

Université de Sherbrooke

**Étude des rôles de la voie antioxydante Nrf2 et la voie anti-inflammatoire
PPAR γ dans le contrôle de l'inflammation lors d'infections sévères par l'influenza**

Par
Hussein Traboulsi
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
[Juillet, 2016]

Membres du jury d'évaluation
Pr Martin Richter, Ph.D., Département de Médecine
Pr. Klaus Klarskov, Ph.D., Département de Pharmacologie
Pr Claude Asselin Ph.D., Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire
Pr Simon Rousseau Ph.D., Département de Médecine, Faculté de Médecine,
Université McGill

© Hussein Traboulsi, 2016

Résumé
Étude des rôles de la voie antioxydante Nrf2 et la voie anti-inflammatoire PPAR γ dans le contrôle de l'inflammation lors d'infections sévères par l'influenza

Par
Hussein Traboulsi
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Chaque année, la grippe provoque des centaines de milliers de décès dans le monde. Dans le cas d'infections sévères, il a été démontré que la génération excessive de molécules inflammatoires telles que les cytokines et les chimiokines, la sécrétion d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ainsi que l'afflux massif de cellules immunitaires innées et adaptatives dans les voies respiratoires contribuent à la génération de dommages pulmonaires aigus et contribuent à l'immunopathologie reliée à l'infection. Tenant compte de ce fait, le défi actuel dans le traitement de la grippe est de contrôler la réponse inflammatoire tout en inhibant la réplication virale afin de permettre à l'organisme de se défendre contre les infections sévères à l'influenza. Des études récentes ont montré que l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ par ses ligands, tel que la 15d-PGJ₂, diminuait l'inflammation pulmonaire et améliorait la survie des souris infectées avec des doses létales du virus influenza. Mis à part ses effets sur PPAR γ , le ligand 15d-PGJ₂ est aussi connu pour activer le facteur nucléaire antioxydant Nrf2. Il a été montré que Nrf2 réduit la réplication du virus influenza. Cependant, son mode d'action dans cette fonction nécessite une clarification. De manière intéressante, une étude a montré que Nrf2 réduit l'inflammation pulmonaire en régulant l'expression de PPAR γ et ceci dans un modèle murin du syndrome de détresse respiratoire aigu. Les résultats de ces études précédentes mènent à l'hypothèse que les voies de PPAR γ et Nrf2 interagissent fonctionnellement et qu'elles sont impliquées dans la réduction de l'inflammation induite lors d'infections sévères causées par l'influenza. L'objectif général de cette étude est donc de mieux comprendre les mécanismes protecteurs de PPAR γ et Nrf2 dans la régulation de l'inflammation et la réplication virale suite à une infection par le virus influenza. Nos résultats ont démontré premièrement que le fait de cibler les deux voies moléculaires PPAR γ et Nrf2, permet une inhibition significative de l'inflammation et de la morbidité liée à l'infection. Dans un deuxième temps, nos résultats dévoilent le mécanisme antiviral de Nrf2 et démontrent que l'activation de cette voie réduit la réplication du virus influenza d'une façon dépendante de l'expression de l'antiprotéase SLPI.

Mots clés: Influenza, inflammation, immunopathologie, antiviral, antioxydant, anti-inflammatoire, Nrf2, PPAR γ .

