

Université de Montréal

**L'étude de l'impact des protéines non structurales NS1 et
NS2 du virus respiratoire syncytial sur la réponse
immunitaire innée**

par

Fabrice Aman Yoboua

Département de biochimie

Faculté de médecine

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

Avril, 2012

© Fabrice Yoboua 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'étude de l'impact des protéines non structurales NS1 et NS2 du
virus respiratoire syncytial sur la réponse immunitaire innée

présenté par

Fabrice Aman Yoboua

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Nathalie Grandvaux, directeur de recherche
Gerardo Ferbeyre, membre du jury

Résumé

Le virus respiratoire syncytial (RSV) est un virus à ARN de polarité négative. Les études démontrent que toute la population sera infectée par ce virus au moins deux fois avant l'âge de 3 ans. Le RSV peut provoquer plusieurs pathologies respiratoires telles que la bronchiolite aiguë et la pneumonie. Les infections sévères corrént avec le développement de l'asthme. Lors d'une infection virale, les particules du RSV sont détectées par le senseur RIG-I qui induit l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3. Respectivement, les facteurs de transcription activeront les réponses inflammatoire et antivirale. Au coeur des pathologies induites par le RSV se trouve une réponse immunitaire mal adaptée. Plus précisément, par l'entremise de NF- κ B, le RSV provoque une production exagérée de cytokines et chimiokines qui induisent une réponse inflammatoire démesurée provoquant du dommage tissulaire. Paradoxalement, le RSV est capable d'échapper à la réponse antivirale. Ces deux phénomènes sont contrôlés par l'entremise des protéines non structurales NS1 et NS2.

Le mécanisme délimitant le mode d'action de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale reste à être déterminé. Avec pour objectif d'élucider comment NS1 et NS2 inhibent la réponse antivirale, nous avons investigué le mécanisme de reconnaissance de l'hôte vis-à-vis de RSV. Nous démontrerons, pour la première fois, que le senseur cytosolique MDA5 est impliqué dans la réponse antivirale contre le RSV. Nous présenterons des résultats préliminaires qui suggèrent que le rôle de MDA5 est non redondant à RIG-I. À l'aide d'ARN interférant dirigé contre RIG-I et de transfection de MDA5, nous démontrerons que MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3, mais plutôt qu'elle régit la stabilité du facteur de transcription. Nous démontrerons aussi que, contrairement à l'hypothèse actuelle sur le fonctionnement de NS1 et NS2, l'inhibition de ces derniers ne provoque pas une augmentation de la cytokine antivirale IFN- β . Cependant, l'expression ectopique de NS1 et NS2 réduit l'activité du promoteur de l'IFN- β et de la protéine cytoplasmic antivirale ISG56 lorsqu'elle est mesurée par essai luciférase.

Mots clés : MDA5, RIG-I, RSV, NS1 et NS2

Abstract

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is a RNA virus with negative polarity. RSV infections are the most common cause of hospitalization among infants. Among populations at risk, infection of RSV can be quite severe. RSV infections can cause bronchiolitis, pneumonia, while severe infections are linked to the development of asthma. Early in the infectious cycle of RSV, the cytosolic sensor RIG-I captures viral particles, and activates the immune response by engaging the transcription factors IRF-3 and NF- κ B. At the heart of RSV mediated pathologies is a skewed immune response. More precisely, RSV over stimulates the release of proinflammatory chemokines and cytokines. Intriguingly, while RSV is able to stimulate the production of proinflammatory cytokines and chemokines, RSV under stimulates the antiviral response. The ability of RSV to evade the antiviral response is thought to be mediated by its non-structural proteins: NS1 and NS2. However, the mechanism by which NS1 and NS2 enable RSV to evade the antiviral response remains to be determined.

In this memoir we investigated, how RSV is recognized by the innate immune response in airway epithelial cells. With this information we hope to improve our understanding of how NS1 and NS2 allow RSV to circumvent the antiviral response. We show for the first time that cytosolic sensor MDA5 plays a role in the recognition of RSV particles. Using a combination of interfering RNA directed against RIG-I, and transfection of MDA5, we show that MDA5 does not contribute to the phosphorylation of IRF-3. According to the data presented, we suggest that MDA5's role in the immune response is to prevent the degradation of IRF-3. Contrary to previous research, we show that the inhibition of the nonstructural protein does not increase the production of the antiviral cytokine IFN- β . However, the ectopic expression of NS1 and NS2 does lead to a reduction of the promoter activity of IFN- β and the antiviral protein ISG56 when measured by luciferase assay. This research highlights the importance of MDA5 as a potential therapeutic target in the development of a cure for RSV.

Key words: MDA5, RIG-I, RSV, NS1 and NS2

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Le virus respiratoire syncytial (RSV)	2
1.1.1 Introduction au Virus Respiratoire Syncytial	2
1.1.4 La biologie moléculaire de RSV	6
1.1.4.1 La protéine G.....	6
1.1.4.2 La protéine F	7
1.1.4.3 La protéine N.....	8
1.1.4.4 La protéine P et L.....	8
1.1.4.5 Les protéines non structurale NS1 et NS2	8
1.2 Le système immunitaire.....	9
1.2.1 Les cellules du système adaptatif	11
1.2.2 La réponse immunitaire innée	11
1.3 Senseur/récepteur impliqué dans la réponse antivirale.....	12
1.3.1 Les Toll-Like Receptors (TLRs).....	12
1.3.2 Les RLRs.....	14
1.3.3 Les facteurs régulant RIG-I.....	17
1.3.3 Les facteur régulant MDA5.	18
1.3.4 PKR	19
1.4 NF- κ B et la réponse inflammatoire.....	20

1.5 La réponse antivirale	22
1.5.1 Les interférons	22
1.5.2 Les IRFs	23
1.5.3 IRF-3	23
1.5.4 Janus-Activated Kinase 1 (JAK1)-STATS.....	26
1.5.5 Les ISG.....	28
1.5.5.1 ISG56	28
1.5.5.2 2'- 5' oligoadenylated synthetase (OAS).....	28
1.5.5.3 Les protéines Mx.....	29
1.6 Rôle des protéines NS1 et NS2 de RSV dans la régulation de l'immunité innée	29
1.6.1 NS1 et NS2 et la signalisation	30
Hypothèse et objectifs de travail	33
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	35
Chapitre 3 : Résultats.....	43
3.1 A : Analyse du rôle de NS1 et NS2 dans l'évasion de la réponse antivirale.....	44
Figure 3-1 : Revue et analyse de l'expression de NS1 et NS2 lors d'une infection par le RSV	44
Figure 3-2 : L'utilisation d'ARNi dirigés contre NS1 ou NS2 lors d'une infection par RSV ne module pas la réponse antivirale	47
Figure 3-3 : L'absence de NS1 et NS2 ne stimule pas l'activité du promoteur de l'IFN- β	49
Figure 3-4 : NS1 et NS2 peuvent moduler des cibles du facteur IRF-3 lors d'infection virale	51
Figure 3-5 : L'absence de NS1 et NS2 influence la sécrétion de plusieurs cytokines.....	53
3.1 B : Étude de la fonction de MDA5 lors de la réponse antivirale.....	55
Figure 3-6 : RIG-I et MDA5 modulent l'activation d'IRF-3	55
Figure 3-7: La dégradation d'IRF-3 produit par l'absence de MDA5 se traduit en une réduction de la réponse antivirale.....	57
Figure 3-8 : MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3	59

Figure 3-9: MDA5 favorise la dimérisation d'IRF-3.....	61
Figure 3-11: L'absence de MDA5 induit une diminution dans l'activation du promoteur de ISG56 dans les cellules HEC1B.....	65
Chapitre 4 : Discussion.....	67
4.1. Approche méthodologique utilisée pour définir le rôle de NS1 et NS2.....	68
4.1.1 Évaluation de la perte de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale.....	68
4.1.2 Évaluation de l'expression ectopique de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale.....	69
4.1.3 Évaluation du rôle des virus comme outil de recherche de NS1 et NS2 sur l'activation d'IRF-3 par l'entremise de virus recombinants.....	70
4.1.4 Évaluation du rôle de NS1 dans la réponse antivirale.....	73
4.1.5 Évaluation et synthèse.....	73
4.2. Déterminer le rôle de MDA5 dans l'induction de la réponse antivirale induite par RSV.....	75
4.2.1 Résumé :.....	75
4.2.2 Réévaluation du rôle de MDA5.....	76
4.2.3 Mécanisme de régulation d'IRF-3 par l'hôte.....	78
Conclusion.....	81
Bibliographie.....	82

Liste des tableaux

Table I : Liste des différents pathogènes reconnus par RIG-I et MDA5	16
Table II : Liste des oligonucléotides des ARNi utilisés dans cette étude	41
Table III : Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation en immunoblot	42

Liste des figures

Figure 1-1 : Représentation schématique de la structure du RSV	3
Figure 1-2: Diagramme de venne illustrant les différentes caractéristiques de l'immunité innée et l'immunité adaptative	10
Figure 1-3 : Schématisation de la cascade de signalisation des TLRs	13
Figure 1-4 : Structure primaire des RLRs	15
Figure 1-5 : Cascade de signalisation de RIG-I/MDA5	19
Figure 1-6 : Schéma illustrant l'activation de NF- κ B	22
Figure 1-7 : L'activation d'IRF-3	25
Figure 1-8 : Cascade des IFNs	27
Figure 1-9 : Schématisation de l'effet de NS1 et NS2 sur la signalisation antivirale	32
Figure 3-1 : Revue et analyse de l'expression de NS1 et NS2 lors d'une infection par le RSV	46
Figure 3-2 : L'utilisation d'ARNi dirigés contre NS1 ou NS2 pendant une infection par RSV ne module pas la réponse antivirale	48
Figure 3-3 : L'absence de NS1 et NS2 ne stimule pas l'activité du promoteur de l'IFN- β	50
Figure 3-4 : NS1 et NS2 peuvent moduler des cibles du facteur IRF-3 pendant une infection virale	52
Figure 3-5 : L'absence de NS1 et NS2 influence la sécrétion de plusieurs cytokines	54
Figure 3-6 : RIG-I et MDA5 modulent l'activation d'IRF-3	56
Figure 3-7 : La dégradation d'IRF-3 produit par l'absence de MDA5 se traduit en une réduction de la réponse antivirale	58
Figure 3-8 : MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3	62
Figure 3-9 : MDA5 favorise la dimérisation d'IRF-3	64
Figure 3-10 : Le protéasome est impliqué dans la dégradation d'IRF-3	65
Figure 3-11 : L'absence de MDA5 induit une diminution dans l'activation du promoteur de l'ISG56 dans les cellules HEC1B infectées par le RSV	82

Liste des abréviations

2'-5' OAS	<i>Oligoadenylate Synthetase</i>
aa	Acide aminée
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEC	<i>Airway Epithelial Cells</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-1	<i>Activated Protein-1</i>
APC	<i>Antigen Presentating Cells</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BRSV	<i>Bovine RSV</i>
BVDV	virus de la diarrhée virale des bovins
Cardif	<i>CARD adaptor inducing IFN-β</i>
CARDs	<i>Caspase Activation and Recruitment Domains</i>
CBP	<i>(CREB)-binding protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTRL	Contrôle
Cul-1	<i>Cullin-1</i>
CX3XCR1	<i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i>
DAK	<i>Dihydroxyacetone kinase</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<i>Daxx</i>	<i>Fas death domain-associated protein</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>

DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DOC	<i>Sodium deoxycholate</i>
ds	<i>double strand</i>
EIF2a	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
ERK	<i>Extracellular signal-regulated MAPK</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAS	<i>Interferon-Gamma Activated Sequence</i>
GDP	Guanine di-phosphate
GTP	Guanine tri-phosphate
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HEC1B	<i>Human endometrial adenocarcinoma cell -1-B</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HERC5	<i>HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5</i>
HPI	<i>Hours Post Infection</i>
HPV	Virus du papillome humain
IAD	Domaine d'interaction protéique
IB	Immunoblot
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFN	Interféron
IFNAR	<i>Interferon (alpha, beta and omega) receptor</i>
IFNGR	<i>Interferon-gamma receptor</i>
Ig	Immunoglobuline
IκB	<i>Inhibitors of NF-κB</i>

I κ b α <i>alpha</i>	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IKK	<i>IκBs kinases</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IP10	<i>Interferon-inducible protein-10</i>
IPS-1	<i>Interferon-β Promoter Stimulator 1</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene facteur 3</i>
ISRE	<i>Interferon sensitive response element</i>
JAK	<i>Janus Tyrosine Kinase</i>
JeV	<i>Virus de l'encéphalite japonaise</i>
kDa	<i>kiloDalton</i>
KO	<i>knockout</i>
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signalling</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associates gene 5</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblastes</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MxA	<i>Mixovirus Resistance Protein A</i>

Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBD	<i>NEMO-Binding Domain</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in β-cells</i>
NHBE	<i>Normal Human Bronchiolar Cells</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
Nox	NADPH oxydase
NS	Non structurales
OAS	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase</i>
OASL	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase-like</i>
OMS	Organisation mondiale de la Santé
P300	<i>E1A binding protein p300</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PCR	réaction en chaîne par polymérisation
PIAS2b	<i>protein inhibitors of activated STAT 2</i>
PIN1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
PKR	<i>RNA-dependant protein kinase</i>
poly I :C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
Protéine F	<i>Fusion protein</i>
Protéine G	<i>Large glycoprotein</i>
Protéine L	<i>Large RNA polymerase subunit</i>
Protéine M	<i>Matrix protein</i>

Protéine N	<i>Major nucleocapsid protein</i>
Protéine NS	<i>Non-Structural protein</i>
Protéine P	<i>Phosphoprotein</i>
Protéine SH	<i>Small hydrophobic protein</i>
PRRs	<i>Pathogen Recognition Receptors</i>
qPCR	PCR en temps réel
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RAUL	RTA-Associated Ubiquitin Ligase
RBX1	RING-box protein 1
RD	<i>Regulatory Domain</i>
REL	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)</i>
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid Inducible Gene-I</i>
RLRs	<i>RIG-I-like Receptors</i>
RNF125	<i>Ring finger protein 125</i>
rRSVwt	RSV recombinante non modifiée
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RSV Δ NS1	RSV recombinants délétés NS1
RSV Δ NS2	RSV recombinants délétés NS2
RSV Δ NS1 Δ NS2	RSV recombinants délétés NS1 et NS2
RSV-N	protéine N du RSV
S9	<i>Homo sapiens Ribosomal Protein S9</i>
SDS-page	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	Standard Error of the Mean
<i>Ser</i>	<i>Serine</i>

SeV	<i>Sendai Virus</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	<i>Surfactant Proteins</i>
ss	<i>Single Strand</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i>
STING	<i>Stimulator of IFN Gene</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TAD	<i>Transcription Activation Domain</i>
TBK-1	<i>TANK-Binding Kinase 1</i>
TH	<i>T helper</i>
Thr	thréonine
TIR	<i>Toll/IL-1 Receptor Domain</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAF	<i>TNFR Associated Factor</i>
TRIF	<i>TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon-β</i>
TRIM25	<i>Tripartite Motif Protein 25</i>
TYK2	Tyrosine Kinsase 2
UBE11	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7</i>
Ubch8	<i>Ubiquitin-Conjugating Enzyme H8</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vIRF	<i>viral Interferon Regulatory Factor</i>
VISA	<i>Virus-Induced Signaling Adapter</i>

VsV	Virus de la stomatite vésiculaire			
WCE	<i>Whole Cell Extract</i>			
ZAPS	<i>PARP-13</i>	<i>shorter</i>	<i>isoform</i>	(ZAPS

Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, **D^{re} Nathalie Grandvaux**.

Sans vous, je ne serais pas arrivé à la fin de cette M.SC. Votre patience, vos mots d'encouragement et votre exigence ont su faire de moi une meilleure personne. Comme je vous l'ai dit : « Je ne sais pas où la vie m'amène, mais je n'ai pas peur parce que je me sens prêt. »

Merci d'avoir cru en moi.

À mon parrain, **D^f Normand Brisson**, merci de votre appui.

À mes chers collègues,

Karin Fink, Espérance Mukawera, Xiaochun Guan, Nicolas Zucchini, Stéfany Chartier, Virginie Williams,

tant de souvenirs, tant de joie. Je vous souhaite le soleil. Merci de votre camaraderie, merci pour votre patience. Sachez que nous serons à jamais liés par cette grande aventure. Bonne chance dans vos plans futurs.

Merci aux anciens et à mes collègues du CHUM :

Genevieve Cormier, Rita Douangpanya, Annick Duval, Lisa Giovannini-Chami, Yves Nzengue, Alexis Martel, Anton Saucy-Faulkner, Marc André Leduc, Jean-Francois Spinella.

Malek Jundi, Hassen Kared et Sandy Pelletier.

Nani gigantum humeris insidentes

Merci à mes géants :

Christine Michaud, Calina Ellwand, Léanne Leclerc,

Isabelle Deschamps, Daniel Trojand, Joel Ryan,

John Basso

Huguette Yoboua, Felix Aman Yoboua, Jean-Rodrigue Yoboua, Réginald Yoboua et

Siriki Diabagaté.

Grâce à vous, j'ai pu escalader cette montagne!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le virus respiratoire syncytial (RSV)

1.1.1 Introduction au Virus Respiratoire Syncytial

Le RSV est un virus ubiquitaire qui cible les cellules épithéliales du tractus respiratoire. Il est membre de la famille *Paramyxovirus*, et appartient au genre *Pneumovirus* [1, 2]. Son génome à acide ribonucléique (ARN) simple brin contient plus de 15 000 bases et est d'une polarité négative [1, 2]. Sous le microscope, on observe deux formes de RSV, une forme filamenteuse de 10 μm de long et une forme sphérique ayant un diamètre entre 80 à 500 nm [3, 4]. La différence de forme n'a pas d'impact sur la virulence du virus. Le génome du RSV code pour 10 protéines : la petite protéine hydrophobique (*Small hydrophobic protein* [SH]), la protéine de fusion (F), la nucléocapside majeure (N), la phosphoprotéine (P), la grande polymérase ARN-ARN dépendante (*large RNA RNA polymérase subunit* [L]), la grosse glycoprotéine (G), la protéine matricielle 1 (M1), la protéine matricielle 2 (M2), la protéine non structurale 1 (NS1) et la protéine non structurale 2 (NS2) [1] [2].

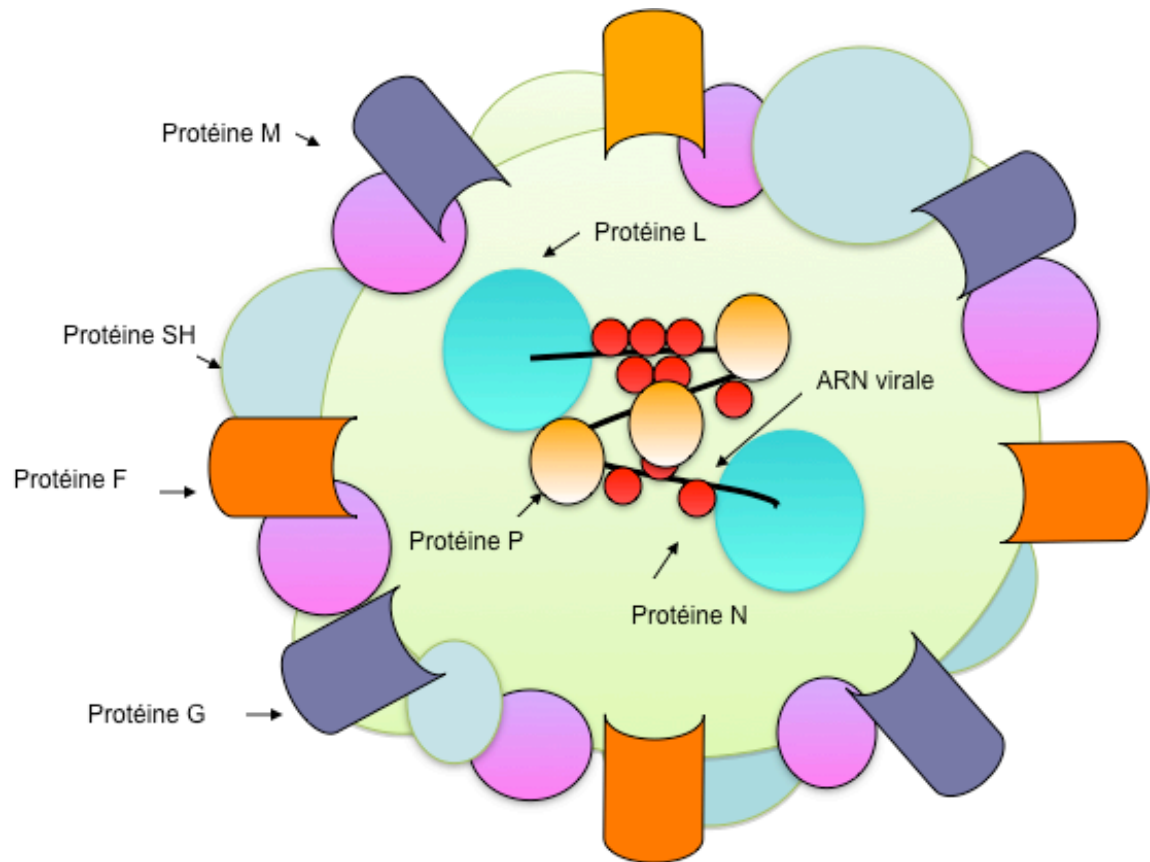


Figure 1-1 : Représentation schématique de la structure du RSV

Illustration du virus RSV montrant les différentes protéines virales ainsi que l'ARN viral. Les protéines F, G et SH participent à l'attachement et à l'entrée du virus. Elles sont situées sur la capsid du virus. La protéine M existe sur deux isoformes, soit M1 et M2. Seulement une forme est représentée dans le schéma. Deux protéines virales ne sont pas représentées dans le schéma : NS1 et NS2. Les protéines NS1 et NS2 ne sont pas empaquetées dans le virus. Adaptée de [1].

Les populations à risque de développer une maladie sévère à la suite d'une infection au RSV sont les nourrissons, particulièrement les nouveau-nés prématurés, les immunodéprimés et les aînés [1, 2]. Le taux d'infection au RSV varie par rapport aux saisons et au climat. Les cliniciens observent une augmentation du taux de cas d'infections par le RSV durant les saisons pluvieuses ou hivernales [5, 6]. Les études de sérologie démontrent que tous les individus seront infectés au moins deux fois par ce pathogène avant l'âge de 3 ans [1, 2].

1.1.2 Impacts socio-économiques de l'infection par le RSV

Découvert à Baltimore, dans une colonie de chimpanzés en 1956 [7], le RSV fut rapidement reconnu comme un pathogène ayant de graves répercussions sociales et économiques. Le RSV cause une infection aiguë des voies respiratoires inférieures. Entre 50 et 70 % des bébés seront infectés par ce virus avant l'âge de 1 an et 100 % avant l'âge de 3 ans [1, 2, 8, 9]. Selon Sampalis et coll., entre 6000 et 12500 individus sont hospitalisés annuellement au Canada pour des complications suivant une infection aiguë au RSV [10]. Aux États-Unis, on estime que 100 000 jeunes sont hospitalisés chaque année en raison de complications engendrées par une infection au RSV [9]. Dans ce pays, les particuliers déboursent, chaque année, entre 300 et 585 millions de dollars pour assurer le traitement des personnes infectées [9]. Les dépenses attribuées au RSV sont justifiées par le grand nombre d'infections. Chez les aînés, le RSV est responsable de 10 % des hospitalisations hivernales dont 10 % de ces cas seront fatals [11]. On estime qu'environ 1 à 2,5 % des cas de RSV chez les jeunes requière une hospitalisation [11]. La majorité des hospitalisations causées par le RSV sont attribuées aux bébés à risques : enfants prématurés, jeunes ayant des défauts cardiovasculaires et poupons nés avec un poids inférieur à la norme [12]. Le taux de mortalité chez les enfants hospitalisés à risques est de 3 %. Pour les enfants non à risques, le taux diminue à 1 % [10]. À l'échelle du globe, L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'il y aura 64 millions de nouvelles infections du RSV annuellement et que 160 000 décès seront liés a ce virus[12].

1.1.3 Pathogenèse

L'infection par le RSV provoque la formation de syncytia. Le syncytium est une entité multicellulaire créée par la fusion de membranes plasmiques de cellules unicellulaires. Durant une infection par le RSV, le syncytium est créé par l'entremise de la protéine F [13]. La formation du syncytium permet la transmission de particules virales de cellule à cellule [14].

Une infection par le RSV débute quand des particules virales pénètrent l'organisme par les voies nasales ou oculaires [15]. À la suite de l'invasion initiale, le virus pénètre dans les cellules nasopharyngiennes pour s'y incuber pendant 2 à 8 jours [15]. Les particules virales synthétisées durant la phase de réplication, pénètrent dans les poumons par

l'inspiration de sécrétions nasales [15]. La phase de réplication du RSV a lieu durant la période d'incubation.

Une maladie grave induite par le RSV chez les bébés est la bronchiolite. La bronchiolite est une maladie des voies respiratoires impliquant les bronchioles. La petite taille des bronches des nouveau-nés rend cette population particulièrement vulnérable aux effets néfastes de sécrétions excessives de mucus et de l'inflammation excessive conduisant à l'enflure des parois provoquée par la réplication du RSV. Ces deux processus bloquent les bronches rendant difficile la respiration de l'enfant. Lors d'une bronchiolite, on observe une toux, une inflammation menant à une destruction des cellules épithéliales et un œdème menant à une infiltration prononcée de cellules immunitaires.

En effet, une infection par le RSV stimule la sécrétion de plusieurs cytokines et chimiokines qui peuvent influencer les tissus environnants. Les cellules épithéliales infectées par le RSV sont capables de relâcher des cytokines pro-inflammatoires telles que *Regulated upon Activation, Normal T-Cell expressed and Secreted* (RANTES), *Interleukin* (IL)-8, IL-6, IL-1 β , IL-10 et *Tumor Necrosis Factor - alpha* (TNF - α) [16-18]. Le relâchement de ces cytokines contribue à une réponse inflammatoire exagérée et pathogénique des tissus infectés. Des anticorps neutralisant contre RANTES ou l'ajout d'un compétiteur de RANTES réduisent les dommages liés à l'inflammation [19, 20]. Pareillement, des souris *knockouts* (KO) pour *Macrophage inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1 α) démontrent une histologie normale à la suite d'une infection par le RSV [21]. Ces données soulignent l'importance de l'inflammation au moment du développement de pathologies respiratoires suivant une infection par le RSV.

L'asthme est une autre maladie qui est associée au RSV. L'asthme est une affection chronique des voies respiratoires provoquant la sibilance. Une infection au RSV provoque une réponse immunitaire modifiée par les cellules *T -Helper* (TH)-2 [12]. Ce phénomène stimule le recrutement des éosinophiles qui a pour effet de sensibiliser les tissus respiratoires et peut avoir des répercussions à long terme. Ce changement semble prédisposer un individu infecté sévèrement au développement de l'asthme à l'adolescence. Toutefois, les études ne font pas l'unanimité. Bien que l'ensemble de la population sera infecté par le RSV, tous ne développeront pas l'asthme [22-24]. Il existe donc d'autres facteurs qui régissent le développement de l'asthme après une infection au RSV. Est-ce que ceux qui sont sévèrement

affectés par le RSV portent une mutation qui les prédispose à l'asthme? La réponse reste à être déterminée [22-24].

Ce qui est consternant par rapport au RSV est qu'il n'existe aucun traitement efficace ou vaccin contre le pathogène. Les premières études cliniques de vaccins utilisant un virus inactivé au formol furent un échec à cause d'une augmentation de la sévérité des infections à la suite d'une réinfection par le RSV environnant [25]. Dès lors, des hypothèses furent émises sur le rôle du système immunitaire de l'hôte dans le développement de maladie suivant une infection au RSV. Un autre vaccin contre le RSV basé sur un virus affaibli par une période de passage au froid s'est avéré instable et non atténué [26]. Pour ce qui est des antiviraux, le *1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide* (Ribavarin), un analogue de l'adénosine et de la guanine limitant la réplication, est utilisé à des fins prophylactiques dans des populations à risque [27]. Au Canada, le Palivizumab, un anticorps monoclonal spécifique contre le RSV est recommandé pour les enfants à risques élevés. Il n'existe pas de consensus entre les professionnels de la santé concernant un traitement particulier contre le RSV.

