

Université de Montréal

**Rôle de l'acétylation du facteur de transcription
IRF3**

par

Tasheen Wissanji

Département de Pharmacie

Faculté de Pharmacie

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

Août 2011

© Tasheen Wissanji, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Rôle de l'acétylation du facteur de transcription IRF3

Présenté par :
Tasheen Wissanji

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lévesque, président-rapporteur

Dr. Marc Servant, directeur de recherche

Dr. Yan Burelle, membre du jury

Résumé

L'immunité innée est notre premier mécanisme de défense contre l'invasion des pathogènes. Cette défense est basée sur la reconnaissance d'éléments invariables des pathogènes par des récepteurs encodés dans les lignées germinales. Dans la réponse anti-virale, le facteur de transcription *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) joue un rôle clé dans la réponse interféron de type I, combattant ainsi la réplication virale et conférant un état anti-viral aux cellules infectées ainsi qu'aux cellules avoisinantes. IRF3 est une protéine dont l'activation et la phosphorylation sont régulées par les kinases TBK1 et IKKi. Nous proposons ici que l'acétylation est une modification post-traductionnelle importante dans la régulation de l'activité d'IRF3. Nous avons observé par immunobuvardage qu'IRF3 est acétylé de façon basale et que cette acétylation est induite par la présence du co-facteur CBP et est inhibée par la présence de la kinase TBK1. Par spectrométrie de masse, nous avons ensuite identifié huit lysines sujettes à l'acétylation sur IRF3. Aussi, par mutagenèse dirigée, nous avons muté de façon ponctuelle chacun de ces sites et avons déterminé que la mutation de la lysine 87 inhibe la capacité d'IRF3 à s'attacher à l'ADN en EMSA et à transactiver son élément de réponse en essai luciférase. Aussi, nous proposons que l'acétylation masque la charge positive de la lysine 87 et contrôle de façon négative l'activité du facteur de transcription IRF3. Notre groupe démontre ainsi pour la première fois l'acétylation du facteur de transcription dans un modèle cellulaire et propose que ce processus joue un rôle inhibiteur dans la régulation de la protéine.

Mots-clés: Réponse anti-virale, Interféron de type I, IRF3, Modification post-traductionnelle, Acétylation

Abstract

Innate immunity is our first line of defense against invading pathogens. This process is based on the recognition of invariable molecular patterns present on different pathogens by germ-line encoded receptors. In the innate immune response against invading viruses, the transcription factor Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) plays a major role in the regulation of type I interferons, priming the defense of infected and surrounding cells against viral infection. The phosphorylation and activation of IRF3 is regulated by the kinases TBK1 and IKKi. Here we suggest that acetylation is also an important post-translational modification in the regulation of this transcription factor. We have observed by immunoblot analysis a basal acetylation of IRF3, which is increased in the presence of its co-factor CBP and inhibited in the presence of its kinase TBK1. Also, we have identified on IRF3 eight different lysine residues subjected to acetylation using mass spectrometry and we have mutated these sites using site-directed mutagenesis. We found that the K87R mutation inhibits IRF3-DNA binding in EMSA and leads to the transactivation of its promoter in luciferase assays. We also suggest that by masking the positive charge of the lysine 87 residue, acetylation negatively controls the activity of IRF3. Our group thus demonstrates for the first time the acetylation of IRF3 in a cellular model and suggests that this modification plays a role in the inhibition of the IRF3 transcription factor.

Keywords: Anti-viral response, Type I interferon, IRF3, Post-translational modification, Acetylation

Liste des figures

Figure 1 : Différents sites de phosphorylation identifiés sur le facteur de transcription IRF3 ainsi que différentes kinases potentiellement impliquées dans sa régulation

Figure 2 : Activation d'IRF3 par différents PRR

Figure 3 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription IRF3

Figure 4: IRF3 est acétylé de façon basale et cette acétylation est modulable par différents facteurs.

Figure 5 : Identification par spectrométrie de masse des lysines acétylées sur IRF3

Figure 6: La mutation de la lysine 87 affecte la capacité à transactiver son promoteur.

Figure 7: La capacité d'IRF3 à dimériser est à s'attacher à CBP n'est pas altérée chez les différents mutants.

Figure 8 : La mutation en K87R inhibe la capacité d'IRF3 à s'attacher à l'ADN.

Figure 9 Alignement de séquence dans la famille des IRF.

Figure 10 : Acétylation des mutants ponctuels d'IRF3.

Figure 11: Acétylation d'IRF3 dans le cytoplasme et le noyau.

Figure 12: Modèle proposé

Liste des tableaux

Tableau I : Amorces utilisées pour la génération des mutants

Liste des abréviations

| | |
|----------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| CARD | Caspase Recruitment Domain |
| Cardif | CARD adaptor inducing IFN- β |
| CBP | CREB binding protein |
| DAC | Déacétylation |
| DAI | DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors |
| EMCV | Encephalomyocarditis |
| GSK3 β | Glycogen synthase kinase 3 |
| HAT | Histone Acetyltransferase |
| HCV | virus de l'Hépatite V |
| HDAC | Histones Deacetylase |
| HDACi | HDAC inhibitor |
| IAD | IRF association domain |
| IFN | Interférons |
| IFNR | IFN receptor |
| IKK | I κ B kinase (IKK) |
| IL-1R | Interleukin-1 receptor, |
| IPS-1 | Interferon-beta promoter stimulator 1 |
| IRAK4 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 |
| IRF | IFN-Regulatory Factors |
| ISG | Interferon-Stimulated Genes |
| ISGF3 | IFN-Stimulated Gene Factor |
| JEV | Japanease Encephalitis Virus |
| JNK | c-Jun-NH ₂ -terminal kinase |
| K | Lysines |
| LGP2 | Laboratory of Genetics and Physiology |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRR | Leucine-Rich Repeat |
| MAVS | Mitochondrial Antiviral Signaling |
| MD2 | Myeloid Differentiation Factor 2 |
| MDA5 | Melanoma Differentiation-Associated Gene |
| MyD88 | Myeloid Differentiation Factor 88 |
| MCMV | Mouse Cytomegalovirus |
| NDV | New Caslte Disease Virus |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NK | Natural Killer |

| | |
|-----------|--|
| iNOS | Nitric oxide synthases |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| poly I :C | Polyinosinic-cytidylic |
| PRR | Pattern Recognition Receptor |
| RIG-I | Retinoic acid Inducible Gene |
| RLR | RIG-1-like receptors |
| dsRNA | double stranded RNA |
| ssRNA | single-stranded RNA |
| snRNP | Small Nuclear Ribonucleoproteins |
| RSV | Respiratory Syncytial Virus |
| SeV | Sendai Virus |
| SILAC | Stable-Isotope Labeling by Amino Acid in Cell Culture |
| SLE | Lupus érythémateux disséminé |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| STING | Stimulator of interferon genes |
| TBK1 | TANK-binding kinase 1/TIR (Toll-interleukin 1 receptor) |
| TIRAP | TIR Domain-Containing Adapter Protein |
| TLR | Toll-like receptors , |
| TM | Transmembranaire |
| TRAF | Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factor |
| TRAM | TRIF-Related Adapter Molecule |
| TRIF | TIR-Domain-Containing Adapter Inducing Interferon -beta |
| VAK | Virus-Activated Kinase |
| VISA | Virus-induced signaling adaptor |
| VSV | Vesicular Somatitis Virus |
| WNV | West Nile Virus |
| ZBP1 | Z-DNA-binding protein 1 |

*We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.*

T.S. Eliot

Remerciements

Merci à mon directeur Marc Servant de m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son équipe. Ce fut pour moi une expérience unique et enrichissante et je le remercie du fond du cœur pour sa confiance qui m'a permis de développer ainsi mon autonomie.

Merci également à Daniel Lévesque d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire, ainsi que pour tous les encouragements.

Merci tout particulièrement à ma famille pour leur amour inconditionnel, leur support et leur patience. Merci de m'avoir appris l'effort, la résilience et la passion du travail bien fait. Merci d'exiger toujours plus que peu et merci de m'avoir gardé toujours un peu enfant.

Merci à mes fidèles amies Noémie et Suzie pour leur support et leur coup de pied au cul, pour tous nos secrets, nos connivences, pour partager les petites défaites et les grandes victoires, pour la compagnie dans le silence et le tapage, pour toute la bouffe, pour les bars, pour les voyages et pour autant d'amour depuis autant d'années.

Merci à mes fabuleux compagnons dans le crime, Monique, Priscilla, Myriam, Simon-Pierre et Jean-François. Merci d'avoir si patiemment enseigné à mes mains maladroites l'art de la science. Merci pour toutes nos discussions animées. Merci par-dessus tout pour tous les bons moments, les mauvaises blagues, les querelles ridicules, la musique à tue-tête, les soirées arrosées, les soirées encore plus arrosées, les confidences et pour tous les hauts et les bas de notre étrange vie commune.

Merci enfin à tous ceux qui ont su égayer mon séjour à la faculté par leur bonne humeur, leur jovialité devant une pinte de bière et par-dessus tout, leur *nerditude* et leur *geekness* assumés avec tant d'humour. Votre enthousiasme pour la science a été formidablement contagieux. Merci à Jean-Philippe, Étienne, Gabrielle, Fady, Paul, Anne, Jérôme, David, Souha, Nicolas, Julie-Émilie, Avril, Kashif et Florence. Un merci particulier à François pour la merveilleuse complicité et pour l'amitié sincère et sans jugement.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Liste des figures..... | iii |
| Liste des tableaux..... | iv |
| Liste des abréviations..... | v |
| Dédicace..... | vii |
| Remerciements..... | viii |
| Chapitre I: Introduction..... | 1 |
| 1. La réponse anti-virale..... | 2 |
| 1.1 La réponse interféron de type I..... | 3 |
| 1.1.1 La famille de TLR..... | 4 |
| 1.1.1.1 Découverte..... | 4 |
| 1.1.1.2 Structure..... | 5 |
| 1.1.1.3 TLR3..... | 6 |
| 1.1.1.4 TLR4..... | 6 |
| 1.1.1.5 TLR7, TLR8 et TLR9..... | 7 |
| 1.1.2 La famille de RLR..... | 8 |
| 1.1.3 Les senseurs cytosolique d'ADN..... | 11 |
| 1.2 La famille des IRF..... | 12 |
| 1.2.1 Fonction..... | 13 |
| 1.2.1.1 IRF1..... | 13 |
| 1.2.1.2 IRF2..... | 14 |
| 1.2.1.3 IRF4..... | 14 |
| 1.2.1.4 IRF5..... | 14 |
| 1.2.1.5 IRF6..... | 15 |
| 1.2.1.6 IRF8..... | 15 |
| 1.2.1.7 IRF9..... | 15 |
| 1.2.1.8 IRF3 et IRF7..... | 16 |
| 1.2.2 Régulation du facteur de transcription IRF3..... | 17 |
| 1.2.2.1 Phosphorylation..... | 17 |
| 1.2.2.2 Ubiquitination..... | 19 |
| 1.2.2.3 Acétylation..... | 20 |
| 2. Acétylation..... | 22 |
| 2.1 L'acétylome..... | 23 |
| 2.2 HDAC et HAT..... | 24 |
| 2.3 L'acétylation et l'immunité anti-virale..... | 26 |
| 2.3.1 La famille des STAT..... | 26 |
| 2.3.2 NF- κ B..... | 27 |
| 2.3.3 La famille des IRF..... | 28 |
| Chapitre II: Hypothèse et Objectifs..... | 30 |
| Chapitre III: Matériel et Méthode..... | 31 |
| Chapitre IV: Résultats..... | 36 |
| Chapitre V: Discussion..... | 46 |
| Perspectives..... | 48 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Élaboration d'un modèle | 53 |
| Chapitre VI: Bibliographie | 57 |

Chapitre I: Introduction

L'intégrité de tous les organismes peut être menacée par l'invasion de microbes pathogènes. Aussi, les détriments causés par les infections des organismes ont mené à l'évolution d'une variété de mécanismes visant à défendre l'hôte. Cette défense nommée immunité est divisée chez les vertébrés en deux branches intimement reliées: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les deux branches de l'immunité se distinguent notamment par le type de récepteurs utilisés pour reconnaître les pathogènes. L'immunité innée, représentant la première ligne de défense contre les pathogènes, reconnaît des éléments invariants des pathogènes à l'aide de récepteurs encodés dans les lignées germinales, d'où la nature innée de cette protection. L'immunité adaptative, quant à elle, utilise des récepteurs spécifiques aux antigènes qui résultent de la recombinaison somatique de segments de gènes, générant par un processus aléatoire une très grande spécificité des récepteurs pour leur antigène. Cette branche adaptative de l'immunité dépend de l'exposition de l'hôte à différents pathogènes et est également pourvue de la particularité de créer une mémoire immunologique chez l'hôte (Medzhitov, 2007; Schenten & Medzhitov, 2011).

L'initiation de la défense de l'hôte débute par la reconnaissance de structures invariantes, essentielles et uniques aux pathogènes, soit les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) par les récepteurs de l'immunité innée encodés dans les lignées germinales, les PRR (*Pattern Recognition Receptor*) (Janeway et al, 2001). Le but de cette reconnaissance est de signaler la présence de microbes, de résorber l'infection ou de la contenir jusqu'à l'activation de la réponse adaptative. Cette première réponse initie différentes cascades cellulaires et induit des gènes spécifiques tels les cytokines pro-inflammatoires et les interférons de type I (Yoneyama & Fujita, 2010). Ces étapes sont essentielles et nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative qui entraînera d'une manière beaucoup plus spécifique la reconnaissance du pathogène. L'interdépendance des

processus innés et adaptatifs est un élément crucial et toujours méconnu du monde immunitaire. En effet, l'immunité innée fut classiquement vue comme une version primitive de l'immunité adaptative et son implication dans de nombreuses pathologies fut longtemps ignorée. Toutefois, notre compréhension de ces mécanismes a des impacts majeurs non seulement dans notre conception générale de l'immunologie, mais également dans le traitement et la prévention de nombreuses pathologies.

L'importance centrale de l'immunité innée est reflétée par les pathologies entraînées par sa dérégulation. Effectivement, des dérégulations de l'immunité innée ont été associés à l'obésité et à la résistance à l'insuline (Arkan et al, 2005; De Nardo & Latz, 2011; Shi et al, 2006), à l'oncogenèse (Clement et al, 2008b; Lin et al, 2001; Savitsky et al, 2010), au choc septique (Chong & Sriskandan, 2011; Kelly-Scumpia et al, 2011) et à de nombreuses maladies auto-immunitaires dont l'arthrite rhumatoïde (Palmlblad et al, 2007), le diabète de type 1 (Han et al, 2008), la sclérodémie (Dieude et al, 2010) et la sclérose en plaque (Vosslander et al, 2011). Dans ces pathologies, une réponse incontrôlée des processus de l'immunité innée entraîne un milieu inflammatoire inapproprié et une réponse cellulaire dérégulée. En somme, l'implication des processus immunitaires innés dans ces pathologies reflète la nécessité d'une stricte régulation de ces mécanismes de défense. Au cours des dernières années, une compréhension plus approfondie de l'immunité innée dans ces processus tant physiologiques que pathologiques nous a mené à repenser le rôle de cette branche d'abord perçue comme primitive, maintenant comprise comme essentielle à la défense des organismes, représentant une cible pharmaceutique envisageable et intéressante.

1. La réponse anti-virale

Les virus sont une forme de pathogène importante et le système immunitaire inné a développé des senseurs spécifiques à la détection d'acides nucléiques exogènes.

En effet, les acides nucléiques viraux se distinguent des acides nucléiques endogènes par leur structure, par certaines modifications post-traductionnelles et par leur présence dans des compartiments cellulaires où les acides nucléiques endogènes ne se retrouvent pas (Medzhitov, 2007). Les acides nucléiques représentent donc des PAMP que l'hôte reconnaît à l'aide de PRR spécifiques pour monter une défense anti-virale par la production d'interféron de type I. Ces récepteurs ont été classés en trois grandes familles: les *Toll-like receptors* (TLR), les *Retinoic acid Inducible Gene (RIG-I)-like receptors* (RLR) et les senseurs cytoplasmiques d'ADN (Yoneyama & Fujita, 2010).

1.1 La réponse interféron de type I

Les interférons (IFN) sont des molécules solubles découvertes il y a plus de 50 ans, sécrétées par la majorité des types cellulaires et capables d'interférer avec la réplication des virus (Isaacs & Lindenmann, 1957). Il existe différents sous-type d'interféron de type I: les interféron- alpha (α) (composé de 13 gènes chez l'humain et 14 chez la souris), - beta (β), -omega (ω), - tau (τ), -kappa (κ), - epsilon (ϵ), -lambda (λ) et -zeta (ξ) et un seul type d'interféron de type II: l'interféron gamma (γ) (Chen et al, 2004). La réponse interféron de type I est principalement soutenue par les IFN- α et IFN- β . Ces protéines se lient directement aux cellules infectées de façon paracrine et autocrine par l'intermédiaire de récepteurs IFNR1 et IFNR2 (Uze et al, 2007) et initie la transcription d'*Interferon-Stimulated Genes* (ISG) par l'activation du complexe *IFN-Stimulated Gene Factor 3* (ISGF3), un hétérotrimère composé des facteurs de transcription STAT1, STAT2 et IRF-9 (Honda et al, 2006).

La régulation transcriptionnelle du gène de IFN- β requiert l'activation des facteurs de transcription IRF3, ATF-2/c-Jun et NF-kB. Ces derniers forment un complexe protéique nommé *enhanceosome* (Maniatis, 1986). La production IFN- α est quand à elle régulée par les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Genin et al, 2009). La production d'interféron de type I et d'ISG induit l'état

anti-viral dans les cellules infectées et les cellules saines en inhibant la réplication virale, en induisant l'apoptose des cellules infectées, en augmentant la capacité lytique des cellules *Natural Killer* (NK), en augmentant l'expression des MCH de classe I et en activant différents éléments de la réponse immunitaire adaptative (Kumar et al, 2011)

La famille des interférons de type III fut récemment découverte.

On retrouve dans cette famille IFN- λ 1, IFN- λ 2, et IFN- λ 3, aussi nommés IL-29, IL-28A et IL-28B respectivement (Donnelly & Kotenko, 2011). Ces molécules n'interagissent pas avec les récepteurs interférons classiquement connus, mais plutôt avec un récepteur contenant une chaîne IFN- λ R1, aussi retrouvée dans les récepteurs de IL-10, IL-22 et IL-26. Tout comme la famille des interférons de type I et II, la famille des interférons de type III activent des voies de signalisation JAK/STAT (Lasfar et al, 2011).