Table des matières

Résumé.....	II
Table des matières	III
Liste des figures	V
Liste des abréviations	VII
Introduction.....	1
1 Virus influenza.....	1
1.1 Description	1
1.2 Structure du virus	2
1.3 Rôle des composants protéiques du virus influenza	3
1.3.1 L'hémagglutinine HA	3
1.3.2 La neuraminidase NA	6
1.3.3 Autres protéines virales	7
1.4 Cycle de réplication du virus influenza	8
1.5 Symptômes typiques de la grippe.....	10
1.6 Capacité de mutagenèse et émergence des virus hautement pathogènes	11
1.6.1 Dérive antigénique	12
1.6.2 Saut antigénique	12
1.7 Protection, prévention et traitement contre la grippe.....	13
1.7.1 Vaccination	13
1.7.2 Les antiviraux.....	14
1.7.3 Traitements anti-influenza alternatifs en développement	16
2 Réponse immunitaire lors d'une infection par le virus influenza	17
2.1 Réponse immunitaire innée	17
2.1.1 Les différents PRRs	17
2.1.2 Reconnaissance des PAMPs du virus influenza par les PRRs	19
2.1.2.1 Reconnaissance par les TLRs	19
2.1.2.1.1 TLR3	19
2.1.2.1.2 TLR7	20
2.1.2.1.3 TLR4	21
2.1.2.2 Reconnaissance par RIG-1	23
2.1.3 Recrutement séquentiel des cellules du système immunitaire au site d'infection	23
3 Immunopathologie de l'influenza.....	28
3.1 Rôles de cytokines dans l'immunopathologie de l'influenza	29
3.1.1 TNF- α	29
3.1.2 IL-6	30
3.1.3 IL-1 α et β	30
3.1.4 Interférons	31
3.2 Rôles des cellules immunitaires dans l'immunopathologie de l'influenza	31
3.3 Rôles du stress oxydatif dans l'immunopathologie de l'influenza	34
4 Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydases- gamma (PPARγ) ..	37
5 Le facteur nucléaire Nrf2	41
Hypothèse et objectifs.....	49

Article 1	50
Article 2	84
Résultats supplémentaires	124
Discussion	132
Conclusion	145
Remerciements	146
Bibliographie	147

Liste des figures

I. Figures de l'introduction :

Figure 1: Structure du virus influenza A.....	3
Figure 2: Structure de l'acide sialique SA.....	5
Figure 3: Cycle de réplication du virus influenza et mécanismes d'actions des traitements antiviraux reconnus.....	10
Figure 4: Induction des voies de signalisation des TLRs par l'infection avec le virus influenza.....	22
Figure 5: Cinétique de la réponse immunitaire lors d'une infection par le virus influenza.....	27
Figure 6: L'immunopathologie de l'influenza est causée par la réponse inflammatoire excessive par l'hôte	33
Figure 7: Illustration des différents domaines du récepteur nucléaire PPAR.....	38
Figure 8: Modèle du mécanisme de la transrépression, dépendante de PPARγ, du gène iNOS suite à une stimulation par le LPS	39
Figure 9: Structures de Nrf2 et Keap1.....	42
Figure 10: La voie de signalisation Nrf2-Keap1	43
Figure 11: Modèles d'activation de Nrf2	45

II. Figures de la publication I

Figure 1: Isoliquiritigenin (ILG) activates PPARγ, Nrf2 and inhibits NF-κB activation induced by TNF-α	62
Figure 2: Antiviral activity of isoliquiritigenin against influenza virus PR8/H1N1 in human bronchial epithelial cells.....	64
Figure 3: The anti-inflammatory effect of isoliquiritigenin (ILG) depends on the PPARγ pathway	65
Figure 4: Reduced morbidity and viral titers in mice treated with ILG-p after influenza infection.....	67
Figure 5: The administration of ILG-p reduces inflammatory cytokine gene expression in the lungs of infected mice.....	70
Figure 6: ILG-p treatment reduces the recruitment of inflammatory cells into the airways of infected mice after influenza infection	71
Figure 7: ILG-p reduces the number of effectors CD8⁺ T cells in the respiratory tract of infected mice.....	73
Figure S1: Structure of ILG-p.....	66
Figure S2: % conversion of ILG-p-NH₃ to ILG in mouse lung extract [1 mM] at 37 °C	65
Figure S3: The administration of ILG-p reduces IFN-γ expression in the lungs of infected mice.....	74

III. Figures de la publication II

Figure 1: CDDO-me activates Nrf2 and increases SLPI expression.....	98
Figure 2: CDDO-me and SLPI treatments decrease trypsin-like serine protease activity in human bronchial epithelial cells.....	101
Figure 3: CDDO-me exhibits antiviral and anti-inflammatory activities upon IAV infection.....	102
Figure 4: CDDO-me induces Nrf2, increases SLPI expression and reduces influenza replication in polarized Calu-3 cells grown at an air-liquid interface (ALI)	104
Figure 5: The antiviral activity of CDDO-me depends on Nrf2 and SLPI expression	105
Figure 6: Recombinant human SLPI decreases IAV replication by interfering with TMPRSS2 activity.....	107
Figure S1: CDDO-me treatment does not modify the expression of TMPRSS2	97
Figure S2: CDDO-me treatment decreases the expression of IFN- α	103
Figure S3: CDDO-me inhibits NF- κ B activation induced by TNF- α but does not activate PPAR γ	113