1.1.4 La biologie moléculaire de RSV

Le virion de RSV est recouvert d'une couche bilipidique ensemencée par des pointes saillantes. Ces pointes sont des protéines transmembranaires hautement glycosylées nommées protéines F, G et SH [1, 2]. Le rôle des protéines F, G, et SH est de faciliter la capture et l'entrée du virus. À l'intérieur du virion, on retrouve la nucléocapside qui forme un complexe avec l'ARN simple brin du RSV [1, 2]. À l'intérieur, on retrouve aussi les protéines L, M2 et P [1, 2]. Il existe également deux protéines qui ne sont pas empaquetées dans le virus mature, soit les protéines NS1 et NS2 [1, 2]. La figure 1 illustre l'organisation du virus.

1.1.4.1 La protéine G

La protéine G est hautement glycosylée et possède deux fonctions:

1. La forme transmembranaire de la protéine G est une des protéines responsables de l'attachement du virus aux cellules [28]. Des anticorps neutralisants ciblant la protéine G sont capables de bloquer l'entrée du virus [28]. Le mécanisme d'action de la protéine G est complexe. La protéine G s'attache aux protéoglycane des cellules épithéliales et est aussi capable d'interagir avec le récepteur du CX3CR1 (*chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*) et le récepteur de l'annexin II localisé dans le feuillet extracellulaire de la membrane plasmique

des cellules immunitaires [29-31].

2. La forme soluble de la protéine G est sécrétée par exocytose. Elle contribue à la réponse immunitaire. Les études basées sur des virus recombinants déficients dans la production de la protéine G soluble montrent une augmentation des protéines *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* (I-CAM), IL-8 et RANTES suivant une infection [32]. Une autre étude démontre que la protéine G est capable d'inhiber l'induction de l'interferon (IFN)- β produite à la suite de l'activation des *Toll-like Receptors* (TLR) 3 et 4 [33].

La variation génétique au niveau de la protéine G est la base pour la distinction des deux sous-groupes du virus RSV [2]. Les sous-groupes A et B varient par rapport à leurs virulences. Une étude démontre que les gens infectés avec le sous-groupe A requièrent plus fréquemment une hospitalisation que ceux infectés avec un RSV du sous-type B [34].

1.1.4.2 La protéine F

La protéine F est une glycoprotéine qui intervient lors de la fusion du virus avec la membrane plasmique de la cellule et lors de la formation de syncytia entre cellules infectées. La protéine F fut découverte quand un anticorps neutralisant bloqua la formation de syncytia [14] lors d'un essai biochimique. La protéine F est synthétisée sous une forme inactive nommée F0 ayant une longueur de 574 acides aminés. Suivant sa synthèse, la protéine F0 est clivée par une protéase de type Furin [30]. Sa résultante est deux polypeptides liés à des ponts disulfures. La protéine F est divisée en trois régions hydrophobes : la première région régit le passage à travers le reticulum endoplasmique lors de la synthèse. Elle est située dans la section N-terminale de la protéine. La deuxième section est responsable de la fusion du virus et de la cellule. Elle est située dans le milieu de la protéine [30]. La troisième section est la protéine transmembranaire est située dans la région C terminale de la protéine. La région C-terminale ancre la protéine F aux virus ce qui permet à la protéine F de s'accrocher aux cellules cibles. Le mécanisme par lequel la protéine F agit comme intermédiaire dans la fusion n'est pas bien défini. Cependant, des études démontrent que la protéine F interagit avec l'héparine [30]. Il se pourrait donc que la protéine F médie la fusion cellulaire en utilisant le récepteur de l'héparine. Un médiateur intracellulaire de la formation de syncytia est la molécule GTP (Guanine tri-phosphate)ase *Ras homologue family member A* (RhoA) [35]. Un antagoniste de la protéine RhoA empêche la formation de syncytium [35].

1.1.4.3 La protéine N

La protéine N est la protéine qui compacte l'ARN viral. Elle est composée de 391 acides aminés [30]. Les liaisons entre la protéine N et l'ARN viral ne sont pas spécifiques.

1.1.4.4 La protéine P et L

La protéine P est une protéine de 241 acides aminés ayant deux fonctions [30]. Premièrement, elle est un cofacteur important pour l'ARN polymérase dépendant de l'ARN L (Protéine L). Deuxièmement, en interagissant avec la protéine N en tant que chaperone, elle confère une spécificité aux liaisons ARN – protéine entre les protéines N et l'ARN viral [30]. La polymérase L transcrit le génome à ARN lors de la phase de réplication du virus.

1.1.4.5 Les protéines non structurales NS1 et NS2

Afin de permettre une infection efficace des tissus humains, les virus pathogènes ont, au cours de l'évolution, développé des caractéristiques qui leur permettent d'atténuer les actions de la réponse immunitaire de l'hôte. Dans le cas du RSV, les protéines NS1 et NS2 permettent au virus d'échapper à la réponse antivirale. NS1 et NS2 sont deux protéines non homologues ayant une longueur de 139 et 124 acides aminés respectivement [36]. Elles ne sont pas empaquetées dans le virion [37]. Cette observation fut réalisée en analysant le patron de migration de cellules infectées au RSV et en les comparant avec le patron de migration de virus purifié sur gel SDS page. Une analyse du patron de migration du virus purifié révèle que les bandes marquées à la méthionine radioactive correspondantes aux protéines NS1 et NS2 ne sont pas présentes dans les extraits du virus. Des données issues d'un immunobuvardage de type western démontrent une localisation nucléaire et cytoplasmique [38]. Cependant, une analyse par microscopie immunofluorescence indirecte démontre que la localisation de NS1 et NS2 n'est que cytoplasmique [39]. La différence des données peut être due aux différentes méthodologies utilisées. Il est important de noter que l'étude qui démontre la localisation cytoplasmique des protéines NS1 et NS2 utilise une approche basée sur l'expression ectopique des protéines et que cette approche ne réplique pas les conditions d'une infection virale. Il est possible que NS1 et NS2 doit interagir avec d'autres protéines virales pour migrer dans le noyau. Le deuxième groupe utilise un virus recombinant. Cette approche simule plus adéquatement les conditions d'une infection réelle.

Les études explorant le rôle de NS1 et NS2 dans un contexte humain ont été faites initialement avec des virus recombinants délétés NS1 et NS2 (RSV Δ NS1 Δ NS2). Les

chercheurs commentent que l'absence des protéines non structurales n'a pas empêché la réplication du RSV. Paradoxalement, le titre du virus issu d'infection recombinante non modifiée (rRSVwt) et RSV Δ NS1 Δ NS2 était inférieur au titre du virus issu de cellules infectées avec un virus *sauvage* type non recombinant [40, 41]. Ceci est probablement dû au fait que l'intégrité génomique du virus recombinant est modifiée. Ceci est une faiblesse méthodologique qui sera abordée dans la section discussion.

Des analyses démontrent que l'absence de NS1 et NS2 diminue toutes les protéines virales à la suite d'une infection virale, ainsi que l'ARN de la protéine N [41]. La protéine N étant une des premières protéines synthétisées est souvent utilisée comme marqueur pour évaluer la réplication du RSV. Les chercheurs récapituleront leurs observations, *in vivo*. L'absence de NS1 ou NS2 chez le chimpanzé et le *Silvalagus* diminue le titre de virus [41, 42]. Le fait que l'infection est atténuée chez les chimpanzés infectés par le RSV Δ NS1 Δ NS2, rend ces virus recombinants intéressants pour le développement de vaccins atténués.

1.2 Le système immunitaire

Au cours de l'évolution, les organismes pluricellulaires ont acquis des mécanismes de défense contre des pathogènes capables de compromettre leur intégrité homéostatique. Chez les vertébrés, le système immunitaire est divisé en deux sous-groupes non distincts : l'immunité innée et l'immunité adaptative [43-45]. L'immunité innée relève des habiletés non spécifiques de l'organisme à détecter et à neutraliser des pathogènes. Le corps envahissant n'est pas reconnu « spécifiquement ». Afin de générer la mémoire spécifique, le corps doit activer la réponse adaptative par l'entremise de la réponse innée [43-45]. L'immunité adaptative permet à l'organisme de reconnaître un élément « non-soi » et d'émettre une réponse spécifique capable de neutraliser le pathogène [43-45]. À la suite de l'engagement contre le pathogène, il y a établissement d'une mémoire immunologique.

Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs ne sont pas mutuellement exclusifs. Les différentes composantes de ces deux milieux participent conjointement à la résolution du conflit entre l'hôte et le non-soi [43-45]. À titre d'exemple, les chimiokines secrétées par des cellules non immunitaires comme les cellules épithéliales attirent les lymphocytes au site d'infection lors d'une infection virale [43-45]. Ensemble, le système inné et le système adaptatif assurent la bonne défense de l'hôte.

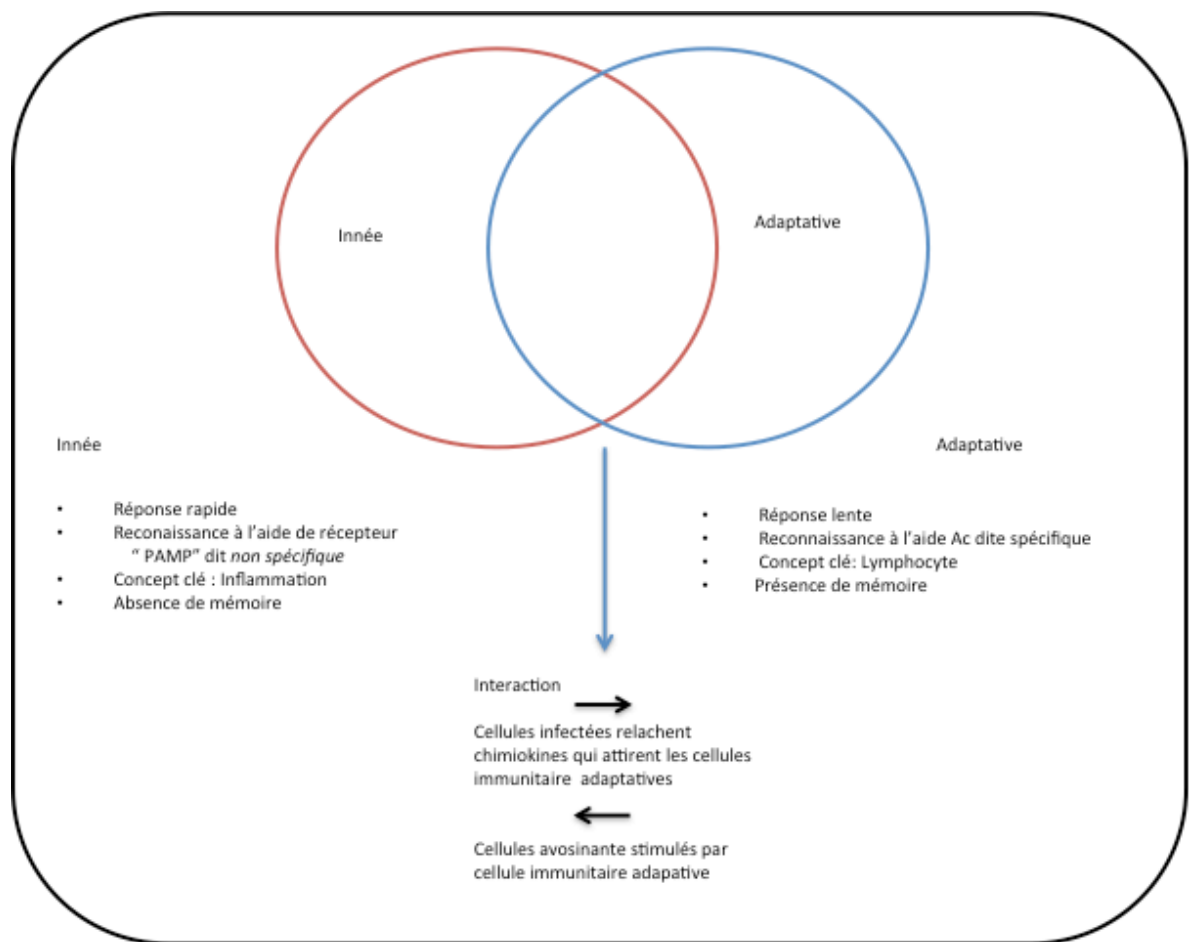


Figure 1-2 : Diagramme de Venne illustrant les différentes caractéristiques de l'immunité innée et l'immunité adaptative

La réponse immunitaire peut être divisée en deux parties non distinctes. La réponse immunitaire adaptative est plus lente et génère une mémoire immunologique. La réponse immunitaire innée est rapide, mais ne génère pas de mémoire coordonnant l'activation de la réponse adaptative

1.2.1 Les cellules du système adaptatif

Le système immunitaire adaptatif a plusieurs types cellulaires nommés globule blanc ayant des fonctions spécifiques lors de la résolution d'infection pathogénique [192,194]. Les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B sont des cellules présentatrices d'antigènes (APC) [43-45]. Leur rôle est d'activer des cellules effectrices nommées lymphocytes cytotoxiques une fois qu'elles ont détecté un pathogène [43-45]. Avant d'avoir reçu le signal d'activation de la part des cellules APC, les cellules cytotoxiques sont naïves et ne peuvent pas effectuer une action antimicrobienne. Les lymphocytes cytotoxiques sont catégorisés en deux groupes qualifiés par la présence de marqueurs CD (*cluster of differentiation*) 4+ et CD8+ [193,194]. Les CD8+ interviennent sur des corps intracellulaires tels que le mycoplasme et virus, tandis que les CD4+ interviennent sur des corps extracellulaires tels que les bactéries extracellulaires [43-45]. Les neutrophiles sont capables de phagocyter les bactéries, les éosinophiles combattent les parasites, les basophiles contribuent à la formation de réaction allergique, les lymphocytes B produisent des anticorps et les cellules NK sont des cellules antitumorales et antivirales [43, 45].

1.2.2 La réponse immunitaire innée

La première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes est une barrière physique qui sépare l'extérieur et l'intérieur de l'organisme. Dans le contexte de RSV, un exemple de barrière mécanique qui protège les tissus sensibles est la muqueuse du tractus respiratoire. Dans la muqueuse respiratoire, on retrouve deux collectines nommées *Surfactant Protein* (SP)-A et SP-D qui lient les protéines F et G du RSV [46-49]. La liaison de SP-A et SP-D agit d'une manière analogue à l'opsonisation puisqu'elle augmente la capture du RSV par les monocytes et les macrophages [46-49]. De plus, l'épithélium pulmonaire forme une couche étanche protectrice qui empêche l'intrusion des pathogènes vers des tissus plus sensibles.

Un autre mode de défense innée contre les pathogènes est l'établissement d'un état inflammatoire. L'inflammation est un processus physiologique qui permet d'attirer les cellules immunitaires au site d'infection. Elle est caractérisée par une augmentation du débit de sang à la zone infectée et une augmentation de la perméabilité des capillaires pour faciliter la diffusion des leucocytes [192-194]. Au niveau cellulaire, l'un des facteurs de transcription qui contrôle l'inflammation des tissus est *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB). Ce dernier module le métabolisme cellulaire et active un état de

réponse au stress. Les gènes régulés par NF- κ B sont divers. Par exemple, NF- κ B est capable de moduler la réponse antivirale. Avec l'aide de IRF (*Interferon Regulatory Factor*)-3, AP-1(*Activated Protein-1*), et l'histone acétyltransférase CBP (*cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein*), NF- κ B va former un *enhanceosome*. Le *enhanceosome* est un complexe qui induit l'expression de l'IFN- β [50]. NF- κ B va permettre l'induction de multiples cytokines et chimiokines tel que TNF- α qui régule l'apoptose [51], le recrutement des cellules et l'activation des cellules immunitaires. NF- κ B va aussi réguler l'expression de molécules d'adhésion qui permettent de recruter des cellules immunitaires. NF- κ B va aussi permettre l'expression des molécules telles que *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), oataxin 1 et IL-8, qui peuvent activer les cellules macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles respectivement [52-56].

Une autre composante de la réponse immunitaire innée est la réponse antivirale. Bref, la réponse antivirale concerne les procédés physiologiques cellulaires qui empêchent la réplication du virus. Elle dépend de l'expression de multiples gènes dont l'activité permet de limiter la production de nouveaux virus, tels que *Mixovirus resistance protein A* (MxA), *RNA-dependant protein kinase* (PKR), et 2,5 OAS.

1.3 Senseur/récepteur impliqué dans la réponse antivirale

Afin de combattre les infections virales, les cellules humaines font appel à des détecteurs nommés *Pattern recognition receptor* (PRR) qui sont capables de reconnaître des motifs portés par les pathogènes, connus sous le nom de *Pathogene Associated Molecular Pattern* (PAMPs). À la suite de la reconnaissance de PAMPs, les PRR activent une cascade de signalisation qui aboutit majoritairement à la production d'interférons, les cytokines antivirales principales pouvant régir un état de résistance globale aux infections virales.

1.3.1 Les Toll-Like Receptors (TLRs)

Les TLRs sont une famille de PRR qui reconnaît une panoplie de ligands et du même fait, une grande variété de pathogènes. Chez l'humain, il y a dix TLRs qui sont capables de reconnaître une panoplie d'organismes. La localisation des TLRs est extracellulaire, ce qui permet à l'organisme de surveiller le milieu interstitiel ainsi qu'endosomal. La localisation de TLR dans les endosomes permet aux cellules de surveiller la voie d'entrée de plusieurs virus. La localisation endosomique des TLR protège aussi l'hôte, puisque les macromolécules de l'organisme sont séquestrées du senseur et ne peuvent faussement enclencher les TLR.

TLR-3 reconnaît l'ARN double brin viral, TLR-9 reconnaît l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral produit par des virus (tels que les virus de type herpes) et enfin, TLR-7 et TLR-8 reconnaissent l'ARN simple brin [57-63]. TLR-4, qui reconnaît majoritairement le LPS des bactéries Grams négatifs, a également été montré comme récepteur des protéines glycosylées, portées par certains pathogènes tel que le RSV.

La cascade de signalisation qui mène à l'activation de la réponse immunitaire suivant la détection d'un PRR dépend du TLR activé. Par exemple, les TLR 7, 8 et 9 activent la réponse pro-inflammatoire par l'entremise de l'adaptateur *Myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88) qui est complexé à la suite de son activation aux protéines IRAK1(interleukin-1 receptor- associated kinases), IRAK4 et *TNF receptor-associated factor -6* (TRAF6) [57-63]. Cette association mène à l'activation de *Activator Protein-1* (AP-1), de NF- κ B ainsi que des IFNs par l'activation des *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPKinases) et du complexe IKK et IRF-7[57-63]. L'activation de TLR-3, mène à l'activation de l'adaptateur *Toll/IL-1 receptor domain* (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) et non MyD88. TRIF active les kinases IKK ϵ et TBK1 (TANK-binding kinase 1) qui activent IRF-3 [57-63]. TRIF active aussi NF- κ B via IKK[64].

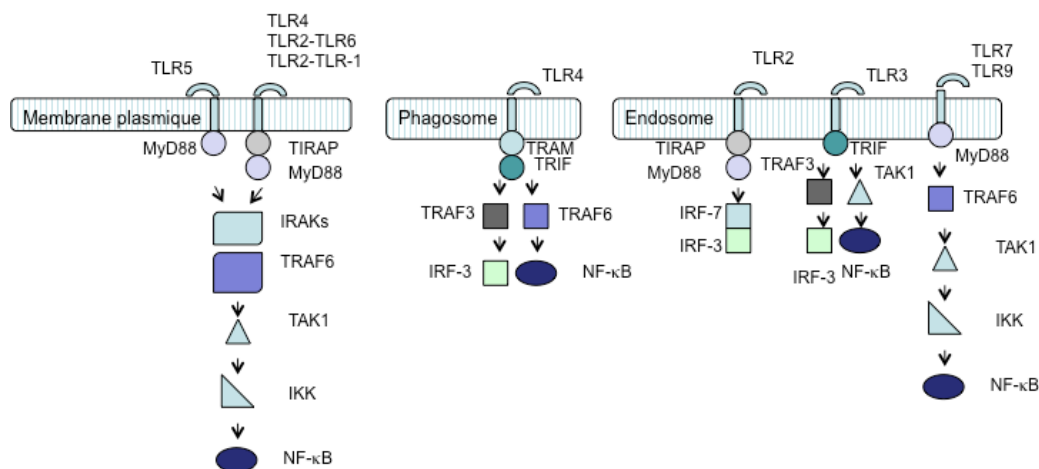


Figure 1-3 : Schématisation de la cascade de signalisation des TLRs

Les TLR sont des senseurs capables de reconnaître des composantes microbiennes. TLR-3 et TLR-4 activent la réponse antivirale et inflammatoire par l'entremise de l'adaptateur TRIF. Les TLR-7, TLR-9, TLR-1, TLR-6, TLR-2 et TLR-4 signalent à travers l'adaptateur MyD88. Schéma inspiré de [57-63].

1.3.2 Les RLRs

Hormis les TLR, les *Retinoic acid Inducible Gene-I* (RIG-I) Like Receptors (RLRs) sont une classe de récepteurs cytosoliques qui participent à la détection et à l'initiation de la réponse antivirale suivant la détection d'ARN viral. Dans cette famille, on retrouve trois protéines homologues portant un motif DexD/H box ARN Helicase [65] soit : RIG-I, Melanoma differentiation associated factor 5 (MDA5) et Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). La structure de RIG-I et de MDA5 est similaire. Elle est divisée en trois modules. Du côté N-terminal des protéines on retrouve 2 répétitions du domaine *Caspase Activation and Recruitment Domains* (CARD) [65]. Ce domaine permet l'interaction avec d'autres protéines portant des motifs CARD. Au centre de la protéine, on retrouve la boîte DexD/H qui est capable d'hydrolyser l'adénosine triphosphate (ATP) et de dérouler l'ARN messager (ARNm). À l'extrémité C terminale, de RIG-I et de MDA5, on retrouve un domaine répresseur. RIG-I a un deuxième domaine de répression qui lui permet de subir des modifications post-traductionnelles additionnelles. LGP2 ne contient pas de domaine CARD [65-71], la protéine n'est donc pas capable de signaler la présence d'ARN viral. Cependant, une étude récente démontre que des cellules de souris KO pour LGP2 ne sont pas capables de produire de l'IFN- β lorsqu'infectedes avec certains virus comme le ECMV, le virus Mengo ou le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [71]. De plus, l'infection avec d'autres virus comme le virus Sendai (SeV), le virus Reo et le virus d'encéphalite japonaise (JeV) produisent un taux inférieur d'IFNs. Une mutation au niveau du domaine de liaisons de l'ATP de LGP2 démontre que ce domaine est important, mais pas essentiel à la bonne production d'IFNs [71]. Finalement, la surexpression de MDA5 et de RIG-I peut inverser le phénotype. Ceci sous-entend que l'action de LGP2 se situe en aval de RIG-I et MDA5. Le rôle de LGP2 est d'agir comme régulateur positif de RIG-I et MDA5 afin de moduler plus finement l'activation de ces derniers [71].

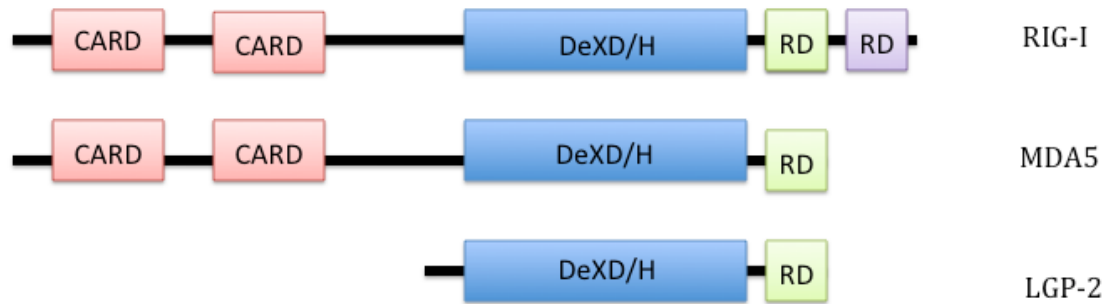


Figure 1-4 : Structure primaire des RLRs

RIG-I, MDA-5 et LGP2 sont trois senseurs cytosoliques homologues. Les trois protéines contiennent un domaine hélicase DeXD/H fonctionnel capable d'hydrolyser l'ATP et d'interagir avec l'ARN. Les domaines CARDS sont des domaines de signalisation permettant d'interagir avec (*mitochondrial antiviral signalling*) MAVS située à la mitochondrie. LGP2 ne contient pas de domaine CARD. Chaque protéine a, au moins, un domaine de répression. Inspirée de [72]

Pour ce qui est de la spécificité, RIG-I et MDA5 ne reconnaissent pas les mêmes virus [73-78].

Table I : Liste des différents pathogènes reconnus par RIG-I et MDA5

Virus/PAMPS reconnu par RIG-I	Virus/PAMPS reconnu par MDA5	Virus/PAMPS reconnu par RIG-I et MDA5
Virus Sendai	Virus encéphalomyélite	Virus de l'encéphalite japonaise
Virus de la Maladie de Newcastle	Theilovirus	Virus de la Dengue
Virus respiratoire syncytial	Virus Mengo	Virus du Nil occidental
Virus de la rougeole	Virus vaccina	Réovirus
Virus Nipah		
Virus parainfluenza		
Virus de la stomatite vésiculaire		
Virus de la rage		
Virus influenza A		
Virus influenza B		
Virus Ebola		
Virus Lassa		
Lymphocytic choriomeningitis virus		
Fièvre de la vallée du Rift		
Le virus de l'hépatite C		
Le virus hépatique murin		
Le norovirus-1 murin		
Virus d'Epstein-Barr		
Le virus de myxoma		
ARN transcrit <i>in vitro</i>	poly : IC	
<i>Legiona pneumophilla</i> (via Polymerase III)		

À la base de ces différences sont les caractéristiques des molécules virales qui sont reconnues par les récepteurs. Les études explorant ces molécules sont relativement récentes, leurs rôles physiologiques commencent à être compris. Par exemple, il a été montré que des molécules d'ARN ayant un motif triphosphate en 5' UTR co-immunoprécipitent spécifiquement avec RIG-I lors de test *in vitro* [79]. De plus, l'ajout de motifs triphosphate à de l'ARN active une production robuste d'IFN à la suite d'une transfection [79]. Cette

production d'IFN est spécifiquement abolie en absence de RIG-I. Cette observation suggère que le motif reconnu par RIG-I est l'ARN portant des triphosphates en 5'UTR. Cependant, des molécules d'ARN viraux du virus de l'hépatite C (HCV) portant des motifs triphosphate en 5' UTR sont incapables d'activer RIG-I, une fois dénudées de leurs motifs poly U/R [80]. Donc, une combinaison de motifs triphosphates et de séquences poly U/R semble contribuer à l'activation de RIG-I. Dans le cas de MDA5, l'absence de la méthylation au niveau de la coiffe est une structure portée par plusieurs ARN viraux. Une étude démontre que l'absence de la méthylation sur l'ARN au ribose 2 augmente l'induction des IFNs [81]. Cette même étude démontre que MDA5 est activée par cette absence.

Quand RIG-I interagit avec l'ARN viral, il se produit un changement de conformation qui expose le domaine CARD du récepteur. La nouvelle conformation de la protéine permet l'homooligomérisation de RIG-I, ainsi que des interactions avec d'autres protéines portant un domaine CARD [82]. MAVS est une protéine d'échafaudage portant un domaine CARD localisé dans le feuillet externe de la membrane plasmique de la mitochondrie et est impliqué dans la signalisation immunitaire [83, 84]. Une fois que RIG-I est activé, il est capable d'interagir avec MAVS [85]. Cette interaction aboutit à l'activation de TRAF3, une ubiquitine ligase qui permet l'activation des kinases IKK ϵ et TBK1 [83, 85-87]. Ces kinases phosphorylent les facteurs IRF-3 et IRF-7, ce qui aboutit à l'activation de la réponse antivirale [85-87]. L'interaction entre MAVS et RIG-I active aussi la réponse pro-inflammatoire par l'activation de NF- κ B [85-87]. TRAF6 est un puissant commutateur impliqué dans la réponse inflammatoire. Nous avons démontré que l'activation de RIG-I active NF- κ B en passant par TRAF6 [88]. Comme RIG-I et MDA5 interagissent avec MAVS, [85] le modèle de signalisation en aval de MDA5 est identique à celui de RIG-I.