1.1.1 La famille de TLR

1.1.1.1 Découverte

Le premier membre découvert de la famille des Toll, nommé *Drosophila* Toll, fut un récepteur transmembranaire originalement identifié pour la formation de l'axe dorso-ventral chez l'embryon de la mouche (Hashimoto et al, 1988). Des similitudes ont été noté entre le récepteur Toll et le récepteur de l'interleukin 1 (IL-1R), dont la présence d'un domaine homologue dit TIR (*Toll-interleukin 1 receptor*) sur les deux récepteurs et le fait que les deux récepteurs pouvaient induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Anderson, 2000; Engstrom et al, 1993). Bien qu'aucune fonction au niveau du développement n'a été attribuée à la famille des TLR chez les mammifères, la découverte de leur rôle en immunité a été cruciale dans notre compréhension de la réponse cellulaire anti-

virale et dans les mécanismes d'évasion face aux pathogènes (Janeway & Medzhitov, 2002). Actuellement, 13 membres de la famille des TLR ont été identifiés, les TLR1-9 étant commun à l'homme et à la souris, le TLR10 étant unique à l'homme et les TLR 11-13 étant unique à la souris (Takeda et al, 2003). La reconnaissance de structures uniques aux bactéries et aux champignons est effectuée par les membres de cette famille pouvant être recruté au phagosome, les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6, tandis que les TLR détectant les acides aminés viraux (TLR 3, TLR7, TLR8 et TLR9) sont situés à l'endosome (Severa & Fitzgerald, 2007).

1.1.1.2 Structure

Les TLR sont des protéines transmembranaires. Leur domaine extracellulaire contient une structure riche en répétition de leucine (LRR, *Leucine-Rich Repeat*) impliquée dans la reconnaissance des ligands. Le domaine intracellulaire contient quant à lui une structure commune aux membres de la famille des TLR et de la famille des récepteurs IL-1 (IL-1R), soit un domaine TIR, essentiel à l'induction de cascades de signalisation (Severa & Fitzgerald, 2007). Le recrutement de différentes molécules adaptatrices au domaine TIR confère une spécificité de signalisation à chaque membre de la famille des TLR. Ces adaptateurs incluent le *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88) (Muzio et al, 1997), *TIR Domain-Containing Adapter Protein* (TIRAP) (Horng et al, 2001), *TIR-Domain-Containing Adapter Inducing Interferon -beta* (TRIF) (Yamamoto et al, 2002), le *TRIF-Related Adapter Molecule* (TRAM) (Fitzgerald et al, 2003b) ainsi que le régulateur négatif SARM (Carty et al, 2006). Le recrutement de ces molécules adaptatrices suite à une liaison du TLR à son ligand induit une activation de voies signalétiques menant à l'activation de facteurs de transcription dont NF- κ B et la famille des *IFN-Regulatory Factors* (IRF) et à l'induction subséquente d'une réponse interféron de type I. Nous discuterons ici plus en détail de quelques membres de la famille des TLR impliqués dans ces voies.

1.1.1.3 TLR3

TLR3 est un récepteur endosomal reconnaissant l'ARN à double brin (dsRNA), un intermédiaire de réplication viral généré par plusieurs types de virus dans les cellules infectées. Ce récepteur est retrouvé principalement dans les cellules dendritiques conventionnelles et les macrophages ainsi que sur certains fibroblastes (Yoneyama & Fujita, 2009). Son rôle a été démontré dans la réponse à plusieurs virus dont le *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) (Rudd et al, 2005) et le *Mouse Cytomegalovirus* (MCMV) (Tabeta et al, 2004). TLR3 et TLR4 sont les seuls membres de la famille des TLR recrutant la molécule adaptatrice TRIF qui induit l'activation de cytokines pro-inflammatoires, mais par-dessus tout, induit la réponse interféron de type I, particulièrement l'induction d'IFN-beta (Takeda & Akira, 2005) par l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B. En effet, suite à la reconnaissance de dsRNA par TLR3, la voie TRIF-dépendante stimule la production d'interféron de type I par le recrutement de TRAF3 et des kinases TBK1 et d'IKKi, ce qui mène la phosphorylation et à l'activation du facteur de transcription IRF3. Via l'intermédiaire TRAF6, la voie TRIF-dépendante peut également stimuler l'activation de NF- κ B. Enfin, par l'entremise de RIP1, TLR3 peut également activer la voie NF- κ B (Meylan et al, 2004). Toutefois, lors de l'infection par certains virus, TLR3 peut être nuisible à l'hôte, comme lors d'une infection au *West Nile Virus* (WNV) où les souris déficientes en TLR3 survivent mieux à une dose létale de virus que les souris de type sauvage (Wang et al, 2004), ou lors d'une infection à l'influenza A où les souris déficientes en TLR3 présentent une fréquence diminuée de pneumonie (Le Goffic et al, 2006).

1.1.1.4 TLR4

TLR4 reconnaît la lipopolysaccharide (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries Gram-négative, à l'aide de ses co-récepteurs CD-14 et *Myeloid Differentiation Factor 2* (MD2). TLR4 a également la capacité de lier des protéines exprimées sur les enveloppes virales (Takeuchi & Akira, 2010).

Tout comme, TLR3, TLR4 utilise la voie TRIF-dépendante pour activer production d'interféron de type I suite à la liaison de son ligand. Toutefois, TLR4 requiert un adaptateur additionnel pour le recrutement de TRIF, soit l'adaptateur TRAM (Bin et al, 2003). Le récepteur TLR4 recrute également l'adaptateur MyD88 par l'entremise de la molécule TIRAP (Hornig et al, 2001). En plus d'activer la voie IRF3 et NF- κ B de façon TRIF-dépendante, TLR4 active la voie NF- κ B par le recrutement de la kinase IRAK1 à MyD88, suivit de l'autophosphorylation d'IRAK1 et de sa phosphorylation par IRAK4 (Li et al, 2002). Cet évènement mène à la dissociation d'IRAK1 de MyD88 et à l'interaction avec TRAF6, une E3 ligase activant la kinase TAK1 (Chen, 2005). TAK1 active quand à lui le complexe IKK qui phosphoryle les inhibiteurs d'NF- κ B, I κ B, les identifiant ainsi pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. NF- κ B transloque ensuite au noyau où il régule l'activation de plusieurs gènes pro-inflammatoires (O'Neill, 2002).

1.1.1.5 TLR7, TLR8 et TLR9

TLR7 et 8 sont des récepteurs situés à l'endosome possédant une grande homologie et dont l'implication dans la voie des interférons de type I a d'abord été démontré à l'aide d'agents immunomodulateurs de faible poids moléculaire, l'imidazoquinoline, imiquimod et le resiquimod (Hemmi et al, 2002). Ces agents ont également été employés dans des souris déficientes en TLR7 pour déterminer que contrairement au TLR8 humain, le récepteur TLR8 murin n'est pas fonctionnel (Jurk et al, 2002). Le ligand physiologique de ces deux récepteurs, ARN à simple brin (ssRNA) riche en guanosine et en uridine (GU), est capable de stimuler la production d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires via le TLR7 et TLR8 (Heil et al, 2004). Aussi, la reconnaissance de virus par le TLR7, tel le ssRNA dérivé du virus d'Influenza (Diebold et al, 2004) et le *Vesicular Somatitis Virus* (VSV) (Lund et al, 2004) a ensuite été déterminée.

L'ADN à doubles brins d'origine bactérienne ou virale est reconnue par les TLR9. Plus particulièrement, l'oligodeoxynucleotides (ODN) contenant des motifs CpG non méthylés, une particularité de l'ADN bactérien et non de celui des vertébrés, est le premier ligand caractérisé du TLR9 (Hemmi et al, 2000). Ces motifs sont également retrouvés dans le génome viral tel que chez le virus de l'Herpes Simplex. TLR9 est situé à l'endosome et requiert une voie endosomale intacte pour la reconnaissance d'ADN à doubles brins (Ahmad-Nejad et al, 2002).

Les récepteurs TLR7 et TLR9 ne sont pas exprimés dans tous les types cellulaires. On les retrouve principalement dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, des cellules ayant la capacité de produire une réponse interféron de type I plus potente que tout autre type cellulaire (Fitzgerald-Bocarsly et al, 1988). Ces cellules sont dépourvues des TLR2, TLR3, TLR4 et TLR5, n'exprimant que les TLR 7 et TLR9 (Jarrossay et al, 2001). L'activation de ces deux récepteurs mène à des voies de signalisation fort semblables. En effet, TLR7 et TLR9 recrutent MyD88 à leur domaine TIR (Hemmi et al, 2003) et, contrairement à la majorité des types cellulaires, expriment de façon constitutive le facteur de transcription IRF7, ce qui leur permet de sécréter une grande quantité d'IFN- α en absence d'une boucle d'IFN rétroactive (Barchet et al, 2002). Enfin, ces deux récepteurs ont été associés aux maladies auto-immunitaires. En effet, plusieurs liens ont été établis entre la production massive d'interféron de type I et le lupus érythémateux disséminé (SLE) (Ronblom & Alm, 2001; Vallin et al, 1999). Aussi, dans les complexes immunologiques typiques du SLE se retrouvent des *Small Nuclear Ribonucleoproteins* (snRNP) capable d'activer TLR7 sous certaines conditions (Savarese et al, 2006). L'ADN contenu dans ces complexes immunologiques est également capable de stimuler TLR9 sous certaines conditions (Means et al, 2005).

1.1.2 La famille de RLR

Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I a originalement été identifié comme l'un des gènes induit par l'acid rétinoïque-*all-trans* dans les cellules leucémiques (Liu et al, 2000). Par la suite, il a été démontré que RIG-I était induit par des agonistes pro-inflammatoires tel le LPS et l'IFN- γ (Cui et al, 2004; Imaizumi et al, 2002). Enfin, RIG-I a été démontré comme un senseur intracellulaire d'ARN viral à doubles brins (Yoneyama et al, 2004). Ces découvertes ont mené à l'identification subséquente de deux molécules intimement liées à RIG-I, *Melanoma Differentiation-Associated Gene* (MDA)-5 et *Laboratory of Genetics and Physiology* (LGP)-2. Ces molécules sont collectivement catégorisées comme des *RIG-like receptors* (RLR).

RLR est une famille de récepteurs cytoplasmiques capable d'induire une réponse interféron de type I. De façon générale, ces senseurs reconnaissent l'ARN des cellules infectées par un virus à ARN. RIG-I et MDA5 contiennent un domaine moléculaire CARD (*Caspase Recruitment Domain*) en N-terminale, essentiel à l'activation de cascades cellulaires (Satoh et al, 2010). Comme LGP2 ne possède pas de domaine CARD, il fut considéré comme un inhibiteur de la signalisation dépendante de RIG-I et de MDA5. Toutefois, de récentes études génétiques suggèrent plutôt un rôle positif de LGP2 dans l'activation de ces voies (Satoh et al, 2010). Les trois membres de cette famille possèdent un domaine ARN hélicase DExD/H-box nécessaire à la reconnaissance du ligand, contenant également un domaine d'activité ATPase. Le récepteur RIG-I possède en plus un domaine répresseur (RD) en C-terminal, requis pour la signalisation RIG-I-dépendante (Kumar et al, 2011).

La détermination spécifique des ligands de RIG-I et de MDA5 a longtemps été un sujet de débat. Au niveau physiologique, il existe une spécificité entre ces deux récepteurs pour différents virus. RIG-I reconnaît principalement des membres de la famille des *Paramyxoviridae* virus tel que le *New Castle Disease Virus* (NDV), le *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) et le *Sendai Virus* (SeV) (Kato et al, 2005),

des membres de la famille *Flaviviridae* tel que le *Japanese Encephalitis Virus* (JEV) et le virus de l'Hépatite V (HCV), ainsi que des membres des familles *Orthomyxoviridae* et *Rhabdoviridae* (Hornung et al, 2006). MDA5 reconnaît quant à lui des membres de la famille des *Picornaviridae* tel que le virus de la Polio et le virus de l'encephalomyocarditis (EMCV) (Kumar et al, 2011). Également, certains virus dont le virus du dengue et le *West Nile Virus* ont besoin des deux récepteurs pour la génération d'une réponse interféron (Fredericksen et al, 2008; Loo et al, 2008).

Il a été stipulé que l'ARN à simple brin (ssRNA) tri-phosphorylé en 5' (5'-ppp) était l'élément essentiel de la reconnaissance par RIG-I (Hornung et al, 2006; Pichlmair et al, 2006). Toutefois, il a été récemment démontré qu'une structure secondaire d'ARN à double brin (dsRNA) est générée durant la synthèse enzymatique de l'ARN et que cette structure secondaire sert de ligand à RIG-I (Schlee et al, 2009; Schmidt et al, 2009). Aussi, le 5'-ppp dsRNA semble avoir une plus grande affinité pour RIG-I que le 5'-ppp ssRNA (Wang et al, 2010), bien que d'autres groupes suggèrent que le dsRNA est reconnu par RIG-I qu'il soit tri-phosphorylé ou monophosphorylé (Kato et al, 2008; Takahashi et al, 2009). Enfin, l'ARN synthétique à doubles brins induisant une réponse interféron de type I, l'acide polyinosinic-cytidylic (poly I:C), dont la reconnaissance a d'abord été attribuée à MDA5 (Kato et al, 2006) a ensuite été démontré comme reconnu par RIG-I lorsque l'ARN à doubles brins était de petite taille (Kato et al, 2008), suggérant que la longueur de l'ARN à doubles brins peut être un élément déterminant la spécificité entre les récepteurs RIG-I et MDA5.

En 2005, une molécule liée à RIG-I fut identifiée de façon indépendante par quatre groupes, et désignée IPS-1 (Kawai et al, 2005), MAVS (Seth et al, 2005), VISA (Xu et al, 2005), et Cardif (Meylan et al, 2005) (ici référé par l'appellation MAVS). MAVS est une molécule constituée d'un domaine CARD en N-terminale, d'une région riche en proline près du N-terminale et d'une région transmembranaire (TM) en C-terminale. La région TM permet à MAVS de se

localiser sur la membrane externe de la mitochondrie, servant ainsi de plateforme de signalisation (Seth et al, 2005). Suite à la reconnaissance d'un virus, RIG-I change de conformation et expose son domaine CARD, permettant l'interaction avec le domaine CARD de MAVS (Cui et al, 2008) et induisant la production d'interféron- β (Kawai et al, 2005; Meylan et al, 2005; Seth et al, 2005; Xu et al, 2005). MAVS semble interagir avec plusieurs membres de la famille des *Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factor* (TRAF). En effet, TRAF2 et TRAF6 ont été identifiés comme des interacteurs de MAVS dans un *yeast two-hybrid system* (Xu et al, 2005). Aussi, les cellules MEF TRAF2^{-/-} ont une capacité diminuée de produire IFN- β de façon RIG-I dépendante (Mikkelsen et al, 2009). TRAF3 a également été caractérisé comme une molécule cruciale dans la voie TLR-dépendante et indépendante (Oganesyanyan et al, 2006) et récemment, l'implication de TRAF5 a été démontrée dans la voie MAVS-dépendante (Tang & Wang, 2010). Aussi, il est proposé que l'ubiquitination de TRAF3 et de TRAF5 mène au recrutement de NEMO/TANK/TBK1, résultant en l'activation d'IRF3, tandis que l'ubiquitination de TRAF5 seul permette le recrutement de NEMO/IKK α /IKK β et résulte par l'activation de NK- κ B (Tang & Wang, 2010).

1.1.3 Les senseurs cytosolique d'ADN

DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*), aussi appelé ZBP1 (*Z-DNA-binding protein 1*), a été le premier récepteur cytosolique identifié pouvant lier l'ADN viral et induisant une réponse interféron- β (Takaoka et al, 2007). Ces effets semblent toutefois spécifiques et certains types cellulaires, puisque l'atténuation de l'expression de DAI par siARN entraînait peu d'effet sur la réponse cellulaire face à l'ADN exogène (Lippmann et al, 2008). Ces résultats ont donc entraîné la recherche d'autres récepteurs cytosoliques de l'ADN viral. Lors de ces efforts, la protéine adaptatrice STING, aussi connue sous le nom de MITA, a été découverte comme un joueur important, mais non un récepteur, dans la réponse interféron de type 1 en réponse à l'ADN et à la réponse dépendante des RLR (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong et al, 2008). La famille des protéines *IFN-*

inducible p200 inclue des molécules tel que AIM2, MNDA et IFI16. Ces protéines contiennent un domaine HIN-200 de 200 acides aminés situé en C-terminal, permettant l'interaction de cette famille avec l'ADN à double brins. Plusieurs fonctions ont été associées à la famille des p200, dont la résistance à l'infection virale, l'induction de l'inflammasome, ainsi que la régulation de l'apoptose (Veeranki & Choubey, 2011). Enfin, une association nouvelle a été détectée dans les cellules HEK293T, impliquant RIG-I et MAVS. Dans ces cellules, l'ajout de poly(dA-dT), analogue synthétique d'ADN à doubles brins, induit une réponse IFN- β dépendante de RIG-I et de MAVS, ainsi que de l'ARN polymérase III (Ablasser et al, 2009; Chiu et al, 2009). En effet, l'activation des voies interféron- β requiert la transcription du poly(dA-dT) par l'ARN polymérase III en ARN pouvant être reconnu par RIG-I. Aussi, l'inhibition de Pol III bloque la capacité d'induire la réponse interféron par Epstein-Barr Virus, l'adénovirus et le virus Herpes simplex (Ablasser et al, 2009; Cheng et al, 2007; Chiu et al, 2009).

Ainsi, la détection de virus par l'intermédiaire de différents récepteurs permet l'initiation d'une réponse immunitaire nécessaire à la défense de l'hôte contre une invasion virale. Cette réponse nécessite la production de molécules tels les interférons de types I et les ISG. La régulation de ces gènes se fait par l'intermédiaire de différents facteurs de transcription. Un facteur clé dans la réponse anti-virale est le facteur de transcription IRF3, impliqué dans l'induction de nombreux gènes tel l'IFN- α 4, IFN- β , CXCL10 et ISG56. Nous nous pencherons ici sur la famille des IRF, une famille de facteurs de transcription impliquée dans les voies immunitaires innées et plus particulièrement sur le facteur de transcription IRF3, élément crucial de la réponse anti-virale.

1.2 La famille des IRF

Les IRF sont une famille de facteurs de transcriptions constitués de 9 membres (IRF1-9) chez l'homme et la souris, dont le premier membre, IRF1 a été découvert il y a plus de 20 ans (Fujita et al, 1988; Mamane et al, 1999; Miyamoto et al, 1988). Chaque membre comprend un domaine d'attachement à l'ADN (DBD) situé en N-terminale, conservé à travers la famille et possédant cinq répétitions de tryptophanes, ressemblant au facteur de transcription Myb (Veals et al, 1992). Le DBD reconnaît des séquences d'ADN correspondant à l'*IFN-Stimulated Response Element*, le ISRE. Une analyse cristallographique de la structure du DBD d'IRF2 a déterminé que la région consensus de reconnaissance des IRF à l'ADN est le 5'-AANNGAAA-3' (Fujii et al, 1999). À l'exception des IRF1 et 2, les membres de la famille des IRF possèdent, en C-terminale, un domaine d'association aux IRF (IAD), conférant la capacité d'homodimériser et d'hétérodimériser avec les différents membres de la famille (Mamane et al, 1999). Ce domaine possède une homologie de structure avec le domaine Mad-homology 2 (MH2) de la famille des Smad qui sert également à médier les interactions entre protéines (Takahasi et al, 2003). La famille des IRF est impliquée dans de nombreux rôles cellulaires, mais est particulièrement reconnue pour son implication dans les voies d'immunité innée, quoique de nouveaux rôles au niveau du développement des cellules immunitaires (IRF1, IRF2, IRF4, IRF8), ainsi qu'au niveau oncogénique (IRF1, IRF3, IRF5, IRF8) ont été reconnus (Tamura et al, 2008). Nous discuterons ici principalement du rôle immunitaire des membres de la famille des IRF.