IV. Figures des résultats supplémentaires:

Figure 12: La CDDO-me réduit la morbidité des souris infectées avec le virus influenza.....	124
Figure 13: CDDO-me induit l'expression de PPAR γ d'une façon dépendante de Nrf2	126
Figure 14: Interrelation entre les voies de PPAR γ et de Nrf2 en réponse au stress oxydatif (ROS).....	127
Figure 15: L'infection avec X31/H3N2 induit l'expression de NQO1 mais pas de PPAR γ	129

V. Figures de la discussion:

Figure 16: L'activation de Nrf2 par la CDDO-me inhibe la réplication virale via SLPI	144
--	-----

Liste d'abréviations

ARNm: ARN messenger
ARE: Antioxidant response element
ARNdb: ARNs double brins
CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL7: Chemokine ligand 2,3,4,5 et 7
CCR2: C-C chemokine receptor type 2
CDDO-me: CDDO methyl ester; Bardoxolone
CMH-I et II: Complexes majeurs d'histocompatibilité de type I et II.
DCs: Dendritic cells
EGCG: Épigallocatechine Gallate
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
HA: Hémagglutinine
HO•: Hydroxyle radical
HOCL: Acide hypochloreux
HAT: Human airway trypsin-like protease
IFNs: Interférons
IL-1 et IL-6: Interleukine-1 et 6 respectivement
ILG: Isoliquiritigénine
ILG-p: ILG-phosphate
IκB: Non-canonical inhibitor of NF-κB
INAs: Inhibiteurs de la neuraminidase (NA)
iNOS: Inductible nitrique oxyde synthase
IRF-3: Interferon regulatory factor-3
Keap1: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LPS: Lipopolysaccharides
M1/M2: Protéine de la matrice 1/2
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
MDCK: Madin Darby canine kidney
MOI: Multiplicity of infection
MX1: Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
NA: Neuraminidase
NADPH oxydase: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NF-κB: Nuclear factor-κB
NK: Natural killer cells
NO: Oxyde nitrique
NOX2: NADPH oxydase2
NP: Nucléoprotéine
Nrf2 : Nuclear factor erythroid derived 2 like 2
NS1: Non structurale 1
NS2 (ou NEP): Non structurale 2 ou (nuclear export protein)
O2•-: Superoxyde
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PA: Polymerase acidic
PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns
PB1, PB2 : polymérase basic 1 et 2 respectivement
PB1-F2: Polymérase basic 1-frame 2

PFU: Plaque forming unit
PPAR γ : Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
pmH1N1-2009: Pandemic H1N1/2009
PRRs: Pattern recognition receptors
PR8: A/Puerto Rico/8/1934/H1N1
Prx: Péroxyrédoxine
RIG-1: Retinoic acid-inducible gene-1
vRNPs: Ribonucléoprotéines virales
ROS: Reactive oxygen species
SA α 2,3Gal: Sialic acid α 2,3 Galactose
SA α 2,6Gal: Sialic acid α 2,6 Galactose
SDRA: Syndrome de détresse respiratoire aigüe
SLPI: Secretory leukoprotease inhibitor
SOD: Superoxydes dismutases
Srxn: Sulfirédoxine
Tc1 ou Tc2: T cell cytotoxic 1 et 2 respectivement.
tipDCs: TNF- α /iNOS producing DCs
TLRs: Toll-like receptor
TMPRSS2: Transmembrane protease, serine 2
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TTSPs: Type II transmembrane serine proteases
TZDs: Thiazolidinediones
15d-PGJ2: 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2