1.3.3 Les facteurs régulant RIG-I.

Les cascades de signalisation activées par MDA5 et RIG-I peuvent être modulées par plusieurs facteurs protéiques, dont *Tripartite motif protein 25* (TRIM25), *Ring finger protein 125* (RNF125) et *PARP-13 shorter isoform* (ZAPS) (ZAPS). Ces modulateurs permettent un contrôle plus fin de la réponse antivirale. Avant que RIG-I puisse être activé, TRIM25, une ubiquitine ligase de types 3, doit polyubiquitiner RIG-I à la lysine 63 [89]. L'absence de TRIM25 anéantit la production d'IFNs suivant une stimulation virale. NS1, une protéine virale d'Influenza qui interagit avec TRIM25, est capable de bloquer l'ubiquitination de RIG-

I abolissant ainsi la voie de signalisation de RIG-I lors d'une infection. RNF125 est une ligase ubiquitine de type 3 qui, lorsqu'activée, transfère une ubiquitine à des protéines cibles, dont RIG-I [90]. Le transfert d'ubiquitines par RNF125 à ces protéines induit leurs dégradations par le protéasome. L'expression de RNF125 est augmentée par les d'IFNs. Ceci crée une boucle autorégulatrice négative suivant un stimulus. ZAPS est une molécule qui promeut l'oligomérisation de RIG-I [82]. L'augmentation de ZAPS augmente la signalisation cellulaire de ce récepteur.

1.3.3 Les facteur régulant MDA5.

Un autre niveau de régulation est l'interaction de MDA5 avec DAK. DAK est une protéine métabolique qui lie MDA5 et non RIG-I [91]. Lorsque surexprimé, DAK interagit avec MDA5 et diminue la production d'IFN suivant un stimulus. À l'opposé, MDA5 est sumolyé par *protein inhibitors of activated Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) 2 (PIAS2b)* [92]. Le transfert d'une molécule de *Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)* augmente la production de IFN – β à la suite d'un stimulus.

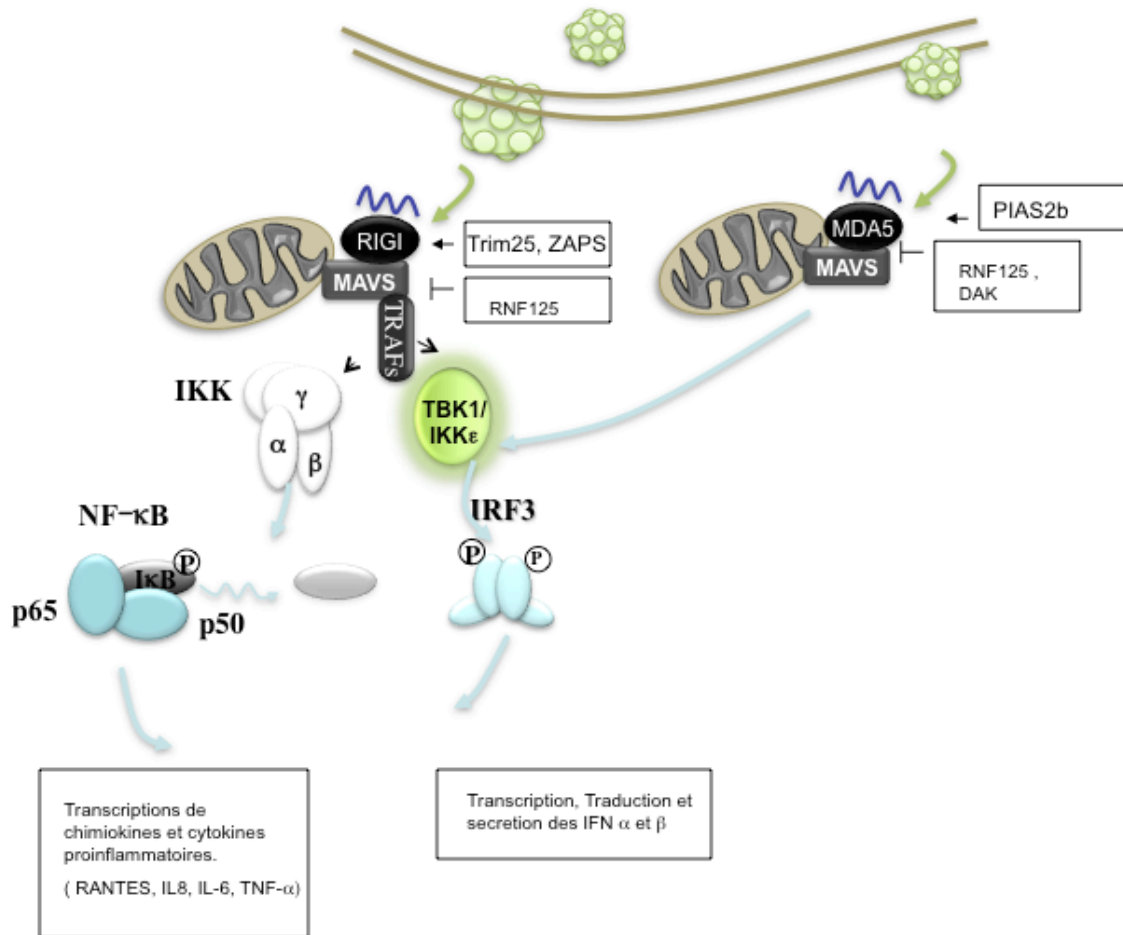


Figure 1-5 : Cascade de signalisation de RIG-I/MDA5

L'ARN viral est capté par RIG-I et MDA5. Cet événement permet l'oligomérisation du senseur ainsi que l'interaction avec son adaptateur MAVS. Pour ce faire, RIG-I doit être ubiquitiné par TRIM25. Éventuellement, TBK1, IKK ϵ et IKK γ seront activés par TRAF2 et TRAF6 respectivement. Ceci mènera à l'activation de NF- κ B et IRF-3. L'activation de RIG-I dépend des facteurs RNF125 ainsi que ZAPS. MDA5 est régulé par RNF125 et DAK est régulé pas PIAS2b. [74]

1.3.4 PKR

PKR est un modulateur important de la réponse antivirale. Elle régule la synthèse protéique ainsi que l'apoptose dans les cellules infectées [93-96]. PKR est faiblement exprimée dans toutes les cellules différenciées [93-96]. L'expression de PKR augmente après une infection virale. Cette augmentation causé par une augmentation d'IFN qui active la transcription du promoteur de PKR [93-96]. Comme RIG-I, PKR reconnaît l'ARN double brin portant un motif triphosphate [93-97]. Durant une infection virale, l'ARN viral li l'extrémité N-terminale de PKR . [98] La liaison de l'ARN viral à PKR provoque un changement de conformation qui active PKR [98]. PKR peut aussi être activée par l'ARNm de IFN- γ [99].

PKR est capable de se lier à une boucle à épingle localisée dans la séquence du 5' *Untranslated region* (UTR) de l'ARNm de IFN- γ [99]. L'activation de PKR est capable d'inhiber la traduction de plusieurs protéines en contrôlant le niveau de phosphorylation de *Eukaryotic translation initiation factor 2 α* (EIF2 α)-GTP. Quand, EIF2 α -GTP est phosphorylé la synthèse des protéines diminue. Dans les conditions où la protéine PKR n'est pas activée, le rôle de EIF2 α est d'initier la traduction en formant le complexe de préinitiation avec Met-ARN_i et la sous-unité ribosomale 40S. Par la suite, une molécule d'ARNm et la sous-unité ribosomale, 60s se lieront au complexe de pré-initiation provoquant le relâchement et l'hydrolyse d'EIF2 α -GTP en EIF2 α -GDP. EIF2 α -GDP n'est pas capable de former un complexe de préinitiation. Afin de pouvoir former un nouveau complexe d'initiation, EIF2 α -GDP doit échanger son GDP en GTP. Pour se faire, l'organisme cellulaire à recourt à la protéine guanine-EIF2b. Guanine-EIF2b est présent en quantité limitante dans les cellules eucaryotes. Quand EIF2 α est phosphorylé par PKR, EIF-2b n'est pas capable de se dissocier de EIF2 α et d'effectuer de nouveau l'échange de GTP à GTP chez EIF2 α -G. Cette séquestration d'EIF2b freine la synthèse protéique, puisque EIF2 α n'est plus capable d'initier la traduction[93-96]. En plus d'arrêter la traduction des gènes, PKR est un important modulateur de signalisation antivirale. PKR est capable d'activer NF- κ B en phosphorylant I κ B [100]. Une étude récente démontre que PKR agit dans une cascade de signalisation impliquant MAVS, TRAF3 et IRF-3 qui mène à l'activation d'ISG (*Interferon Stimulated Gene*) 15 [101]. ISG15 est un gène qui antagonise la réplication de virus dans un organisme infecté. Ce qui est particulièrement intéressant est que PKR n'utilise pas sa fonction kinase pour activer cette voie de signalisation, mais agit plutôt comme un adaptateur. Le rôle adaptateur de PRK semble devancer la détection par RIG-I [101], donc PKR serait potentiellement un des premiers PRR dans la réponse antivirale.

1.4 NF- κ B et la réponse inflammatoire

NF- κ B est un facteur de transcription qui régule une multitude de processus physiologiques. Son activation contribue à la bonne médiation d'un état d'inflammation parce que sa résultante est le relâchement de cytokines et de chimiokines qui attire des cellules immunitaires ou module le métabolisme intercellulaire de tissus face à un stimulus [102-106]. Les processus régulés par NF- κ B sont divers, mais de prime abord, NF- κ B régule

l'homéostasie cellulaire face à la réponse d'un stress. L'influence de NF- κ B s'étend à des processus connexes tels que la survie cellulaire, la prolifération, l'inflammation et la différenciation des tissus [102-106].

La famille de facteurs de transcription NF- κ B est composée de 5 sous-unités protéiques pouvant s'associer en homodimère et hétérodimère. NF- κ B est capable de lier la séquence consensus « KB ». Les membres de la famille NF- κ B sont : *c-reticuloendotheliosis viral oncogene homolog* (Rel), RelB (p50), p65, p100 et p105 [102-106]. Tous, à l'exception de p105 et p100, ont un domaine de transactivation (TAD), qui permet à ces protéines de moduler la transcription de gènes. La forme active de NF- κ B la plus commune est hétérodimère p65/p50. La voie classique de l'activation des dimères p65/p50 se déroule comme suit : Dans son état non activé, les dimères NF- κ B sont associés à une protéine inhibitrice nommée *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha* (I κ B α) [102-106]. Lorsque les dimères de NF- κ B ne sont pas activés, NF- κ B circule entre le noyau et le cytoplasme. Un équilibre s'installe entre l'importation et l'exportation de NF- κ B, favorisant une localisation cytoplasmique. Cet équilibre existe pour deux raisons. Premièrement, l'association entre I κ B α et p65 masque la séquence de localisation nucléaire (NLS) de p65, ce qui bloc la contribution de p65 à la migration dans le noyau [102-106]. Cependant, I κ B α ne bloque pas la séquence de localisation nucléaire de p50, ce qui permet en effet une migration du complexe p65/p50 dans les noyaux même en absence de stimuli. Lorsqu'inactive P65/p50 est associée dans le noyau I κ B α . I κ B α porte une séquence d'exportation nucléaire (NES). P65/p50 est exporté par le biais de son association avec I κ B α . Le processus d'exportation est plus efficace que le processus d'importation [102-106].

En présence d'un stimulus tel que le TNF- α , l'IL-1 ou la détection d'un virus par un PRR, I κ B α est dégradé, ce qui favorise une localisation nucléaire de NF- κ B [102-106]. Les activateurs de NF- κ B sont des stimuli qui activent le complexe I κ B Kinase (IKK) [102-106]. Le complexe IKK est composé de trois membres, deux kinases nommées IKK α et IKK β et d'une protéine d'échafaudage nommée IKK γ (ou NEMO(*NF- κ B essential modulator*)) [102-106]. L'activation du complexe IKK mène à la phosphorylation d'I κ B α sur les Serines 32 et 36, ce qui engendre une polyubiquitiation, suivie d'une dégradation de cette protéine par le protéasome. Une fois qu'I κ B α est dégradé, NF- κ B est capable de migrer dans le noyau et

moduler la transcription de gène NF- κ B dépendant. Lors d'une infection au RSV, nous avons déterminé que la phosphorylation de p65 à la serine 536 était amorcée par RIG-I par la kinase IKK β et passait par la protéine d'échafaudage TRAF6 [88].

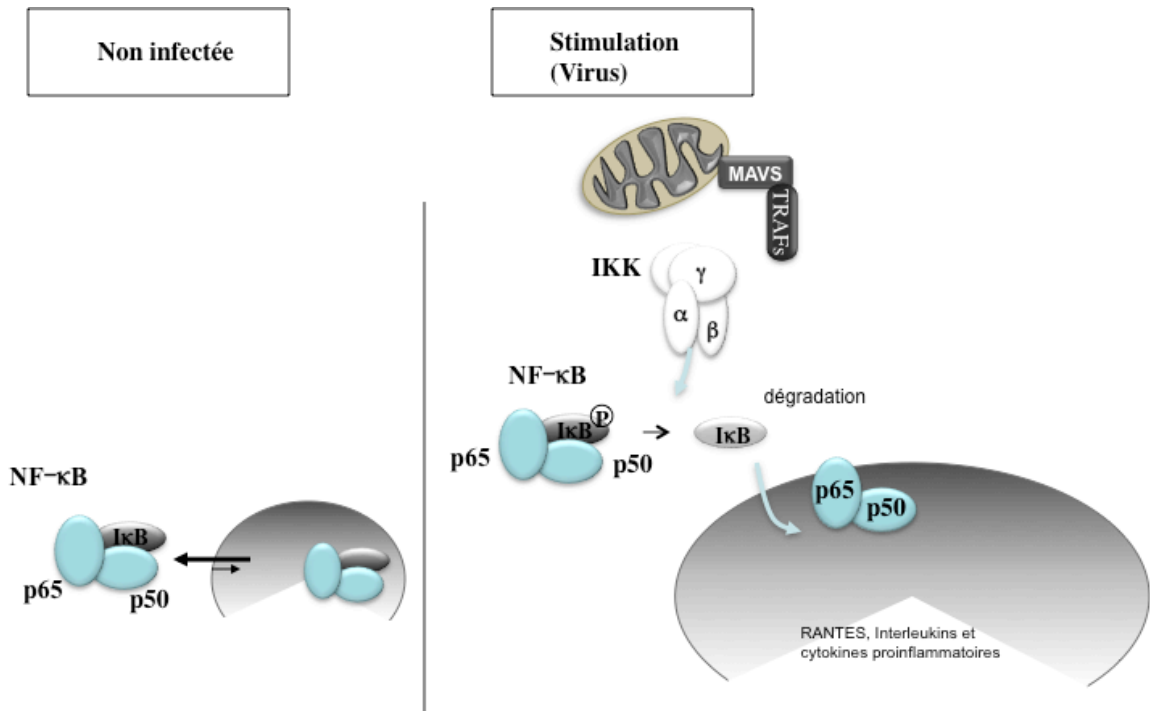


Figure 1-6 : Schéma illustrant l'activation de NF- κ B

Un signal d'activation tel un virus ou une chimiokine active le complexe IKK. Cette activation mène à la phosphorylation de I κ B α . L'ajout d'un phosphore à I κ B α libère les molécules de NF- κ B. Les complexes p65 et p50 peuvent maintenant migrer dans le noyau et moduler [102-106].

1.5 La réponse antivirale

1.5.1 Les interférons

Afin de répondre à des stress viraux, l'organisme est capable de produire des cytokines antivirales nommées interférons (IFN). Les IFNs sont des protéines qui activent les défenses de l'organisme à la suite de la détection d'un pathogène. Les IFNs régulent non seulement la réponse antivirale innée, mais également la réponse antivirale adaptative [107-111]. L'humain produit trois types d'IFNs : les IFNs de type I, les IFNs de type II et les IFNs de type III. [107-111].

Les IFNs de type I sont sécrétés par toutes les cellules humaines. Leurs récepteurs sont les récepteurs transmembranaires IFNAR1 et IFNAR2. Il y a trois types d'IFNs de type

1 : l'IFN- α , l'IFN- β et l'IFN- ω [107-111]. Il existe 23 types d'IFN- α . On ne sait pas si ces 23 variants ont une fonction biologique. Les IFN- α ont une taille variable de 19 à 21 kDa (kilodalton) [107-111]. Bien que la taille de ces protéines puisse être variable, il existe une région entre les acides aminés 115 et 151 qui est hautement conservée. L'IFN- β est une glycoprotéine de 20 kDa de long; elle partage 30 % d'homologie avec IFN- α [107-111]. Les IFNs de type 2 sont sécrétés par les cellules TH₁, les cellules cytotoxiques et les cellules *Natural Killers* (NK) [107-111]. Les récepteurs pour les IFNs de type 2 sont les récepteurs transmembranaires (*Interferon gamma receptor*) 1 IFNGR1 et IFNGR2. Les IFNs de type III, nom collectif pour IL28a et IL28b et IL-29 [112] fut récemment découverts. Le locus des IFNs est situé dans le chromosome 9p22 et la transcription des IFNs est régulée par les IRFs.

1.5.2 Les IRFs

La synthèse *de novo* des IFNs de type I et III est régulée par une famille de facteurs de transcription nommée les *Interferon Regulatory Factor* (IRF) [113-117]. Il existe chez l'humain neuf IRFs : IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4/pip/IC-Stat, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IRF-8/ICSBP et IRF9/ISGF4/p48 [113-117]. Il existe aussi trois IRFs viraux codés par le virus Sarcoma de Kopasi (vIRF). Les IRFs sont une famille de protéines homologues ayant un domaine de liaison à l'ADN (DBD) à l'extrémité N-terminale, capables de reconnaître les motifs *Interferon sensitive response element* (ISRE) (AANNNGAAA) dans les promoteurs cibles [113-117]. Le domaine N-terminal est variable entre les IRFs et représente le domaine d'interaction protéique (IAD). IRF-3, IRF-5 et IRF-7 sont impliqués dans la réponse antivirale [113-117].

1.5.3 IRF-3

Découvert en 1995, IRF-3 est aujourd'hui reconnu comme un médiateur précoce de la réponse antivirale parce que devant un stimulus, contrairement à IRF-7, l'activation d'IRF-3 ne dépend que de modifications post-traductionnelles et ne requiert pas de synthèse *de novo* [113-117]. Dans une cellule non stimulée, IRF-3 est présent dans le cytoplasme sous forme inactive, monomérique, et hypophosphorylée [113-117]. La localisation d'IRF-3 est majoritairement dans le cytoplasme, mais en réalité, il existe un déplacement continu entre le noyau et le cytoplasme avec un équilibre qui favorise une prépondérance cytoplasmique [113-117]. Ce sont les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, qui modifieront l'équilibre du va-et-vient entre le noyau et le cytoplasme. Suivant la détection

d'un pathogène par un PRR, IRF-3 est phosphorylé notamment par les kinases TBK1 ou IKKε sur plusieurs serines situées à l'extrémité C terminale de la protéine [118-122]. Les principaux résidus phosphorylés d'IRF-3 sont Ser385, Ser386, Ser396, Ser398, Ser402, Ser405, et Thr 403 [123, 124]. Une étude démontre que TBK1 phosphoryle directement les Ser402 et Ser396 [125]. Après une analyse mutationnelle des différents sites phosphorylables, il a été observé que la phosphorylation au site Ser396 contrôle l'homodimérisation, l'association à CBP et l'accumulation nucléaire d'IRF-3 [125]. Des études de cristallographie suggèrent que des interactions stériques dans les IAD du facteur de transcription permettraient l'homodimérisation d'IRF-3 suivant sa phosphorylation [126]. Une fois le dimère formé, IRF-3 migre dans le noyau à l'aide d'une protéine d'importation nommée α-importine [127]. Dans le noyau, les dimères d'IRF-3 formeront un holocomplexe avec CBP (ou Histone acétyltransferase p300 [128]. Ceci permettra une modulation de l'hétérochromatine et une liaison aux séquences ISRE. De plus, l'interaction entre CBP et p300 freine l'exportation nucléaire d'IRF-3 par I-CMT [127]. À la suite de son activation, IRF-3 est dégradé par le protéasome après son ubiquitination dans le noyau [129].

Les gènes régulés par IRF-3 sont divers et sont impliqués dans plusieurs processus. La résultante de leur activation régit un état de résistance après une infection virale. Plusieurs études soulignent la contribution de IRF-3 dans l'activation de la réponse antivirale. Les puces *Affymatrix* mesurent le niveau de transcriptions produites à la suite d'un stimulus. Une analyse de puces *Affymatrix* effectuée par J. Anderson et coll. qui comparait des MEF (*Mouse Embryonic Fibroblastes*) déficientes en IRF-3 (ΔIRF-3) avec des MEFs de type sauvage, révèle que l'IFN-β, l'IFN-α4, l'IFN-α5 et l'ISG54 sont dépendants de l'expression d'IRF-3 [130]. Des données similaires furent démontrées avant en exprimant du IRF-3 activé constitutivement [131]. Cette même puce révèle que le gène MIP-1β, dépendent de l'expression d'IRF-3. MIP-1β une chimiokine qui recrute les mastocytes, les lymphocytes et les monocytes. Les gènes impliqués dans le MHC (*Major histocompatibility complex*) non classique des cellules NK sont aussi régulés par IRF-3. IRF-3 régule directement certains gènes régulant l'apoptose telles que Fas death domain-associated protein (Daxx) et Viperin [130]. L'expression de RANTES est régulée par IRF-3. RANTES est une chimiokine qui est exprimée par les cellules-T et les cellules épithéliales, et attire les monocytes, les éosinophiles et les cellules T [132]. IRF-3 régule également l'expression de certains ISGs dont ISG54,

l'ISG56, et ISG60. Après l'activation, IRF-3 est régulé par des mécanismes permettant de réguler finement l'activité d'IRF-3. Par exemple, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting* (PIN1) est une isomérase qui régule la stabilité de IRF-3 [133]. Tatsuya et coll., ont démontré que PIN1 et IRF-3 interagissent. Les auteurs ont émis l'hypothèse que PIN1 serait un frein qui prévient l'activation prolongée de IRF3 en provoquant sa dégradation. À l'inverse, la modification d'IRF-3 par ISGylation semble ralentir sa protéolyse [134]. Tout comme l'ubiquitination, ISGylation est un système d'activation de molécules qui aboutit au transfert d'une molécule d'ISG15 sur une protéine. IRF-3 est ISGylé. Premièrement, une « ubiquitin like ligase » de type 1 nommé *Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7* (UBE1L) active ISG15 [135, 136]. Par la suite, ISG15 est transférée à une E2 nommée UBCH8 [137]. ISG15 sera ensuite lié à IRF-3 par *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5* (HERC5), une protéine analogue au E3 ligase [138-140].

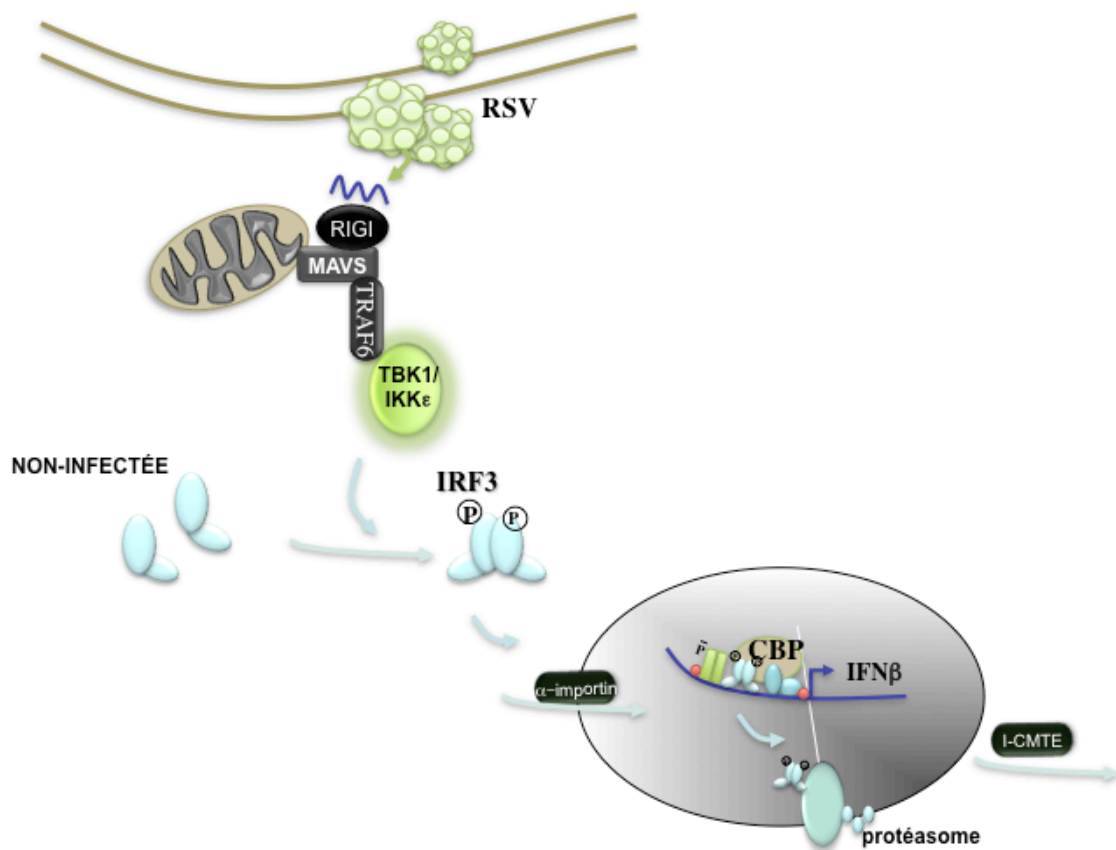


Figure 1-7 : L'activation d'IRF-3

La détection d'un PAMPS par un RIG-I mène à l'activation d'IRF-3. Le cycle d'activation d'IRF-3 débute quand IRF-3 est phosphorylé par TBK1 ou IKKε. Après la phosphorylation

d'IRF-3, celui-ci dimérise et migre dans le noyau où il se complexe avec CBP/p300 afin de moduler la transcription de ces gènes cibles. Après la transcription, IRF-3 est ubiquitiné et dégradé par le protéasome [113-117, 131].

1.5.4 Janus-Activated Kinase 1 (JAK1)-STATS

L'activation de IRF-3 mène à la production *de novo* d'IFNs I et III [141-145]. Ces cytokines, suivant leur synthèse, sont sécrétées dans l'espace interstitiel, où ils interagissent de manière paracrine ou autocrine avec deux récepteurs transmembranaires : IFNAR et IFNAR2[141-145]. Ces récepteurs sont exprimés dans la majorité des tissus cellulaires. Une fois qu'une molécule d'IFN α/β lie son récepteur, il aura un changement de la conformation qui provoquera une dimérisation du récepteur et une activation des domaines catalytiques, présents dans leur portion cytoplasmique [141-145]. Les kinases JAK1 et Tyrosine Kinase 2 (TYK2) seront alors activées et transphosphorylent le récepteur [141-145]. Cette action permettra la phosphorylation de facteurs cytosoliques tels que les protéines de signalisation « signal transducers and activators of transcription 1 et 2 » (STAT1 et STAT2) [141-145]. La phosphorylation de STAT1 et STAT2 permet la formation d'un complexe trimérique avec le facteur IRF9, pour former le facteur de transcription nommé IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) [141-145]. De plus, STAT1 phosphorylé peut former un homodimère. Une fois dimérisés ou trimérisés, les complexes migrent dans le noyau de la cellule où ils activeront la transcription des gènes portant une séquence ISRE dans leurs promoteurs ou au (Interferon-Gamma Activated Sequence) GAS, dépendamment du type de dimère formé. [141-145]. Les gènes activés seront des ISGs et seront capables de médier un état de résistance viral [141-145].