1.2.1 Fonction

1.2.1.1 IRF1

Il a été démontré qu'IRF1 est induit par IFN- γ , un interféron de type II. Aussi, IRF1 interagit directement avec MyD88 et suite à l'activation de TLR9, migre au noyau. De ce fait, les cellules dendritiques conventionnelles et les macrophages

déficients en IRF1 ont une production diminuée d'IFN- β , de iNOS et de IL12p35 en réponse au l'interféron- γ combiné au CpG (Negishi et al, 2006).

1.2.1.2 IRF2

IRF2 est retrouvé de façon constitutive dans plusieurs types cellulaire et son expression est également inductible par la réponse interféron. Son rôle est principalement inhibiteur et il agit en antagonisant IRF1 (Harada et al, 1989). Cependant, il collabore parfois avec IRF1 pour activer la transcription de IL-12p40 (Salkowski et al, 1999) et Cox-2 (Blanco et al, 2000).

1.2.1.3 IRF4

IRF4 est exprimé dans les cellules immunitaires et est capable de former un complexe avec MyD88, bien que ce facteur de transcription soit principalement situé au noyau (Negishi et al, 2005). Aussi, les souris IRF4 $-/-$ sont très sensibles au choc endotoxique induit par CpG-B (Mittrucker et al, 1997). L'ARN messager d'IRF4 est induit suite à l'activation des TLR et, puisque IRF4 et IRF5 s'attachent à MyD88 par la même région, IRF4 peut entrer en compétition avec IRF5, suggérant un rôle inhibiteur d'IRF4

1.2.1.4 IRF5

IRF5 possède la capacité d'interagir avec MyD88 et TRAF6 (Takaoka et al, 2005). Suite à l'activation de TLR9, IRF5 transloque au noyau et s'attache au promoteur *Il12b*. Aussi, les macrophages IRF5 $-/-$ ont une capacité diminuée de produire des cytokines pro-inflammatoires tel IL-12, TNF- α et IL-6, quoique la régulation directe par d'IRF5 de ces promoteurs soit toujours un sujet de débat (Takaoka et al, 2005). Également, IRF5 a été impliqué dans la voie RIG-I-dépendante puisque les souris IRF5 $-/-$ sont hautement vulnérable à une infection

au VSV. Cet effet de IRF5 dépend toutefois du type cellulaire, possiblement puisque IRF5 est exprimé de façon préférentielle dans les cellules hématopoïétiques. Aussi, les macrophages des souris IRF5 $-/-$ produisent une quantité réduite de cytokines pro-inflammatoires tel IL-6 (Yanai et al, 2007).

1.2.1.5 IRF6

IRF6 est exprimé de façon constitutive dans la peau et son rôle dans la réponse immunitaire demeure inconnu. Ce facteur de transcription est toutefois requis pour la différenciation des kératinocytes et les souris IRF6 $-/-$ présentent des anomalies au niveau de la peau, des membres et du développement cranio-facial (Ingraham et al, 2006; Richardson et al, 2006).

1.2.1.6 IRF8

IRF8 est exprimé dans les cellules immunitaires et possède une certaine homologie avec IRF4. Il est postulé qu'IRF8 agit dans la voie TLR9, puisque des cellules dendritiques IRF8 $-/-$ ne produisent pas de TNF- α et d'IL-6 en réponse au CpG. Ces mêmes cellules n'activent pas NF- κ B et les MAPK suite à une stimulation de TLR9 (Tsujimura et al, 2004). Il est à noter que IRF8 ne se lie pas à MyD88, mais interagit avec TRAF6 (Zhao et al, 2006). IRF8 est également requis pour l'expression de IL-12p40 dans les macrophages et les cellules dendritiques (Masumi et al, 2002) et pour l'induction d'interféron de type 1 dans les cellules dendritiques (Tailor et al, 2007).

1.2.1.7 IRF9

IRF9 fait parti du complexe *Interferon-Stimulated Gene Factor* (ISGF3), un hétérotrimère composé de STAT1, STAT2 et IRF-9. ISGF3 est activé en réponse aux interférons de types I par les récepteurs IFNR1 et IFNR2 et l'hétérotrimère

transloque au noyau et interagit avec des éléments de réponse ISRE. Bien que STAT1 et IRF9 coopèrent au contact de l'élément de réponse ISRE, le DBD d'IRF9 est responsable de l'attachement à l'ADN du complexe ISGF3 (Tang et al, 2007).

1.2.1.8 IRF3 et IRF7

Comme discuté précédemment, IRF3 et IRF7 sont des facteurs de transcription clé dans la réponse anti-virale par les voies TLR-dépendantes et indépendantes, contrôlant la production d'interféron de type I. Également, IRF3 et IRF7 sont les deux membres de la famille des IRF à posséder la plus grande homologie (Tamura et al, 2008). Il a été stipulé qu'un modèle en deux étapes est en jeu lors de la réponse interféron de type I, où IRF3 est responsable de l'induction de IFN- β dans la réponse initiale et IRF7, dont l'ARN messager est induit par IFN- β , est responsable de l'induction IFN- α lors de la réponse tardive (Levy, 1998; Sato et al, 2000; Taniguchi & Takaoka, 2002). Toutefois, des études effectuées sur des MEF IRF7^{-/-} ont révélé que la phase initiale et la phase tardive étaient abolies lors d'une infection au VSV et EMCV (Honda et al, 2005). Aussi, la formation d'hétérodimère entre IRF3 et IRF7 est présumée cruciale pour la phase initiale, suivit d'une induction d'IRF7 durant la phase tardive.

Récemment, le rôle d'IRF3 a été démontré dans l'apoptose. À l'aide de son domaine BH3 nouvellement identifié, IRF3 interagit avec la protéine pro-apoptotique Bax et transloque à la mitochondrie où il active la voie apoptotique mitochondriale par la libération de cytochrome C dans le cytosol et l'activation subséquente de caspase 9. L'activation de l'apoptose requiert la présence de RIG-I, MAVS, TRAF3 et TBK1, mais contrairement à la réponse anti-virale, la réponse pro-apoptotique d'IRF3 ne nécessite pas son activité transcriptionnelle et implique les protéines TRAF2 et TRAF6. Aussi, l'activation de cette voie a été

démontrée suite à l'infection au SeV, au VSV et à EMCV (Chattopadhyay et al, 2010; Chattopadhyay & Sen, 2011; Chattopadhyay et al, 2011).

1.2.2 Régulation du facteur de transcription IRF3

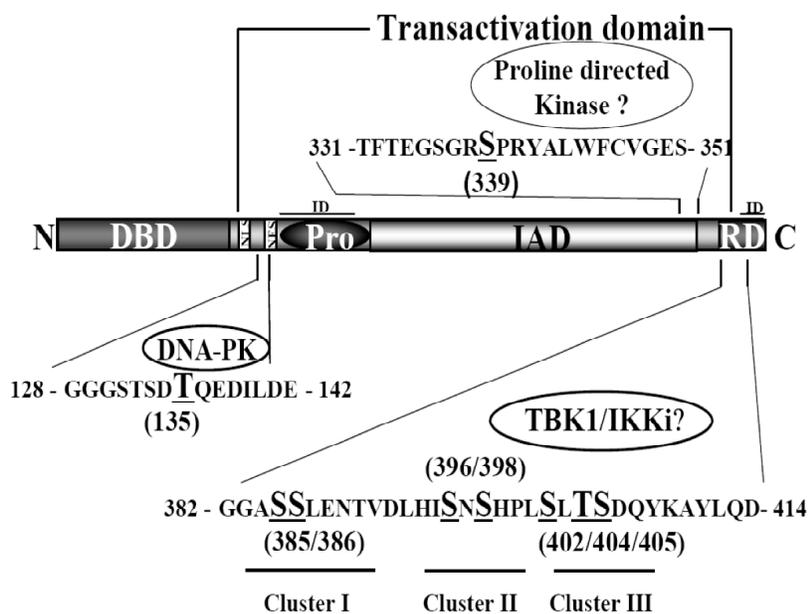
IFN Regulatory Factor 3 (IRF3) a été identifié comme le troisième membre de la famille des IRF en 1995 (Au et al, 1995). IRF3 est une protéine de 55 kDa constituée de 427 acides aminés et composée des domaines suivants : un DBD en N-terminale, un domaine riche en proline (PR), un domaine IAD et un domaine de transactivation en C-terminale (Lin et al, 1999). Ce facteur de transcription est exprimé de façon latente, dans une conformation fermée, dans le cytoplasme de tous les types cellulaires. Suite à une infection virale, tel que par le Sendai Virus, IRF3 est phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine dans sa région C-terminale ce qui provoque un changement de la conformation de la protéine, libérant son domaine IAD, permettant à IRF3 de dimériser et de transloquer au noyau où il interagit avec son co-activateur CBP/p300 et stimule la transcription de gènes cibles (Lin et al, 1999) tel IFN- β , IFN- α 4, ISG56 et CXCL10. Pour mettre fin à l'activation d'IRF3, il est proposé que le facteur de transcription soit ubiquitiné et dégradé par le protéasome (Tsuchida et al, 2009). Nous discuterons ici des modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation du facteur de transcription IRF3.

1.2.2.1 Phosphorylation

Suite à la découverte d'IRF3, la recherche d'une VAK (*Virus-Activated Kinase*) pouvant phosphoryler le facteur de transcription en C-terminale s'amorça. Une interaction entre la partie C-terminale d'IRF3 et la kinase IKK α une composante du complexe IKK régulant l'activation de NK- κ B (Karin & Ben-Neriah, 2000), fut détectée dans un *two-hybrid screen* et en 2003, *TANK-binding kinase 1* (TBK1) et IKKi (aussi nommée IKK ϵ), deux kinases homologue à la kinase I κ B, ont été

identifiées comme les kinase phosphorylant IRF3 en C-terminale (Fitzgerald et al, 2003a; Sharma et al, 2003). La kinase *c-Jun-NH₂-terminal kinase* (JNK) également été associé à la régulation d'IRF3 par la phosphorylation de la sérine 173 (Zhang et al, 2009). Les kinases AKT et GSK3 β ont été associé à la régulation d'IRF3 en interagissant avec la kinase TBK1 (Joung et al, 2010; Lei et al, 2010).

Les sites phosphorylés en C-terminale ont été découverts par la création de différents mutants ponctuels (Lin et al, 1998; Yoneyama et al, 1998) et ont depuis été confirmés par spectrométrie de masse (Bergstroem et al, 2010; Clement et al, 2008a; Fujii et al, 2010; Takahasi et al, 2010). Jusqu'à présent, la phosphorylation en C-terminale, des Ser339, Ser385, Ser386, Ser 390, Ser396, Ser398, Ser402, Thr404, et Ser405 a été établie (Bergstroem et al, 2010; Clement et al, 2008a; Lin et al, 1998; Yoneyama et al, 1998). Le site d'activation minimal d'IRF3, la séquence de phosphorylation, ainsi que le rôle de la phosphorylation de chacun de ces sites demeure un sujet de débat et de controverse (Bergstroem et al, 2010; Chen et al, 2008; Mori et al, 2004; Panne et al, 2007; Servant et al, 2003; Takahasi et al, 2010).



(Clement et al, 2008a)

Figure 1 *Différents sites de phosphorylation identifiés sur le facteur de transcription IRF3 ainsi que différentes kinases potentiellement impliquées dans sa régulation.*

1.2.2.2 Ubiquitination

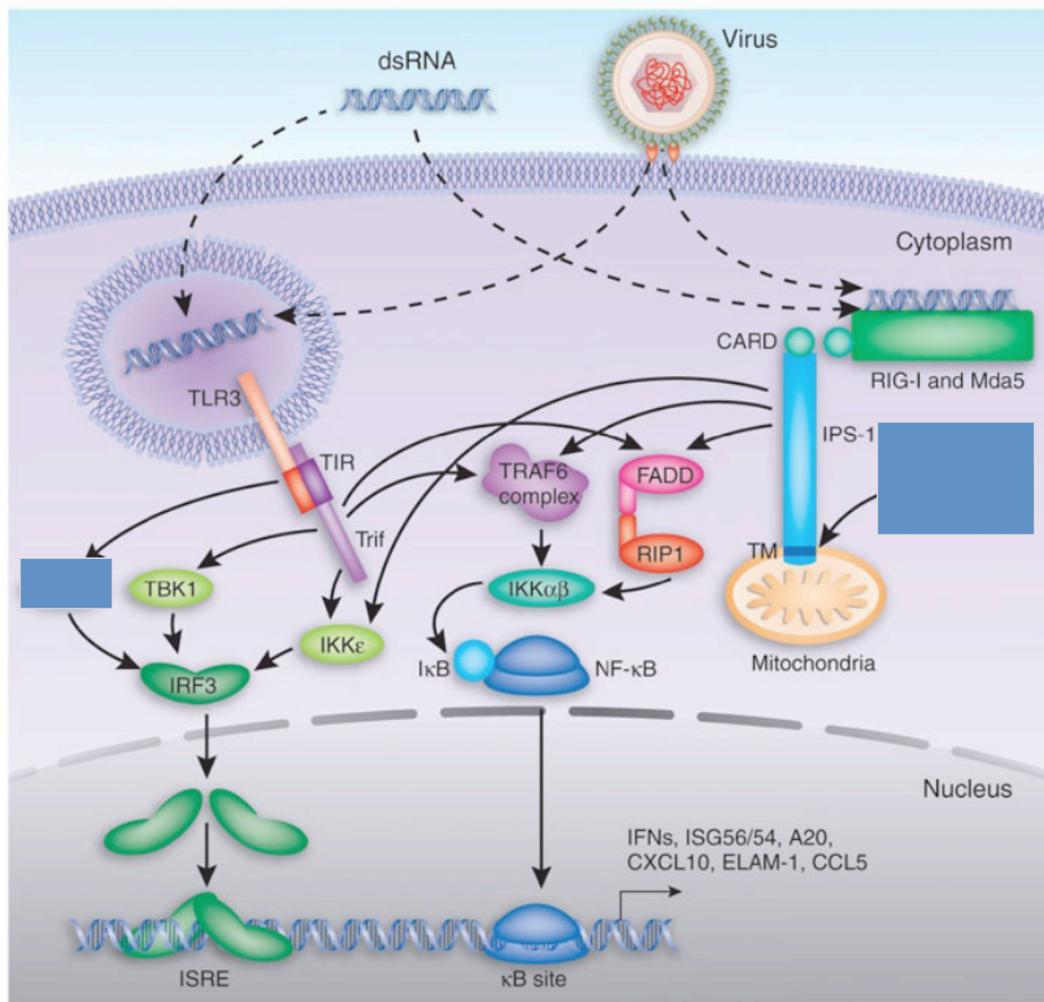
La dégradation par la voie ubiquitine-protéasome joue un rôle important dans la régulation de plusieurs protéines. Les protéines destinées à la dégradation sont marquées par une chaîne de polyubiquitine dans une cascade impliquant trois étapes : l'activation de l'ubiquitine, catalysée par une molécule E1, le transfert de l'ubiquitine, catalysé par une molécule E2 et la liaison d'une ubiquitine, catalysée par une molécule E3 (Bibeau-Poirier et al, 2006). La molécule d'ubiquitine contient elle-même sept résidus de lysines, toutes capables de soutenir la formation de chaînes d'ubiquitines. La formation de chaînes de poly-ubiquitine en Lysine-48 sur une protéine donnée cible cette dernière à la dégradation via le protéasome tandis que la formation de chaîne sur la Lysine 63 est quant à elle liée à la signalisation cellulaire et la réparation de l'ADN (Kerscher et al, 2006).

Il est proposé que le facteur de transcription IRF3 soit dégradé par le protéasome suite à son activation afin d'empêcher une production soutenue interféron de type I qui serait néfaste à l'hôte. Cette hypothèse est renforcée par l'observation qu'un inhibiteur du protéasome, MG-132, empêche la dégradation d'IRF3 (Lin et al, 1998). En 2006, notre groupe de recherche a proposé que la phosphorylation en C-terminale par les kinases TBK1 et IKKi crée un signal qui mène à la reconnaissance d'IRF3 par une ubiquitine ligase *Cullin-based*, induisant la polyubiquitination d'IRF3 et sa dégradation subséquente (Bibeau-Poirier et al, 2006). Par la suite, plusieurs protéines ont été associées à l'inhibition d'IRF3 via sa dégradation. Pin1 est une peptidyl-prolyl isomerase qui interagit avec IRF3 lorsque ce dernier est phosphorylé et favorise sa polyubiquitination. Aussi, la réduction de l'expression de Pin1 par ARN interférence ou par son ablation par

délétion génétique a pour conséquence d'augmenter la réponse IFN- β (Saitoh et al, 2006). Il a également été suggéré que la dégradation d'IRF3 implique Ro52 (TRIM21), une E3 ligase liant IRF3 par son domaine SPRY. Aussi, lorsque l'expression de Ro52 est abolie par shARN, la production d'IRF- β est augmentée en réponse au poly(I :C) (Higgs et al, 2008). RBCK1, une autre E3 ligase qui interagit avec IRF3, régule de façon négative la réponse interféron- β . De plus, l'expression de cette E3 ligase est induite suite à une infection au Sendai Virus (Zhang et al, 2008). Enfin, RAUL, une *HECT-domain* E3 ligase a été démontrée comme catalysant l'ubiquitination et la dégradation d'IRF3 et d'IRF7. Cette molécule est également activée lors d'un mécanisme d'évasion viral utilisé par le virus de l'herpès Kaposi-Sarcoma pour diminuer la réponse interféron de type I (Yu & Hayward, 2010).