Introduction

1. Virus influenza

1.1. Description

La grippe est une maladie infectieuse causée par le virus influenza. Chez l'homme, cette infection des voies respiratoires supérieures cause un ensemble de symptômes tels que la fièvre, les frissons, les douleurs musculaires et articulaires, la toux, le mal de gorge, la fatigue, le mal de tête, l'écoulement nasal et la congestion nasale (Eccles, 2005). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'infection par le virus influenza cause annuellement trois à cinq millions de cas d'infections graves, dont 250 000 à 500 000 décès dans le monde. À ceci, il faut ajouter les pandémies grippales qui sont plus meurtrières et susceptibles de survenir plusieurs fois par siècle lors de l'émergence de nouvelles souches virales hautement contagieuses (Kreijtz et al., 2011). Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont des virus enveloppés dont le génome est constitué de 8 segments d'ARN simple brin de sens négatifs (ARN-). Ces 8 segments encodent au moins 16 protéines dont certaines n'ont été découvertes que tout récemment (Szewczyk et al., 2014). Selon la taille du génome et la nature des protéines de la matrice et de la surface, les virus influenza sont divisés en quatre genres: A, B, C et D. Les virus influenza A sont, en outre, classés en fonction de la nature de leurs glycoprotéines de surface telles que l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (Sun et al., 2013). La nomenclature complète des virus influenza est la suivante: le genre (A), l'hôte d'origine (sauf s'il s'agit d'une souche humaine), le lieu géographique, le numéro de la souche, l'année de son isolement suivie de la description des sous-types antigéniques de HA et NA (par exemple, A/Puerto Rico/8/1934/H1N1) (Nelson et Holmes, 2007). Les virus influenza de types A et B causent la majorité des infections humaines, mais le type A est celui qui est responsable généralement des cas d'infections sévères et cause périodiquement des pandémies plus mortelles chez l'homme. Jusqu'à présent, seulement trois sous-types HA (H1, H2 et H3) et deux sous-types NA (N1 et N2) sont reconnus pour causer des épidémies humaines, caractérisées par une capacité accrue du virus à se transmettre d'une personne à une autre (Li et al., 2015).

1.2. Structure du virus

Les virus influenza sont des particules sphériques de l'ordre de 100 nm de diamètre enveloppées par une membrane lipidique qui est dérivée entièrement de celle de la cellule hôte préalablement infectée. Les virus de type A possèdent trois protéines transmembranaires (HA, NA et M2) intégrées dans l'enveloppe virale (**Figure 1**) (Bouvier et Palese, 2008). Le virus influenza B possède quatre protéines dans son enveloppe (HA, NA, NB et BM2). Le virus C a pour sa part seulement deux glycoprotéines à sa surface, soit l'hémagglutinine-estérase (HEF pour *hemagglutinin-esterase-fusion*) agissant comme HA et NA des virus A et B, et, la seconde protéine, CM2, qui semble avoir une perméabilité aux ions, comme M2 et BM2 (Maeda et al., 2003). À l'intérieur du virus, des complexes protéines-ARN appelés ribonucléoprotéines virales (vRNPs) sont attachés à l'enveloppe via la protéine de la matrice M1 (Bouvier et Palese, 2008). Les vRNPs des virus d'influenza A et B comportent chacun huit segments simple brin d'ARN viral de sens négatif (ARN-) numérotés par ordre décroissant de leurs tailles (Bouvier et Palese, 2008; Maeda et al., 2003). Les segments 1, 2, 3, 4, 5 et 6 encodent pour une seule protéine par segment, soit PB2, PB1 (pour *polymerase basic 1 et 2*), PA (pour *polymerase acidic*), HA, NP et NA respectivement (Chen et al., 2001) (**Figure 1**). Chez certaines souches pandémiques d'influenza A, le segment 2 est dans un cadre de lecture alternatif de +1 encodant également la protéine PB1-F2. Jusqu'à présent, aucun analogue de PB1-F2 n'a été identifié chez les souches d'influenza B ou C (Bouvier et Palese, 2008; Conenello et Palese, 2007; Chakrabarti et Pasricha, 2013). Le segment 7 code pour la protéine de la matrice M1 (Bouvier et Palese, 2008). Le canal ionique M2 des virus A est aussi exprimé à partir du segment 7 par épissage alternatif de l'ARNm (Lamb et al., 1981). Quant aux virus B, BM2 est également encodé par le segment 7 mais dans le cadre de lecture alternatif de +2 (Briedis et al., 1982; Horvath et al., 1990). Enfin, le segment 8 permet l'expression de la protéine non structurale 1 (NS1) (Kochs et al., 2007; Garcia-Sastre, 2001). Par épissage alternatif de l'ARNm, ce dernier segment code également pour la protéine NEP (pour *nuclear export protein*; aussi nommée NS2) (Briedis et Lamb, 1982). Enfin, le virus influenza D est un nouveau pathogène ayant les bovins comme son hôte primaire. Toutefois, l'épidémiologie et la pathogénicité de ce virus ne sont pas encore connus (Sreenivasan et al., 2015)