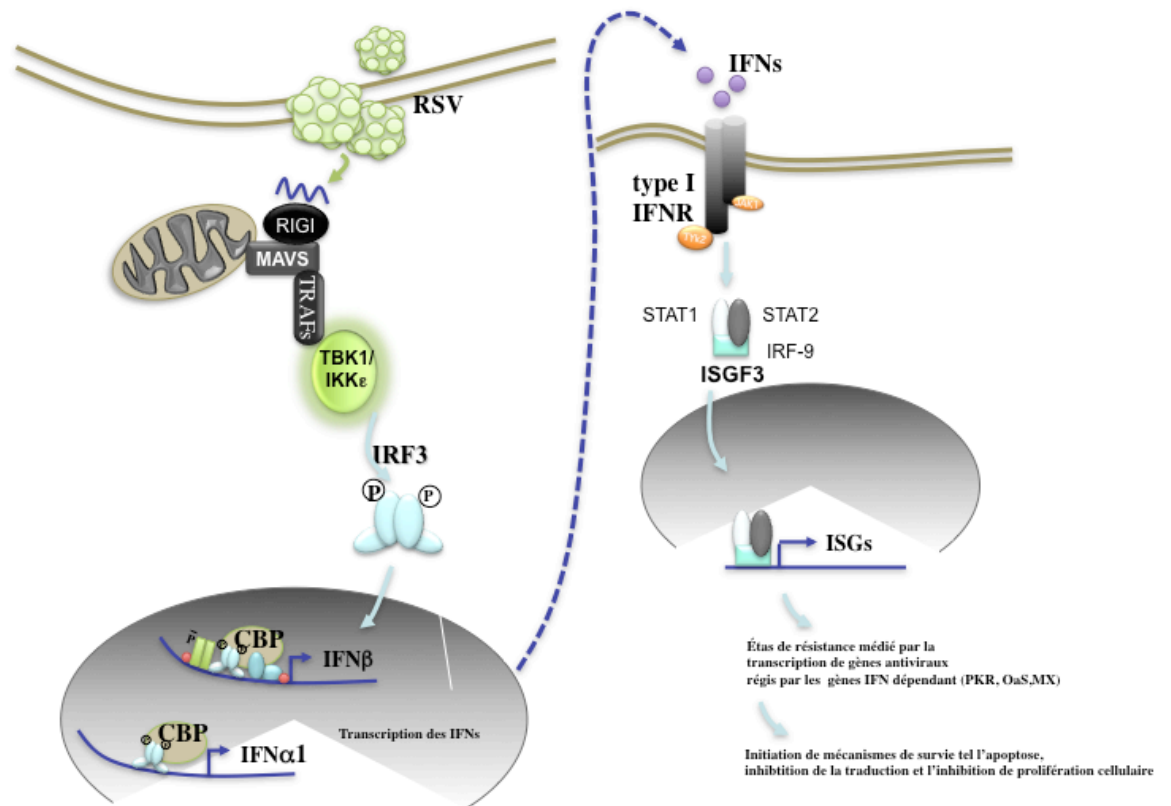


Figure 1-8 : Cascade des IFNs

Les IFNs produits par l'activation des IRFs sont sécrétés hors de la cellule, où, de manière autocrine et paracrine, elle enclenche les récepteurs IFNAR1 et IFNAR2. L'engagement des récepteurs active les kinases TYK2 et JAK1 qui participent à la formation du facteur ISGF3 en phosphorylant les protéines STAT1 et STAT2. Le facteur de transcription augmente la transcription des ISG, qui médient l'état antiviral de la cellule.

1.5.5 Les ISG

1.5.5.1 ISG56

La famille de gène IFIT contient 4 membres : *ISG56*, *ISG54*, *ISG60* et *ISG58* [146]. Ces gènes sont conservés et sont surexprimés suivant la détection d'un pathogène ou d'un traitement aux IFNs [146]. Les gènes IFIT codent pour des protéines cytoplasmiques antivirales portant le même nom que leurs gènes. Ces protéines ont diverses activités catalytiques et portent plusieurs motifs tétratricopeptidiques. Les motifs tétratricopeptidiques permettent aux protéines IFIT d'interagir avec plusieurs partenaires. Par exemple, ISG60 se lie à MAVS et TBK1 favorisant ainsi leur interaction, ce qui permet d'augmenter l'activation d'IRF-3. ISG56 est capable d'inhiber la traduction de protéines en se liant à la sous-unité eIF-3 du complexe d'initiation de la traduction [146]. Plus tardivement, dans une infection virale, ISG56 et ISG54 sont capables de moduler l'activation d'IRF-3 en empêchant les interactions entre MAVS et *stimulator of IFN gene* (STING) et entre TBK1 et STING. Ceci a pour effet de diminuer la production de IFN- β [146, 147]. L'augmentation de ISG54 induit l'apoptose [148]. ISG56 et ISG54 sont des protéines capables de liées ARNm viral antagonisant ainsi la traduction de protéines virale ISG56 est une protéine dont la régulation est bien élucider.L'expression de ISG56 augmente en réponse à IRF-3 sous un traitement d'IFN [131]. L'expression d'ISG56 est transitoire et après une infection par RSV. [146]. .

1.5.5.2 2'-5' oligoadenylated synthetase (OAS)

Les protéines de la famille des 2'-5' oligoadenylated synthetase (OAS) sont des ARN polymérases qui ne nécessitent pas de matrice [149]. Chez l'humain, on retrouve 4 gènes qui codent pour quatre protéines actives lors d'infections virales (OAS1, OAS2, OAS3, OASL) [149]. La synthèse des OAS est régulée par les IFNs puisque dans son promoteur on retrouve des séquences ISRE. OASL est régulé par IRF-3 ce qui permet une régulation plus minutieuse de ce dernier [150]. Lors d'une infection virale, l'ARN double brin produit par un virus lie l'OAS. Cette liaison provoque un changement de conformation qui déclenche la production de 2'-5' oligoadenyl, ces acides nucléiques produits par OAS ont une longueur variable [149]. Ces produits de taille variable lient l'ARNase L, une protéine de 741 acides aminés localisée dans le cytoplasme qui lorsqu'activé dimérise et dégrade l'ARN cellulaire ainsi que l'ARN viral [149]. La diminution d'ARN dans la cellule freine la synthèse de nouvelles protéines. De plus, les morceaux d'ARN produits lors du clivage de l'ARN viral

sont captés par RIG-I et MDA5 amplifiant ainsi le signal de détection [151, 152]. En 1997, un groupe démontre que des 2'-5' adénylate couplés à un ARN du RSV peuvent réduire la réplication de RSV dans des tissus épithéliaux pulmonaires [153]. Une autre étude démontre que l'inhalation de 2'-5' adénylate freine la réplication du virus dans les tissus pulmonaires [154]. Finalement, l'absence de OAS, sensibilise les cellules aux infections par virus respiratoire syncytial après qu'ils aient pris un traitement à l'IFN- γ . [150]. Normalement, un traitement à l'IFN- γ , protège les cellules.

1.5.5.3 Les protéines Mx

Les protéines Mx sont une famille de protéines antivirales régulées par les IFNs de type I et III [155]. Elles sont membres de la superfamille des dynamines. Leurs structures peuvent être divisées en trois parties/sections : le côté C terminal de la protéine est un domaine GTPase fonctionnel [155], le domaine central est le domaine d'association et le domaine de liaison aux GTP que l'on retrouve du côté N-terminal [155]. MxA empêche la réplication virale en se polymérisant autour des protéines virales et en les séquestrant les unes par rapport aux autres [155]. Ceci empêche les particules virales de participer à une nouvelle ronde de réplication [155]. Durant une infection par le RSV, l'expression de MxA augmente [156]. Cependant, la surexpression de Mx ne protège pas les cellules contre le RSV [157].

1.6 Rôle des protéines NS1 et NS2 de RSV dans la régulation de l'immunité innée

La première étude conférant un rôle immunomodulateur aux protéines NS1 et NS2 fut publiée en étudiant un virus de la même famille ayant comme tropisme les bovidés : le *Bovine RSV* (BRSV). Les auteurs ont créé un virus recombinant Δ NS1/NS2 [158]. Ils ont observé que l'absence de NS1 et NS2 augmente la phosphorylation du facteur de transcription *Interferon regulatory factor 3* (IRF-3) [158]. De plus, ils ont constaté une augmentation de la production de la protéine antivirale *Myxovirus resistant protein* (Mx) et de l'interféron (IFN) - α/β ainsi qu'une augmentation générale de l'activité des promoteurs contrôlés par ISRE à la suite d'une stimulation virale [158]. Plus tard, la même équipe a publié un manuscrit soulignant le fait que NS1 et NS2 issue du RSV humain protègent le virus contre les actions néfastes des IFNs [159]. Dès lors se lance une course dans le but d'élucider les mécanismes d'action de NS1 et NS2.

1.6.1 NS1 et NS2 et la signalisation

Du point de vue de la signalisation, les virologistes ont découvert que NS1 et NS2 peuvent moduler l'activation d'IRF-3 et de NF- κ B [38]. Une étude décrit que l'absence de NS1 et NS2 induit une suractivation d'IRF-3. Ceci récapitule les données observées chez le BRSV, mais dans une lignée cellulaire humaine (A549) et de primate (Véro). Plus précisément, les chercheurs ont observé que dans l'absence de NS1 ou NS2, le taux de cellules ayant accumulé IRF-3 dans le noyau est supérieur aux cellules ayant été infectées avec un virus de type *sauvage* [38]. De plus, IRF-3 persiste plus longtemps dans le noyau [38], ce qui a pour effet d'allonger la réponse antivirale. L'absence de NS2 diminue paradoxalement la réponse inflammatoire en inhibant l'activation de NF- κ B [38]. Plus tard, l'effet stimulateur de NS2 a été confirmé quand un autre groupe a publié des résultats basés sur une stratégie d'ARN interférant qui démontrent qu'une diminution de l'expression de NS2 réduit l'activation de la voie v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Akt) et NF- κ B [160]. Une réduction de NF- κ B et Akt a pour effet de sensibiliser les cellules infectées à l'apoptose cellulaire. Cette même étude démontre que l'absence de NS1 réduit l'activité du promoteur ciblés par NF- κ B [160].

L'absence de NS1 et NS2 lors d'une infection RSV induit une augmentation des IFN- α 1, 6, 13, 4, 5, 8, 10, 14, 17 et 21 ainsi que de la production IFN- β , IFN- λ 1, 2 et 3 [161]. Les mécanismes par lesquels NS1 et NS2 modulent l'activation de la réponse antivirale sont divers. Au début de la cascade de signalisation d'IRF-3, une étude démontre une interaction directe entre NS2 et *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG – I) [162]. Cette interaction entre NS2 et RIG-I compromet l'activation du facteur de transcription IRF-3 [162]. Par contre, les auteurs ne proposent aucun mécanisme pour expliquer ce phénomène. En aval de l'activation de RIG-I, une étude démontre une réduction dans la quantité d'une protéine d'échafaudage impliquée dans l'activation d'IRF-3; TRAF-3 lors d'une transfection ectopique de NS1 ou NS2 [39, 163]. Finalement, la surexpression de NS1 diminue l'abondance de IKK ϵ , une des kinases responsables de la phosphorylation d'IRF-3 [39, 163]. Paradoxalement, les auteurs observent une légère augmentation d'IKK ϵ suivant une transfection de NS2 recombinant [39, 163]. NS1 et NS2 semblent donc pouvoir moduler la réponse antivirale à plusieurs niveaux.

NS1 et NS2 peuvent induire la dégradation d'importants modulateurs de la voie *Janus Kinase* (JAK) – *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STATS). À ce niveau, les

études se contredisent. Une étude démontre que STAT2 est dégradé par NS1 et NS2 [164], alors qu'une deuxième étude défend la position que la dégradation de STAT2 est dirigée par NS2 seulement. [165]. Le premier résultat fut démontré dans des cellules exprimant de façon stable des séquences humanisées de NS1 ou NS2. STAT2 fut induit par l'ajout d'IFN- β , bien que NS1 toute seule ne module pas l'expression de STAT2 [164]. Les auteurs affirment observer un effet synergique sur la dégradation de STAT2 lorsqu'il infecte des A549 exprimant NS1 et NS2 de manière stable. Les auteurs ne montrent cependant pas de immunoblot démontrant l'expression de NS1 ou NS2. Le deuxième résultat a été démontré en utilisant un virus vaccine exprimant une copie de chaque gène du virus [165]. Cette approche est très *in vitro*, puisqu'elle utilise un virus comme vecteur. Les auteurs ont probablement utilisé cette approche puisque l'expression de NS1 et NS2 est extrêmement difficile à soutenir. Ceci est probablement dû au fait que l'expression ectopique de NS1 ou NS2 assujettie les transcrit à des modifications transcriptionnelles qui limitent leur durée de vie. Un troisième groupe a publié des résultats montrant que NS1 et NS2 sont capables d'induire la dégradation de STAT2 lorsqu'exprimée ectopiquement dans des 293T [166]. Ce groupe précise que la dégradation de STAT2 est médiée par le domaine ligase de NS1. Un quatrième groupe qui a exprimé NS1 ou NS2 de manière transitoire n'observe pas d'effets de NS1 sur STAT2, ni d'effets synergétiques [39, 163]. Les auteurs démontrent l'expression de NS1 et NS2 dans leur étude.

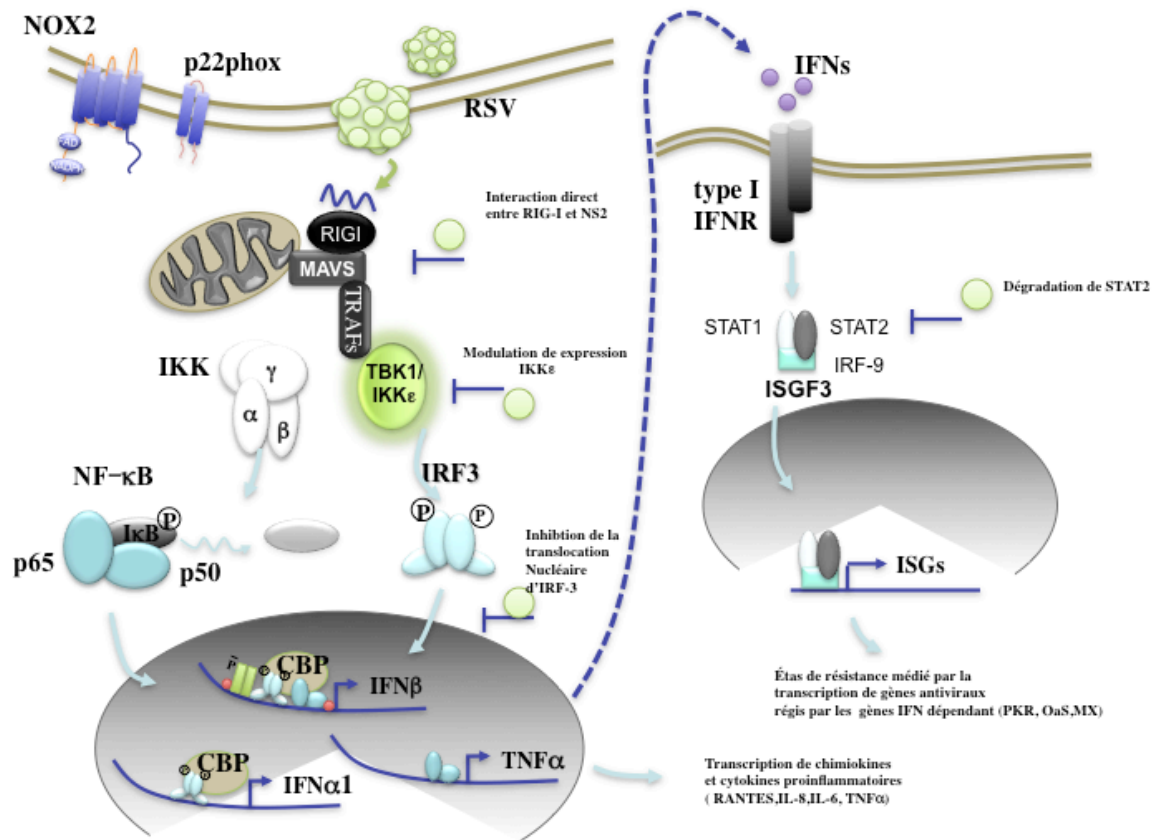


Figure 1- 9 : Schématisation de l'effet de NS1 et NS2 sur la signalisation antivirale

Les protéines virales NS1 et NS2 sont capables de moduler les cascades pro-inflammatoires et antivirales en agissant sur plusieurs interlocuteurs clés. NS2 bloque la transmission du signal d'activation au niveau de RIG-I. La surexpression de NS1 et NS2 module l'expression d'IKKε. L'absence de NS1 et NS2 prolonge le niveau d'IRF-3 dans le noyau. NS1 et NS2 stimulent la dégradation de STAT2.

Hypothèse et objectifs de travail

L'OMS désigne le RSV comme un pathogène à priorité élevée, et pour cause, car le RSV est l'agent pathogénique causant le plus d'hospitalisations chez les jeunes bébés. Afin d'améliorer les possibilités de trouver un remède contre le RSV, nous devons approfondir nos connaissances sur le mode d'infection du virus. Les données suggèrent qu'une production exagérée de la réponse inflammatoire contribue au développement des pathologies sévères. Cette exacerbation de la réponse inflammatoire est en partie liée à l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription qui active l'expression des gènes codant pour des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. Nous avons démontré que l'activation de NF- κ B est en partie dépendante de la reconnaissance de RSV par le senseur cytosolique RIG-I lors d'une infection au RSV [88]. L'activation de RIG-I mène aussi à l'activation d'IRF-3, principal régulateur de la réponse antivirale. Cependant, le RSV n'active pas une forte réponse antivirale. Comment ce fait-il? La littérature suggère que les protéines NS1 et NS2 codées par le RSV sont responsables des mécanismes d'évasion développés par le virus.

Dans une de nos dissertations précédentes, nous avons élucidé un des rôles potentiels de RIG-I lors d'une infection au RSV [88]. Peu d'études évaluent la contribution de MDA5 face au RSV. Une étude démontre que MDA5 ne pouvait pas lier l'ARN viral à la suite d'une expérience co-immunoprécipitation [167]. Cette observation n'est pas suffisante pour exclure le rôle de MDA5 lors de la réponse antivirale. En effet, l'activation de ISG54 lors d'une infection au RSV était retardée dans des cellules MEFsMDA5^{-/-} [168]. Notre hypothèse de travail est que MDA5 stimule la réponse antivirale en passant par IRF-3 lors d'une infection au RSV.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons divisé notre hypothèse en deux objectifs.

1. Vérifier l'impact de NS1 et NS2 sur l'activation d'IRF-3

1. 1.1 Premièrement, nous avons évalué l'impact de la perte de NS1 et NS2 lors d'une infection au RSV sur la réponse antivirale. Pour ce faire, nous avons choisi d'inhiber l'expression de NS1 et NS2 par ARN interférant et ensuite choisi d'observer l'effet de cette perte sur des marqueurs d'activation d'IRF-3.
2. 1.2 Deuxièmement, nous avons évalué la contribution de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale en exprimant ectopiquement NS1 et NS2. Nous avons observé que

l'expression de ces protéines augmente l'activation de marqueur de la réponse antivirale.

2. Déterminer le rôle de MDA5 dans l'induction de la réponse antivirale induite par RSV

2.1 Notre premier objectif était d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'expression de MDA5 sur l'activation d'IRF-3 lors d'une infection virale. Pour ce faire, nous avons analysé la phosphorylation d'IRF-3 ainsi que sa dimérisation.

2.2 En deuxième lieu, nous avons évalué l'effet d'une transfection de MDA5 en absence de RIG-I. Pour ce faire, nous avons observé la phosphorylation d'IRF-3 ainsi que sa dimérisation.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Réactifs

Le DMSO, le Tween 20, le DOC et la BSA proviennent de Sigma-Aldrich. Le U0126 et le z-Vad-fmk proviennent de Biomol International. Le réactif TransIT-LT1 provient de Mirus BIO. Le réactif de transfection Oligofectamine provient de Invitrogen. La lactacystine a été achetée de Calbiochem. Les oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR quantitative proviennent de Invitrogen alors que les ARNi sont de Dharmacon.

Plasmides

Le plasmide rapporteur pRL-null *Renilla* luciférase a été obtenu de Promega. Le plasmide FLAG-MDA5 provient du Dr J. Hiscott (Université McGill, Montréal, Québec). Les plasmides ISG56prom-pGL3 et le IFN-bprom-pGL3 ont été décrits ([169]). Les plasmides utilisés pour quantifier le nombre de copies d'ARNm dans les expériences de PCR quantitatives sont les plasmides pCR2.1-TOPO-IFN- β , RSVA2-N-PCR4-TOPO et S9-PCR4-TOPO clonée en utilisant le kit de clonage top d'Invitrogen.

Culture cellulaire

Les cellules A549 (ATCC) ont été cultivées dans un milieu F12 Ham (Gibco) auquel nous avons ajouté 10 % de FBS (*Fetal bovine serum*) (Gibco) inactivé par un traitement à la chaleur ainsi que 1 % de L-Glutamine (Gibco) et ont été cultivées de manière subconfluente (passage au 1/5). Les cellules HEC1B (ATCC) ont été cultivées dans un milieu MEM (ATCC) supplémenté avec un NEAA (Non-essential Amino acids GIBCO), Sodium pyruvate (GIBCO) et 10 % de FBS. Le traitement à la lactacystine a été effectué dans du milieu F12 Ham 2 % FBS et 1 % L-Glutamine pour la durée de l'expérience.

Transfection d'ARNi

Des cellules A549 ou HEC1B de passage entre 2 et 3 à confluence d'environ 30 % (1×10^5 cellules/35mm ou 2×10^4 cellules/24puits platées 24 h avant pour les A549; ou 3×10^4 cellules/24puits mises en culture 24h avant pour les HEC1B) ont été transfectées à l'aide de l'oligofectamine (Invitrogen) selon les instructions du fabricant avec 200pmol des ARNi (Tableau 2).

Essai rapporteur luciférase

Selon les expériences, des cellules A549 ont été transfectées avec des ARNi comme décrit ci-dessus ou transfectées avec des plasmides d'expression comme suit : des A549 mises en culture à environ 60 % de confluence (8×10^4 cellules par 24 puits mise en culture 24 h avant) ont été transfectées avec des quantités variables du plasmide d'expression indiqué avec le *TransIT-LT1* (Mirus) selon les instructions du fabricant avec un ratio ADN/réactif de transfection de 1/2. 48 h après la transfection d'ARNi ou 16 h après la transfection de plasmide d'expression, les cellules ont été transfectées avec 50 ng de pRL-null *Renilla* luciférase et 100 ng de plasmide ISG56prom-pGL3 ou le IFN-b prom-pGL3 firefly luciférase pour 8 h. Les HEC1B furent transfectés à 60 % de confluence avec du Fugene (Roche) en suivant les instructions du fabricant. Le ratio ADN/réactif est de 1 :3. Les cellules ont ensuite été infectées par RSV, comme décrit ci-dessous, pour 16 h puis l'activité des gènes rapporteurs a été mesurée à l'aide du Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) selon les indications du fabricant. Les activités sont exprimées comme des ratios par rapport à la condition NS après normalisation par rapport à l'activité luciférase de la *Renilla*.

Infections virales

Des cellules A549 subconfluentes (~80 %, 5×10^5 cellules A549/35 mm) ont été infectées avec le RSV type A2 (Advanced Biotechnologies) purifié à un MOI (*Multiplicity Of Infection* : ratio de virus par cellule) de 3 dans un milieu F12 Ham contenant 2 % de FBS et 1 % de L-Glutamine pour le temps indiqué. Le stock initial du virus fut amplifié et purifié ainsi qu'aliquoté [170]. Le même protocole a été utilisé pour les HEC1B dans un milieu MEM. Aux endroits indiqués, la lactacystine et le DMSO ont été ajoutés 1 h avant l'infection dans un milieu sans FBS. Au moment de l'infection, 2 % de FBS ont été ajoutés.

Analyses de type western

Au moment de la récolte des cellules, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par du PBS froid dans lequel les cellules ont été grattées, récoltées dans des eppendorfs et culottées par centrifugation. Elles ont ensuite été resuspendues dans un tampon de lyse NP-40 (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % glycérol et 1 % IGEPAL [Nonidet P-40]) contenant des inhibiteurs de protéases (1 mg/ml leupeptine et 2 mg/ml aprotine) et de

phosphatases (30 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM PNPP et 25 mM β-Glycérophosphate) et incubées sur glace pendant 20 minutes.

Après 3 gels/dégels en azote liquide, les échantillons ont été centrifugés pendant 20 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouvel eppendorf. La concentration protéique dans les extraits cellulaires totaux (WCE) ainsi générés a été quantifiée par un essai Bradford (Biorad) en utilisant une gamme de BSA. 15mg a ensuite été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE puis transféré sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) et bloqué pendant 1 h à température ambiante avec une solution de blocage constituée de PBS (1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄) contenant 5 % de lait écrémé et 0,05 % de Tween20. Après un lavage extensif avec une solution de PBS contenant 0,05 % Tween20 (PBS-T), les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires indiqués selon les conditions indiquées au Tableau II (p. 43). Après un lavage extensif au PBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire correspondant lié au HRP (*Horse radish peroxidase*) pendant 1 h à température ambiante puis les bandes immunoréactives ont été visualisées par ECL à l'aide du *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer Life Sciences). Entre les anticorps phosphospécifiques et les anticorps totaux correspondants, les membranes ont été lavées dans une solution adéquate (0,2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH6.8, 0,1 mM b-mercaptoéthanol) pendant 20 minutes à 50 °C puis lavées extensivement dans du PBS et enfin bloquées à nouveau dans la solution de blocage. L'Acquisition de la chimioluminescence a été faite avec l'appareil LAS4000mini CDD 9 (GE healthcare) en utilisant le logiciel d'acquisition LAS4000 min version 1.2 ou manuellement en utilisant un film.

Modification du tampon de lyse pour permettre la détection des protéines NS1 et NS2

Pour visualiser NS1 et NS2, nous avons ajouté au moment de la lyse 1 mg/ml de Pepstatin A, 1 mM de DTT, 1 mM de EGTA et 1 mM de PMSF.

Électrophorèse non dénaturante

10 µg de protéine furent mélangés avec un tampon de chargement non dénaturant (125 mM Tris HCl, 30% glycérol et du bleu de bromophénol), et par la suite migrés sur un gel d'acrylamide non dénaturant de 7.5 %. Le tampon de migration de la chambre haute est

composé de 25 mM Tris HCl pH 8.4 (température pièce), 192 mM glycine et 1% DOC. Le tampon de migration de la chambre basse est composé de 25 mM Tris HCl pH 8.4 (ajusté à 4°C) et 192 mM glycine. La migration des échantillons a lieu sous glace à 25 mA pendant 40 min. Par la suite, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) et bloqué tel qu'indiqué plus haut.

Multiplexe ELISA

Une infection au RSV à un MOI de 2 a été effectuée dans un milieu Opti-MEM réduit, 48 heures après la transfection d'ARNi. 50 ml du supernatant ont été analysés en utilisant un kit VeriPlex™ Human Interferon Multiplex ELISA (PBL interferon) d'après les instructions du fabricant. L'acquisition de la chimioluminescence a été faite avec l'appareil LAS4000mini CDD 9 (GE healthcare). La quantification a été évaluée avec le logiciel Q-view (Quansys Biosciences).