1.2.2.3 Acétylation

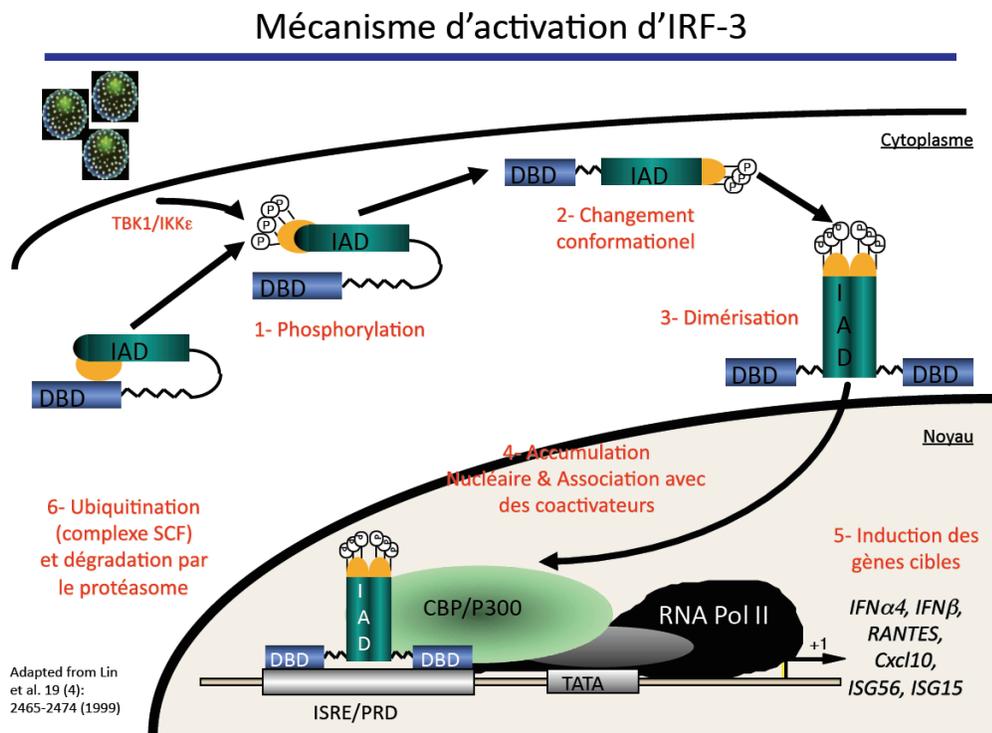
L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui, tout comme l'ubiquitination, prend place sur des résidus de lysines (K). Peu d'information traite actuellement de l'état d'acétylation du facteur de transcription IRF3. Toutefois, trois études indépendantes (Caillaud et al, 2002; Nusinzon & Horvath, 2006; Suhara et al, 2002) nous ont portés à investiguer ce sujet (voir Discussion). Aussi, nous introduirons l'acétylation comme modification post-traductionnelle, ainsi que les joueurs clé dans sa régulation et décrirons par la suite les connaissances actuelles liant l'acétylation à la régulation de la réponse anti-virale.



Modifié de (Sen & Sarkar, 2005)

Figure 2 : Activation d'IRF3 par différents PRR

La reconnaissance d'ARN à doubles brins par TLR3, RIG-I et MDA-5 mènent à l'activation de cascades cellulaire et ultimement, à l'activation du facteur de transcription IRF3



Modifié de (Lin et al, 1999)

Figure 3 : Mécanisme d'activation du facteur de transcription IRF3

IRF3 est retrouvé de façon latente, dans une conformation fermée, en l'absence de stimulation. Suite à une infection virale, les kinases TBK1 et IKK ϵ phosphorylent IRF3 dans la partie C-terminale, ce qui mène à un changement de conformation d'IRF3, lui permettant de dimériser. Le dimère transloque au noyau où il se lie à son co-facteur CBP et induit ces gènes cibles. Par la suite, IRF3 ubiquitiné et dégradé par le protéasome.

2. Acétylation

L'acétylation des lysines (K) est une ancienne modification post-traductionnelle conservée des procaryotes à l'humain (Choudhary et al, 2009) qui neutralise la charge positive de cet acide aminé et qui, par conséquence, change la fonction de

la protéine de nombreuses façons (Kouzarides, 2000). Cette modification est catalysée par des molécules nommées *Histone Acetyltransferase* (HAT) et renversée par les *Histones Deacetylase* (HDAC). Certaines lysines acétylées peuvent être reconnues par des protéines contenant un bromodomaine, présent par exemple dans les larges complexes protéiques modulant l'architecture de la chromatine (Choudhary et al, 2009). L'acétylation est une modification post-traductionnelle principalement caractérisée pour son rôle sur les histones où son implication a été démontrée dans des processus tel l'expression génique, le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, ainsi que dans la réparation de l'ADN (Smith & Workman, 2009). Principalement, l'hyperacétylation des histones permet l'ouverture de la structure chromatinienne et est liée à la transcription de gènes (Durrin et al, 1991). L'acétylation des histones s'inscrit dans le cadre de l'épigénétique, un terme assigné dans les années 1940 et qui décrivait à l'origine la régulation du développement par les gènes. Cette définition a aujourd'hui évolué pour décrire les changements héréditaires transmis en l'absence de changement à la séquence à l'ADN, décrivant de façon élégante que nous représentons plus que l'ensemble de nos gènes (Lee & Workman, 2007).

2.1 L'acétylome

En 2006, le premier recensement des protéines acétylées a révélé la présence de plus de 195 protéines acétylées, dont un étonnant 20% provenait de protéines mitochondriales (Kim et al, 2006). En 2009, Choudhary et al. ont augmenté de plus de 6 fois le nombre connu de protéines acétylées, identifiant 3600 sites d'acétylation sur plus de 1750 protéines humaines en utilisant la technologie SILAC (*Stable-Isotope Labeling by Amino Acid in Cell Culture*) couplée à la spectrométrie de masse par LTQ Orbitrap, séquençant et quantifiant l'acétylome humain et proposant que l'acétylation est un processus cellulaire presque aussi fréquent que la phosphorylation (Choudhary et al, 2009; Smith & Workman, 2009). Ce travail colossal révèle que l'acétylation ne se limite pas aux processus

nucléaires et a été détectée sur près de 400 protéines cytoplasmiques et 200 protéines mitochondriales. Les résultats suggèrent également une interaction entre la phosphorylation et l'acétylation, puisque de nombreuses protéines régulant la signalisation par les kinases étaient acétylées. Aussi, un rôle de l'acétylation dans la stabilité des protéines est suggéré puisque 46 protéines régulant l'ubiquitination et la déubiquitination étaient acétylées. Sommes toutes, Choudhary et al. ont identifiées des protéines acétylées jouant des rôles dans différents processus fonctionnels tel le cycle cellulaire, les hélicases d'ADN et d'ARN, les protéines kinases, les facteurs de transcription et bien sûr, les histones (Choudhary et al, 2009; Smith & Workman, 2009).

2.2 HDAC et HAT

Les HDAC peuvent être regroupées en deux familles distinctes. La famille classique est dépendantes du Zn^{2+} et est structurellement homologue aux protéines Hda1/Rpd3 chez la levure (de Ruijter et al, 2003), tandis que la deuxième famille dépend du NAD^+ et possède une homologie avec la protéine Sir2 chez la levure (Haigis & Guarente, 2006). Les HDAC sont également divisés selon leur conservation phylogénique, la classe I, II et IV représentant la famille classique et la classe III, la famille des sirtuins. La classe I est homologue à Rpd3 et est composée des membres HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8. La classe II est homologue de Hda1 et peut être subdivisé en IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9) et IIb (HDAC6 et HDAC10). La classe III est homologue de Sir2 et représente les membres SIRT1 à 7. Enfin, la classe IV est constituée du dernier membre des HDAC identifié, partageant une égale homologie à Rpd3 et Hda1 et nommé HDAC11 (Spange et al, 2009).

Les HDAC de classe I sont constitués de 320 à 500 acides aminés et sont exprimés de façon ubiquitaire. Outre leur domaine déacétylation (DAC), ils contiennent un domaine C-terminale sujet aux modifications post-traductionnelles sont la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Spange et al, 2009).

Les HDAC de classe II sont des molécules de 1000 acides aminés. La classe IIa possède un domaine catalytique Hda-1 en C-terminale et plusieurs domaines régulatoires en N-terminale. La classe IIb possède un domaine catalytique en N-terminale (Yang & Seto, 2008). La classe I des HDAC se situe presque exclusivement au noyau, tandis que la classe II peut se situer au cytoplasme et au noyau selon les signaux cellulaires, bien que HDAC6 soit situé principalement au cytoplasme (de Ruijter et al, 2003).

La découverte des inhibiteurs de HDAC (HDACi) a précédé la découverte même des HDAC. Le sodium de butyrate a été le premier composé identifié pouvant augmenter l'acétylation des histones (Riggs et al, 1977). Plus tard, la Trichostatin A (TSA), un antibiotique fongique (Yoshida et al, 1990), l'acide valproïque (VPA), employé dans le traitement de l'épilepsie (Gottlicher et al, 2001), ainsi que de nombreuses autres molécules ont été identifiées comme des HDACi. Les HDACi sont actuellement des molécules prometteuses dans la lutte contre le cancer. Une recherche ardente a en effet démontré que *in vivo*, les HDACi réduisaient l'invasion des tumeurs, l'angiogénèse et les métastases (Bolden et al, 2006). Toutefois, cibler les HDAC n'affecte pas que la structure de la chromatine, mais l'ensemble de l'acétylome et par conséquent, de nombreuses fonctions cellulaires. Enfin, la nécessité de HDACi spécifiques à certaines classes de HDAC est également une question de débat (Karagiannis & El-Osta, 2007).

Contrairement aux HDAC, la classification des HAT est moins évidente, les HAT étant plus diversifiés en structure et en fonction. Ils se regroupent de façon générale en deux classes, les types A et B. Les HAT A sont principalement impliqués dans l'acétylation liée à la transcription. Cette famille est subdivisée en 5 catégories : GNAT, MYST, p300/CBP, facteurs de transcription généraux et cofacteurs de récepteur nucléaire (Roth et al, 2001). Les HAT de type B sont cytoplasmiques et acétylent les histones nouvellement produites. Parmi les HAT les plus étudiés se trouvent CBP et p300, contenant tous deux un bromodomaine et sont trouvés majoritairement dans le même complexe. La famille des GCN5

contient quant à elle GCN5 et PCAF (*p300/CBP associated factor*). Il existe également des HAT qui ne se situent dans aucune des familles mentionnées, vu leur pauvre homologie de séquence. Aussi, chez le mammifère, il existe plus de 30 HAT ayant des substrats distincts tant histones que non-histone (Spange et al, 2009).

Peu d'attention est actuellement porté sur les inhibiteurs de HAT (HATi). Des peptides synthétiques tel Lys-CoA pour p300 et H3-CoA-20 pour PCAF démontrent un certain potentiel mais ne pénètrent pas la cellule (Lau et al, 2000). D'autres composé tel l'acide anacardique et le garcinol sont des inhibiteurs non-spécifiques de p300/CBP et PCAF (Balasubramanyam et al, 2004). Enfin, le dérivatif de quinoline MC1626 inhibe GCN5 (Smith et al, 2007) et l'isothiazolone inhibe PCAF et p300 (Stimson et al, 2005).

2.3 L'acétylation et l'immunité anti-virale

Lors de dernières années, l'acétylation de nombreux facteurs de transcription a été caractérisée. Aussi, nous nous sommes penchés sur quelques facteurs de transcription importants dans les voies immunitaires innées anti-virales et dont la régulation implique l'acétylation. Ces protéines sont également toutes régulées par d'autres modification post-traductionnelle, notamment la phosphorylation, et bien que notre compréhension du rôle de l'acétylation en est encore à ces débuts, son implication dans la régulation de facteurs de transcription impliqué dans la réponse anti-virale demeure un sujet pertinent et enthousiasmant.

2.3.1 La famille des STAT

La famille des STAT comprend sept membres, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT 6. En réponse aux interférons de type I, à certaines cytokines et facteurs de croissance, la kinase JAK est activée. JAK phosphoryle

STAT qui forme alors un hétérotriplexe nommé ISGF3, composé de STAT1, STAT2 et IRF9, et induit sa translocation au noyau. Aussi, la phosphorylation de la Tyr 701 sur STAT1 et Tyr 690 sur STAT2 ont été démontrées comme importantes dans l'activation d'ISGF3 (Shuai et al, 1993). STAT active des gènes contenant dans leur promoteur un élément de réponse GAS ou ISRE, modulant des fonctions cellulaires tel la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation (Spange et al, 2009). La dephosphorylation de tyrosine inactive STAT de façon directe (Mertens & Darnell, 2007). STAT1 peut être acétylé par CBP dans son DBD sur les Lys410 et 413 (Kramer et al, 2006). Il est suggéré que l'acétylation de STAT1 inhibe ses fonctions puisque la sur-expression de HDAC1, HDAC2 et HDAC3 augmente la transcription de gènes régulés par STAT1 (Klampfer et al, 2004). Aussi, l'acétylation STAT1 sur les lysines K410 et K413 interagit avec p65, une sous unité de NF- κ B, résultant en une perte d'affinité de p65 pour l'ADN et une diminution de l'induction de gènes cibles anti-apoptotiques (Kramer et al, 2006). L'acétylation de STAT2 a été suggérée comme cruciale pour la liaison de l'hétérodimère STAT1/STAT2 au récepteur de IFN α 2 et à IRF9 (Tang et al, 2007), quoique ces données contredisent l'observation que les gènes induits par STAT1/STAT2 sont fortement inhibés par la présence d'inhibiteur des HDAC (Nusinzon & Horvath, 2003).

2.3.2 NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est un joueur central dans la réponse immunitaire dans les processus inflammatoires, ainsi que dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules. La famille NF- κ B/Rel est constituée des sous unités de p50, p52, p65 (RelA), c-Rel et RelB, qui forment des homo- et hétérodimères (Xiao, 2004). L'hétérodimère p50/p65 est la combinaison la plus fréquemment retrouvée chez le mammifère. Le complexe NF- κ B est retenu dans le cytoplasme par la molécule inhibitrice I κ B. L'activation des kinases IKK résulte par la phosphorylation de I κ B, son ubiquitination et sa dégradation

subséquente. NF- κ B transloque alors au noyau et régule l'activité de gènes cibles (Hayden & Ghosh, 2008). Les modifications post-traductionnelles affectent l'activité de NF- κ B et l'acétylation de p65 et de p50 sur différents sites affecte l'activité de NF- κ B de différentes façons. Lorsque phosphorylé, p65 interagit de façon préférentielle avec CBP/p300, résultant en l'acétylation de p65 sur différents résidus. L'acétylation en K221 et K310 est associée à une activité transcriptionnelle augmentée de NF- κ B (Chen & Greene, 2004; Chen et al, 2002). Ce résultat est supporté par l'observation que la déacétylation de K310 par SIRT1 et SIRT2 inhibe la transcription des gènes régulés par NF- κ B (Rothgiesser et al, 2010; Yeung et al, 2004). En contraste, l'acétylation de p65 sur les K314 et K315 n'affecte pas l'attachement de NF- κ B pour l'ADN, mais induit la transcription d'un substrat de gènes particuliers (Buerki et al, 2008). L'acétylation de K122 et K123 réduit l'affinité de p65 pour ADN, augmente l'affinité pour I κ B et augmente l'export nucléaire (Kiernan et al, 2003). Pour la sous unité p50, l'acétylation en K431, K440 et K441 augmente l'affinité de NF- κ B pour l'ADN, augmente l'interaction avec p300 ainsi que l'activité transcriptionnelle (Deng & Wu, 2003; Deng et al, 2003).

2.3.3 La famille des IRF

L'acétylation de certains membres de la famille des IRF a été observée et cette modification post-traductionnelle semble importante dans la modulation de l'activité de ces facteurs de transcription. Aussi, il est intéressant qu'un nombre grandissant d'évidence suggère que le DBD, un domaine conservé dans cette famille, a la capacité d'être acétylé. Aussi, une lysine située dans le DBD et conservée à travers la famille des IRF semble être une cible particulière de l'acétylation.

Il a été démontré que le facteur de transcription IRF2 est acétylé *in vitro* et *in vivo* par p300 et PCAF (Masumi & Ozato, 2001). Par spectrométrie de masse,

l'acétylation des K75 et K78, deux résidus situés dans le DBD, a été déterminée. La mutation de la K75 en arginine (R) affecte l'activation du promoteur histone H4, sans affecter l'attachement à l'ADN, tandis que la mutation de la K78, une lysine conservée dans la famille des IRF, abroge la capacité d'IRF2 à s'attacher à l'ADN. Aussi, IRF2 est acétylé dans les cellules NIH 3T3 en croissance, où il interagit avec son promoteur histone H4 et p300, mais pas dans les cellules arrêtées, suggérant que l'acétylation joue un rôle positif dans la régulation d'IRF2 (Masumi et al, 2003).

L'acétylation d'IRF5 a aussi été démontrée récemment, bien que les résidus acétylés n'ont pas été identifiés. En effet, Feng et al. démontrent qu'une acétylation inductible d'IRF5 suite à une infection au NDV, une surexpression de CBP/p300 ou un traitement à la TSA. Le groupe montre également que la partie N-terminale d'IRF5 interagit avec HDAC1 et que la partie C-terminale interagit avec CBP et p300. Aussi, le groupe suggère une régulation positive de IRF5 par son acétylation (Feng et al, 2010).

Contrairement à IRF2 et IRF5, l'acétylation de IRF7 joue un rôle inhibiteur en diminuant l'affinité d'IRF7 pour l'ADN. Caillaud et al. ont démontré l'acétylation de la K92 sur IRF7, une lysine conservée dans la famille des IRF. Aussi, l'acétylation d'IRF7 est catalysée par les HAT PCAF et GCN5 et non par CBP/p300. Une mutation de la lysine 92 en arginine annihile l'attachement à l'ADN d'IRF7, mais une mutation des résidus entourant cette lysine empêche la reconnaissance de la lysine par les HAT et a pour conséquence de diminuer l'acétylation, créant un mutant s'attachant de façon plus stable à l'ADN et augmentant la capacité d'IRF7 de transactiver ces gènes cibles (Caillaud et al, 2002).

L'acétylation d'IRF9 a été démontré dans le cadre de l'acétylation de la cascade JAK/STAT. L'acétylation de plusieurs lysines dans le DBD a été démontrée par spectrométrie de masse, dont la lysine 81, conservée dans la famille des IRF.

Cette acétylation est catalysée par CBP, mais non par PCAF et GCN5. La mutation de la lysine 81 abolit l'interaction d'IRF9 avec l'ADN et a été déterminée comme cruciale pour la dimérisation d'IRF9 (Tang et al, 2007).

Peu d'information est actuellement connue sur l'acétylation du facteur de transcription IRF3. Suhara et al. ont démontré que CBP/p300 a la capacité d'acétyler IRF3 *in vitro* (Suhara et al, 2002) et Feng et al, dans une expérience contrôlée, ont immunoprécipité un extrait cellulaire total à l'aide d'anticorps anti-lysine acétylée et ont montrés par immunobuvardage la présence de IRF3 (Feng et al, 2010), bien que ce résultat est facilement expliqué par l'immunoprécipitation indirecte d'IRF3 via une protéine acétylée tel que CBP. Enfin, Horvath et Nusinzon ont suggéré que HDAC6 est un joueur important dans l'induction d'IFN- β dépendante d'IRF3 sans toutefois mesurer si IRF3 lui-même était acétylé (Nusinzon & Horvath, 2006). Nous avons par conséquent décidé d'investiguer nous même l'acétylation du facteur de transcription IRF3, ce qui constitue donc le sujet de ce mémoire.

Chapitre II: Hypothèse et Objectifs

Nous posons l'hypothèse que l'acétylation joue un rôle dans la régulation du facteur de transcription IRF3. Cette hypothèse est basée sur l'observation que cette modification post-traductionnelle régule l'activité de certains membres de la famille des IRF, particulièrement IRF7, un proche homologue d'IRF3. L'acétylation dans la famille des IRF semble prendre place principalement dans le DBD de ces facteurs de transcription, une région conservée à travers la famille des IRF. Aussi, l'acétylation d'IRF3 a été observée par un autre groupe *in vitro*, bien que ce mécanisme n'ait pas été caractérisé. Il est également intéressant de noter que ce processus est important dans la régulation de l'interféron-béta, un

gène cible d'IRF3. Nos objectifs sont donc de déterminer si IRF3 est une protéine acétylée dans un modèle cellulaire et de déterminer si cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la régulation du facteur de transcription.