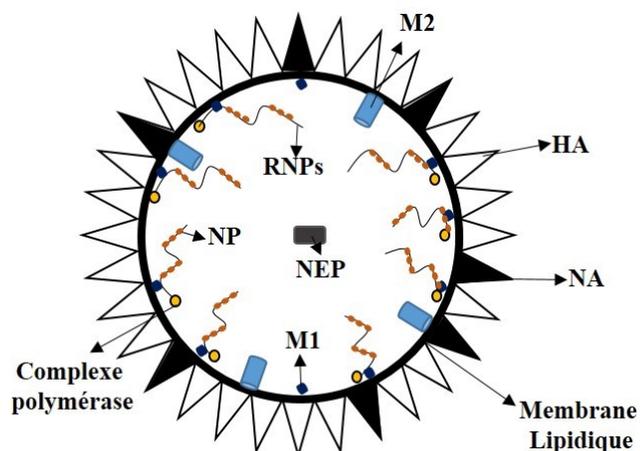


Figure 1: Structure du virus influenza A. Représentation générale permettant l'identification des différentes protéines et des ribonucléoprotéines virales. Les protéines HA, NA et M2 sont à la surface du virus tandis que les protéines internes NP, PA, PB1 et PB2 sont associées à l'ARN viral simple brin sens négatif pour former les vRNPs liées à la membrane virale par la protéine interne M1. Adaptée de (Bui et al., 1996).

1.3. Rôle des composants protéiques du virus influenza

1.3.1. L'hémagglutinine HA

HA est une glycoprotéine présente à la surface des virus influenza sous forme d'un homotrimère. Elle est composée de 2 sous-unités liées par un pont disulfure. Son nom provient de la capacité de la protéine à agglomérer ou agglutiner les globules rouges (érythrocytes) (Worch, 2014). Jusqu'à maintenant, il existe au moins 18 types distincts de HA pour les virus de type A classés selon leurs différences antigéniques (Wu et al., 2014). HA joue plusieurs rôles importants durant le cycle de réplication virale. Elle est responsable de l'attachement du virus aux acides sialiques présents à la surface des cellules épithéliales du système respiratoire. Elle est impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome de façon dépendante d'un pH acide. HA initie également le bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique, une étape qui précède le relâchement des nouveaux virions (Lu et al., 2013; Beaulieu et al., 2013; Rossman et Lamb, 2011).

En ce qui concerne l'attachement des virus à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire, HA se lie aux acides sialiques se trouvant à la membrane de ces cellules (Lu et al., 2013). L'acide sialique est un monosaccharide de 11 carbones, dont les plus fréquents

retrouvés chez les mammifères sont les acides N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et N-glycolylneuraminique (Neu5Gc), tous les deux reconnus par HA des virus influenza (**Figure 2**). En plus de permettre l'attachement du virus, l'acide sialique est impliqué dans les interactions cellulaires et dans la protection des protéines contre leur dégradation (Khatua et al., 2013; Sun et Whittaker, 2013). À la surface cellulaire, l'acide sialique est attaché à la partie N-terminale d'un oligosaccharide lié à une glycoprotéine ou un glycolipide transmembranaire. Il se retrouve fréquemment lié, au niveau de son deuxième carbone, à une molécule de galactose. Cette liaison peut se faire au niveau du groupement hydroxyle 3 ou 6 du galactose, donnant ainsi la nomenclature de l'acide sialique (α -2,3) ou (α -2,6)-N-acétyl galactosamine (ou N-acétylneuraminique) (Sun et Whittaker, 2013). L'hémagglutinine des souches d'influenza d'origine humaine se fixe préférentiellement aux acides sialiques α -2,6 (SA α 2,6Gal), soit la forme majoritaire retrouvée au niveau des cellules épithéliales respiratoires humaines. Celle des virus aviaires préfère davantage se lier aux acides sialiques α -2,3 (SA α 2,3Gal), présents au niveau du tractus gastro-intestinal des oiseaux (Ocana-Macchi et al., 2009). Chez l'homme, les SA α 2,6Gal sont abondamment exprimés dans l'épithélium du tractus respiratoire supérieur et sur les cellules épithéliales non ciliées, alors que les SA α 2,3Gal sont principalement retrouvés dans le tractus respiratoire inférieur et sur les cellules ciliées. Ces dernières représentent donc une cible pour les virus aviaires lorsqu'ils infectent l'homme, rehaussant ainsi les craintes d'une éventuelle pandémie de grippe aviaire (H5N1) (Fukuyama et Kawaoka, 2011) (**Figure 2**). Il est utile de noter que les virus de type H17 et H18 ne se lient pas aux récepteurs canoniques des acides sialiques et que leurs modes d'attachement ne sont pas bien connus pour l'instant (Sun et al., 2013).