Extraction d'ARN et PCR quantitative

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNAqueous-96 Isolation (Ambion) en suivant les instructions du fabricant, mais en éliminant par contre l'étape de traitement à la DNase1 incluse dans ce kit. Après la quantification de l'ARN total extrait par mesure de l'absorption à 260 nm et l'évaluation de sa qualité à l'aide du ratio d'absorption à 260 nm/280 nm, 1 mg de cet ARN total a été soumis à une transcription inverse avec le kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une réaction sans transcriptase inverse a été effectuée pour servir de contrôle de contamination d'ADN génomique. Les réactions de transcription inverse de 20 µl ont été diluées jusqu'à 100 µl avec de l'eau UltraPure (Gibco) et 1,5 µl de cette dilution a été utilisé par réaction de PCR quantitative. Les réactions de PCR ont toujours été effectuées en duplicata avec le FastStart SYBR Green Master (Roche) en présence de 0,4 mM d'amorce sens et antisens de RSV-N (S AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA; AS : TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAAT), DUOX2 (S : AACCTAAGCAGCTCACAAC; AS : CAGAGAGCAATGATGGTGAT), IFN-β (S): GAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGC; AS: (GTTCCCTTAGGATTTCCACTG ACTATGGTCC) et S9 (S : CGTCTCGACCAAGAGCTGA; AS:GGTCCTTCCATCAAGCGTC) La détection a été effectuée avec un Rotor-Gene 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research). Les courbes standards produites afin de pouvoir déterminer le nombre de copies d'ARNm ont été réalisées par dilution en série des plasmides pCR2.1-TOPO-IFN-b,

RSVA2-N-PCR4-TOPO, S9-PCR4-TOPO. La valeur absolue du nombre de copies d'ARNm ainsi obtenue est normalisée sur celle du gène S9 et les résultats sont présentés comme un pourcentage par rapport au point contrôle.

Analyses statistiques

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

Table II : Liste des oligonucléotides des ARNi utilisés dans cette étude.

Nom		Séquences (5'-3')
siCtrl	séquence sens	cauagcguccuugaucacauu
	séquence anti-sens	ugugaucaaggacgcuauguu
siRIG-I	séquence sens	aacgauuccaucacuauccaudTdT
	séquence anti-sens	5'-auggauagugauggaauuguudTdT
siMDA-5	séquence sens	ggugaaggagcagauucagdTdT
	séquence anti-sens	cugaaucugcuccuucaccdTdT
siNS1(1)	séquence sens	ggcagcaauucauugaguauugdtdt
	séquence anti-sens	cauacucaaugaauugcugccdTdT
siNS1(2)	séquence sens	cuagaugacaauugugaaaauu
	séquence anti-sens	uuucacaauugucaucuaguuu
siNS2(2)	séquence sens	gacaugagaccguugucacdTdT
	séquence anti-sens	gugacaacggucucaugucdTdT

Table III : Liste des anticorps et de leurs conditions d'utilisation en immunoblot

<u>Anticorps</u>	<u>Dilution</u>	<u>Diluant</u>	<u>Provenance</u>
a-actine (C4)	1/10000	PBS-T-5 % BSA	Millipore
a-NS1/NS2 RSVA2*	1/2000	PBS-T-5 % BSA	Laboratoire de Peter Collins (NIH, É.-U.)
a-MDA-5*	1/3000	PBS-T-5 % lait	Alexis Biochemicals
a-RIG-I	1/1500	PBS-T-5 % lait	Alexis Biochemicals
a-RSV	1/4000	PBS-T-5 % lait	Chemicon International
a-chèvre IgG (H+L)	variable	PBS-T-5 % lait	Jackson ImmunoResearch Laboratories inc.
a-lapin IgG (H+L)	variable	PBS-T-5 % lait	Jackson ImmunoResearch Laboratories inc.
a-lapin IgG (H+L)	variable	PBS-T-5 % lait	KPL
a-souris IgG (H+L)	variable	PBS-T-5 % lait	KPL

*Les anticorps marqués avec le * sont des anticorps polyclonaux.

- ***Tous les anticorps primaires sont incubés pendant la nuit à 4 °C sauf l'actine qui est incubé 1 h à température ambiante.***

Chapitre 3 : Résultats

3.1 A : Analyse du rôle de NS1 et NS2 dans l'évasion de la réponse antivirale

Figure 3-1 : Revue et analyse de l'expression de NS1 et NS2 lors d'une infection par le RSV

L'expression de NS1 et NS2 est difficile à détecter, car les protéines sont rapidement dégradées. Donc, nous avons optimisé un protocole d'extraction qui permet la visualisation des protéines. En utilisant ce protocole, nous avons observé par immunobuvardage de type western à l'aide d'anticorps contre NS1 et NS2 que l'expression de ces protéines lors d'une infection par RSVA2 est transitoire avec un maximum de 8 heures d'infection (figure 3.1, p. 45). Trois différents groupes ont étudié la question de l'expression de NS1 et NS2 lors d'une infection au RSV. V. Bitko et coll. ont observé que l'expression de NS1 et NS2 atteint un maximum entre 8 et 18 heures d'infection [160]. Les protéines ne sont pas dégradées par la suite. Ce groupe a utilisé le sous-type du RSV LONG. Puisque nos études ont été effectuées avec le sous-type A2, les différences observées pourraient être dues à la différence physiologique entre virus. Le groupe de Teng et coll. a démontré que l'expression de NS1 et NS2 dans des HEP-2 augmente de façon linéaire [171]. Cependant, puisque le groupe a utilisé un MOI de 1 durant leurs infections, il se peut que la cinétique soit décalée et que la dégradation des protéines non structurales soit repoussée. Un troisième groupe a démontré un maximum à 14 heures, mais puisque la cinétique n'est pas plus étendue, il est impossible de déterminer s'il y a en effet un maximum [38].

La plupart des études qui ont pour but de déterminer le rôle de NS1 ou NS2 dans l'infection par le RSV sont basées sur des virus recombinants RSV Δ NS1 ou RSV Δ NS2. Une des faiblesses de cette stratégie est que l'absence de NS1 et NS2 diminue l'efficacité de réplication du virus [41].

Il existe donc un biais dans les observations issues d'études basées sur les virus recombinants. Dans notre étude, nous avons inhibé l'expression de NS1 et NS2 par ARNi. Cette stratégie permet d'éviter les artefacts puisqu'elle n'interfère pas avec la réplication du virus. En regardant la figure 3.1B (p.45) et la figure 3.2C (p.47), nous n'observons pas, par immunobuvardage et par analyse de qPCR, de différences par rapport à la quantité de particules virales produites. Lorsque la première séquence d'ARNi contre NS1 est

transfectée dans des cellules A549, nous observons un changement dans la morphologie de cellule. Afin de minimiser le risque d'avoir des résultats basés sur des effets non spécifiques, nous avons commandé une deuxième séquence ARNi contre NS1 (NS1 (2)). La deuxième séquence diminuait l'expression de NS1 sans influencer la morphologie des cellules (figure 3.1C, p. 45). Puisque, à la base, les ARNi peuvent être reconnus par la machinerie antivirale de la cellule et peuvent enclencher une réponse antivirale, nous avons de prime à bord, testé tous nos ARNi pour leurs inductions de l'IFN- β . Sans infection, les ARNi utilisés dans cette étude n'activent pas la transcription de l'IFN- β . (figure 3.2C, p. 47 et figure 3.3A et B, p.49).

L'expression ectopique de NS1 et NS2 par des techniques conventionnelles est particulièrement difficile. Selon l'hypothèse actuelle, la raison pour ceci est due au fait que lors d'une infection au RSV, la transcription et la traduction de protéine s'effectuent dans le cytoplasme. Quand nous transfectons un plasmide codant pour un gène viral, la transcription s'effectue dans le noyau [164]. La différence de localisation assujettit le transcrit viral à des modifications post transcriptionnelles non-usuelles. Plusieurs groupes ont souligné des difficultés dans la transfection et l'expression de plasmides codants pour NS1 et NS2 [166], [164]. Le groupe de Holtzman (Washington, É-U) a réussi à obtenir une expression plus soutenue de NS1 et NS2 en humanisant les codons [164]. Dans notre étude, nous avons utilisé les plasmides pCDNA3.1hNS1 et pCDNA3.1hNS2 fournis par Holtzman.

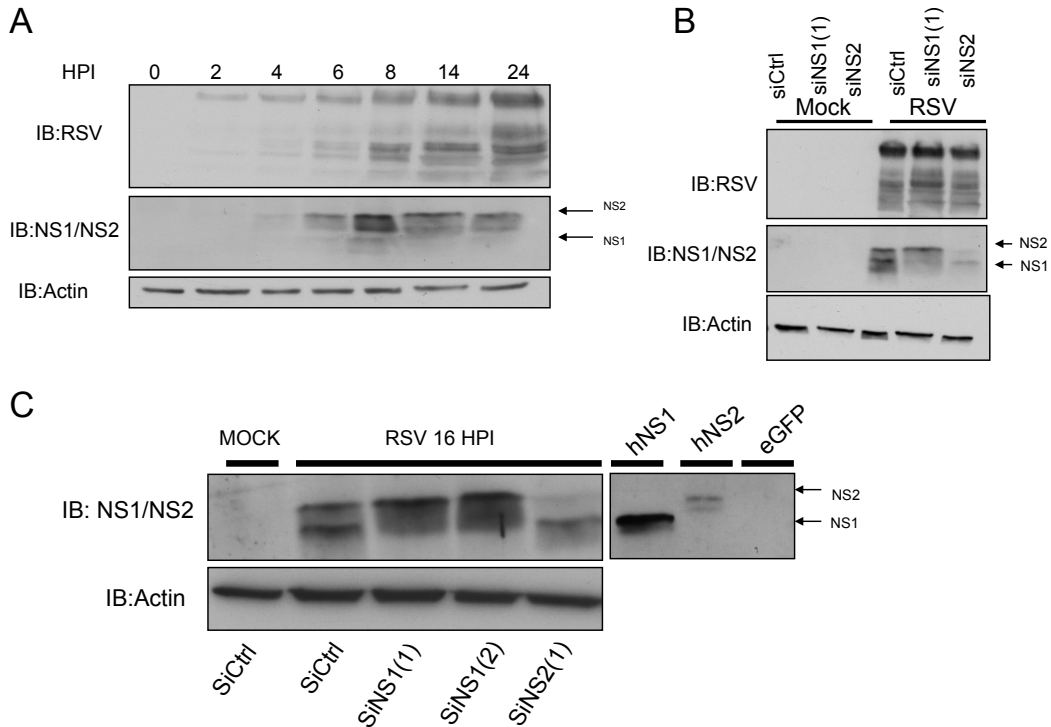


Figure 3-1 : Revue et analyse de l'expression de NS1 et NS2 lors d'une infection par le RSV
 A : Des cellules A549 ont été infectées avec du RSV à un MOI de 3 pour les temps indiqués (HPI).

B et C : Des cellules A549 ont été transfectées avec soit des oligonucléotides ARNi contrôle soit des ARNi spécifique pour NS1 (1), NS1 (2) ou NS2 pour 48 heures. Les cellules ont ensuite été infectées ou non par le RSV à un MOI de 3 pour les temps indiqués. Les cellules A549 ont été transfectées pendant 39 heures avec les plasmides hNS1 ou hNS2. Les extraits cellulaires totaux (WCE) ont été résolus par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose suivi d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Ces résultats sont représentatifs de 2 (A) et 3 expériences B, C).

Figure 3-2 : L'utilisation d'ARNi dirigés contre NS1 ou NS2 lors d'une infection par RSV ne module pas la réponse antivirale

Grâce à nos outils, nous avons pu étudier l'effet de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale. D'après la littérature, une infection par RSV Δ NS1NS2 augmente la localisation d'IRF-3 dans le noyau [38]. Elle augmente aussi l'activité des gènes sous le contrôle du segment PRD1 du promoteur de l'IFN- β [38]. Afin d'analyser l'effet d'un manque de NS1 ou de NS2 lors d'une infection par RSV, nous avons transfecté des ARNi contre NS1 et NS2 dans des A549 suivies par une infection par RSV. Par la suite, nous avons quantifié par PCR quantitative l'ARN messager de la protéine N ainsi que l'IFN- β . Nous avons remarqué que, contrairement à plusieurs études, l'inhibition individuelle de NS1 ou de NS2, ne mène pas à une augmentation de la transcription de l'IFN- β (figure 3.2A, p. 47). Nous avons cependant observé une augmentation de l'ARNm de l'IFN- β quand nous avons réduit l'expression des deux protéines NS1 et NS2 de manière concomitante. Les cellules ayant été transfectées avec NS1 ou NS2 ont des niveaux comparables d'expression de la protéine N, observation qui valide notre approche expérimentale. Nous avons perçu, cependant, que la transfection d'ARN interférente dirigée contre NS1 et NS2 augmente la transcription de l'ARN N (figure 3.2B, p. 47). Il est fort improbable que l'absence de NS1 et de NS2 stimule la production de virus. L'hypothèse actuelle du rôle de NS1 et NS2 serait que ces protéines modulent la réponse antivirale en faveur du virus. Par conséquent, l'inhibition de ces protéines aurait un effet néfaste sur la réplication du RSV.

Nous avons utilisé comme contrôle, le gène S9. S9 est un gène domestique codant pour une protéine ribosomale (NM_001013). Nous avons ultérieurement observé par PCR quantitative que l'expression du transcrite S9 ne varie pas lors d'une infection par le RSV.

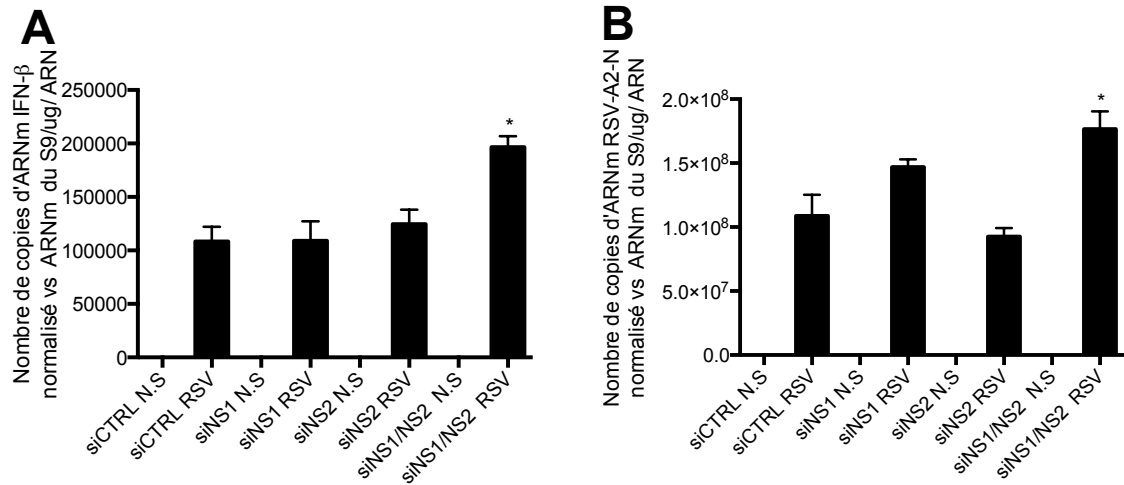


Figure 3-2 : Des ARNi dirigés contre NS1 ou NS2 lors d'une infection au RSV ne modulent pas la réponse antivirale

Des cellules A549 ont été transfectées avec 200 pmol d'ARNi contrôles ou 200 pmol d'ARNi spécifiques contre NS1 ou NS2 pendant 66 heures avant d'être infectées ou non (N.S) par RSV à un MOI de 3 pendant 16 heures. Par la suite, l'ARN total a été extrait et soumis à une transcription inverse et analysée par le PCR quantitatif à l'aide d'amorces spécifiques pour S9 et l'IFN- β . La valeur absolue de la copie d'ARNm de S9, de RSV-N et de l'IFN- β a été quantifiée à l'aide d'une courbe standard produite par des dilutions en séries de plasmides. Le tout fut normalisé par rapport au gène S9 (contrôle). Niveau d'ARNm est normalisé à la quantité d'ARNm retrouvée dans les cellules siCtrl non stimulées. Cette expérience a été accomplie une seule fois. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicatas dépendants : *, p 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

Figure 3-3 : L'absence de NS1 et NS2 ne stimule pas l'activité du promoteur de l'IFN- β

Afin de compléter les résultats obtenus dans la figure 3.2, nous avons dirigé des ARNi contre NS1 et NS2 lors d'une infection par RSV. Ensuite, nous avons quantifié l'activité du promoteur de l'IFN- β en présence et en absence des protéines non structurales en utilisant la technique d'essai luciférase rapporteur. Le plasmide utilisé fut IFN- β -prm-Pgl. L'absence de NS1 et NS2 diminue l'activité du promoteur de l'IFN- β à 8 heures et à 16 heures d'infection (figure 3.3A et B, p. 49). De plus, la diminution de l'activité du promoteur de l'IFN- β n'est pas due à une diminution du virus puisque nous avons mesuré ceci par immunobuvardage (figure 3.3C, p. 49). Les résultats de la figure 3.3 contredisent plusieurs études qui explorent la relation entre le NS1/NS2 et l'IFN- β , comme démontré par nos données de la figure 3.2.

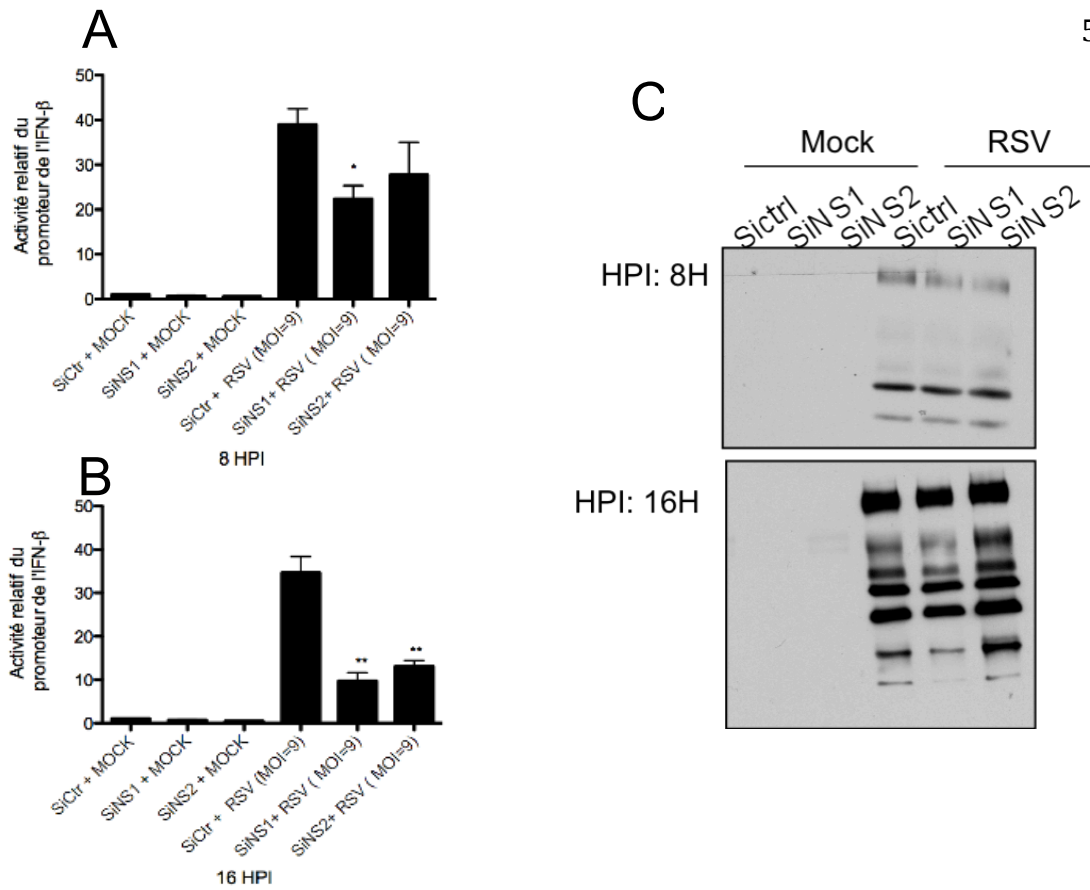


Figure 3- 3 : L'absence de NS1 et NS2 inhibe l'activité du promoteur de l'IFN- β

Des cellules A549 ont été transfectées avec des ARNi contrôles ou spécifiques contre NS1 ou NS2 pendant 66 heures avant d'être infectées ou non par RSV à un MOI de 11 pendant 8 heures (A) et 16 heures (B). Par la suite, les cellules ont été cotransfectées pendant 16 heures avec le plasmide pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne) et le IFN- β -pGL3 avant d'être infectées au RSV (A) à un MOI de 9. Les activités de luciférase ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition non stimulée après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicatas dépendants : *, p 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. C : Suivant l'analyse de luciférase, le lysat cellulaire fut analysé par western blot en utilisant un anticorps ciblant RSV.

Figure 3-4 : NS1 et NS2 peuvent moduler des cibles du facteur IRF-3 lors d'infection virale

Holtzman et coll. ont démontré que les cellules épithéliales infectées par le RSV stimule moins l'activité du promoteur des ISGs [164]. Par la suite, les auteurs du manuscrit ont transfecté des plasmides codant pour hNS1 et hNS2 dans des A549 et ont stimulé les cellules avec de l'IFN- β . Ils ont découvert que les cellules exprimant NS2 ou une combinaison de hNS1 et hNS2 antagonisent la transcription de OAS lorsque mesurées par PCR en temps réel. Ces mêmes cellules sont aussi plus permissives aux infections virales puisque les échantillons transfectés avec du hNS2 ou du hNS1 et hNS2 ont un titre viral de EMCV plus élevé que les conditions contrôles suivant un essai d'infection. Les cellules infectées avec du NS1 ont une activation de OAS réduites, mais ceci n'est pas significatif. Afin de vérifier le rôle de NS1 et NS2 lors de la réponse antivirale, nous avons transfecté différentes doses de NS1 et NS2 suivies d'une stimulation par RSV ou par le virus Sendai (SeV). Le SeV est membre de la famille *Paramyxoviridae*, il est donc apparenté au RSV. Le SeV ne possède pas de protéines non structurales. Le SeV induit une forte réponse antivirale. Nous nous attendions à ce que les cellules infectées au SeV ayant été transfectées avec des plasmides hNS1 ou hNS2 soient déficientes dans leurs activations de promoteur antivirales. Si nous observons l'activité du promoteur de IFN- β , nous observons qu'après une infection par RSV, les cellules exprimant NS2 et non NS1 sont capables d'interférer avec l'activité du promoteur de l'IFN- β . Ceci récapitule les données de l'équipe du Dr Holtzman. Si nous stimulons les cellules avec du virus SeV, nous observons que NS1 et NS2 sont capables de moduler l'activité du promoteur de IFN- β .

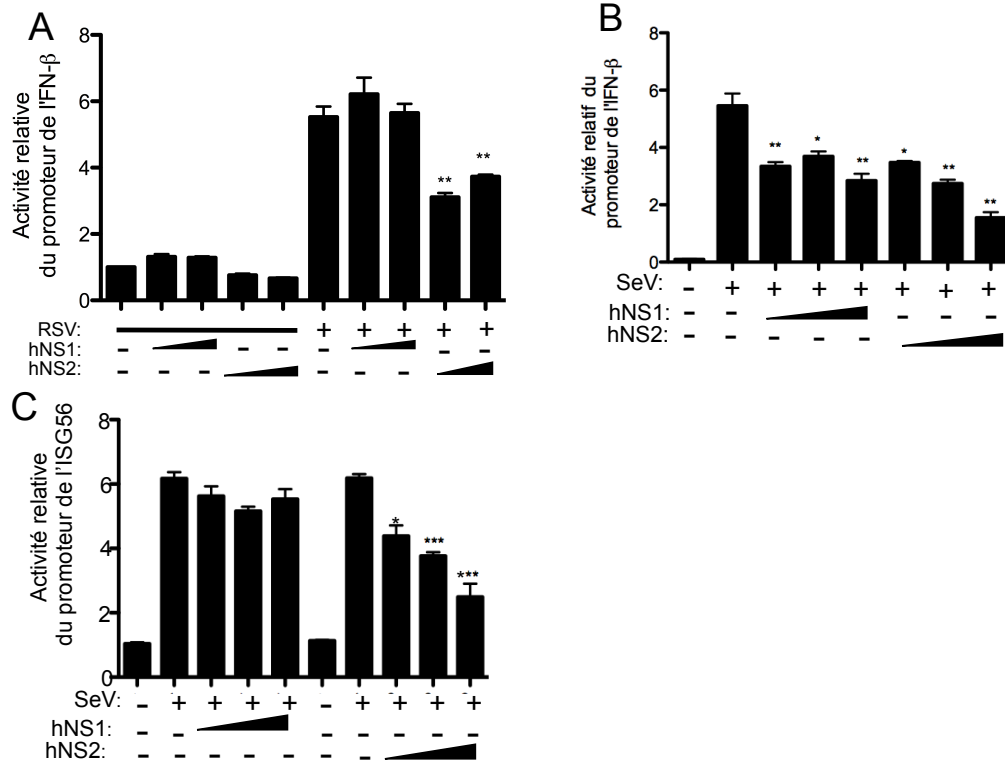


Figure 3-4 : NS1 et NS2 peuvent moduler des cibles du facteur IRF-3 lors d'infection virale
 A B et C : Des cellules A549 ont été cotransfectées pendant 16 heures avec différentes quantités (A. 250 ng et 500 ng , B et C. 125 ng , 250 ng, 500 ng) de plasmide codant pour les protéines virales NS1 ou NS2 ayant des codons optimisés pour la traduction dans des cellules humaines ainsi que pour pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne), le ISG56-pGL3 (C) ou le IFN-β-pGL3 (A et B) avant d'être infectées au RSV (A) à un MOI de 9 ou au SeV (B, C) pendant 8 heures. Les activités de luciférase ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition non stimulée après normalisation avec l'activité de luciférase de la *Renilla*. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicatas dépendants : *, p 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

Figure 3-5 : L'absence de NS1 et NS2 influence la sécrétion de plusieurs cytokines

Dans leur article séminal sur le rôle de NS1 et NS2 dans l'activation de la réponse immunitaire, Spann et coll. démontrent que l'absence des protéines non structurales inhibe la translocalisation de NF- κ B dans le noyau [38]. Ils observent par la suite une réduction de l'activité du promoteur de gènes dépendants de NF- κ B ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'IL-8, de RANTES et de TNF- α . Nous avons observé la même tendance lors d'un essai d'Elisa. Nous avons observé une diminution de la sécrétion de TNF- α et de IL-1 α , deux cytokines pro-inflammatoires. NS1 ou NS2 aurait donc un rôle pro-inflammatoire. Du côté de la réponse antivirale, nous n'avons pas observé d'augmentation ou de changement de production chez IFN- α , IFN- ω et IFN- λ . IP-10 est une protéine induite par IFN- γ . Elle attire les cellules immunitaires aux sites d'infections. Nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de IP-10. Cependant, nous avons remarqué une réduction de l'activité de l'IFN- β . Les résultats de la figure 3.5 (p. 53) ont été générés par Karin Fink.