Chapitre III: Matériel et Méthode

Culture cellulaire

Les cellules 293T proviennent d'ATCC (Manassas, VA) et les MEF IRF3^{-/-} proviennent du laboratoire de John Hiscott (Montreal, Université McGill). Ces lignées cellulaires sont maintenues en culture dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*) *high glucose* (Wisent 319-015) contenant 10% de sérum de bovin foetal à 37°C en présence de 5% CO₂.

Virus, Anticorps et Plasmides

Le Sendai Virus provient de Charles River Laboratories (N. Franklin, CT).

L'anticorps anti-Flag (F3165) et l'anti-Flag M2 Affinity gel (A2220) proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). L'anticorps anti-lysines acétylées (#9441) provient de Cell Signaling technology (Danvers, MA). L'anticorps anti-CBP (A-22) (#sc-369) provient de Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA).

Les constructions pCMV2-Flag IRF3 wt, -K39R, --K77R, -K87R, -K98R, -K193R, -K315R, -K366R, -K409R ont été générées par mutagenèse dirigée (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). Les

constructions pGEX-4T-3 IRF3 wt et K77R ont gracieusement été offertes par John Hiscott (Montreal, Université McGill) et le mutant K87R a été généré par mutagenèse dirigée. Les constructions pcDNA3.1 Flag-HDAC1 (13820) et -HDAC6 (13823) proviennent de Addgene.

Mutagenèse dirigée

Les mutants pCMV2-Flag IRF3 -K39R, --K77R, -K87R, -K98R, -K193R, -K315R, -K366R, -K409R et pGEX-4T-3-IRF3 -K87R ont été générées par mutagenèse dirigée. 10 ng de plasmides pCMV2-Flag IRF3-wt ou pGEX-4T-3-IRF3-wt ont été mis en présence de PFU ultra pour 16 cycles, suivant le protocole suivant: 30 secondes 95°C, 1 minute 55°C et 6 minutes 68°C. Ceci fut suivi d'une digestion d'une heure à 37°C par la Dpn1. 5 ul du produit de PCR a été transformé dans des bactéries XL1-blue. Les mutations ont été confirmées par séquençage.

Tableau I : Amorces utilisées pour la génération des mutants

| | |
|----------------------|--|
| IRF3 K39R Sens | CCGCATCCCTTGGAGGCACGGCCTACG |
| IRF3 K39R Anti-Sens | CGTAAGCCGTGCCTCCAAGGGATGCGGAAGCG |
| IRF3 K77R Sens | CCTGCCAACCTGGAGGAGGAATTTCCGC |
| IRF3 K77R Anti-Sens | GGGCAGAGCGGAAATTCCTCCAGGTTGGC |
| IRF3 K87R Sens | GCCCTCAACCGCAGAGAAGGGTTGCGTTTAGC |
| IRF3 K87R Anti-Sens | CGCAACCCTTCTCTGCGGTTGAGGGCAGAGCGG |
| IRF3 K98R Sens | GGACCGGAGCAGGGACCCTCACGACC |
| IRF3 K98R Anti-Sens | CGTGAGGGTCCCTGCTTCGGTCCTTCGC |
| IRF3 K193R Sens | CCCTCTGAGAACCCACTGAGGCGGCTGTTGGTGCCGGGG |
| IRF3 K193R Anti-Sens | CGGCACCAACAGCCGCCTCAGTGGGTTCTCAGAGGGCCCC |
| IRF3 K315R Sens | GGTCCCAAGGACAGGGAAGGAGGCGTG |
| IRF3 K315R Anti-Sens | GGTCAAACACGCCTCCTTCCCTGTCCTTGGGG |
| IRF3 K366R Sens | GGCTCGTGATGGTCAGGGTTGTGCCACG |
| IRF3 K366R Anti-Sens | GGGCACAACCCTGACCATCACGAGCCTCTTGG |
| IRF3 K409R Sens | CCGACCAGTACAGGGCCTACCTGCAGGACTTGG |

IRF3 K409R Anti-Sens

CCTGCAGGTAGGCCCTGTACTGGTCCGAGGTG

Les sites de mutations sont soulignés**Transfection**

Les 293T et les MEFs ont été transfectées par phosphate de calcium ou à la lipofectamine 2000 pour 48 et 24 heures respectivement.

Immunobuvardage et Immunoprécipitation et Gel Natif

Les extraits cellulaires ont été lysés dans un tampon Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 30 mM NaF, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 40 mM B-Glycerophosphate, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml of Leupeptin, Pepstatin, and Aprotinin, 1% Triton X-100). Pour les essais d'acétylation, 400 nM de TSA (Calbiochem 647925) ont été rajoutés au tampon de lyse. Pour l'immunoprécipitation anti-Flag, 1 mg d'extraits cellulaires totaux ont été immunoprécipités sur billes M2 durant 4h à 4°C. Les billes ont été lavées 5 fois dans le tampon de lyse et deux éluions ont été effectuées à l'aide de peptide Flag (Sigma, F3290) pour un temps total d'une heure. La co-immunoprécipitation a été effectuée durant 16h à 4°C avec 750 µg d'extraits cellulaires incubés avec 2 µg d'anticorps anti-CBP A22 pré-couplé à 30 ul de protéine A-Sépharose. Les billes ont été lavées 5 fois à l'aide du tampon de lyse et l'éluion a été faites dans du SDS loading buffer. Les extraits ont été séparés par SDS-PAGE contenant 7.5% d'acrylamide durant 16h à 6 mAMP. Suite à la migration, ces protéines sont transférés sur une membrane de nitrocellulose pendant trois heures à 4°C dans un tampon de transfert avec méthanol (14,4g/L de glycine, 3g/L de TRIS et 20% méthanol). L'analyse a été effectuée par immunobuvardage à l'aide des anticorps appropriés. L'anticorps anti-lysine acétylée a été utilisé pour 16h à 4°C à un ratio de 1:1000 dans une solution de 5% BSA. L'anticorps anti-Flag a été utilisé 1 heure à température ambiante à une concentration de 1 µg /ul dans une solution 5% lait. 20 µg d'extraits cellulaires totaux ont été utilisés pour la séparation sur gel natif (Native -PAGE) contenant 7.5% d'acrylamide. Un *pre-run* de 30 minutes à 40 mAMP a été effectué avec 25 mM Tris et 192 mM de glycine, pH

8.4, avec and sans 1% deoxycholate dans la chambre de cathode et d'anode respectivement. Les extraits ont été préparés dans le tampon natif (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol et bromophenol blue) et séparés pour 60 minutes à 25 mAMP. Les résultats ont été obtenus par immunobuvargade en utilisant l'anticorps anti-Flag.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

20 ng d'oligonucléotide à double brin représentant l'élément ISRE d'ISG15 (5'GATCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCCA-3') ont été mis en présence de 100 uCi de [γ ³²P]ATP (Perkin Elmer) et de 5U de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen) durant 30 minutes à 37°C. La sonde radiomarké a été purifiée par colonne G-25 (Roche). Pour les EMSA, 20 µg d'extraits cellulaires totaux ont été incubés à température ambiante pour 15 minutes dans un tampon contenant 20 mM HEPES pH 7.0, 40 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 4% (vol/vol) Ficoll, 0.08% (vol/vol) Triton X-100, 1 µg of poly(dI)-poly(dC), et environ 0.1 ng de sonde ISG15 radiomarkée au ³²P dans un volume final de 25 ul. 4 ug d'anticorps anti-Flag ont été ajoutés dans certains extraits une heure à 4°C avant l'addition de la sonde radiomarkée. Les réactions ont été séparés par un gel contenant 6% d'acrylamide et 0.2% N,N'- methylenebisacrylamide polyacrylamide dans un tampon 0,25X TBE pour 2h à 200V. Le gel a été séché et exposé pour analyse à l'aide du scanneur Typhoon 9410.

Essais Luciférase

Des cellules MEF IRF3^{-/-} (100 000 cellules par condition) ont été transfectées par lipofectamine 2000 dans une plaque 24 puits par 250 ng de rapporteur ISG54 (*firefly*), 100 ng de pLR-TK (*renilla*) et 25 ng de pCMV2-Flag-IRF3. 24 heures après la transfection, le milieu a été changé pour un volume minimal de milieu contenant ou non 200 HAU/ml de SeV. 24 heures après l'infection, les cellules ont été rincées au PBS froid, puis arrêtées dans l'azote liquide et lysées dans un tampon de lyse passive provenant de Promega (Madison, WI). 5 µl d'extraits

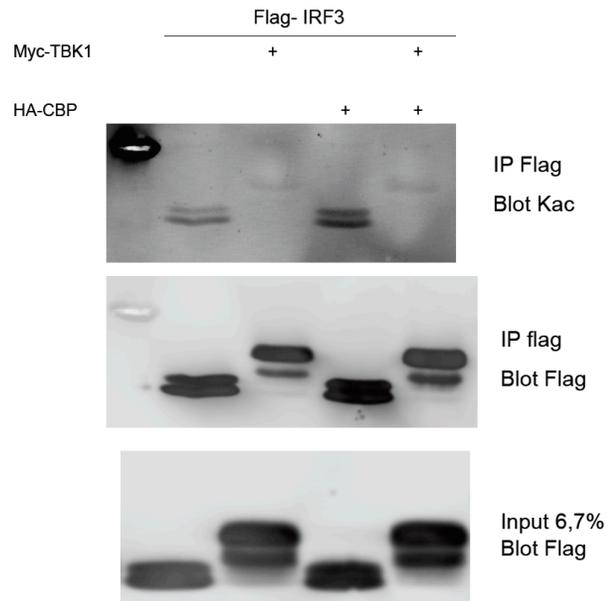
cellulaires ont été utilisés pour l'analyse par le *dual-luciferase activity kit* selon les instructions de la compagnie. Les valeurs obtenues pour la *firefly* luciférase ont été normalisées par celles obtenues pour la *renilla* luciférase afin de contrôler l'efficacité de transfection.

Production de protéines GST-IRF3 recombinantes

PGEX-4T-3-IRF3 (1-133)_{wt}, IRF3 (1-133)K77R and IRF3 K87R (1-133) ont été transformées dans des bactéries *Escherichia coli*, puis, suivant une induction à l'isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (1 mM pour 3 h à 37°C), ont été purifiées à l'aide d'une colonne d'agarose glutathione.

Chapitre IV: Résultats

A)



B)

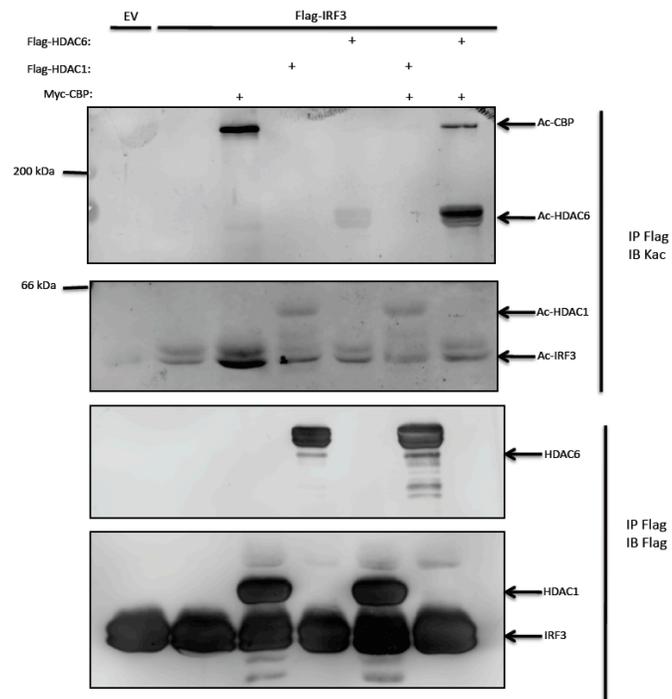
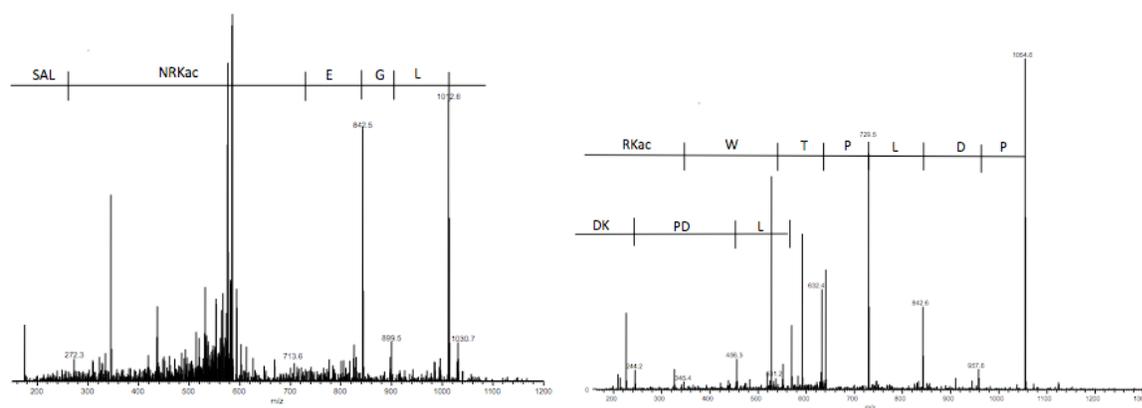


Figure 4: IRF3 est acétylé de façon basale et cette acétylation est modulable par différents facteurs.

Des cellules 293T ont été transfectées par phosphate de calcium avec les constructions indiquées, soit 250 ng de Flag-IRF3, 500 ng de Myc-TBK1, 750 ng de Myc-CBP et 750 ng de Flag-HDAC1/6. 48h post-transfection, les cellules ont été lysées et immunoprécipitées à l'aide de billes M2. L'éluion a été accomplie par une compétition avec un peptide Flag et les éluats ont été séparés sur SDS-PAGE et analysés à l'aide d'un anticorps anti-lysine acétylées (Kac)

On observe d'abord une acétylation basale du facteur de transcription IRF3. L'observation de l'acétylation d'IRF3 par immunobuvardage reflète un faible pourcentage de la quantité totale d'IRF3 immunoprécipitée. L'acétylation est augmentée lorsque IRF3 est en présence de son co-facteur CBP. Cette observation suggère que CBP, qui possède un domaine HAT et par conséquent, une activité acétyltransférase, acétyle le facteur de transcription. L'acétylation d'IRF3 n'est plus observable lorsque le facteur de transcription est en présence de sa kinase TBK1 et on observe que les formes retardées sur gel, formes phosphorylées d'IRF3, ne sont pas acétylées. Cette observation nous suggère que l'acétylation est une modification post-traductionnelle basale et inhibitrice de la protéine IRF3 et est antagonisée par la phosphorylation qui est quant à elle, reconnue pour activer IRF3. En B), on observe que le signal d'acétylation basale est également modulé à la baisse lors de la présence de HDAC1 et 6. Cette observation est importante d'abord d'un point de vue technique puisque, dans le même essai, il est possible d'observer une induction et une diminution de l'acétylation par la présence d'une HAT et de HDAC respectivement. Ce résultat suggère également que les HDAC1 et HDAC6 ont la capacité de déacétyler IRF3, du moins lors de leur expression ectopique.

A)



B)

| Lysine/Conditions | IRF3 | IRF3+CBP | IRF3+TBK1 | IRF3+CBP+TBK1 |
|-------------------|--------------|----------|-----------|---------------|
| 39 | 20% | 33% | 0% | 0% |
| 77 | 40% | 33% | 0% | 25% |
| 87 | 80% | 17% | 50% | 66% |
| 98 | 25% | 0% | 20% | 0% |
| 193 | 60% | 33% | 20% | 0% |
| 315 | À déterminer | 17% | 0% | 0% |
| 366 | 40% | 80% | 40% | 66% |
| 409 | 0% | 33% | 0% | 0% |

Figure 5 : Identification par spectrométrie de masse des lysines acétyles sur IRF3

En A) Des cellules 293T ont été transfectés avec les constructions Flag-IRF3, Flag-IRF3 + Myc-TBK1, Flag-IRF3 + Myc-CBP ou Flag-IRF3 + Myc-TBK1 + Myc-CBP avec ou sans l'inhibiteur de déacétylase TSA (400 nM). Les cellules ont été lysées et 10 mg d'extrait cellulaire total a été immunoprécipité à l'aide de billes M2. Les extraits ont été élués à l'aide de peptide Flag. Les extraits ont été séparés par SDS-PAGE et le gel a été coloré par silver staining. Les bandes principales ont été excisées et analysées par spectrométrie de masse. Les graphiques représentent deux des huit sites d'acétylation détectés. En B) Tableau récapitulatif de six différentes analyses par spectrométrie de masse. Les pourcentages représentent l'acétylation du résidu/la lecture du résidu. Les résultats présentés sont ceux des résidus détectés au moins trois fois par spectrométrie de masse.

L'analyse par spectrométrie de masse a identifiée huit différentes lysines sujette à l'acétylation sur le facteur de transcription IRF3 : K39, K77, K87, K98, K193, K315, K366, K409. L'analyse par spectrométrie de masse révèle que tel qu'observé par immunobuvardage, IRF3 est acétylé de façon basale et cette acétylation est globalement diminuée lors de la présence de TBK1. Cependant, contrairement au résultat d'immunobuvardage, la présence de CBP ne semble pas augmenter de façon significative l'acétylation d'IRF3, à l'exception des résidus en C-terminale (K315, K366, K409).

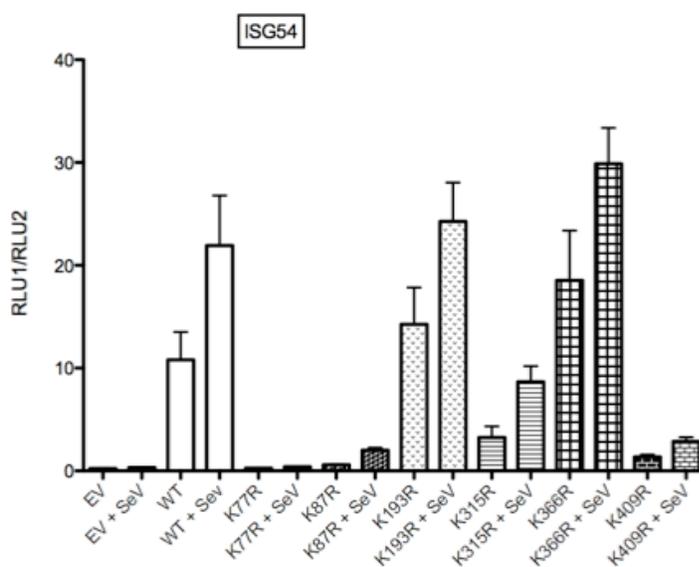


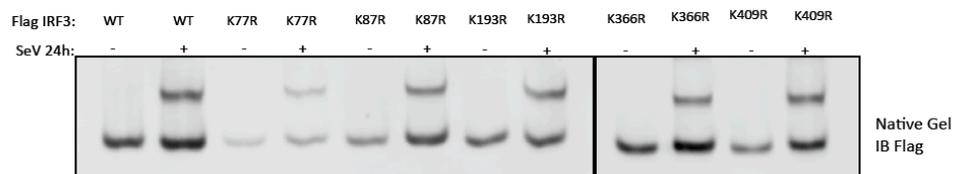
Figure 6: La mutation de la lysine 87 affecte la capacité à transactiver son promoteur.