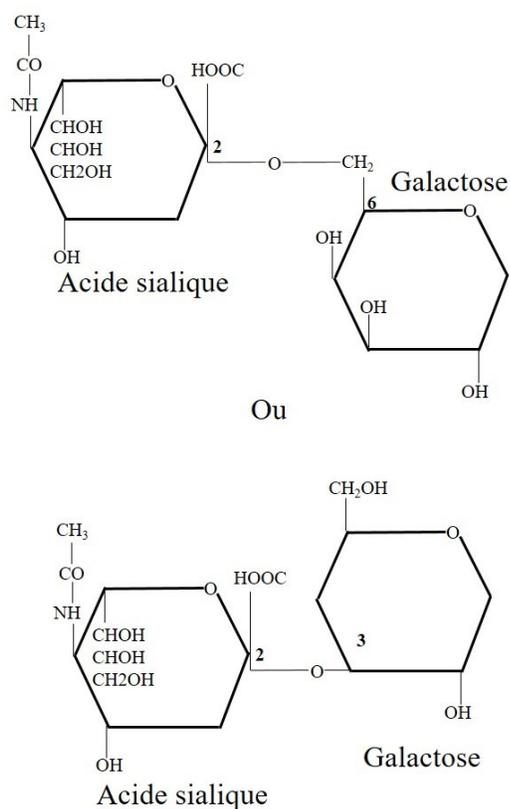


Figure 2: Structure de l'acide sialique SA. Aussi nommé acide N-acétylneuraminique (NANA), il représente le récepteur pour l'hémagglutinine des virus influenza. Il est associé à une chaîne glucidique présente à la surface de la membrane cellulaire. Il peut être lié au galactose de la chaîne glucidique par une liaison α -2,3 ou α -2,6. Au niveau des cellules des voies respiratoires supérieures, c'est la liaison α -2,6 qui est dominante et lie les virus influenza humains. Au niveau des cellules du système respiratoire inférieur (bronchioles), c'est la liaison α -2,3 qui est dominante et peut lier les virus aviaires. Adaptée de (De Clercq, 2006).

En ce qui concerne le second rôle de HA, celle-ci permet la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome lorsque le pH atteint 6.0 durant le cycle de réplication du virus. Pour se faire, HA doit être clivée par des protéases exprimées par la cellule hôte. Le clivage du précurseur HA₀ se produit à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule, libérant ainsi les 2 sous-unités HA₁ et HA₂ (Beaulieu et al., 2013). La sous-unité HA₁ contient le site de liaison à l'acide sialique. L'extrémité N terminale de HA₂, constituée d'environ 14 acides aminés hydrophobes, est nommée peptide de fusion qui est responsable de la fusion des 2 membranes (Bouvier et Palese, 2008). Pour la plupart des sous-types de HA, la séquence consensus au niveau du site de clivage contient un résidu d'arginine (R) spécifique. Ce site de clivage des virus influenza A faiblement pathogènes possèdent une seule arginine et