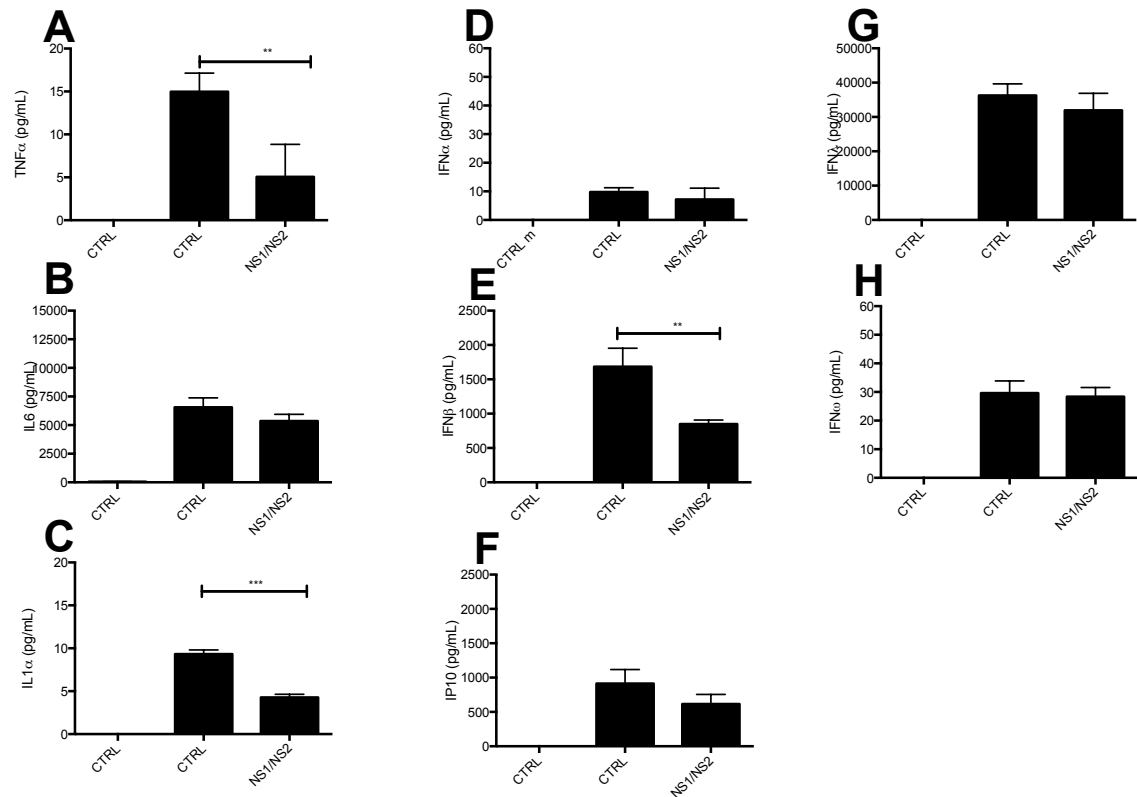


Figure 3-5 : L'absence de NS1 et NS2 influence la sécrétion de plusieurs cytokines

L'expression de TNF- α et de IL-1 α , IL-6, l'IFN- β IFN- α , IP10, IFN- ω et IFN- λ a été mesurée en utilisant le kit *VeriPlex*TM Human Interferon Multiplex ELISA. Le surnageant des cellules A549 fut récolté après avoir été transfecté avec des ARNi contrôles ou spécifiques ciblant NS1 et NS2. Les cellules ont été infectées avec du RSV pendant 24 heures. Les analyses statistiques sont le *one-way* ANOVA suivi du Dunnett post test en utilisant siCtrl-RSV comme contrôle. Les barres indiquent la moyenne \pm SEM. Les résultats sont issus de trois triplicatas dépendants; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

3.1 B : Étude de la fonction de MDA5 lors de la réponse antivirale

Figure 3-6 : RIG-I et MDA5 modulent l'activation d'IRF-3

L'activation d'IRF-3 est médiée par plusieurs PPR tel que TLR-3, RIG-I et possiblement MDA-5. Chaque PPR intervient à différentes phases de l'infection et sert à soutenir la réponse immunitaire. Par rapport aux infections par RSV, le modèle actuel de l'activation d'IRF-3 par RIG-I et TLR-3 comprend deux phases. IRF-3 initialement activé par RIG-I est, plus tard au cours de l'infection l'activation d'IRF-3, soutenu principalement par TLR-3 [167]. Peu d'études ont exploré le rôle de MDA5 sur IRF-3 lors d'une infection au RSV et pour cause : l'importance de RIG-I dans l'activation de IRF-3 fut découverte très tôt [172]. De plus, une étude publiée en 2007 montre que lors d'une expérience d'immunoprécipitation, MDA5, contrairement à RIG-I, ne s'associe pas avec l'ARN du RSV [167]. MDA5 est cependant important à la réponse immunitaire. Nous avons démontré que la réduction de MDA5 lors d'une infection au RSV compromettrait l'activation de NF- κ b lorsque mesurée par luciférase [88].

Les panels A et B démontrent l'effet de la diminution de RIG-I ou de MDA5 sur IRF-3. Un des marqueurs d'activation d'IRF-3 est l'apparition de formes phosphorylées d'IRF-3, plus précisément, la phosphorylation d'IRF-3 à la Serine 396. Nous observons dans les conditions contrôles que l'apparition des formes phosphorylées d'IRF-3 (les formes III et IV) des 4 heures post infections. Cette observation nous confirme que l'infection au RSV active IRF-3. Dans les cellules traitées avec des ARNi ciblant RIG-I, nous n'observons pas de forme phosphorylée d'IRF-3 suivant la stimulation au RSV. Ceci confirme le rôle de RIG-I comme PPR qui enclenche l'activation de IRF-3 (figure 3.6A, p. 55). Nous observons aussi que la diminution de RIG-I diminue le niveau de base de MDA5. Ceci n'est sûrement pas un effet non spécifique. MDA5 est régulé par les IFNs. Une perte de RIG-I compromet la signalisation des IFNs qui diminue la production de MDA5. Dans les conditions traitées avec des ARNi ciblant MDA5, nous observons que l'absence de MDA5 provoque, aux heures précoces, une réduction des formes III et IV ainsi que la phosphorylation de IRF-3 à la Serine 396 (figure 3.6B, p. 55). Contrairement à RIG-I, l'absence de MDA5 induit la dégradation de IRF-3 aux heures plus tardives. Ces résultats nous poussent à émettre l'hypothèse que le rôle de MDA5 est de soutenir l'activation de IRF-3.

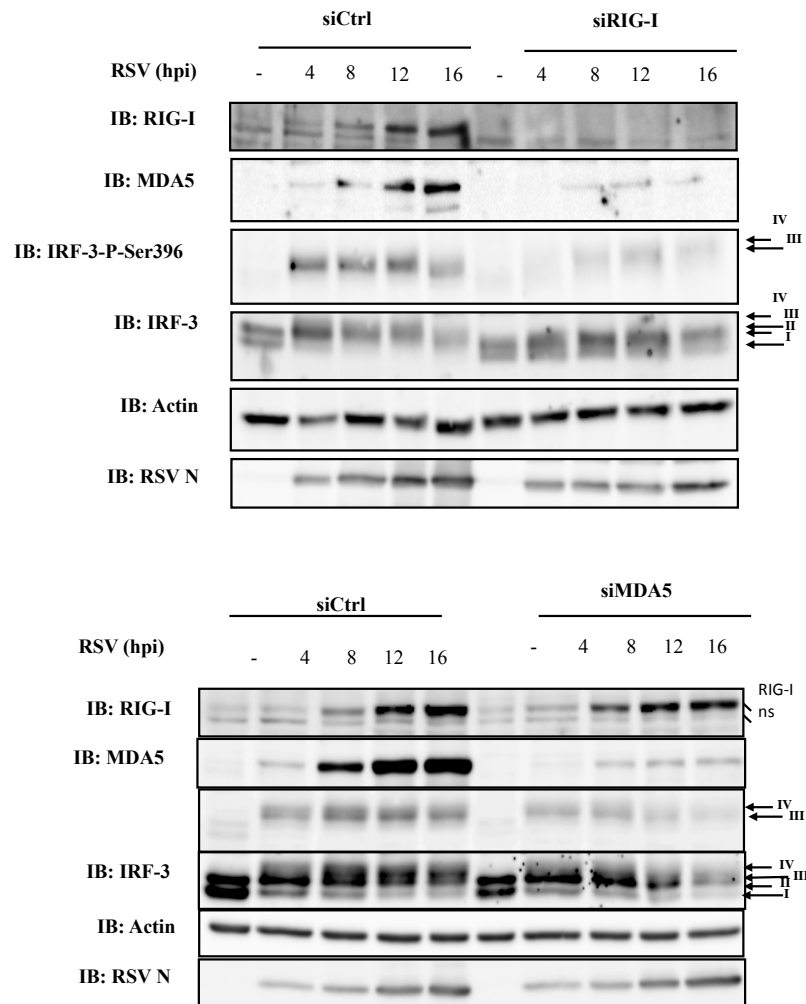


Figure 3-6 : RIG-I et MDA5 modulent l'activation d'IRF-3

A et B : Des cellules A549 ont été transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi spécifiques pour RIG-I ou MDA5 pendant 48 heures avant d'être infectées ou non par RSV à un MOI de 3 pendant les temps indiqués. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose suivi par un immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences différentes.

Figure 3-7: La dégradation d'IRF-3 produit par l'absence de MDA5 se traduit en une réduction de la réponse antivirale

Dans cette expérience, nous voulions déterminer si la dégradation d'IRF-3 causée par l'inhibition de l'expression de MDA5 pouvait se traduire en une diminution de la réponse antivirale. Nous avons donc transfecté des cellules A549 avec de l'ARNi contre MDA5 suivi d'une infection au RSV. Nous observons qu'à 8 heures, l'absence de RIG-I, et non de MDA5 a eu un effet sur l'activité du promoteur de ISG56, un marqueur pour l'activité d'IRF-3 (figure 3.7A et B, p. 57). Cependant, à 16 heures, l'heure où l'on observe une diminution d'IRF-3 par immunobuvardage en absence de MDA5, nous remarquons également une diminution de l'activité du promoteur d'ISG56 dans les cellules traitées avec des ARN interférents contre MDA5. Nous récapitulons ces observations lorsque nous détectons la protéine ISG56 par une analyse de type immunobuvardage (figure 3. 7 A, B, p. 57). Nous observons que l'absence de RIG-I ne permet pas la production de ISG56 aux heures précoces, tandis qu'aux heures plus tardives, nous observons une légère augmentation de ISG56. Cette activation de la réponse pourrait être due à l'augmentation de l'activité de TLR3. En ce qui a trait à l'absence de MDA5, nous observons que la production de ISG56 augmente et plafonne à 12 heures de manière identique aux cellules contrôle. À 16 heures, il y a toutefois moins d'ISG56 lorsque l'on compare avec 12 heures alors que dans les cellules contrôles, l'expression de la protéine continue d'augmenter. Ceci corrèle avec la dégradation d'IRF-3.

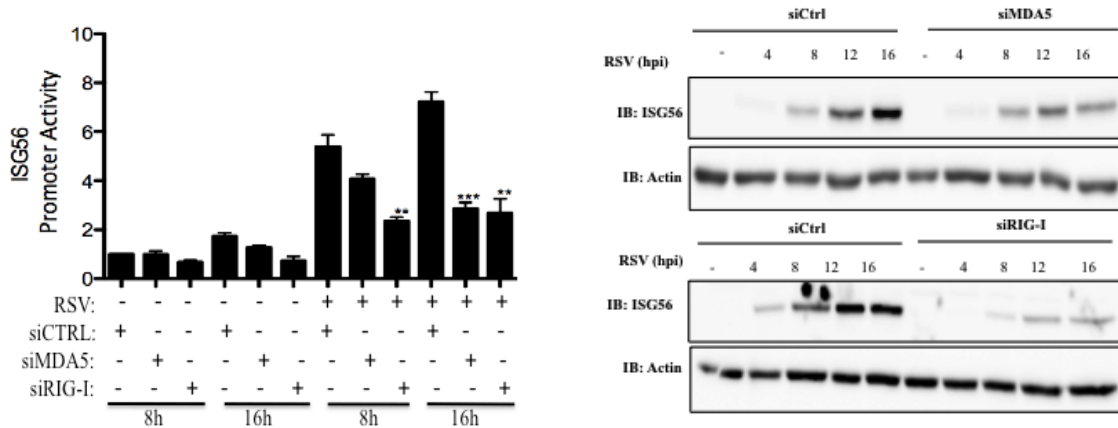


Figure 3-7 : La dégradation d'IRF-3 produit par la diminution de l'expression de MDA5 se traduit par une réduction de la réponse antivirale

A : Des cellules A549 ont été transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi spécifiques pour MDA5 ou RIG-I pendant 48 heures avant d'être transfectées avec le pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne) et le plasmide ISG56prom-pGL3 luciférase pendant 8 heures. Par la suite, ces cellules ont été infectées ou non avec un RSV à un MOI de 9 pendant les heures indiquées. Les activités de luciférase ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition non stimulée après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicats dépendants : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

B : Des cellules A549 ont été transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi spécifiques contre RIG-I ou MDA5 pendant 48 heures avant d'être infectées ou non par RSV à un MOI de 3 pour les temps indiqués. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose suivie d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences différentes.

Figure 3-8 : MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3

Afin de confirmer que la fonction de MDA5 était différente de la fonction de RIG-I comme nous l'avons déterminé par l'utilisation de ARNi, nous avons transfecté un plasmide pFlag-MDA5 en présence ou en absence d'ARN interférent dirigé contre RIG-I lors d'une stimulation au RSV. Si l'homologue de RIG-I contribuait à la phosphorylation d'IRF-3, nous nous attendions d'observer une augmentation de la phosphorylation IRF-3 dans les conditions où nous avons transfecté MDA5. De plus, dans les conditions où nous avons diminué l'expression de RIG-I, nous nous attendions à observer que la surexpression de MDA5 compense le manque de phosphorylation d'IRF-3 engendré par la perte de RIG-I.

Nos résultats sont forts intéressants. Premièrement, la diminution efficace de RIG-I induit une diminution de la phosphorylation d'IRF-3. Deuxièmement, l'expression ectopique de MDA5 induit l'expression de RIG-I, même en absence de stimulation. L'ajout du RSV ne semble pas augmenter l'expression de RIG-I à la suite d'une activation par l'expression de MDA5. Le mécanisme serait donc saturable. Dans les puits où nous avons exprimé MDA5 et infecté les cellules par RSV, nous remarquons une diminution de la phosphorylation d'IRF-3 à la Serine 396, une diminution des formes IV et III, ainsi qu'une légère augmentation de la forme I d'IRF-3 par rapport aux cellules contrôle. Finalement, dans les conditions où nous avons exprimé MDA5 et inhibé l'expression de RIG-I, nous n'observons pas de rétablissement de la phosphorylation d'IRF-3.

Ces résultats suggèrent que MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3. La diminution de la phosphorylation d'IRF-3 suggère un mécanisme de compétition entre MDA5 et RIG-I pour un substrat. Selon ce modèle, MDA5 et RIG-I font la concurrence pour de l'ARN viral. Quand une molécule d'ARN viral est captée par RIG-I, elle contribuerait à la phosphorylation d'IRF-3. Quand une molécule d'ARN virale est captée par MDA5, elle contribuerait à une augmentation de la durée de vie d'IRF-3.

La séquestration des molécules d'ARN viral par MDA5 permet néanmoins l'activation de la réponse antivirale, et ce, d'une manière indépendante de la phosphorylation d'IRF-3. En effet, une expérience de gène rapporteur luciférase démontre que suivant une stimulation par le RSV, le promoteur d'ISG56 est actif. Si notre modèle est vrai, nous devrions nous demander pourquoi nous n'observons pas une accumulation d'IRF-3 dans les conditions transfectées avec MDA5.

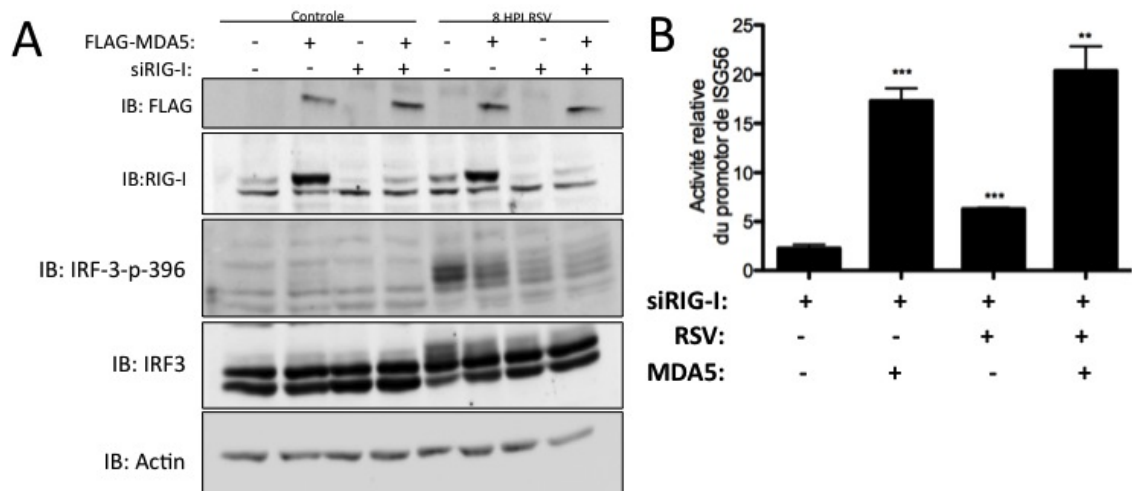


Figure 3-8 : MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3

A : Des cellules A549 ont été transfectées avec un oligonucléotide ARN contrôle ou des oligonucléotides ARN interférant spécifiques contre RIG-I pendant 48 heures avant d'être infectées ou non par RSV à un MOI de 3 pendant 8 heures. Les WCE ont été résolus par SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose suivie d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Cette expérience a été accomplie une seule fois.

B : Des cellules A549 furent transfectées avec des ARN contrôles ou spécifiques contre RIG-I pendant 48 heures avant d'être transfectées avec le pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne), le promoteur ISG56-pGL3 luciférase pour 8 heures et 500 ng de FLAG-MDA5. Par la suite, ces cellules furent infectées ou non avec un RSV à un MOI de 9 pendant 16 heures. Les activités luciférase ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition non stimulée après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicata dépendants : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Figure 3-9: MDA5 favorise la dimérisation d'IRF-3.

Le modèle d'activation actuel de la réponse antivirale stipule que IRF-3 est phosphorylé par IKK ϵ et TBK1 [118]. Cette phosphorylation permet par la suite l'homodimérisation d'IRF-3 [125]. La phosphorylation serait donc nécessaire pour la transcription de gène dépendant d'IRF-3 tel qu'ISG56. Afin de déterminer si MDA5 active la réponse antivirale en agissant directement sur IRF-3 nous avons étudié l'effet de l'expression de MDA5 sur la capacité d'IRF-3 à former des dimères. Nous observons que la transfection de deux plasmides codants pour MDA5 ayant été amplifiée séparément afin d'exclure la possibilité d'une contamination, n'augmente pas la phosphorylation d'IRF-3. Cependant, une exposition longue d'une expérience de dimérisation révèle une faible trace à la hauteur de la bande de migration de dimère de IRF-3. Des analyses plus poussées devront être faites afin de déterminer si MDA5 agit au niveau de la formation du dimère.

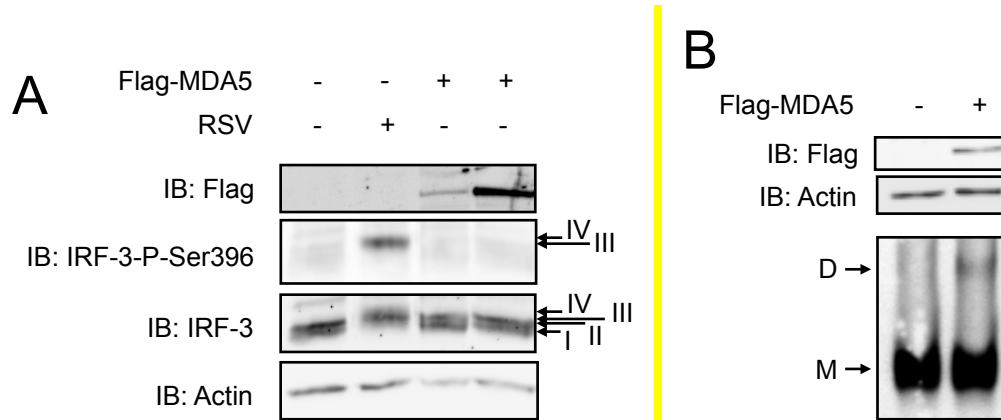


Figure 3- 9 : MDA5 favorise la dimérisation d'IRF-3

A : Des cellules A549 ont été transfectées avec un plasmide contrôle ou un plasmide codant pour la protéine FLAG-MDA5 pendant 24 heures. À titre de contrôle positif, des cellules A549 ont été infectées avec du RSV à un MOI de 3 pendant 8 heures. Les WCE ont été résolus sur gel dans des conditions gels natifs non dénaturantes (B) ou dénaturantes (A) avant d'être transférés sur membrane de nitrocellulose suivie d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps indiqués. L'actine a servi de contrôle de chargement. Ces résultats ont été reproduit deux fois.

Figure 3-10 : Le protéasome est impliqué dans la dégradation d'IRF-3

Le protéasome est un complexe protéique qui dégrade les protéines conjuguées à une molécule d'ubiquitine. Le rôle du protéasome est de dégrader les protéines mal repliées et désuètes. Le protéasome peut agir sur les voies de signalisation en dégradant des protéines impliquées dans la transmission de signal. Par exemple, le protéasome module la réponse inflammatoire en dégradant l'inhibiteur de NF- κ B [173]. En ce qui concerne la réponse antivirale, la première étude liant le protéasome et la dégradation d'IRF-3 remonte à 1998 [124]. Ici, les auteurs du document démontrent que l'on peut prévenir la dégradation d'IRF-3 en inhibant le protéasome avec l'aide du MG132. Comme le MG132, la lactacystine est un inhibiteur du protéasome. La lactacystine est un antagoniste irréversible et efficace puisqu'elle pénètre facilement dans les cellules.

Afin de déterminer si la disparition prématurée d'IRF-3 induite par l'inhibition de MDA5 au cours d'une infection par RSV passe par le même mécanisme que la dégradation naturelle d'IRF-3, nous avons transfecté des cellules A549 avec des ARNi contrôles ou des ARNi spécifiques contre MDA5 avant l'infection par le RSV. Les cellules ont été traitées par la lactacystine ou le DMSO (véhicule). Si l'absence de MDA5 induit la dégradation d'IRF-3 par un mécanisme qui est indépendant du protéasome, l'ajout de la lactacystine ne devrait pas prévenir la dégradation du facteur de transcription. Notre analyse de la figure 3.10 nous montre que notre traitement ARNi contre MDA5 a été efficace puisque nous avons une diminution de l'expression de MDA5. Aussi, les cellules traitées avec de la lactacystine expriment plus fortement IRF-3 à 4 h et à 8 h, ce qui suggère que notre traitement de lactacystine inhibe bien la dégradation par le protéasome. Quant à la dégradation prématurée d'IRF-3, nous observons que les cellules traitées avec de la lactacystine expriment plus fortement IRF-3 à 16 heures que les cellules traitées avec un contrôle au DMSO. Ceci semble suggérer que la dégradation d'IRF-3 se fait par le protéasome. Notre expérience de dimérisation récapitule nos observations. IRF-3 est moins dégradé en présence de la lactacystine.

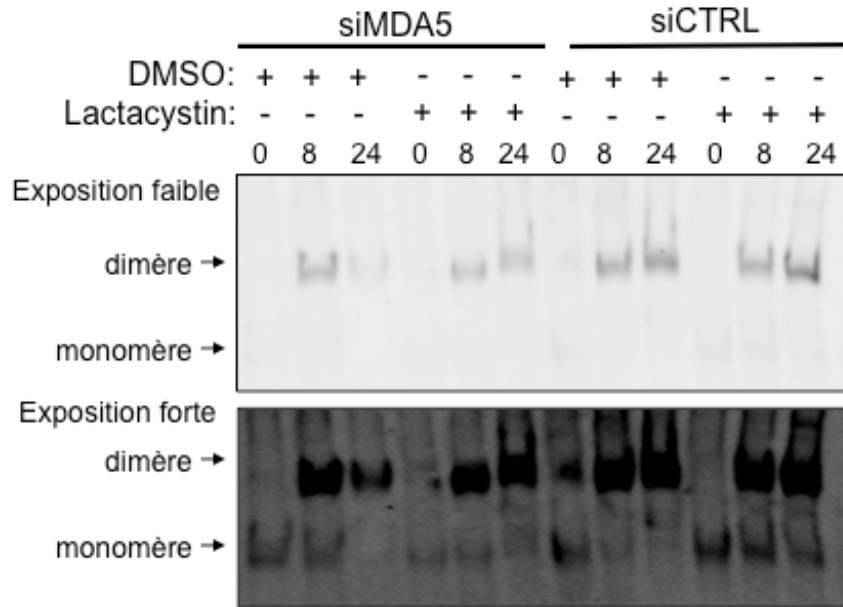


Figure 3-10 : Le protéasome est impliqué dans la dégradation d'IRF-3

Des cellules A549 ont été transfectées avec des ARNi contrôle ou des ARNi spécifiques pour MDA5 pour 56 heures avant d'être prétraitées pendant 1 h avec 8 mM de lactacystine ou de DMSO (véhicule) ensuite infecté ou non avec du RSV à un MOI de 3 pour les temps indiqués. Les WCE ont été résolus par électrophorèse non-dénaturant avant d'être transférés sur membrane de nitrocellulose suivie d'immunobuvardage (IB) à l'aide des anticorps ciblant IRF-3.

Figure 3-11: L'absence de MDA5 induit une diminution dans l'activation du promoteur de ISG56 dans les cellules HEC1B infectées par le RSV

L'induction de MDA5 lors d'une infection est indépendante des interférons, de STAT1 et de NF- κ B[174]. Cependant, dans des cellules DC KO pour IRF-3, l'induction de MDA5 est perdue. MDA5 serait donc modulable par IRF-3 et IRF-3 serait modulable par MDA5. Afin d'explorer cette dynamique, des ARNs interférents ciblant MDA5 furent transfectés dans des cellules HEC1B qui ont une réponse à l'IFN compromise. Les résultats démontrent que l'absence de MDA5 compromet l'activation du promoteur de ISG56. La cinétique fut étendue. Ceci peut être expliqué par le fait que les cellules prennent plus de temps à activer leurs défenses antivirales puisque la signalisation des IFNs est compromise. Nos résultats démontrent que la perte d'IRF-3 produite par inhibition de l'expression de MDA5 est indépendante des IFNs. Ils démontrent aussi que le mécanisme de répression sur IRF-3 n'est pas présent dans plus d'un type de cellule.

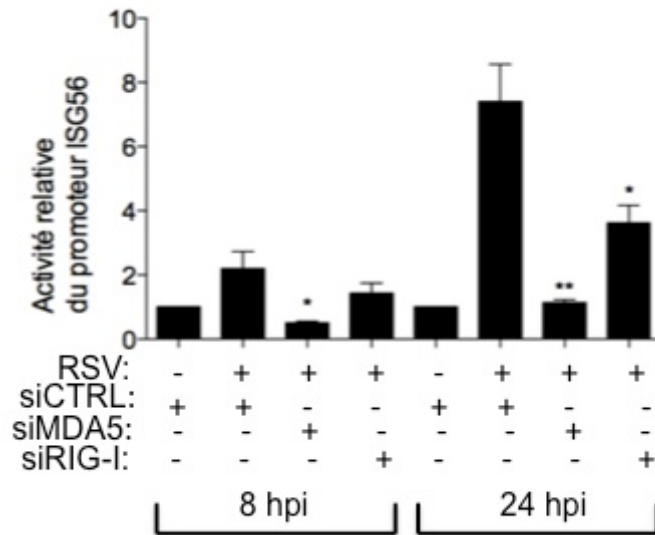


Figure 3- 11 : L'absence de MDA5 induit une diminution dans l'activation du promoteur de ISG56 dans les cellules HEC1B infectées par le RSV

Des cellules HEC1B ont été transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi spécifiques pour MDA5 ou RIG-I pendant 48 heures avant d'être transfectées avec le pRL-null *Renilla* luciférase (contrôle interne) et le plasmide ISG56prom-pGL3 luciférase pendant 8 h. Par la suite, ces cellules ont été infectées ou non avec un RSV à un MOI de 9 pendant les heures indiquées. Les activités luciférases ont été exprimées comme des ratios par rapport à la condition non stimulée après normalisation avec l'activité luciférase de la *Renilla*. Les barres indiquent la valeur moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été évaluées en utilisant le T-Test. Les résultats sont issus de trois triplicata dépendants : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Chapitre 4 : Discussion

4.1. Approche méthodologique utilisée pour définir le rôle de NS1 et NS2

Les virus se protègent de la réponse antivirale de plusieurs façons. Par exemple, ils peuvent empêcher la synthèse des molécules d'IFNs suivant la détection d'un pathogène par un PRR ou ils peuvent compromettre la cascade de signalisation effectrice qui est activée à la suite de l'enclenchement du récepteur IFNAR. Les protéines NS1 et NS2 codées par le génome du RSV agissent à deux niveaux. Le modèle actuel expliquant les fonctions de NS1 et de NS2 est issu de l'amalgame de plusieurs études basées sur une panoplie de types cellulaires qui utilisent différentes souches de RSV et de modes d'infections ainsi que différents MOI de virus au temps d'infection. Les résultats sont souvent contradictoires et biaisés par les méthodologies utilisées pour effectuer les observations.