Des MEF IRF3 -/- ont été transfectées à la lipofectamine 2000 par 250 ng de rapporteur ISG54 et 100 ng de pLR-TK et complétées par 25 ng de Flag-IRF3 de type sauvage (WT) ou muté en K-R à différentes lysines. 16h post transfection, les cellules ont été infectées ou non par 200 HAU/ml de SeV. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon de lyse passif et analysés par essais luciférase. Les résultats représentent les valeurs normalisées par la renilla comme contrôle interne de l'efficacité de transfection.

Nous avons muté les lysines acétylées, identifiées par spectrométrie de masse en arginine, afin de déterminer si l'acétylation de ces résidus joue un rôle sur la

régulation du facteur de transcription IRF3. En reconstituant des MEFs IRF3 $-/-$ à l'aide des différents mutants. L'absence d'IRF3 dans les MEF IRF3 $-/-$ est notable par l'absence de transactivation d'ISG54 lors de la présence de Sendai virus seul. Des effets observables au niveau de la transactivation d'ISG54 sont présents pour différents mutants. D'abord, le mutant K77R ne possède plus d'activité transcriptionnelle. Cette observation est prévisible puisque la lysine 77, conservée dans la famille des IRF et situé en K75 sur IRF1 et K92 sur IRF7 forme un lien direct avec l'ADN, tel qu'identifié par cristallographie sur IRF1 (Escalante et al, 1998), tout comme la K92 sur IRF7, un proche homologue d'IRF3. Aussi, nous ne pouvons pas associer cet effet à l'acétylation sur la lysine puisque que la lysine 77 forme probablement un lien direct avec l'ADN. Également, la modification de la lysine 409 diminue le rapport *firefly/renilla* (RLU1/RLU2), mais seulement en augmentant la valeur *renilla*, ce qui nous porte à conclure que la transactivation du rapporteur ISG54 n'est pas réellement affectée. Finalement la mutation de la lysine 87 en arginine affecte quand à elle la transactivation du rapporteur ISG54. Cette lysine n'est pas conservée dans la famille des IRF, mais est conservée sur la protéine IRF3 à travers les espèces. Nous avons donc investigué à quel niveau la mutation de la lysine 87 affecte l'activité du facteur de transcription IRF3.

A)



B)

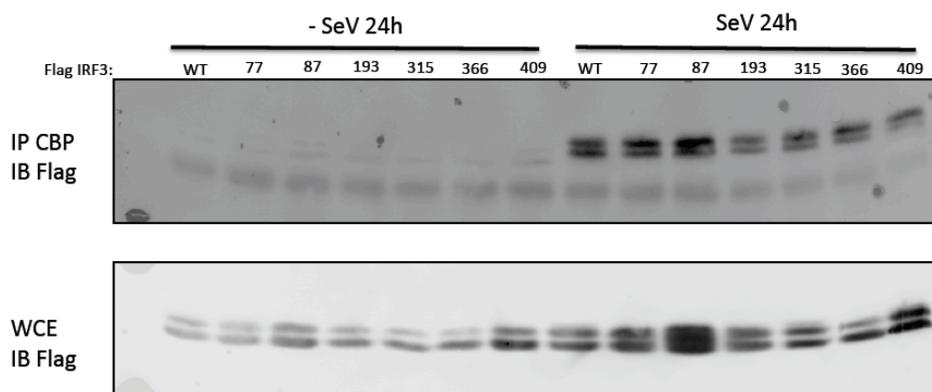
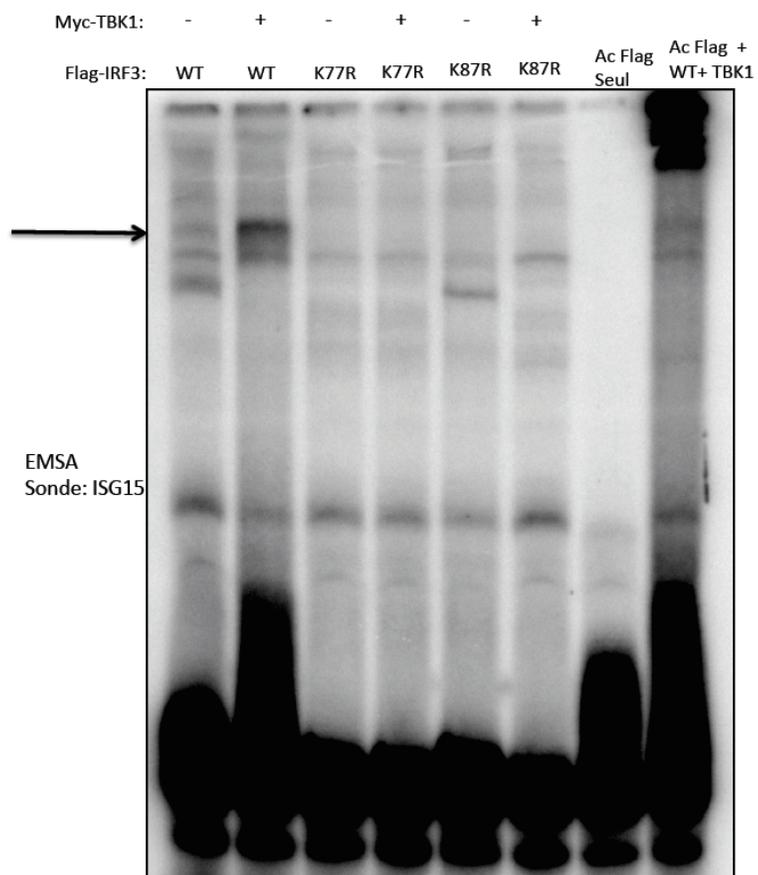


Figure 7: La capacité d'IRF3 à dimériser est à s'attacher à CBP n'est pas altérée chez les différents mutants.

Des cellules 293T ont été transfectées par phosphate de calcium avec les constructions Flag-IRF3 indiquées. 16h post transfection, les cellules ont été mis en présence de SeV (200 HAU/ml) pour une durée de 16h. les cellules ont ensuite été lysées et séparés par gel natif en A) et immunoprécipité avec un anticoprps-anti-CBP en B), puis séparés par SDS-PAGE. Les résultats sont analysés par un anticorps anti-Flag.

Afin de trouver le rôle de l'acétylation des lysines observées en spectrométrie de masse, nous avons détaillés les différentes étapes menant à l'activation d'IRF3. Suite à sa phosphorylation par la kinase TBK1, IRF3 se dimérise. Nous observons en A) par gel natif que la dimérisation des mutants d'IRF3 n'affecte pas la capacité de la protéine à produire un homodimère, observable par la bande supérieure. Nous avons ensuite immunoprécipité les différents mutants d'IRF3 à l'aide d'un anticorps anti-CBP. Ceci nous apporte deux informations. D'abord, CBP étant situé au noyau, sert d'ancre nucléaire à IRF3 qui, possédant un NLS et un NES, se déplace entre le cytoplasme et le noyau de façon basale . Seules les formes activées d'IRF3, soit les extrait mis en présence de SeV, s'attachent à CBP puisque ces dernières transloquent au noyau pour exercer leur fonction transactivatrice. Ensuite, CBP étant un co-facteur essentiel à l'activité transcriptionnelle d'IRF3, cet essai nous permet de déterminer si l'attachement au co-facteur est préservée lorsque l'acétylation ponctuelle des lysines est inhibée. Aussi, nous n'observons pas de différence notable quant à la capacité des différents mutants à se lier à CBP et suggérons donc que la mutation ponctuelle des lysines en arginine ne joue un rôle ni dans la dimérisation d'IRF3 ni dans l'attachement au co-facteur CBP.

A)



B)

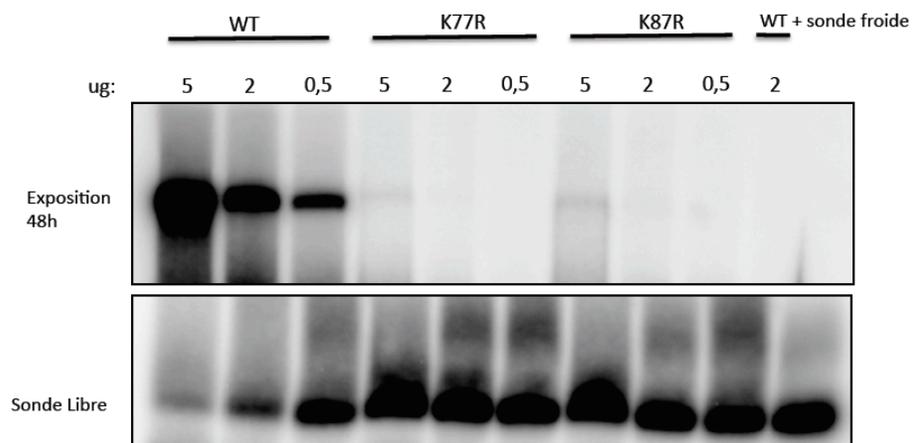


Figure 8 : La mutation en K87R inhibe la capacité d'IRF3 à s'attacher à l'ADN.

Des cellules 293T ont été transfectées avec les constructions Flag-IRF3 et myc-TBK1 tel qu'indiquées pour 24 heures. Les cellules ont été lysés et 20 ug d'extrait cellulaire total a été utilisé pour l'EMSA. Le gel a été exposé pour 16 heures. B) Différentes concentrations de protéines recombinantes ont été utilisées selon le même protocole que A).

En A) la sur-expression des différentes constructions d'IRF3 nous montre que la protéine WT possède la capacité à se lier à l'élément de réponse ISG15. Cette capacité est induite par la présence de TBK1, la kinase activant IRF3. Nous observons également que le mutant IRF3-K77R ne possède plus la capacité à se lier à son élément de réponse, résultat attendu puisque la lysine 77, conservée dans la famille des IRF, se lie directement avec l'ADN. Enfin, nous observons que IRF3-K87R perd également la capacité à se lier à son élément de réponse. Afin de vérifier si la perte d'interaction avec l'élément de réponse est due à une perte d'inductibilité ou un perte de la capacité intrinsèque du mutant à se lier à ISG15, nous avons produit des protéines recombinantes de la partie N-terminale (1-133) d'IRF3, obtenant ainsi uniquement le DBD d'IRF3. La forme sauvage de ce mutant possède la capacité intrinsèque de s'attacher à son élément de réponse, contrairement à IRF3 entier (1-427) qui se retrouve dans une forme latente fermée en l'absence de stimulation. Aussi, nous observons que le mutant K87R perd la capacité intrinsèque de s'attacher à l'ADN.

A)

| | $\alpha 2$ | $\alpha 3$ | |
|-------|---|------------------|-----|
| hIRF4 | 55 KHAGKQDYNREEDAALFKAWALFKGKFREGIDKPDP----- | PTWKTRLRCALNKSN | 105 |
| hIRF8 | 41 KHAGKQDYNQEVDAIFKAWAVFKGKFKEG-DKAEP----- | ATWKTRLRCALNKSP | 90 |
| hIRF9 | 43 KHAGKQDFREDQDAAFKAWAIFKGKYKEG-DTGGP----- | AVWKTRLRCALNKSS | 92 |
| hIRF5 | 48 RHATRHPGSPQDGDNTIFKAWAKE'GKYTEGVDEADP----- | AKWKANLRCALNKSR | 98 |
| hIRF6 | 41 KHATRHPQEEENTIFKAWAVETGKYQEGVDDPDP----- | AKWKAQLRCALNKSR | 91 |
| hIRF1 | 39 KHAARKHGW DINKDAFLFRSWAHTGGRYKAGEKEPDP----- | KTWKANFRFCAMNSLP | 89 |
| hIRF2 | 39 MHAARHGWDVEKDAPLFRNRAIHTGKHQPGVDKPDP----- | KTWKANFRFCAMNSLP | 89 |
| hIRF7 | 45 KHFA RKDLS-EADARIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRFCALRSTR | | 103 |
| hIRF3 | 39 KHGLRQDAQ-QEDFGIFQAWAEATGAYVPGRDKPDL----- | PTWKRNFRCALNRKE | 88 |

B)

| | 70 | 80 |
|--|---|----|
| <i>IRF3 protein- homo sapiens</i> | T G A Y V P G R D K P D L P T W K R N F R S A | |
| <i>IRF3 protein- rattus norvegicus</i> | S G A Y T P G K D K P D L S T W K R N F R S A | |
| <i>IRF3 protein- bos taurus</i> | S G A Y T P G K D K P D L P T W K R N F R S A | |
| <i>IRF3 protein- sus scrofa</i> | S G A Y T P G K D K P D L P T W K R N F R S A | |
| <i>IRF3 protein- mus musculus</i> | S G A Y T P G K D K P D V S T W K R N F R S A | |
| | S G A Y T P G K D K P D L P T W K R N F R S A | |

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

Figure 9 Alignement de séquence dans la famille des IRF.

Les DBD des différentes membres de la famille des IRF chez l'humain est démontrée en A) les hélices $\alpha 2$ et 3 sont soulignées. Un alignement de séquence d'IRF3 chez différentes espèces est observé en B)

On observe en A) un alignement de la région DBD à travers la famille des IRF. Il est important de noter que la lysine 77 est la seule lysine conservée dans le DBD à travers les IRF 1-9. En B), on observe que la lysine 77 ainsi que la lysine 87 sont des lysines qui sont conservées sur le facteur de transcription IRF3 chez différentes espèces.

Chapitre V: Discussion

À travers les différents résultats présentés, nous avons démontré la première caractérisation à ce jour de l'acétylation du facteur de transcription IRF3. En effet, bien que l'acétylation fut démontré *in vitro* (Suhara et al, 2002), nous avons non seulement été les premiers à démontrer cette acétylation dans un modèle cellulaire, mais par dessus tout, nous avons identifié un résidu dont l'acétylation affecte de façon cruciale la fonction de la protéine. Notre étude possède aussi la force d'une identification par spectrométrie de masse de plusieurs résidus pouvant être acétylé et ces résultats constituent également une innovation dans notre domaine d'étude.

Bien sûr, notre étude comporte également des limitations, soit inhérentes aux techniques employées, soit des faiblesses au niveau de la modélisation des processus de régulation du facteur de transcription IRF3. Nous discuterons donc ici de ces limites et des perspectives envisageables pour y pallier.

D'abord, à la figure 1, on peut observer que la surexpression de CBP augmente l'acétylation d'IRF3 en immunobuvardage. Nous attribuons cette augmentation au fait que CBP, possédant un domaine acétyltransférase, est la HAT qui acétyle le facteur de transcription IRF3. Cette association est intuitive puisque CBP est un co-facteur reconnu d'IRF3, est nécessaire à l'activation de l'holocomplexe et a été démontré comme ayant la capacité *in vitro* d'acétyler IRF3 (Suhara et al, 2002). Nous n'avons cependant pas démontré dans notre étude la spécificité de la HAT pour son substrat. Également, nos résultats de spectrométrie de masse démontrent pas que la surexpression de CBP augmente l'acétylation d'IRF3, ce qui pourrait suggérer que CBP n'est pas la HAT impliquée. Aussi, une avenue intéressante à explorer serait de mesurer l'acétylation de IRF3 dans des cellules CBP^{-/-} ou dans des cellules où l'expression de CBP est diminuée par siARN. Également, il serait

intéressant d'observer par immunobuvardage si la surexpression de d'autres HAT connues tel que PCAF et GCN5 ont la capacité d'acétyler IRF3.

Ensuite, à la figure 3, nous avons démontré dans des cellules MEF IRF3^{-/-} que la capacité de transactiver le promoteur ISG54, un élément de réponse ISRE, est affectée par la mutation en arginine de la lysine 87. Cette technique a l'avantage d'éliminer tout effet possible d'IRF3 endogène et a été une méthode d'analyse de choix pour nous. Cependant, ces essais luciférase constituent notre seule validation de l'incapacité du mutant K87R à transactiver un élément de réponse ISRE. Il serait donc recommandable que ce résultat soit pallié par d'autres essais, dont un immunobuvardage des protéines ISG54 et ISG56 dans des MEF IRF3^{-/-} reconstituées à l'aide du mutant. Aussi, il serait envisageable d'apporter un aspect plus fonctionnel à l'impact de la mutation de la lysine 87 en arginine en testant si la complémentation de cette construction dans des MEF IRF3^{-/-} affecte la survie des cellules face à une infection virale.

Une limitation majeure de l'ensemble de notre étude est l'emploi exclusif de la surexpression d'IRF3. En effet, il est possible que le profil d'acétylation de la protéine endogène diffère du profil observé, particulièrement au niveau l'acétylation d'IRF3 au niveau basal. Toutefois, il est à noter que nos résultats d'immunobuvardage corrélerent avec nos résultats de spectrométrie de masse quant à l'effet de TBK1 sur l'acétylation d'IRF3, ce qui renforce grandement notre hypothèse de la régulation dynamique de l'acétylation du facteur de transcription. Pour contourner un effet possible de la surexpression, deux méthodes sont envisageables. D'abord, isoler la protéine endogène par immunoprécipitation. L'observation de l'acétylation de la protéine endogène est toutefois techniquement plus élaborée que l'observation en surexpression. En effet, un défi majeur dans cette démarche est l'immunoprécipitation d'une grande quantité de protéine de 55kDa sans l'interférence des chaînes lourdes d'anticorps. Lors de la sur-expression des protéines Flag-IRF3, l'emploi de billes M2 et l'élution par compétition avec un peptide Flag a été employé pour ne pas masquer le signal

d'acétylation. Il faudrait donc développer un protocole pour lier de façon covalente des anticorps IRF3 à des billes contenant des protéines A et élaborer une élution efficace qui permettrait l'isolation d'une bonne quantité d'IRF3 endogène. Un désavantage majeur de l'emploi de la liaison covalente de l'anticorps anti-IRF3 aux billes est l'emploi d'une grande quantité d'anticorps anti-IRF3, un produit onéreux et limitant. Pour contourner ce problème, il est possible de compléter des MEFs IRF3^{-/-} avec une construction Flag-IRF3 jusqu'à l'obtention d'un niveau d'expression similaire à l'endogène en comparant le niveau d'expression par immunobuvardage à des MEF IRF3^{+/+}. Ces résultats pourraient nous informer de l'acétylation d'IRF3 à une concentration plus physiologique que dans un système d'expression ectopique.