rarement une seule lysine ce qui est reconnu par des protéases de type protéases à sérine (Fukuyama et Kawaoka, 2011). Ces dernières sont présentes dans un nombre restreint de tissus tels que le système respiratoire et le tractus intestinal, limitant ainsi la propagation du virus à ces organes. Parmi les premières protéases identifiées comme étant capables de cliver HA *in vitro* se retrouvent la plasmine et la tryptase Clara (Tashiro, 1997). Les protéases à sérines transmembranaires de Type II (TTSPs pour *type II transmembrane serine proteases*) sont aussi maintenant connues pour leur rôle dans l'activation de HA à la surface cellulaire et supportent la réplication virale au niveau du système respiratoire. Dans cette famille de protéases, HAT (pour *human airway trypsin-like protease*; aussi nommée TMPRSS11D), TMPRSS2, TMPRSS4 et TMPRSS13 (pour *transmembrane protease, serine 2, 4 et 13* respectivement) ainsi que la matriptase ont été identifiés comme étant capable de cliver HA (Bottcher-Friebertshauer et al., 2013; Zmora et al., 2015; Ohler et Becker-Pauly, 2012; Baron et al., 2013; Okumura et al., 2010; Beaulieu et al., 2013). Des analyses par microscopie en immunofluorescence de TMPRSS2 et HAT ont démontré qu'elles sont exprimées à la surface de la cellule. Cependant, TMPRSS2, contrairement à HAT, s'accumule dans l'appareil de Golgi et colocalise avec la furine (Bottcher-Friebertshauer et al., 2010). Ceci suggère donc que le clivage du virus peut se faire dans l'appareil de Golgi avec TMPRSS2 ou la furine, ou à la membrane plasmique par TMPRSS2 ou la HAT (Fukuyama et Kawaoka, 2011).

1.3.2. La neuraminidase NA

NA est une glycoprotéine homotétramérique à la surface du virus influenza. Elle appartient à la classe des glycosides-hydrolases et clive la liaison glycosidique entre l'acide sialique et le galactose. Ceci permet de détacher l'hémagglutinine de son récepteur. (Colman et al., 1983). Pour les virus de type A, 9 types distincts de NA ont été identifiés jusqu'à présent selon leurs différences antigéniques (Hu et al., 2015). NA, comme HA, reconnaît aussi l'acide sialique à la membrane plasmique de la cellule hôte. NA permet cependant le relâchement des virions à la fin du cycle de réplication virale, contribuant donc à la mobilité des particules virales dans le mucus présent dans les voies respiratoires. NA joue également un rôle avec HA dans l'initiation du bourgeonnement des virions (Bouvier et Palese, 2008). La neuraminidase est la cible des principaux antiviraux disponibles sur le

marché. En effet, depuis 2010, les inhibiteurs de la neuraminidase composent la seule classe d'antiviraux recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le traitement des infections par les virus influenza A et B (Pizzorno et al., 2011; Samson et al., 2013).

1.3.3. Autres protéines virales

En plus de glycoprotéines de surface (HA et NA), l'enveloppe virale est constituée de deux protéines de matrice. La première, M1, permet l'encapsidation de vRNPs dans l'enveloppe de la membrane virale et participe à l'exportation nucléaire (Akarsu et al., 2003). La protéine de matrice M2 est un canal ionique transmembranaire retrouvé sous forme d'homotétramères (Bouvier et Palese, 2008). Après l'endocytose du virus, le canal M2 est activé par le faible pH de l'endosome. À ce stade, M2 transporte les protons vers l'intérieur du virus. Ceci permet d'interrompre l'interaction entre M1 et les vRNPs. Cette étape est nécessaire pour la libération du génome viral (Schnell et Chou, 2008; Pielak et Chou, 2011).

À l'intérieur du virus, le complexe de polymérase virales formé de PA, PB1 et PB2 est responsable à la fois de la transcription et la réplication permettant la synthèse de l'ARN virale en catalysant l'addition séquentielle de nucléotides au cours de l'élongation de l'ARN (Biswas et Nayak, 1994). La protéine NP est un partenaire du complexe de la réplication et la transcription. Cette protéine est retrouvée sous forme d'homotétramères ou d'homotrimères selon le type du virus (Ye et al., 2006; Ng et al., 2008; Ng et al., 2012). Elle participe à l'architecture des vRNPs en recouvrant et protégeant les huit segments d'ARN.

NS1, une autre protéine du virus, ne possède pas d'activité enzymatique mais peut toutefois inhiber la réponse antivirale en affectant négativement la production d'interférons (IFNs) de type I par les cellules infectées (Krug, 2015).