En se basant sur cette observation de la littérature, notre but était de confirmer le rôle des protéines NS1 et NS2 dans l'activation de la réponse antivirale médiée par le facteur IRF-3 et, le cas échéant, d'en étudier les mécanismes. Afin d'examiner le rôle de NS1 et NS2 sur IRF-3, nous avons opté pour une stratégie d'ARN interférant nous permettant de faire des études de perte de fonction tout en évitant de modifier le génome viral et, de ce fait, de potentiellement en modifier les caractéristiques de répllication comme cela a été fait dans d'autres études décrites ci-dessous. Afin de compléter nos observations, nous avons également utilisé des plasmides permettant d'exprimer NS1 et NS2 à partir des séquences humanisées [164] et donc de réaliser des expériences de gain de fonction indépendamment de l'infection. Cette approche nous a permis de contrevalider nos observations par deux méthodes différentes et complémentaires. Les méthodologies que nous avons utilisées pour évaluer la réponse antivirale sont l'essai luciférase, la quantification de l'ARNm par qPCR ainsi que l'analyse des sécrétions protéines par multiplexe. L'analyse de l'activité du promoteur par essai de luciférase permet d'analyser la transcription d'un gène. Les quantifications d'ARNm par qPCR permettent d'analyser la transcription, mais prennent également en compte la stabilité de l'ARNm. Par contre, ces méthodes n'indiquent pas nécessairement si l'ARNm sera traduit.

4.1.1 Évaluation de la perte de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale

Nous avons comme objectif d'évaluer la perte des protéines non structurales sur l'activation d'IRF-3 par le biais de marqueurs de l'activation de la réponse antivirale : IFN- β et l'ISG56. Nous avons observé que la perte de NS1 et NS2 par ARN interférant n'augmente pas l'activité luciférase du promoteur de l'IFN- β , ni la production l'ARNm de l'IFN- β ou

la sécrétion de l'IFN β mesurée par ELISA. Nous avons aussi démontré que l'absence de NS1 et NS2 induisait une perte dans la sécrétion du TNF- α et de IL-1 α . Comme nous, plusieurs études ont évalué la perte de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale. Les résultats de ses études contredisent nos trouvailles. Par exemple, en utilisant des virus recombinants, Spann et coll. ont démontré par essai luciférase que la perte des protéines non structurales augmente l'activité du promoteur de gène IRF-3-dépendant [38]. Kim Trin C et coll. ont démontré en utilisant un virus recombinant que l'absence de NS1 et NS2 induit une augmentation de IFN β par analyse de type *Northern* [175]. De leur côté, Spann et coll. 2004 ont démontré que l'absence de NS1 ou NS1 et NS2 augmentait la production de IFN β sécrété suivant une infection au RSV recombinant [161].

En ce qui concerne l'effet de NS1 et NS2 sur l'expression des protéines virales, nous avons remarqué que la perte de NS1 ou de NS2 n'influence pas l'expression des protéines virales. Des études issues de virus recombinant telles que celles de Swedan et coll. et de Teng et coll. ont révélé que l'inhibition de NS2 diminue l'expression de NS1 et vice-versa [38, 171]. Dans ces études, il est donc difficile d'attribuer un rôle précis à une protéine non structurale.

4.1.2 Évaluation de l'expression ectopique de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale

Nos résultats explorant l'effet de la transfection ectopique des protéines non structurales concordent avec la majorité des résultats publiés. L'expression NS1 et NS2 module la réponse antivirale à plusieurs niveaux. L'expression de NS1 diminue l'activité du promoteur de IFN β lorsqu'il est infecté avec un SeV, un virus apparenté au RSV ne pouvant pas se masquer efficacement de la réponse antivirale. L'expression de NS2 modulerait la réponse antivirale au niveau de l'IFN β et de ISG56, peu importe le virus testé : RSV ou SeV. Swedan et coll. ont démontré que l'expression ectopique de NS1 et NS2 réduisait l'activité du promoteur de ISG54 et de l'IFN β lorsqu'ils sont infectés par un virus recombinant n'exprimant pas NS1 et NS2 (RSV Δ NS1 Δ NS2) [39]. Nos résultats démontrent toutefois que NS1 ne pouvait pas moduler l'activité du promoteur de l'IFN β suivant une infection au RSV. Tel qu'expliqué dans la section résultats, le virus que nous avons utilisé exprime la protéine NS1. Donc, l'ajout d'un surplus de NS1 n'a pas d'effet mesurable sur l'activité du promoteur puisque le mécanisme d'inhibition est déjà entamé. Cependant, dans le cas du virus RSV Δ NS1 Δ NS2, l'ajout de NS1 permet l'inhibition du facteur de l'IFN β puisqu'il n'y a pas de NS1 de base pour inhiber l'activation du promoteur. Pareillement, Ling

et coll. ont démontré que l'expression de NS2 ectopique inhibait l'activité du promoteur de l'IFN- β et de ISG56 lorsque la réponse antivirale était déclenchée par la transfection de RIG-I constitutivement active [162]. Finalement, Holtzman et coll. ont démontré que l'expression NS1 et NS2 ectopique pouvait réduire la production de OAS suivant une stimulation à l'IFN- β [164].

4.1.3 Évaluation du rôle des virus comme outil de recherche de NS1 et NS2 sur l'activation d'IRF-3 par l'entremise de virus recombinants

Les données issues de la littérature suggèrent que NS1 et NS2 ont des habilités qui permettent d'évader la réponse antivirale. Cependant, nous n'avons pas observé une augmentation dans la sécrétion de l'IFN- β en absence de NS1 ou de NS2. Afin de résoudre cette discordance, il est important d'évaluer les expériences antérieures. La majorité des résultats explorant le rôle de NS1 et NS2 lors d'une infection au RSV sont issus d'études basées sur des virus recombinants. Cependant, les virus recombinants ont plusieurs faiblesses. Dans la section ci-dessous, nous évaluerons les données issues de manuscrits examinant le rôle de NS1 et NS2 sur la réponse antivirale utilisant des virus recombinants.

Spann et coll. fut l'une des premières équipes à observer directement le rôle de NS1 et NS2 sur l'activation d'IRF-3 par microscopie immunofluorescence [38]. Afin d'étudier la contribution des protéines non structurales sur la réponse antivirale, les auteurs ont observé l'absence de NS1 et NS2 sur IRF-3 en utilisant des virus recombinants. Par la suite, ils ont calculé le pourcentage de cellules ayant du IRF-3 dans le noyau à un temps donné. Un survol de leurs résultats souligne les difficultés liées à l'utilisation de virus recombinants. Plus précisément, les auteurs affirment que l'absence de NS1 ou NS2 prolonge l'activation d'IRF-3 lorsqu'elle est comparée à l'infection par le virus de souches sauvages (RSVwt). Par contre, si nous observons plus précisément leurs résultats, il est possible de nuancer cette affirmation. En ce qui concerne les virus recombinants n'exprimant pas NS1 (RSV Δ NS1), les résultats sont clairs et précis, soit une prolongation de l'activation d'IRF-3. Les auteurs observent plus d'IRF-3 dans le noyau par immunofluorescence. Cependant, dans le cas de cellules infectées avec du virus n'exprimant pas NS2 (RSV Δ NS2), les résultats sont nébuleux et nécessitent une clarification. Le patron d'activation d'IRF-3 issu de cellules infectées avec du RSV Δ NS2 diffère de celui des cellules infectées avec du RSVwt. Une comparaison directe du niveau de translocation nucléaire d'IRF-3 par immunofluorescence révèle qu'à 6 h et à 10 h les cellules

infectées avec du RSV Δ NS2 affichent moins d'IRF-3 dans le noyau que les cellules infectées avec du RSVwt. Si NS2 inhibe l'activation d'IRF-3, le patron d'activation opposé serait plutôt attendu. En effet, Swedan démontre que la transfection ectopique de NS2 augmente légèrement l'expression de IKK ϵ [39]. Conjointement, ces deux résultats suggèrent que NS2 semble plutôt stimuler l'activation d'IRF-3. Mais, si nous analysons minutieusement la localisation d'IRF-3 à 10 h et à 14 h, nous observons que le déplacement d'IRF-3 vers le noyau augmente et tend vers la norme. L'activation d'IRF-3 serait donc retardée. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la perte de NS2 décélère l'activation d'IRF-3. Selon notre analyse, ce délai est dû à une réplication compromise chez les virus RSV Δ NS2. Dans la même étude, les auteurs soulignent une sous-production des protéines N et P dans les conditions infectées au RSV Δ NS2. Malheureusement, les auteurs de l'article négligent d'ajouter un gène de référence. Il est donc difficile de contextualiser l'importance de la diminution des protéines N et P. Cependant, une revue de la littérature révèle que le virus RSV Δ NS2 utilisé dans l'étude de Spann a des capacités de réplication affaiblies [171]. Cette observation appuie notre hypothèse que le virus ne se réplique pas à la même vitesse que le virus de type sauvage et il est donc raisonnable de supposer qu'IRF-3 ne s'est pas accumulé dans le noyau convenable puisqu'il y a eu un délai dans son activation. Le délai dans l'activation d'IRF-3 serait causé par un retard dans la capture de particule virale par les PRR causé par une diminution relative du nombre de particules virales. En effet, l'activation d'IRF-3 est dépendante de la réplication du virus. Du RSV traité aux UV ne peut pas se répliquer et ne peut pas activer IRF-3 [38].

Afin de bien cibler le rôle de NS2, il faudrait aussi analyser l'accumulation nucléaire d'IRF-3 par immunobuvardage de type western et observer si au fil du temps la perte de NS2 étend le plateau d'activation d'IRF-3 comme on l'observe dans les conditions d'infections aux RSV Δ NS1. Dernièrement, afin de vérifier notre hypothèse, il faudrait mesurer le titre de virus infecté au RSV Δ NS2 afin d'observer si la réplication du virus est bel et bien compromise.

Il est particulièrement intéressant d'observer que, dans cette même étude, les auteurs font l'observation que le facteur de transcription NF- κ B est aussi sous activé en absence de NS2. Le fait que l'activation de NF- κ B suit le même patron d'activation que celui d'IRF-3 suggère que le mécanisme qui sous-tend la sous-activation d'IRF-3 est général. Ceci appuie

l'hypothèse que le virus NS2 se réplique moins bien que le virus RSVwt type. En effet, nous avons montré que la réplication de RSV est nécessaire à l'activation de NF- κ B [88]. Cette distinction n'est pas sans conséquence. Est-ce que l'activation prolongée d'IRF-3 est due à la perte de fonction de NS2 ou au fait que la cellule ne détecte pas la présence de particules virales à des heures précoces? Il est donc difficile de conclure le rôle de NS2 avec l'utilisation du virus RSV Δ NS2.

Les résultats issus de virus KO RSV Δ NS1 Δ NS2 sont aussi difficiles à interpréter. À 6 h, l'absence de NS1 et NS2 sous active IRF-3 comparé au virus de type sauvage, mais à 10 h, le niveau d'IRF-3 dans le noyau est comparable au niveau du RSVwt. Nous observons donc une juxtaposition des deux phénomènes. Au début, l'absence de NS2 ralentit la production de particules virales, ce qui a pour effet de réduire l'accumulation d'IRF-3 dans le noyau. À des heures plus tardives, nous observons que la perte de NS1 stimule l'activation d'IRF3 dans le noyau.

En 2009, Ling et coll. ont repris l'expérience de Spann quant à l'effet de NS2 sur IRF-3 et ont obtenu des résultats différents. D'après les auteurs, la contribution de NS2 lors d'une infection au RSV était fortement sous-estimée dans les travaux de Spann. Afin de corriger ces sous-estimations, Ling et coll. ont adapté la méthodologie de Spann [162]. Spann et coll. avaient évalué l'activation d'IRF-3 en calculant le ratio de cellules montrant des IRF-3 activés dans leurs noyaux sur le nombre total de cellules estimées par marquage au DAPI [38]. Selon Ling et coll., ces résultats étaient erronés puisqu'ils supposaient que toutes les cellules étaient infectées. Dans cette nouvelle étude, les auteurs ont calculé le ratio de cellules portant du IRF-3 activé sur un total de cellules marquées par un anticorps ciblant la protéine F du RSV. La méthodologie de Ling et coll. a révélé, lors d'une série d'expériences nouvelles, qu'en absence de NS2, l'accumulation d'IRF-3 dans le noyau était supérieure à l'accumulation à la suite d'une infection au RSVwt à des heures précoces [162]. Cependant, les études de Spann et Ling diffèrent sur un autre point important. Bien que les deux études utilisent les mêmes virus au même MOI ainsi que le même type cellulaire, la cinétique d'activation d'IRF-3 n'est pas la même. Dans les expériences de Ling et coll., IRF-3 n'est pas dégradé à 16 h [162]. Selon notre expérience et dans l'article de Spann, une diminution significative d'IRF-3 est observée à 16 h [38]. Il serait intéressant de déterminer les facteurs qui expliquent pourquoi IRF-3 n'est pas dégradé à la même heure dans les deux

expériences. En absence d'explication, une comparaison directe entre les deux expériences n'est pas recommandée considérant l'importance de la cinétique dans l'effet observé de NS2 par Spann et coll. [38].

4.1.4 Évaluation du rôle de NS1 dans la réponse antivirale

En ce qui concerne NS1, le mécanisme d'action qui qualifie le mode d'inhibition d'IRF-3 reste à être élucidé. En 2011, J.Ren et coll. ont publié un article démontrant que NS1 peut interagir directement avec IRF-3 et inhiber la liaison du facteur de transcription avec sa séquence cible [176]. Bien que le manuscrit contribue beaucoup à l'avancement de nos connaissances sur le mécanisme d'inhibition d'IRF-3 par NS1, il laisse plusieurs questions sans réponses.

Premièrement, le fait que NS1 empêche la liaison d'IRF-3 à sa séquence cible n'explique pas comment, en absence de NS1, l'activation d'IRF-3 est plus prononcée et prolongée. La liaison d'IRF-3 se fait dans le noyau et l'entrée d'IRF-3 dans le noyau se fait en aval de cet événement. NS1 aurait-il donc deux rôles? De plus, contrairement aux autres groupes, les auteurs du manuscrit n'observent pas une augmentation d'IRF-3 dans le noyau suivant une infection au RSV Δ NS1 comme on peut l'observer dans les manuscrits de Ling, e Tran K.C et de Spann [38, 162, 171]. En effet, les auteurs observent moins d'IRF-3 dans le noyau suivant la perte de NS1. Afin de contextualiser leur découverte, il faudrait expliquer pourquoi les auteurs ne retrouvent pas au cours des heures plus tardives une suractivation d'IRF-3. Le virus recombinant qu'ils utilisent se réplique plus faiblement que le RSVwt ce qui se traduit à des IRF3 moins actifs. Pourtant, à des heures précoces, les auteurs observent par luciférase une augmentation du promoteur de ISG. Il existe donc une discordance entre la théorie et leurs résultats. Les faiblesses relevées ci-dessus témoignent des difficultés liées à l'utilisation de virus recombinants. Bref, les virus recombinants sont difficiles à utiliser puisqu'ils peuvent changer le taux de réplication du virus. Ceci a pour conséquence de modifier la réaction immunitaire face au virus.

4.1.5 Évaluation et synthèse

Très peu d'études évaluent l'effet de l'absence de NS1 ou de NS2 sur IRF-3 par d'autres méthodes que la microscopie par immunofluorescence. Cependant, cette méthode donne une quantification très imprécise de l'activation d'IRF-3. L'activation d'IRF-3 dépend de sa phosphorylation à l'extrémité C terminale qui peut être observée par immunoblot. En

utilisant RSV Δ NS1 Δ NS2, Trang et coll. montrent qu'il y a une augmentation d'IRF-3 dans le noyau, comparé à RSVwt [175]. Ce qui est particulièrement intéressant cependant c'est qu'une analyse de la migration d'IRF-3 par immunobuvardage de type western révèle qu'il y a moins de formes hyperphosphorylées dans les conditions infectées par RSV Δ NS1 Δ NS2 que dans les infections avec RSVwt. Ce résultat est surprenant puisque la phosphorylation précède la translocation nucléaire alors que nous nous serions donc attendu à une augmentation de la phosphorylation. Dans cette étude, nous observons aussi que les cellules infectées par RSV Δ NS1 Δ NS2 expriment plus d'ARNm codant pour l'IFN β et ISG15 que les conditions infectées avec RSVwt, ce qui reflète une activation plus forte de la réaction antivirale.

Dans la même veine, une étude réalisée par Spann et coll. analysant l'expression l'IFN β à 14 h, 18 h et 26 h, révèle que les cellules infectées pendant 14 heures avec le RSV Δ NS1 secrètent plus d'IFN β que la souche RSVwt [161]. À 18 h et 26 h, les virus RSV Δ NS1 et RSV Δ NS1 Δ NS2 ont un apport plus élevé de sécrétions IFN β que le virus RSVwt. Dans cette étude, l'absence de NS2 diminue les sécrétions IFN β ; cependant, les auteurs ont analysé par qPCR la production de IFN β et y ont retrouvé plusieurs contradictions. Une analyse de l'ARNm révèle que les conditions infectées avec le RSV Δ NS1 Δ NS2 expriment plus d'IFN β et ce, plus tôt lors d'une infection tandis que très peu d'IFN β sont produits à la suite d'une infection au RSV Δ NS1. Ces résultats contredisent les résultats du même auteur publiés précédemment, ce qui souligne que la perte de NS1 ou NS2 augmente la transcription de gènes dépendants de l'IFN β par la méthode d'essai luciférase [38]. Ramaswaly et coll. démontrent que dans des cellules HTBC (épithéliale tracheobronchiale humaine), la perte de NS1 mène à une perte dans la production de MxA et une surproduction de MxA dans les conditions KO pour NS2 [165]. Dans les A549 cependant, c'est seulement la perte de NS2 qui provoque une augmentation dans la production de MxA. L'effet de NS1 et de NS2 sur la réponse cellulaire varierait donc selon le type cellulaire. L'analyse de l'expression de MxA est utilisée pour analyser l'effet sur les gènes régulés par les interférons. Cependant, il est important de noter que cela ne reflète pas un effet direct de la quantité d'IFN, mais peut refléter l'effet sur la signalisation en aval du IFNAR. Dans les cellules des souris MLE-15, à 48 h, il y a augmentation de l'ARNm d'IFN β sans toutefois avoir une augmentation dans la sécrétion d'IFN β dans les cellules infectées

du RSV Δ NS1 Δ NS2[177]. Par luciférase, plusieurs groupes démontrent que l'expression de NS1 ou NS2 réduit l'activité des promoteurs de ISGs ou d'IFN β . Ling et coll. 2009 montrent que l'expression de NS2 réduit l'activité des promoteurs de ISG56 et de d'IFN- β lorsque les cellules sont stimulées avec une transfection de RIG- Δ -N[162]. Swedan et coll. transfèrent NS1 ou NS2 et observent une réduction de l'activité luciférase des promoteurs ISGs et de d'IFN β . Il n'existe donc pas de consensus au niveau du rôle des protéines NS1 ou NS2 sur la réponse antivirale [39].

En conclusion, nos résultats contredisent certaines données de la littérature. Les raisons restent à être déterminées. Elles ne semblent cependant pas être reliées au MOI ni au temps d'infection. Une des faiblesses de notre approche est qu'elle ne prend pas en compte le fait que NS1 et NS2 peuvent former des hétéromères et agir de manière coopérative. De nouvelles données de microscopie ont récemment démontré que NS1, exprimée ectopiquement, adopte une localisation nucléaire. Toutefois, quand elle est co-exprimée avec NS2 provenant d'une infection virale, ou d'une expression ectopique, NS1 se localise dans la mitochondrie et le cytoplasme [163]. Il serait difficile d'argumenter que la différence de localisation n'influence pas la fonction de la protéine. À quel point nos observations représentent-elles la fonction réelle des protéines? Afin de répondre clairement à cette question, il serait nécessaire de trouver un moyen d'inhiber NS2 sans influencer la localisation de NS1.

Le mécanisme d'action de NS1 et NS2 reste à être déterminé. Cependant, de nouveaux résultats permettent d'émettre une nouvelle hypothèse. NS1 s'associe dans la mitochondrie lorsqu'exprimée avec NS2, et cette même protéine lorsque absente dans une infection provoque une augmentation de la localisation d'IRF-3 dans le noyau [163]. Des données récentes suggèrent que IRF-3 est capable de s'associer à la mitochondrie [178]. Est-ce que l'association de NS1 dans la mitochondrie pourrait séquestrer le facteur de transcription dans la mitochondrie?

4.2. Déterminer le rôle de MDA5 dans l'induction de la réponse antivirale induite par RSV

4.2.1 Résumé :

Nous avons démontré que la diminution de MDA5 engendrait la dégradation précoce d'IRF-3. Nous avons démontré cette dégradation en analysant l'expression totale

du facteur de transcription dans des échantillons infectés par le RSV suivant une transfection d'ARNi ciblant MDA5. La dégradation précoce d'IRF-3 se traduit par une réduction de l'activité transcriptionnelle du promoteur d'ISG56 mesurée par essai luciférase. Nous avons aussi mesuré une diminution du niveau d'expression d'ISG56 aux heures tardives de l'infection. Ce qui nous a marqué c'est que l'expression de plasmide codant pour MDA5 n'augmente pas le niveau de phosphorylation d'IRF-3. Nous avons donc stipulé que MDA5 avait un rôle distinct de RIG-I. Nos données démontrent que MDA5 provoque la dimérisation et ralentit la dégradation d'IRF-3. En effet, les données publiées récemment démontrent que MDA5 est une protéine complexe influençant plusieurs voies de signalisation.

4.2.2 Réévaluation du rôle de MDA5

Selon des données publiées récemment par Ian Berker, MDA5 ne serait pas exclusivement un senseur cytosolique [179]. À la suite de la détection d'ARN double brin, MDA5 agirait comme un agent de nucléation qui faciliterait l'agrégation spontanée en fibre des molécules portant des modules de type « CARD » tels que la protéine MAVS. Plus précisément, en présence d'ARN double brin, MDA5 se polymérise en structure hélicoïdale qui longe le long d'ARN viral, créant une plateforme oligomérique répétitive avec des points de jonction portant un motif CARD capable d'interagir avec d'autres protéines portant un CARD. En autres mots, la nucléation entamée par MDA5 permettrait de former des structures de signalisation protéiques complexes avisant la réponse antivirale. Dès lors, MDA5 aurait un rôle analogue aux protéines d'échafaudage dans les signalosomes. Dans ce contexte, il est facile d'envisager que la perte de MDA5 lors d'une infection virale engendrerait des répercussions négatives.

Nos données révèlent que la perte de MDA5 par ARNi modifie la phosphorylation d'IRF-3 lors d'une infection virale. Nous observons que les bandes évaluant l'expression des formes III et IV d'IRF-3 ont un niveau d'expression plus bas dans les conditions traitées avec des ARNi ciblant MDA5 que dans les conditions contrôles. Ce résultat, en conjonction avec notre essai de dimérisation qui révèle que les cellules A549 traitées avec de la lactacystine après avoir subi une transfection d'ARN ciblant MDA5 ont une accumulation de dimère, suggère que le mécanisme qui régit la dégradation précoce d'IRF-3 cible préférentiellement les espèces d'IRF-3 déjà activées ou phosphorylées. La perte de MDA5 pourrait engendrer une modification de la phosphorylation sur des acides aminés

autres que la serine 396. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous pourrions faire un essai fonctionnel sur des clones d'IRF-3 ayant leurs sites de phosphorylation mutée telle qu'effectuée par le laboratoire de Dr. Marc Servant [125]. Autrement, nous pouvons effectuer des analyses spectrochimiques ou effectuer des électrophorèses bidimensionnelles.

La logique qui découle de notre modèle stipule que si MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation de IRF-3, l'absence de MDA5 ne devrait pas contrevenir à la phosphorylation du facteur de transcription. En effet, si, comme nous le proposons, le rôle de RIG-I est de provoquer la phosphorylation d'IRF-3 et que MDA5 séquestre l'ARN viral de RIG-I, la perte de MDA5 devrait induire une augmentation dans la phosphorylation d'IRF-3 aux heures précoces, c'est-à-dire avant la dégradation de IRF-3. Cependant, nous n'observons pas une augmentation dans la phosphorylation à la serine 396. Afin de résoudre cette discordance, nous proposons trois explications possibles. La première explication possible est que l'absence de MDA5 compromet la réponse de l'hôte. Lorsque transfecté, MDA5 est capable d'activer le promoteur de l'ISG56 et d'induire la synthèse de RIG-I. Puisque MDA5 contribue à la réponse antivirale, il va de soi que la perte de MDA5 devrait défavoriser la réponse immunitaire. Il se peut donc que la raison pour laquelle nous observons une réduction de la phosphorylation d'IRF-3 en l'absence de MDA5 soit que des facteurs qui sont en aval de MDA5 ne sont pas activés convenablement. Par exemple, l'activation de MDA5 induit des ISGs qui, lors d'une boucle rétroactive, peuvent activer des PRR. En absence de MDA5, cette boucle serait compromise et mènerait à une perte de la réponse antivirale. Deuxièmement, il est possible que la dégradation d'IRF-3 commence à des heures précoces, mais qu'elle ne soit pas encore détectable. Nous n'observons pas d'augmentation de la phosphorylation parce que l'augmentation de la phosphorylation est inférieure à la dégradation d'IRF-3. Une troisième explication possible est que l'effet stabilisateur de MDA5 sur IRF-3 concerne, de prime à bord, les espèces de IRF-3 qui sont déjà phosphorylées. Donc, l'absence de MDA5 induit la dégradation des molécules d'IRF-3 déjà activées. En d'autres mots, les molécules d'IRF-3 déjà phosphorylées seront les premières à être dégradées, ce qui serait appuyé par nos données. Nous observons un retour de la forme dimérique d'IRF-3 lorsque nos cellules sont traitées par de la lactacystine.

La transfection ectopique de MDA5 augmente la synthèse de RIG-I, et ce, sans augmenter d'une manière observable la phosphorylation d'IRF-3 à la serine 396. Comme

mentionné précédemment, il est possible que MDA5 agisse sur un site autre que la serine 396. Cependant, une analyse d'IRF-3 totale dans des conditions transfectées, MDA5 sans infection nous suggère qu'il n'y a pas présence de modification posttraductionnelle qui augmenterait la taille d'IRF-3. Un événement de phosphorylation augmente la taille d'une protéine et ralentit donc la migration de la protéine. Nous n'observons pas de forme III ou IV d'IRF-3. Est-ce que MDA5 serait capable d'activer IRF-3 sans phosphorylation? Si nous effectuons un essai de dimérisation sur des cellules transfectées avec un plasmide codant MDA5, nous observons la formation de dimère. L'intensité de notre signal de détection est très faible. Nous devrions optimiser le protocole afin d'améliorer la qualité des résultats. Une méthode alternative qui permettrait de vérifier la dimérisation d'IRF-3 induite par l'expression ectopique de MDA5 serait de faire une transfection de MDA5 en présence d'IRF-3 marquées avec deux différents épitopes (FLAG, MYC, V5, etc.) et de faire une expérience de coimmunoprécipitation réciproque en présence et en absence de MDA5.

4.2.3 Mécanisme de régulation d'IRF-3 par l'hôte

Une mauvaise activation ou une activation prolongée d'IRF-3 pourrait avoir des conséquences physiologiques graves. Par exemple, l'activation d'IRF-3 prolongée peut mener à des maladies auto-immunes telles que le syndrome Aicardi-Goutieresau et le lupus de type Chilbain [180]. Est-ce que l'organisme serait en mesure d'utiliser MDA5 pour moduler la durée de la réponse antivirale? Afin de se prémunir contre certains défauts, l'organisme a recourt à plusieurs mécanismes de régulation qui interviennent à différents niveaux de la cascade d'activation d'IRF-3. Premièrement, l'organisme peut moduler l'activité de IRF-3 en prolongeant ou en diminuant la durée de son activation. Les stratégies de contrôle temporel exercées par l'organisme jouent souvent sur la stabilité du facteur de transcription. La caspase 8, RBX1, Pin1, CUL-1 et RAUL sont toutes des protéines de l'hôte qui peuvent moduler la demi-vie de IRF-3 [133, 181], [182] et [129]. Il a récemment été découvert qu'IRF-3 est régulé par la caspase 8. Cette interaction permettrait de raccourcir la durée d'activation de IRF-3. N. Shears et coll. démontrent que la caspase 8 peut cliver IRF-3. Les voies qui activent la caspase 8 sont celles de RIG-I et de TLR-3 [181]. Une inhibition de la caspase 8 lors d'une infection virale inhibe la dégradation de IRF-3 et prolonge par la suite la réponse antivirale [181]. Afin de devenir actif, la caspase 8 subit une série de modifications posttraductionnelles. De façon similaire, au clivage d'IRF-3,

l'organisme peut augmenter la dégradation de IRF-3 en jouant sur son niveau d'ubiquitination. RBK1, RAUL et Cul-1 sont des protéines ubiquitineuse cellulaires qui contreviennent à l'activation de IRF-3 en ubiquitant directement IRF-3 et du fait, stimulent la dégradation du facteur de transcription [182] et [129, 133]. Dans la même veine, PIN est une enzyme métabolique qui, lorsqu'exprimée, stimule indirectement l'ubiquitination des molécules de IRF-3 phosphorylées [133]. HERC5 est une protéine cellulaire qui ajoute un ISG15 à un IRF-3. Cette modification posttraductionnelle atténue l'interaction entre Pin et IRF-3, soutenant ainsi l'activation de IRF-3 [183].