Une limitation possible de l'immunobuvardage est la disponibilité de l'épitope pour l'anticorps. En effet, la présence de TBK1 entraîne une activation et un changement de conformation d'IRF3 qui pourrait masquer l'épitope que reconnaît l'anticorps anti-Kac. Cette limitation expliquerait pourquoi la présence de TBK1 inhibe en immunobuvardage le signal d'acétylation d'IRF3. Néanmoins, grâce aux résultats concomitants de spectrométrie de masse, nous croyons que l'immunobuvardage nous permet bel et bien d'observer une diminution du niveau d'acétylation d'IRF3 et non une diminution de la disponibilité de l'épitope pour l'anticorps anti-Kac. Par contre, il est possible que l'expression ectopique de CBP modifie la conformation d'IRF3 ce qui permet une plus grande disponibilité des résidus acétylés et par conséquent, une augmentation du signal d'acétylation en immunobuvardage. Nous suggérons aussi qu'une inhibition de l'expression de CBP par siARN et une mesure de l'acétylation de IRF3 permettrait de contourner ce problème.

Perspectives

Nos travaux sur l'acétylation du facteur de transcription IRF3 s'inscrivent dans un plus large contexte de l'étude du rôle de l'acétylation dans l'immunité innée. En

effet, de nombreuses études se sont penchées au cours des dernières années sur l'implication de cette modification post-traductionnelle dans la famille des IRF et dans la réponse interféron en général. Nous discuterons ici de trois études intimement liées à notre sujet d'intérêt, leurs conclusions pertinentes à notre étude, l'impact qu'entraînent ces conclusions sur nos hypothèses et les leçons qu'il est possible d'en tirer.

Dans la première étude, Caillaud et al. démontrent l'acétylation du facteur de transcription IRF7, un proche homologue d'IRF3. Cette acétylation est présente de façon basale lors de la sur-expression d'IRF7 et est augmentée lors d'une infection virale. À l'aide de différents mutant de délétion, le groupe identifie la lysine 92 comme étant le seul résidu acétylé sur IRF7. La mutation en K92R annihile la capacité d'IRF7 à transactiver le rapporteur IFN α 6 en essai luciférase et empêche l'attachement à la sonde ISG15 en EMSA. Suspectant un lien direct entre la lysine 92 et l'ADN, le groupe substitue les acides aminés entourant la lysine 92, créant ainsi le mutant IRF7GTTR. La lysine 92 sur IRF7 est une lysine conservée à travers la famille des IRF et se retrouve sur la position 77 sur IRF3. Sur le mutant IRF7 GTTR, les acides aminés entourant la lysine 92 ont été remplacés par les acides aminés entourant la lysine 77 d'IRF3, selon les séquence homologues IRF3 (75-78) : TWKR et IRF7 (90-93) : GWKT. La rationnelle derrière cette mutation étant que, (i) la région adjacente à la lysine acétylée confère une spécificité à la HAT impliquée et que (ii) PCAF n'acétyle pas IRF3 selon leurs résultats d'immunobuvardage et ne reconnaît donc plus la séquence modifiée sur le mutant IRF7 GTTR. Par conséquent, le groupe stipule que le mutant IRF7 GTTR n'est plus acétylé par PCAF sur la lysine 92. Aussi, le groupe démontre une diminution de l'acétylation du mutant GTTR en immunobuvardage comparé à la forme sauvage, bien qu'il ne démontre pas une diminution de l'acétylation du mutant K92R. De plus, le mutant GTTR s'attache toujours à l'ADN en EMSA et possède une capacité augmentée à transactiver le promoteur IFN α 6. Finalement, le groupe démontre que ce mutant forme un lien plus stable avec la sonde ISG15 que IRF7 de type sauvage et conclue que

l'acétylation en K92 joue un rôle inhibiteur qui désengage IRF7 de L'ADN, contrôlant ainsi de façon négative l'activation de gènes cibles (Caillaud et al, 2002).

Il est évident que cette étude constitue un pilier majeur de nos travaux dû au fait (i) de la proche homologie entre IRF3 et IRF7, (ii) de l'identification de lysines acétylées dans le DBD et (iii) du rôle inhibiteur de cette acétylation dans la régulation du facteur de transcription. Aussi, cette étude nous permet d'expliquer la difficulté obtenue à observer une diminution de l'acétylation sur les différents mutants ponctuels de lysine en arginine.

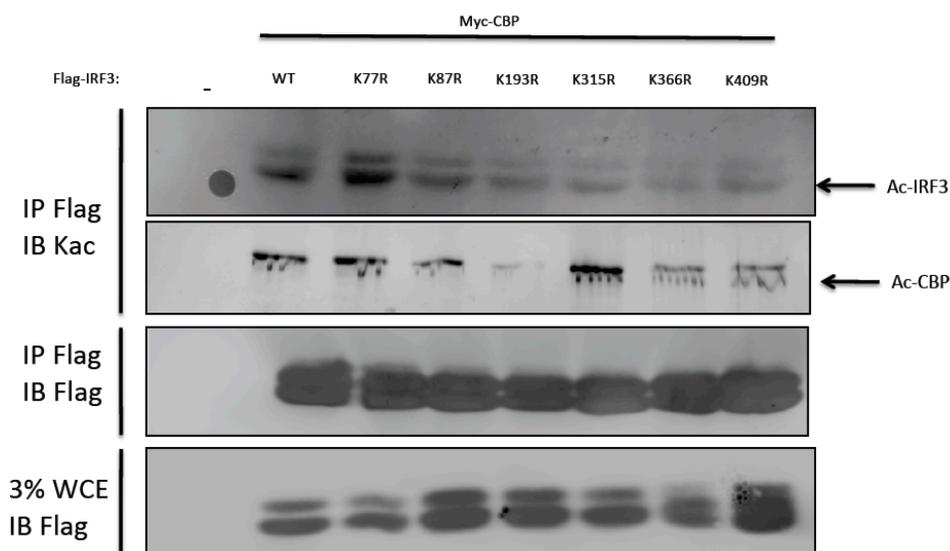


Figure 10 : Acétylation des mutants ponctuels d'IRF3.

Des cellules 293T ont été transfectées par phosphate de calcium avec les constructions indiquées, soit 250 ng de Flag-IRF3 et 750 ng de Myc-CBP. 48 heures post-transfection, les cellules ont été lysées et immunoprécipitées à l'aide de billes M2. L'éluat a été accompli par une compétition avec un peptide Flag et les éluats ont été séparés par SDS-PAGE et analysés à l'aide d'un anticorps anti-lysines acétylées (Kac). N=1

Également, il est intéressant de noter le groupe conclu que la lysine 92, servant à solidifier les liens entre le complexe de transcription et le promoteur, subit une

neutralisation de sa charge positive par l'acétylation ce qui a pour conséquence de diminuer la capacité d'IRF7 de s'attacher à l'ADN. Cette conclusion décrit parfaitement nos résultats et par conséquent, il serait fort intéressant de muter le contexte de la lysine 87 sur IRF3 afin de diminuer l'acétylation de ce résidu. L'approche de mutation du contexte de la lysine 92 avait été reprise pour muter le contexte de la lysine 77 par un ancien membre du laboratoire, Dre. Annie Bibeau-Poirier, créant le mutant IRF3 T75GR78T (résultat non publié). Ce mutant, en essai *in vitro*, pouvait s'attacher à la sonde ISGG15, mais ne transactivait toutefois plus le promoteur ISG56 en essai luciférase. Cependant, contrairement à la lysine 77, la lysine 87 n'est pas conservée dans la famille des IRF. Aussi, il serait possible de simplement muter les acides aminés adjacents à la lysine 87 en alanine, un acide aminé neutre, afin de mesurer l'acétylation de ce mutant par immunobuvardage, l'attachement à l'ADN par EMSA et la transactivation de gènes cibles par essais luciférase. Enfin, comme pour IRF7, nous observons une acétylation basale d'IRF3 et proposons donc que la lysine 87 doit être déacétylée pour s'attacher à son promoteur. Ceci soulève l'implication de HDAC, ce qui nous porte à l'analyse d'une seconde étude.

En 2006, Nusinzon et Horvath ont démontré l'implication des HDAC dans la régulation de la réponse IFN- β . Le groupe démontre d'abord qu'un traitement à la TSA, un inhibiteur connu des HDAC, inhibe la production de IFN- β , suggérant que la déacétylation est un processus essentiel à cette réponse. À l'aide d'un *siRNA screen* contre les HDAC de 1 à 10, le groupe identifie trois HDAC impliquées dans la régulation du gène d'interféron béta, soit la HDAC1 et 8 qui, lorsque inhibée par siARN, augmente la transactivation des PRDI/III et PRDII, les constituants de l'élément de réponse IFN- β dépendant d'IRF3 et de NF-kB respectivement. Contrairement aux HDAC1 et HDAC8, HDAC6, troisième HDAC identifiée par le groupe, diminue la réponse interféron lorsque inhibée, mais uniquement pour l'élément de réponse PRDI/III. Les auteurs éliminent la possibilité que cet effet soit dû à l'acétylation du facteur de transcription IRF3 par deux expériences. D'abord, les auteurs démontrent que la translocation nucléaire

d'IRF3 n'est pas affectée par un traitement à la TSA. Ensuite, les auteurs montrent que le traitement à la TSA n'affecte pas l'attachement à la chromatine d'IRF3 par *chromatin IP*. Enfin, les auteurs concluent qu'une balance de l'activité des HDAC1, HDAC6 et HDAC8 est nécessaire pour une activation optimale du promoteur de IFN- β (Nusinzon & Horvath, 2006).

L'étude de Nusinzon et Horvath nous a permis d'identifier HDAC6 comme une HDAC potentiellement impliquée dans la voie IRF3. Aussi, bien que les auteurs concluent que l'acétylation du facteur de transcription n'est pas en jeu, nous croyons plutôt que cette conclusion est basée sur trop peu d'évidence. En effet, la seule expérience du groupe dans cette direction a été la *chromatin IP* en présence de TSA, un inhibiteur pharmacologique. Aussi, nous pouvons argumenter qu'une inhibition partielle d'HDAC6 par la TSA dans cet essai pourrait justifier l'attachement à l'ADN d'IRF3. Il est aussi à noter que le groupe n'a pas fait d'immunoprécipitation de chromatine en présence de siARN contre HDAC6, ni regardé l'attachement d'IRF3 à l'ADN en EMSA. Nos essais d'immunobuvardage actuels nous suggèrent qu'en expression ectopique, HDAC6 a la capacité de déacétyler IRF3, quoique cette propriété soit également partagée jusqu'à un certain degré par HDAC1. Par contre, nous trouvons fort intéressant la spécificité suggérée d'HDAC6 dans la voie IRF3 et suggérons, pour la suite de nos travaux, d'inhiber par siARN HDAC6 et observer par EMSA, une méthode fort sensible, si l'attachement à l'ADN d'IRF3 est modulé. Enfin, le groupe démontre de façon fort intéressante l'implication dynamique des processus d'acétylation et de déacétylation dans la réponse interféron et nous suggère qu'un équilibre complexe régit l'activation de ce promoteur.

Finalement, la dernière étude présentée est celle de Suhara et al. qui suggère que CBP/p300 sont indispensables à l'attachement de l'holocomplexe contenant IRF3 à son promoteur et, de façon plus pertinente à notre sujet d'étude, montre une acétylation *in vitro* de IRF3 par p300 suite à une infection virale et suggère

qu'IRF3 à besoin d'être acétylé pour coopérer avec p300 et interagir avec l'ADN. Le groupe a en effet surexprimé une construction GST-IRF3 dans des L929, puis infectées les cellules au NDV. GST-IRF3 a ensuite été isolé par GST *pull-down* et les complexes précipités ont été incubé avec de [¹⁴C]acetyl-CoA, puis séparé par SDS-PAGE et analysé par immunobuvardage à l'aide d'anticorps anti-GST et anti-p300. Le groupe suggère également qu'une forme monomérique d'IRF3 ne peut être acétylé par la protéine recombinante p300 en présence de [¹⁴C]acetyl-CoA, quoique ces résultats ne soit pas montrés (*data not shown*).

Ce résultat contredit notre hypothèse qu'IRF3 est acétylé de façon basale et que cette acétylation diminue suite à une activation. Cependant, en observant la méthodologie du GST-pull down, on peut suggérer qu'une acétylation basale peut être perdue à travers une lyse et des lavages dans un tampon ne contenant pas de TSA, élément que nous avons dû développer dans notre propre protocole. Également, étant donné que nos résultats d'immunobuvardage et nos résultats de spectrométrie de masse, une technique dotée d'une très grande sensibilité, suggèrent une acétylation basale, nous demeurons confiant face à nos propres observations. Enfin, comme le groupe stipule que l'acétylation d'IRF3 suit une cinétique particulière lors d'une infection virale, il aurait été intéressant de regarder l'évolution de l'acétylation dans une cinétique d'infection virale plutôt qu'à un point donné.

Élaboration d'un modèle

À travers les différents résultats présentés, nous avons démontré que l'acétylation est une modification post-traductionnelle importante dans la régulation du facteur de transcription IRF3. À travers l'immunobuvardage et la spectrométrie de masse, nous avons observé une acétylation basale d'IRF3 et une diminution de cette acétylation lors de la présence de la kinase TBK1. Également, par nos résultats d'immunobuvardage et tenant compte du travaille d'autres groupes de

recherche, nous croyons que CBP est la HAT qui acétyle IRF3. Aussi, nous suggérons qu'en substituant la lysine pour une arginine par mutagenèse dirigée, nous mimons l'acétylation de la lysine en lui retirant sa charge positive, tout en conservant la structure du résidu. Par conséquent, nous suggérons que la perte d'affinité pour l'ADN observée en EMSA du mutant K87R mime une perte d'affinité de la protéine IRF3 lorsqu'elle est acétylée sur la K87 pour son promoteur.

Pour la suite des travaux, nous devons démontrer les conséquences d'une perte d'acétylation sur la régulation d'IRF3. En tenant compte du travail d'autres groupes de recherche, nous proposons d'investiguer le rôle de l'acétylation sur IRF3 par les mécanismes suivants (i) mutation des résidus entourant la lysine 87, (ii) inhibition des HDAC6 par siARN et (iii) inhibition de CBP par si ARN. Sommes toute, en nous basant sur nos résultats, nous émettons l'hypothèse que l'acétylation est une modification post-traductionnelle basale et inhibitrice d'IRF3 et que la désacétylation du facteur de transcription est nécessaire à son activation complète.

Modèle

IRF3 est une protéine latente et cytoplasmique en l'absence d'infection virale. Cependant, IRF3 possède un NLS et un NES et de façon basale, transloque entre le noyau et le cytoplasme, bien qu'elle ne s'accumule pas au noyau en l'absence d'activation. Aussi, nous suggérons que lors de cette translocation basale, IRF3 est acétylé par CBP, son co-facteur nucléaire.

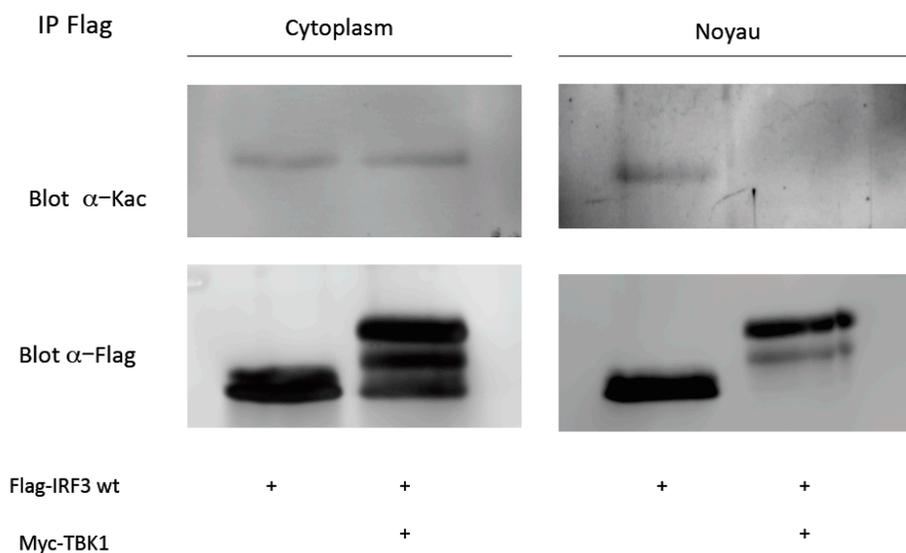


Figure 11: Acétylation d'IRF3 dans le cytoplasme et le noyau.

Des cellules 293T ont été transfectées au phosphate de calcium avec les constructions indiquées, soit 500 ng de Flag-IRF3 et 1 mg de Myc-TBK1. 48 post-transfection, les cellules ont été lysées avec un protocole d'extraction cyto-nucléaire. Les extraits ont ensuite été immunoprécipités avec des billes M2 et élués par une compétition avec un peptide Flag. Les éluats ont été séparés par SDS-PAGE et analysés à l'aide d'un anticorps anti-lysines acétylées (Kac). N=1.

Ce résultat nous suggère que la déacétylation d'IRF3 se produit avant la translocation au noyau et donc, dans le cytoplasme. Ce résultat corrèle parfaitement avec notre hypothèse de l'implication d'HDAC6 dans la déacétylation d'IRF3, puisque cette HDAC est située principalement au cytoplasme.

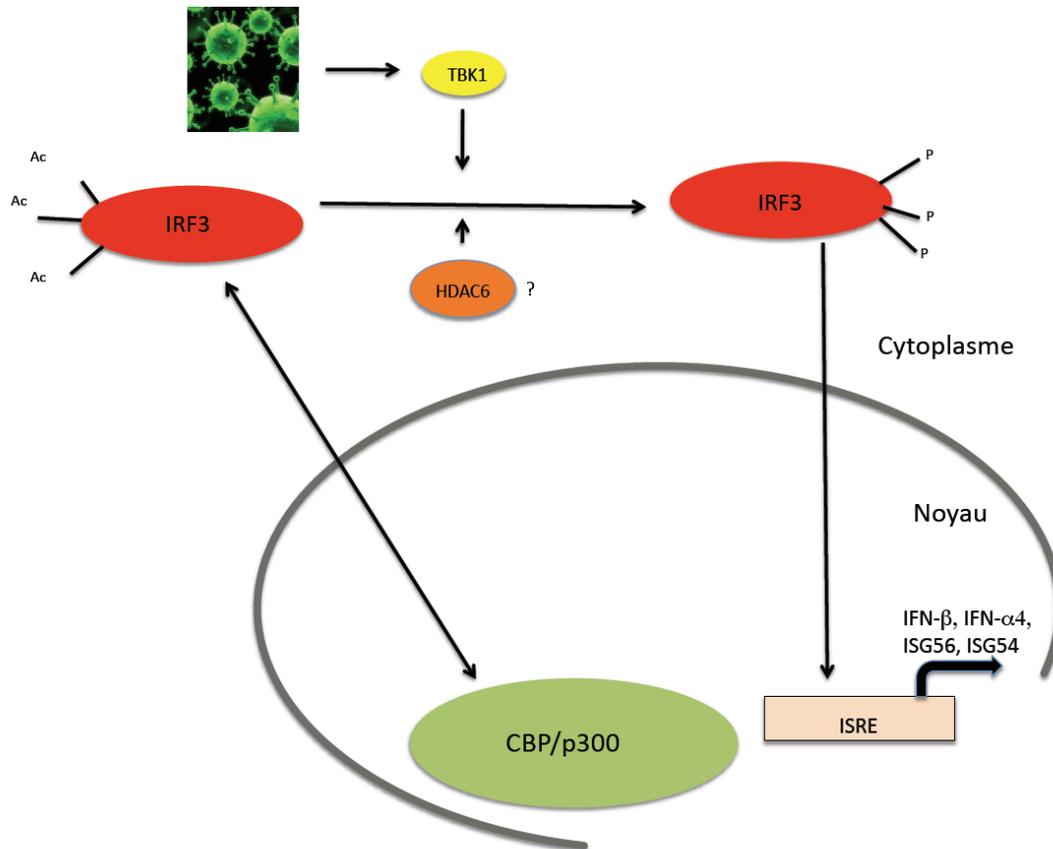


Figure 12: Modèle proposé.

De façon basale, IRF3 transite entre le cytoplasme et le noyau. Dans le noyau, IRF3 est acétylé par CBP, ce qui inhibe le facteur de transcription au repos. Suite à une infection virale, la kinase TBK1 phosphoryle IRF3 en C-terminale. Une HDAC, possiblement HDAC6, déacétyle IRF3 afin de permettre l'interaction avec l'ADN et la transactivation de gènes cibles. Le modèle proposé suggère qu'IRF3 est acétylé de façon latente et phosphorylé lorsqu'activé, mais l'hypothèse d'une forme intermédiaire à la fois acétylée et phosphorylée demeure possible dans ce modèle.

Chapitre VI: Bibliographie

Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V (2009) RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* **10**(10): 1065-1072

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**(7): 1958-1968

Anderson KV (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* **12**(1): 13-19

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* **11**(2): 191-198

Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11657-11661

Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK (2004) Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* **279**(49): 51163-51171

Barchet W, Cella M, Odermatt B, Asselin-Paturel C, Colonna M, Kalinke U (2002) Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* **195**(4): 507-516

Bergstroem B, Johnsen IB, Nguyen TT, Hagen L, Slupphaug G, Thommesen L, Anthonen MW (2010) Identification of a novel in vivo virus-targeted phosphorylation site in interferon regulatory factor-3 (IRF3). *J Biol Chem* **285**(32): 24904-24914

Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, Hiscott J, Grandvaux N, Meloche S, Servant MJ (2006) Involvement of the

IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* **177**(8): 5059-5067

Bin LH, Xu LG, Shu HB (2003) TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem* **278**(27): 24526-24532

Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN (2000) Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med* **191**(12): 2131-2144

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 769-784

Buerki C, Rothgiesser KM, Valovka T, Owen HR, Rehrauer H, Fey M, Lane WS, Hottiger MO (2008) Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65. *Nucleic Acids Res* **36**(5): 1665-1680

Caillaud A, Prakash A, Smith E, Masumi A, Hovanessian AG, Levy DE, Marie I (2002) Acetylation of interferon regulatory factor-7 by p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor (PCAF) impairs its DNA binding. *J Biol Chem* **277**(51): 49417-49421

Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**(10): 1074-1081

Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BR, Sen GC (2010) Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J* **29**(10): 1762-1773

Chattopadhyay S, Sen GC (2011) IRF-3 and Bax: a deadly affair. *Cell Cycle* **9**(13): 2479-2480

Chattopadhyay S, Yamashita M, Zhang Y, Sen GC (2011) The IRF-3/Bax-mediated apoptotic pathway, activated by viral cytoplasmic RNA and DNA, inhibits virus replication. *J Virol* **85**(8): 3708-3716

Chen J, Baig E, Fish EN (2004) Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* **24**(12): 687-698

Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 392-401

- Chen LF, Mu Y, Greene WC (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J* **21**(23): 6539-6548
- Chen W, Srinath H, Lam SS, Schiffer CA, Royer WE, Jr., Lin K (2008) Contribution of Ser386 and Ser396 to activation of interferon regulatory factor 3. *J Mol Biol* **379**(2): 251-260
- Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**(8): 758-765
- Cheng G, Zhong J, Chung J, Chisari FV (2007) Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 9035-9040
- Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**(3): 576-591
- Chong DL, Sriskandan S (2011) Pro-inflammatory mechanisms in sepsis. *Contrib Microbiol* **17**: 86-107
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**(5942): 834-840
- Clement JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S, Servant MJ (2008a) Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* **82**(8): 3984-3996
- Clement JF, Meloche S, Servant MJ (2008b) The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell Res* **18**(9): 889-899
- Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP (2008) The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* **29**(2): 169-179
- Cui XF, Imaizumi T, Yoshida H, Borden EC, Satoh K (2004) Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates the expression of interferon-gamma stimulated gene 15 in MCF-7 cells. *Biochem Cell Biol* **82**(3): 401-405
- De Nardo D, Latz E (2011) NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol*

- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**(Pt 3): 737-749
- Deng WG, Wu KK (2003) Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J Immunol* **171**(12): 6581-6588
- Deng WG, Zhu Y, Wu KK (2003) Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J Biol Chem* **278**(7): 4770-4777
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**(5663): 1529-1531
- Dieude P, Dawidowicz K, Guedj M, Legrain Y, Wipff J, Hachulla E, Diot E, Sibilia J, Mouthon L, Cabane J, Amoura Z, Crakowski JL, Carpentier P, Avouac J, Meyer O, Kahan A, Boileau C, Allanore Y (2010) Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity. *J Rheumatol* **37**(5): 987-992
- Donnelly RP, Kotenko SV (2011) Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* **30**(8): 555-564
- Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M (1991) Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* **65**(6): 1023-1031
- Engstrom Y, Kadalayil L, Sun SC, Samakovlis C, Hultmark D, Faye I (1993) kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in Drosophila. *J Mol Biol* **232**(2): 327-333
- Escalante CR, Yie J, Thanos D, Aggarwal AK (1998) Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* **391**(6662): 103-106
- Feng D, Sangster-Guity N, Stone R, Korczeniewska J, Mancl ME, Fitzgerald-Bocarsly P, Barnes BJ (2010) Differential requirement of histone acetylase and deacetylase activities for IRF5-mediated proinflammatory cytokine expression. *J Immunol* **185**(10): 6003-6012
- Fitzgerald-Bocarsly P, Feldman M, Mendelsohn M, Curl S, Lopez C (1988) Human mononuclear cells which produce interferon-alpha during NK(HSV-FS) assays are HLA-DR positive cells distinct from cytolytic natural killer effectors. *J Leukoc Biol* **43**(4): 323-334

- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T (2003a) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**(5): 491-496
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003b) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**(7): 1043-1055
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M, Jr. (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol* **82**(2): 609-616
- Fujii K, Nakamura S, Takahashi K, Inagaki F (2010) Systematic characterization by mass spectrometric analysis of phosphorylation sites in IRF-3 regulatory domain activated by IKK-i. *J Proteomics* **73**(6): 1196-1203
- Fujii Y, Shimizu T, Kusumoto M, Kyogoku Y, Taniguchi T, Hakoshima T (1999) Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J* **18**(18): 5028-5041
- Fujita T, Sakakibara J, Sudo Y, Miyamoto M, Kimura Y, Taniguchi T (1988) Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *EMBO J* **7**(11): 3397-3405
- Genin P, Vaccaro A, Civas A (2009) The role of differential expression of human interferon--a genes in antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**(4): 283-295
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**(24): 6969-6978
- Haigis MC, Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* **20**(21): 2913-2921
- Han J, Zhong J, Wei W, Wang Y, Huang Y, Yang P, Purohit S, Dong Z, Wang MH, She JX, Gong F, Stern DM, Wang CY (2008) Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes* **57**(8): 2118-2127

Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T (1989) Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* **58**(4): 729-739

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**(2): 269-279

Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**(3): 344-362

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**(5663): 1526-1529

Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S (2003) The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* **170**(6): 3059-3064

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**(2): 196-200

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813): 740-745

Higgs R, Ni Gabhann J, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA (2008) The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* **181**(3): 1780-1786

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**(3): 349-360

Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**(7034): 772-777

Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**(9): 835-841

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**(5801): 994-997

Imaizumi T, Aratani S, Nakajima T, Carlson M, Matsumiya T, Tanji K, Ookawa K, Yoshida H, Tsuchida S, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Satoh K (2002) Retinoic acid-inducible gene-I is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(1): 274-279

Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KJ, Malik MI, Dunnwald M, Goudy SL, Lovett M, Murray JC, Schutte BC (2006) Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet* **38**(11): 1335-1340

Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 258-267

Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**(7213): 674-678

Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M, National Center for Biotechnology Information (U.S.). (2001) Immunobiology 5 the immune system in health and disease. Garland Pub., New York, pp. xviii, 732 p.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216

Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A (2001) Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**(11): 3388-3393

Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY (2010) Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol* **186**(1): 499-507

Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**(6): 499

Karagiannis TC, El-Osta A (2007) Will broad-spectrum histone deacetylase inhibitors be superseded by more specific compounds? *Leukemia* **21**(1): 61-65

Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663

Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**(1): 19-28

Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**(7): 1601-1610

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**(7089): 101-105

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**(10): 981-988

Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, Wynn JL, Lee PY, Kumagai Y, Efron PA, Akira S, Wasserfall C, Atkinson MA, Moldawer LL (2011) B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med*

Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 159-180

Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S, Benkirane M (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem* **278**(4): 2758-2766

Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* **23**(4): 607-618

Klampf L, Huang J, Swaby LA, Augenlicht L (2004) Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *J Biol Chem* **279**(29): 30358-30368

Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* **19**(6): 1176-1179

Kramer OH, Baus D, Knauer SK, Stein S, Jager E, Stauber RH, Grez M, Pfitzner E, Heinzl T (2006) Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev* **20**(4): 473-485

- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**(1): 16-34
- Lasfar A, Abushahba W, Balan M, Cohen-Solal KA (2011) Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* **2011**: 349575
- Lau OD, Kundu TK, Soccio RE, Ait-Si-Ali S, Khalil EM, Vassilev A, Wolffe AP, Nakatani Y, Roeder RG, Cole PA (2000) HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* **5**(3): 589-595
- Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R, Chignard M, Si-Tahar M (2006) Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* **2**(6): e53
- Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 284-295
- Lei CQ, Zhong B, Zhang Y, Zhang J, Wang S, Shu HB (2010) Glycogen synthase kinase 3beta regulates IRF3 transcription factor-mediated antiviral response via activation of the kinase TBK1. *Immunity* **33**(6): 878-889
- Levy DE (1998) Analysis of interferon-regulated proteins binding the interferon-alpha-stimulated response element. *Methods* **15**(3): 167-174
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5567-5572
- Lin R, Genin P, Mamane Y, Sgarbanti M, Battistini A, Harrington WJ, Jr., Barber GN, Hiscott J (2001) HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene* **20**(7): 800-811
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**(5): 2986-2996
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J (1999) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2465-2474
- Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, van Laak V, Slevogt H, N'Guessan P D, Hippenstiel S, Chakraborty T, Flieger A, Suttorp N, Opitz B (2008) IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic

DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol* **10**(12): 2579-2588

Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, Tong JH, Lanotte M, Waxman S, Chen SJ, Mao M, Hu GX, Zhu L, Chen Z (2000) Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **96**(4): 1496-1504

Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M, Jr. (2008) Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* **82**(1): 335-345

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5598-5603

Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J (1999) Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**(1): 1-14

Maniatis T (1986) Mechanisms of human beta-interferon gene regulation. *Harvey Lect* **82**: 71-104

Masumi A, Ozato K (2001) Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *J Biol Chem* **276**(24): 20973-20980

Masumi A, Tamaoki S, Wang IM, Ozato K, Komuro K (2002) IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. *FEBS Lett* **531**(2): 348-353

Masumi A, Yamakawa Y, Fukazawa H, Ozato K, Komuro K (2003) Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. *J Biol Chem* **278**(28): 25401-25407

Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD (2005) Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* **115**(2): 407-417

Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**(7164): 819-826

Mertens C, Darnell JE, Jr. (2007) SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* **131**(3): 612

Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J (2004) RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**(5): 503-507

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**(7062): 1167-1172

Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, Melchjorsen J, Julkunen I, Gaestel M, Arthur JS, Flavell RA, Ghosh S, Paludan SR (2009) RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem* **284**(16): 10774-10782

Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kundig TM, Potter J, Shahinian A, Wakeham A, Patterson B, Ohashi PS, Mak TW (1997) Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* **275**(5299): 540-543

Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, Miyata T, Taniguchi T (1988) Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **54**(6): 903-913

Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, Fujita T (2004) Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**(11): 9698-9702

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**(5343): 1612-1615

Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, Takayanagi H, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K (2006) Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(41): 15136-15141

Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, Matsuyama T, Taniguchi T, Honda K (2005) Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15989-15994

Nusinzon I, Horvath CM (2003) Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14742-14747

Nusinzon I, Horvath CM (2006) Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Mol Cell Biol* **26**(8): 3106-3113

O'Neill LA (2002) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**: 47-61

Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**(7073): 208-211

Palmblad K, Sundberg E, Diez M, Soderling R, Aveberger AC, Andersson U, Harris HE (2007) Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **9**(2): R35

Panne D, McWhirter SM, Maniatis T, Harrison SC (2007) Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* **282**(31): 22816-22822

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801): 997-1001

Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, Hardman MJ, Knowles L, Boot-Handford RP, Shore P, Whitmarsh A, Dixon MJ (2006) Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet* **38**(11): 1329-1334

Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM (1977) n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* **268**(5619): 462-464

Ronnblom L, Alm GV (2001) An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol* **22**(8): 427-431

Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120

Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Luscher B, Hottiger MO (2010) SIRT2 regulates NF-kappaB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci* **123**(Pt 24): 4251-4258

Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, Li X, Lukacs NW (2005) Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol* **79**(6): 3350-3357

Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S (2006) Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* **7**(6): 598-605

Salkowski CA, Kopydlowski K, Blanco J, Cody MJ, McNally R, Vogel SN (1999) IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice. *J Immunol* **163**(3): 1529-1536

Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**(4): 539-548

Sato T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4): 1512-1517

Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Krug A (2006) U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* **107**(8): 3229-3234

Savitsky D, Tamura T, Yanai H, Taniguchi T (2010) Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother* **59**(4): 489-510

Schenten D, Medzhitov R (2011) The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv Immunol* **109**: 87-124

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G (2009) Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**(1): 25-34

Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S (2009) 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12067-12072

Sen GC, Sarkar SN (2005) Hitching RIG to action. *Nat Immunol* **6**(11): 1074-1076

Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J (2003) Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **278**(11): 9441-9447

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**(5): 669-682

Severa M, Fitzgerald KA (2007) TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**: 167-192

Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**(5622): 1148-1151

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **116**(11): 3015-3025

Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE, Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* **261**(5129): 1744-1746

Smith AT, Livingston MR, Mai A, Filetici P, Queener SF, Sullivan WJ, Jr. (2007) Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-independent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 1109-1111

Smith KT, Workman JL (2009) Introducing the acetylome. *Nat Biotechnol* **27**(10): 917-919

Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(1): 185-198

Stimson L, Rowlands MG, Newbatt YM, Smith NF, Raynaud FI, Rogers P, Bavetsias V, Gorsuch S, Jarman M, Bannister A, Kouzarides T, McDonald E, Workman P, Aherne GW (2005) Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Mol Cancer Ther* **4**(10): 1521-1532

Suhara W, Yoneyama M, Kitabayashi I, Fujita T (2002) Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**(25): 22304-22313

- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3516-3521
- Taylor P, Tamura T, Kong HJ, Kubota T, Kubota M, Borghi P, Gabriele L, Ozato K (2007) The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* **27**(2): 228-239
- Takahashi K, Horiuchi M, Fujii K, Nakamura S, Noda NN, Yoneyama M, Fujita T, Inagaki F (2010) Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. *Genes Cells* **15**(8): 901-910
- Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Shigemoto T, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T, Inagaki F (2009) Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J Biol Chem* **284**(26): 17465-17474
- Takahashi K, Suzuki NN, Horiuchi M, Mori M, Suhara W, Okabe Y, Fukuhara Y, Terasawa H, Akira S, Fujita T, Inagaki F (2003) X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* **10**(11): 922-927
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**(7152): 501-505
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, Taniguchi T (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**(7030): 243-249
- Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**(1): 1-14
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376
- Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**(6): 805-820
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**: 535-584

- Tang ED, Wang CY (2010) TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling. *PLoS One* **5**(2): e9172
- Tang X, Gao JS, Guan YJ, McLane KE, Yuan ZL, Ramratnam B, Chin YE (2007) Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* **131**(1): 93-105
- Taniguchi T, Takaoka A (2002) The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* **14**(1): 111-116
- Tsuchida T, Kawai T, Akira S (2009) Inhibition of IRF3-dependent antiviral responses by cellular and viral proteins. *Cell Res* **19**(1): 3-4
- Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, Ozato K (2004) Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol* **172**(11): 6820-6827
- Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S (2007) The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**: 71-95
- Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L (1999) Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **163**(11): 6306-6313
- Veals SA, Schindler C, Leonard D, Fu XY, Aebersold R, Darnell JE, Jr., Levy DE (1992) Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **12**(8): 3315-3324
- Veeranki S, Choubey D (2011) Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Mol Immunol* **49**(4): 567-571
- Vosslander S, van der Voort LF, van den Elskamp IJ, Heijmans R, Aubin C, Uitdehaag BM, Crusius JB, van der Pouwkraan TC, Comabella M, Montalban X, Hafler DA, De Jager PL, Killestein J, Polman CH, Verweij CL (2011) Interferon regulatory factor 5 gene variants and pharmacological and clinical outcome of Interferonbeta therapy in multiple sclerosis. *Genes Immun*
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* **10**(12): 1366-1373

Wang Y, Ludwig J, Schuberth C, Goldeck M, Schlee M, Li H, Juranek S, Sheng G, Micura R, Tuschl T, Hartmann G, Patel DJ (2010) Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol* **17**(7): 781-787

Xiao W (2004) Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol* **1**(6): 425-435

Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**(6): 727-740

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**(12): 6668-6672

Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T (2007) Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3402-3407

Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 206-218

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* **23**(12): 2369-2380

Yoneyama M, Fujita T (2009) Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* **20**(1): 4-22

Yoneyama M, Fujita T (2010) Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* **20**(1): 4-22

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**(7): 730-737

Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**(4): 1087-1095

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**(28): 17174-17179

Yu Y, Hayward GS (2010) The ubiquitin E3 ligase RAUL negatively regulates type I interferon through ubiquitination of the transcription factors IRF7 and IRF3. *Immunity* **33**(6): 863-877

Zhang B, Li M, Chen L, Yang K, Shan Y, Zhu L, Sun S, Li L, Wang C (2009) The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response. *Cell Res* **19**(4): 412-428

Zhang M, Tian Y, Wang RP, Gao D, Zhang Y, Diao FC, Chen DY, Zhai ZH, Shu HB (2008) Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell Res* **18**(11): 1096-1104

Zhao J, Kong HJ, Li H, Huang B, Yang M, Zhu C, Bogunovic M, Zheng F, Mayer L, Ozato K, Unkles J, Xiong H (2006) IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *J Biol Chem* **281**(15): 10073-10080

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB (2008) The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**(4): 538-550