Comme l'organisme, les virus ont développé des stratégies qui leur permettent de contrevienir à l'activation de IRF-3.

1. Certains virus, comme l'HPV, peuvent prévenir l'activation de IRF-3 en agissant en amont de sa phosphorylation [184];
2. Certains virus, comme l'HCV, peuvent compromettre l'habilité de IRF-3 de transactiver des gènes clés [185] [186];et
3. Certains virus comme le BVDV et le VIH, peuvent induire la dégradation de IRF-3 en stimulant son ubiquitination [187-189].

Nous avons démontré que l'absence de MDA5 induisait la dégradation d'IRF-3. Il serait intéressant d'investiguer si certains virus ont développé des stratégies d'évasion de la réponse antivirale en jouant sur le niveau d'expression de MDA5. Cette stratégie serait intéressante pour deux raisons. Premièrement, l'inactivation de MDA5 à des temps précoces diminuerait la réponse antivirale puisque le capteur ne serait pas capable de signaler la présence de PAMPS virale. Deuxièmement, selon notre modèle, plus tard au cours de l'infection, l'absence de MDA5 induirait la dégradation de IRF-3. Une étude *in vivo* a démontré que des souris knockouts pour MDA5 avaient un plus haut taux de morbidité et de mortalité ainsi que des symptômes plus prononcés et un plus gros titre viral que les souris contrôles [190].

Direction future : L'inhibition de MDA5 par un virus pourrait être une stratégie gagnante

Les virus *Paramyxoviridae* tels que SeV, le virus parainfluenza 5 et le virus de Newcastle, traduisent une protéine V qui interagit directement avec MDA5 et qui module

les voies d'activation de NF- κ B et de IRF-3 [191]. La protéine V contient une région très conservée dans son extrémité C terminale qui interagit avec les sites de liaisons de l'ARN de MDA5 [190]. Lors d'une infection, la protéine V fait compétition à MDA5 pour des PAMPS sur les molécules ARN virales. Cette compétition a pour effet de restreindre l'accès de l'ARN viral au senseur. Lorsqu'exprimée, la protéine V diminue la synthèse d'interférons produite en réponse à une stimulation à l'ARN double brin. Le mécanisme par lequel cette inhibition se produit n'est pas défini. Il serait intéressant d'observer l'effet de la protéine V sur MDA5 endogène lors d'une infection virale et sur IRF-3. Est-ce que les virus ont appris à échapper à la réponse antivirale en induisant la dégradation de MDA5?

Conclusion

En somme, ce travail a permis d'attribuer une nouvelle fonction non redondante à MDA5. Avant notre recherche, le rôle de MDA5 était réduit à un PPR qui captait des PAMPS et qui, par la suite, amorçait le signal de phosphorylation d'IRF-3 tel que RIG-I. Nous avons démontré que MDA5 ne contribue pas à la phosphorylation d'IRF-3. Selon nos données, MDA5 stabiliserait l'expression d'IRF-3, permettant ainsi la modulation de la durée de la réponse antivirale. Des données récentes (N. Grandvaux, inédit) démontrent que la perte d'IRF-3 passe par une augmentation de l'ubiquitination d'IRF-3. Un mécanisme reste à être élucidé. Par la suite, MDA5 devrait être la cible d'investigation pharmaceutique avec comme objectif d'évaluer la stratégie pour moduler la durée et l'intensité de la réponse antivirale.

En ce qui concerne NS1 et NS2, nous avons démontré que la perte de ces protéines n'induit pas une augmentation de la réponse antivirale mesurée par l'augmentation de l'IFN- β . La raison pour laquelle ceci se produit reste à être déterminée. Cependant, nous avons remarqué que l'expression ectopique de NS1 et ou NS2 pouvait moduler la réponse antivirale.

Pour terminer, les résultats présentés nous ont aidé à mieux comprendre différents aspects de la réponse antivirale. Ces données serviront à guérir des maux, qu'ils proviennent du RSV ou d'autre pathogènes viraux.

Bibliographie

1. Hacking, D. and J. Hull, *Respiratory syncytial virus - Viral biology and the host response*. Journal of Infection, 2002. **45**(1): p. 18-24.
2. Simoes, E.A.F., *Respiratory syncytial virus infection*. Lancet, 1999. **354**(9181): p. 847-852.
3. Bachi, T. and C. Howe, *Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus*. Journal of Virology, 1973. **12**(5): p. 1173-1180.
4. Roberts, S.R., R.W. Compans, and G.W. Wertz, *Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells*. Journal of Virology, 1995. **69**(4): p. 2667-2673.
5. Noyola, D.E. and P.B. Mandeville, *Effect of climatological factors on respiratory syncytial virus epidemics*. Epidemiology and Infection, 2008. **136**(10): p. 1328-1332.
6. Omer, S.B., et al., *Climatic, temporal, and geographic characteristics of respiratory syncytial virus disease in a tropical island population*. Epidemiology and Infection, 2008. **136**(10): p. 1319-1327.
7. Blount Jr, R.E., J.A. Morris, and R.E. Savage, *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine., 1956. **92**(3): p. 544-549.
8. Lazzaro, T., G. Hogg, and P. Barnett, *Respiratory syncytial virus infection and recurrent wheeze/asthma in children under five years: An epidemiological survey*. Journal of Paediatrics and Child Health, 2007. **43**(1-2): p. 29-33.
9. Hall, C.B., et al., *The Burden of respiratory syncytial virus infection in young children*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(6): p. 588-598.
10. Sampalis, J.S. and J.V. Williams, *Morbidity and mortality after RSV-associated hospitalizations among premature canadian infants*. Journal of Pediatrics, 2003. **143**(5 SUPPL.): p. S150-S156.
11. Katz, B.Z., J. Lo, and M. Sorrentino, *Costs of Respiratory Syncytial Virus Infection at a Tertiary-Care Children's Hospital*. P and T, 2003. **28**(5): p. 343-345.
12. Collins, P.L. and B.S. Graham, *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis*. Journal of Virology, 2008. **82**(5): p. 2040-2055.
13. Faden, H., et al., *Immune response to respiratory syncytial virus: Prevention of syncytia formation by human serum during in vitro infection*. Pediatric Research, 1984. **18**(10): p. 987-991.
14. Walsh, E.E., M.W. Brandriss, and J.J. Schlesinger, *Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein*. Journal of General Virology, 1985. **66**(3): p. 409-415.
15. Domachowske, J.B. and H.F. Rosenberg, *Respiratory syncytial virus infection: Immune response, immunopathogenesis, and treatment*. Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12**(2): p. 298-309.
16. Yoon, J.S., et al., *Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells*. Pediatric Pulmonology, 2007. **42**(3): p. 277-282.
17. Guerrero-Plata, A., E. Ortega, and B. Gómez, *Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production*. Viral Immunology, 2001. **14**(1): p. 19-30.

18. McCann, K.L. and F. Imani, *Transforming growth factor β enhances respiratory syncytial virus replication and tumor necrosis factor alpha induction in human epithelial cells*. Journal of Virology, 2007. **81**(6): p. 2880-2886.
19. Tekkanat, K.K., et al., *Rantes (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease*. European Journal of Immunology, 2002. **32**(11): p. 3276-3284.
20. Culley, F.J., et al., *Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease*. Journal of Virology, 2006. **80**(16): p. 8151-8157.
21. Haeberle, H.A., et al., *Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: Role of MIP-1 α in lung pathology*. Journal of Virology, 2001. **75**(2): p. 878-890.
22. Folkerts, G., et al., *Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1998. **157**(6 I): p. 1708-1720.
23. Tuffaha, A., J.E. Gern, and R.F. Lemanske Jr, *The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma*. Clinics in Chest Medicine, 2000. **21**(2): p. 289-300.
24. Durbin, J.E. and R.K. Durbin, *Respiratory syncytial virus-induced immunoprotection and immunopathology*. Viral Immunology, 2004. **17**(3): p. 370-380.
25. Kim, H.W., et al., *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. American Journal of Epidemiology, 1969. **89**(4): p. 422-434.
26. Lin, Y.H., et al., *Genetic stability determinants of temperature sensitive, live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidates*. Virus Research, 2006. **115**(1): p. 9-15.
27. Wright, M. and G. Piedimonte, *Respiratory syncytial virus prevention and therapy: Past, present, and future*. Pediatric Pulmonology, 2011. **46**(4): p. 324-347.
28. Levine, S., R. Kaliaber-Franco, and P.R. Paradiso, *Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus*. Journal of General Virology, 1987. **68**(9): p. 2521-2524.
29. Tripp, R.A., et al., *CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein*. Nature Immunology, 2001. **2**(8): p. 732-738.
30. Cane, P., *Respiratory Syncytial Virus*. Perspectives in Medical Virology 2007: Elsevier.
31. Malhotra, R., et al., *Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells*. Microbes and Infection, 2003. **5**(2): p. 123-133.
32. Arnold, R., et al., *Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells*. Virology, 2004. **330**(2): p. 384-397.
33. Shingai, M., et al., *Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction*. International Immunology, 2008. **20**(9): p. 1169-1180.
34. Walsh, E.E., et al., *Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection Is Related to Virus Strain*. Journal of Infectious Diseases, 1997. **175**(4): p. 814-820.
35. Gower, T.L., et al., *RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection*. Virology, 2001. **283**(2): p. 188-196.

36. Evans, J.E., P.A. Cane, and C.R. Pringle, *Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus*. *Virus Research*, 1996. **43**(2): p. 155-161.
37. Huang, Y.T., P.L. Collins, and G.W. Wertz, *Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: Identification of a fourth envelope-associated protein*. *Virus Research*, 1985. **2**(2): p. 157-173.
38. Spann, K.M., K.C. Tran, and P.L. Collins, *Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(9): p. 5353-5362.
39. Swedan, S., A. Musiyenko, and S. Barik, *Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways*. *Journal of Virology*, 2009. **83**(19): p. 9682-9693.
40. Widjoatmodjo, M.N., et al., *A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats*. *Virology Journal*, 2010. **7**: p. 114.
41. Jin, H., et al., *Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo*. *Virology*, 2000. **273**(1): p. 210-218.
42. Whitehead, S.S., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(4): p. 3438-3442.
43. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology, 7th ed.* 2012, London [etc.]: Garland Science, p :1-4.
44. Alberts, B., *Biologie moléculaire de la cellule, 4ieme ed*, 2002: Garland Science Taylor & Francis Group.p :1363-1366
45. Roitt, I.M., J. Brostoff, and D.K. Male, *Immunology, 6ieme ed* 2001: Mosby. :p :1-10
46. Ghildyal, R., et al., *Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity*. *Journal of Infectious Diseases*, 1999. **180**(6): p. 2009-2013.
47. LeVine, A.M., et al., *Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo*. *Journal of Clinical Investigation*, 1999. **103**(7): p. 1015-1021.
48. Krishnan, S., M. Halonen, and R.C. Welliver Sr, *Innate immune responses in respiratory syncytial virus infections*. *Viral Immunology*, 2004. **17**(2): p. 220-233.
49. LeVine, A.M., et al., *Surfactant protein-D enhances phagocytosis and pulmonary clearance of respiratory syncytial virus*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004. **31**(2 I): p. 193-199.
50. Merika, M., et al., *Recruitment of CBP/p300 by the IFN β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription*. *Molecular Cell*, 1998. **1**(2): p. 277-287.
51. Wallach, D., *Cell death induction by TNF: A matter of self control*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997. **22**(4): p. 107-109.
52. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. **88**(12): p. 5252-5256.

53. Charo, I.F., et al., *Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(7): p. 2752-2756.
54. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(6): p. 1494-1505.
55. Teixeira, M.M., et al., *Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **100**(7): p. 1657-1666.
56. Roberts, P.J., et al., *The effects of interleukin-8 on neutrophil fMetLeuPhe receptors, CD11b expression and metabolic activity, in comparison and combination with other cytokines*. British Journal of Haematology, 1993. **84**(4): p. 586-594.
57. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nature Immunology, 2001. **2**(8): p. 675-680.
58. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family*. Immunology Letters, 2003. **85**(2): p. 85-95.
59. Barton, G.M. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor signaling pathways*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1524-1525.
60. Bell, J.K., et al., *Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors*. Trends in Immunology, 2003. **24**(10): p. 528-533.
61. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*, 2003. p. 335-376.
62. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(7): p. 499-511.
63. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Seminars in Immunology, 2007. **19**(1): p. 24-32.
64. Han, K.J., et al., *Mechanisms of the TRIF-induced Interferon-stimulated Response Element and NF- κ B Activation and Apoptosis Pathways*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(15): p. 15652-15661.
65. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 2851-2858.
66. Komuro, A. and C.M. Horvath, *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. Journal of Virology, 2006. **80**(24): p. 12332-12342.
67. Saito, T., et al., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-1 and LGP2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(2): p. 582-587.
68. Cui, S., et al., *The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5' -Triphosphate Sensor of RIG-I*. Molecular Cell, 2008. **29**(2): p. 169-179.
69. Murali, A., et al., *Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(23): p. 15825-15833.
70. Bamming, D. and C.M. Horvath, *Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(15): p. 9700-9712.

71. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(4): p. 1512-1517.
72. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity*. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2007. **18**(5-6): p. 545-551.
73. Bowzard, J.B., et al., *PAMPer and tRIGer: Ligand-induced activation of RIG-I*. Trends in Biochemical Sciences, 2011. **36**(6): p. 314-319.
74. Ireton, R.C. and M. Gale Jr, *RIG-I like receptors in antiviral immunity and therapeutic applications*. Viruses, 2011. **3**(6): p. 906-919.
75. Kato, H., K. Takahashi, and T. Fujita, *RIG-I-like receptors: Cytoplasmic sensors for non-self RNA*. Immunological Reviews, 2011. **243**(1): p. 91-98.
76. Loo, Y.M. and M. Gale, *Immune Signaling by RIG-I-like Receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-692.
77. Śliwa-Dominiak, J. and W. Deptuła, *RLR receptors - Important elements of innate immunity*. Central-European Journal of Immunology, 2011. **36**(2): p. 117-119.
78. Schmidt, A., S. Rothenfusser, and K.P. Hopfner, *Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: From translocation to translation*. European Journal of Cell Biology, 2012. **91**(1): p. 78-85.
79. Hornung, V., et al., *5' -Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-997.
80. Saito, T., et al., *Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 523-527.
81. Züst, R., et al., *Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5*. Nature Immunology, 2011. **12**(2): p. 137-143.
82. Hayakawa, S., et al., *ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses*. Nature Immunology, 2011. **12**(1): p. 37-44.
83. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. EMBO Journal, 2006. **25**(14): p. 3257-3263.
84. Tang, E.D. and C.Y. Wang, *MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling*. Journal of Virology, 2009. **83**(8): p. 3420-3428.
85. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nature Immunology, 2005. **6**(10): p. 981-988.
86. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-682.
87. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling*. Molecular Cell, 2005. **19**(6): p. 727-740.
88. Yoboua, F., et al., *Respiratory syncytial virus-mediated NF- κ B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK β* . Journal of Virology, 2010. **84**(14): p. 7267-7277.
89. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.

90. Arimoto, K.I., et al., *Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(18): p. 7500-7505.
91. Diao, F., et al., *Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(28): p. 11706-11711.
92. Fu, J., et al., *MDA5 is SUMOylated by PIAS2 β in the upregulation of Type I interferon signaling*. Molecular Immunology, 2011. **48**(4): p. 415-422.
93. Balachandran, S. and G.N. Barber, *PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2007. **383**: p. 277-301.
94. García, M.A., E.F. Meurs, and M. Esteban, *The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 799-811.
95. Nallagatla, S.R., R. Toroney, and P.C. Bevilacqua, *Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR*. Current Opinion in Structural Biology, 2011. **21**(1): p. 119-127.
96. Pindel, A. and A. Sadler, *The role of protein kinase R in the interferon response*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2011. **31**(1): p. 59-70.
97. Balachandran, S., et al., *Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 129-141.
98. Nanduri, S., et al., *Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation*. EMBO Journal, 1998. **17**(18): p. 5458-5465.
99. Cohen-Chalamish, S., et al., *Dynamic refolding of IFN- γ mRNA enables it to function as PKR activator and translation template*. Nature Chemical Biology, 2009. **5**(12): p. 896-903.
100. Jesús, G., J. Alcamí, and M. Esteban, *Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF- κ B*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(7): p. 4653-4663.
101. Arnaud, N., et al., *Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response*. PLoS Pathogens, 2011. **7**(10).
102. Verma, I.M., et al., *Rel/NF- κ B/I κ B family: Intimate tales of association and dissociation*. Genes and Development, 1995. **9**(22): p. 2723-2735.
103. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity*, 2000. p. 621-663.
104. Li, Q. and I.M. Verma, *NF- κ B regulation in the immune system*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(10): p. 725-734.
105. Gilmore, T.D., *Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-6684.
106. Scheidereit, C., *I κ B kinase complexes: Gateways to NF- κ B activation and transcription*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6685-6705.
107. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures*. Journal of General Virology, 2000. **81**(10): p. 2341-2364.
108. Sen, G.C., *Viruses and interferons*, 2001. p. 255-281.
109. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale Jr, *Viruses and interferon: A fight for supremacy*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(9): p. 675-687.

110. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
111. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(9): p. 644-658.
112. Kotenko, S.V., et al., *IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. Nature Immunology, 2003. **4**(1): p. 69-77.
113. Taniguchi, T. and A. Takaoka, *Type I interferon system and IRF family of transcription factors in host defense regulation*. Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences, 2005. **81**(1): p. 1-13.
114. Servant, M.J., B. Tenoever, and R. Lin, *Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2002. **22**(1): p. 49-58.
115. Mamane, Y., et al., *Interferon regulatory factors: The next generation*. Gene, 1999. **237**(1): p. 1-14.
116. Malmgaard, L., *Induction and regulation of IFNs during viral infections*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2004. **24**(8): p. 439-454.
117. Barnes, B., B. Lubyova, and P.M. Pitha, *On the role of IRF in host defense*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2002. **22**(1): p. 59-71.
118. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-1151.
119. McWhirter, S.M., et al., *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(1): p. 233-238.
120. Fitzgerald, K.A., et al., *IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signalling pathway*. Nature Immunology, 2003. **4**(5): p. 491-496.
121. TenOever, B.R., et al., *Activation of TBK1 and IKK ϵ kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity*. Journal of Virology, 2004. **78**(19): p. 10636-10649.
122. Solis, M., et al., *Involvement of TBK1 and IKK ϵ in lipopolysaccharide-induced activation of the interferon response in primary human macrophages*. European Journal of Immunology, 2007. **37**(2): p. 528-539.
123. Mori, M., et al., *Identification of Ser-386 of Interferon Regulatory Factor 3 as Critical Target for Inducible Phosphorylation That Determines Activation*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(11): p. 9698-9702.
124. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation*. Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**(5): p. 2986-2996.
125. Clément, J.F., et al., *Phosphorylation of IRF-3 on ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association*. Journal of Virology, 2008. **82**(8): p. 3984-3996.
126. Takahashi, K., et al., *X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications*. Nature Structural Biology, 2003. **10**(11): p. 922-927.

127. Kumar, K.P., et al., *Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(11): p. 4159-4168.
128. Servant, M.J., et al., *Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(1): p. 355-363.
129. Bibeau-Poirier, A., et al., *Involvement of the I κ B kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and Cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation*. *Journal of Immunology*, 2006. **177**(8): p. 5059-5067.
130. Andersen, J., et al., *IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection*. *Genes and Immunity*, 2008. **9**(2): p. 168-175.
131. Grandvaux, N., et al., *Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: Direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(11): p. 5532-5539.
132. Lin, R., et al., *Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(2): p. 959-966.
133. Saitoh, T., et al., *Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1*. *Nature Immunology*, 2006. **7**(6): p. 598-605.
134. Lu, G., et al., *ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation*. *Cellular and Molecular Biology*, 2006. **52**(1): p. 29-41.
135. Zhang, D. and D.E. Zhang, *Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2011. **31**(1): p. 119-130.
136. Giannakopoulos, N.V., et al., *ISG15 Arg151 and the ISG15-conjugating enzyme UbcE1L are important for innate immune control of sindbis virus*. *Journal of Virology*, 2009. **83**(4): p. 1602-1610.
137. Arimoto, K.I., H. Konishi, and K. Shimotohno, *UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I*. *Molecular Immunology*, 2008. **45**(4): p. 1078-1084.
138. Wong, J.J.Y., et al., *HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(28): p. 10735-10740.
139. Takeuchi, T., S. Inoue, and H. Yokosawa, *Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **348**(2): p. 473-477.
140. Dastur, A., et al., *Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(7): p. 4334-4338.
141. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. *Nature Reviews Immunology*, 2003. **3**(11): p. 900-911.
142. Oshea, J.J., M. Gadina, and R.D. Schreiber, *Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway*. *Cell*, 2002. **109**(2 SUPPL. 1): p. S121-S131.
143. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
144. Imada, K. and W.J. Leonard, *The Jak-STAT pathway*. *Molecular Immunology*, 2000. **37**(1-2): p. 1-11.

145. Darnell Jr, J.E., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. *Science*, 1994. **264**(5164): p. 1415-1421.
146. Fensterl, V. and G.C. Sen, *The ISG56/IFIT1 gene family*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2011. **31**(1): p. 71-78.
147. Li, Y., et al., *ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(19): p. 7945-7950.
148. Stawowczyk, M., et al., *The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(9): p. 7257-7266.
149. Player, M.R. and P.F. Torrence, *The 2-5A system: Modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation*. *Pharmacology and Therapeutics*, 1998. **78**(2): p. 55-113.
150. Behera, A.K., et al., *2' -5' oligoadenylate synthetase plays a critical role in interferon- γ inhibition of respiratory syncytial virus infection of human epithelial cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(28): p. 25601-25608.
151. Malathi, K., et al., *RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP*. *RNA*, 2010. **16**(11): p. 2108-2119.
152. Luthra, P., et al., *Activation of IFN- β expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(5): p. 2118-2123.
153. Cirino, N.M., et al., *Targeting RNA decay with 2' ,5' oligoadenylate-antisense in respiratory syncytial virus-infected cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(5): p. 1937-1942.
154. Player, M.R., D.L. Barnard, and P.F. Torrence, *Potent inhibition of respiratory syncytial virus replication using a 2-5A-antisense chimera targeted to signals within the virus genomic RNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(15): p. 8874-8879.
155. Haller, O. and G. Kochs, *Human MxA protein: An interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2011. **31**(1): p. 79-87.
156. Pletneva, L.M., et al., *Induction of type I interferons and interferon-inducible Mx genes during respiratory syncytial virus infection and reinfection in cotton rats*. *Journal of General Virology*, 2008. **89**(1): p. 261-270.
157. Atreya, P.L. and S. Kulkarni, *Respiratory Syncytial Virus Strain A2 Is Resistant to the Antiviral Effects of Type I Interferons and Human MxA*. *Virology*, 1999. **261**(2): p. 227-241.
158. Schlender, J., et al., *Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response*. *Journal of Virology*, 2000. **74**(18): p. 8234-8242.
159. Bossert, B. and K.K. Conzelmann, *Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: A chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells*. *Journal of Virology*, 2002. **76**(9): p. 4287-4293.

160. Bitko, V., et al., *Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF- κ B-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth*. Journal of Virology, 2007. **81**(4): p. 1786-1795.
161. Spann, K.M., et al., *Suppression of the Induction of Alpha, Beta, and Gamma Interferons by the NS1 and NS2 Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus in Human Epithelial Cells and Macrophages*. Journal of Virology, 2004. **78**(8): p. 4363-4369.
162. Ling, Z., K.C. Tran, and M.N. Teng, *Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I*. Journal of Virology, 2009. **83**(8): p. 3734-3742.
163. Swedan, S., et al., *Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location*. Journal of Virology, 2011. **85**(19): p. 10090-10100.
164. Lo, M.S., R.M. Brazas, and M.J. Holtzman, *Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness*. Journal of Virology, 2005. **79**(14): p. 9315-9319.
165. Ramaswamy, M., et al., *Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction*. Virology, 2006. **344**(2): p. 328-339.
166. Elliott, J., et al., *Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the elongin-cullin E3 ligase*. Journal of Virology, 2007. **81**(7): p. 3428-3436.
167. Liu, P., et al., *Retinoic acid-inducible gene 1 mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1401-11.
168. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 335-45.
169. Soucy-Faulkner, A., et al., *Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression*. PLoS Pathogens, 2010. **6**(6).
170. Fink, K., et al., *Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF- κ B in airway epithelial cells*. Journal of Immunology, 2008. **180**(10): p. 6911-6922.
171. Teng, M.N. and P.L. Collins, *Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein*. Journal of Virology, 1999. **73**(1): p. 466-473.
172. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nature Immunology, 2004. **5**(7): p. 730-737.
173. Sun, L. and G. Carpenter, *Epidermal growth factor activation of NF- κ B is mediated through I κ B α degradation and intracellular free calcium*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2095-2102.
174. Yount, J.S., T.M. Moran, and C.B. Lopez, *Cytokine-independent upregulation of MDA5 in viral infection*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7316-9.

175. Tran, K.C., B. He, and M.N. Teng, *Replacement of the respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 by the V protein of parainfluenza virus 5*. *Virology*, 2007. **368**(1): p. 73-82.
176. Ren, J., et al., *A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein*. *J Gen Virol*, 2011. **92**(Pt 9): p. 2153-9.
177. Moore, E.C., J. Barber, and R.A. Tripp, *Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15)*. *Virology Journal*, 2008. **5**.
178. Chattopadhyay, S., et al., *Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax*. *EMBO Journal*, 2010. **29**(10): p. 1762-1773.
179. Berke, I.C. and Y. Modis, *MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA*. *EMBO J*, 2012. **31**(7): p. 1714-26.
180. Stetson, D.B., et al., *Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity*. *Cell*, 2008. **134**(4): p. 587-98.
181. Sears, N., et al., *Caspase-8-mediated cleavage inhibits IRF-3 protein by facilitating its proteasome-mediated degradation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(38): p. 33037-33044.
182. Yu, Y. and G.S. Hayward, *The ubiquitin E3 ligase RAUL negatively regulates type I interferon through ubiquitination of the transcription factors IRF7 and IRF3*. *Immunity*, 2010. **33**(6): p. 863-77.
183. Shi, H.X., et al., *Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(10): p. 2424-36.
184. Ronco, L.V., et al., *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity*. *Genes Dev*, 1998. **12**(13): p. 2061-72.
185. Li, K., et al., *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(8): p. 2992-2997.
186. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1167-1172.
187. Hilton, L., et al., *The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation*. *Journal of Virology*, 2006. **80**(23): p. 11723-11732.
188. Chen, Z., et al., *Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus*. *Virology*, 2007. **366**(2): p. 277-292.
189. Okumura, A., et al., *HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. *Virology*, 2008. **373**(1): p. 85-97.
190. Gitlin, L., et al., *Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo*. *PLoS Pathogens*, 2010. **6**(1).
191. Goodbourn, S. and R.E. Randall, *The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2009. **29**(9): p. 539-547.

192. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology, 7th ed.* 2012, London [etc.]: Garland Science, p :2-11.
193. Alberts, B., *Biologie moléculaire de la cellule, 4ieme ed*, 2002: Garland Science Taylor & Francis Group.p :1460
194. Roitt, I.M., J. Brostoff, and D.K. Male, *Immunology, 6ieme ed* 2001: Mosby. :p :22-28