Ensuite, la protéine NEP est impliquée dans le processus d'exportation nucléaire en s'interagissant en même temps avec les vRNPs et la machinerie d'export nucléaire de la cellule hôte (Bouvier et Palese, 2008). Ce rôle de NEP est assuré par la présence d'un motif

d'exportation nucléaire NES (pour *nuclear export sequence*) qui se trouve dans sa région N-terminale.

Pour terminer, la protéine virale PB1-F2 (pour *polymerase basic 1-frame 2*) a été découverte en 2001 dans la souche virale A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Elle est exprimée dans certaines souches virales du genre A, tandis qu'elle est absente dans les virus B et C (Bouvier et Palese, 2008). Bien que PB1-F2 ne soit pas essentielle pour la réplication virale *in vitro*, au moins trois fonctions lui ont été attribuées. Tout d'abord, elle induit directement ou indirectement l'apoptose des cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les macrophages alvéolaires. Deuxièmement, PB1-F2 peut améliorer l'activité du complexe de polymérase virales en retenant la polymérase PB1 dans le noyau durant la réplication virale. Finalement, PB1-F2 peut déréguler ou exacerber la réponse inflammatoire innée suite à l'infection, ce qui diminuera l'élimination du virus (Conenello et Palese, 2007; Chakrabarti et Pasricha, 2013).

1.4. Cycle de réplication du virus influenza

Tout d'abord, l'hémagglutinine du virus influenza s'attache à l'acide sialique se trouvant à la surface des cellules épithéliales du système respiratoire (**étape 1: attachement**) (**Figure 3**). Ensuite, le virus pénètre dans la cellule par endocytose. Cette étape se produit par différentes voies telles que la voie dépendante de la clathrine, la voie dépendante de la cavéoline et la voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Bouvier et Palese, 2008). Une fois dans l'endosome, des voies de signalisation impliquant PI3K et ERK 1/2 (pour *Extracellular signal-regulated kinases1/2*) sont initiées. Elles vont permettre l'activation des pompes V-ATPase causant l'acidification des endosomes (**étape 2: internalisation et acidification endosomale**) (Marjuki et al., 2011). L'acidification permet la maturation de l'endosome et son transport dans la cellule. Elle est aussi impliquée dans la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale. Cette fusion n'est possible qu'après le clivage du précurseur HA0 de l'hémagglutinine par des protéases de l'hôte permettant la libération de la sous-unité qui contient le peptide de fusion. Ce clivage peut être soit intracellulaire, à la surface de la cellule ou bien extracellulaire (Beaulieu et al., 2013). Il peut également avoir lieu pendant l'entrée des virus dans les cellules infectées ou

après libération des nouveaux virions à la fin du cycle de réplication (**étape 3**: changement de conformation de HA et fusion membranaire) (Beaulieu et al., 2013). Par la suite, le canal ionique M2 permet l'entrée des protons à l'intérieur du virus, ce qui permet la libération des vRNPs dans le cytoplasme (**étape 4**: relâchement du génome viral) (Pielak et Chou, 2011). Afin de répliquer et transcrire les ARNs viraux, les vRNPs sont transportés vers le noyau sous le contrôle des signaux NLS présents dans les protéines NP (**étape 5**: entrée au noyau). Une fois dans le noyau, l'ARN viral est répliqué pour donner une copie d'ARN de polarité positive ARN⁺ servant de matrice pour la synthèse d'un grand nombre de copies d'ARN⁻. Ces derniers constitueront le génome des nouveaux virions. En parallèle, la transcription de l'ARN virale est initiée pour donner des ARNm possédant une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' (Chenavas et al., 2013). (**étapes 6 et 7**: réplication virale et synthèse protéique). Une fois synthétisées par les ribosomes, les protéines virales nécessaires pour la formation de nouveaux vRNPs (PA, PB1, PB2 et NP) sont importées vers le noyau. Les nouveaux vRNPs formés sont ensuite exportés vers le cytoplasme grâce aux protéines NEP et M1 qui interagissent avec la machinerie d'exportation (ex: protéine CRM1). Pour leur part, HA et NA subissent des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE) et continuent leurs maturations dans l'appareil de Golgi. HA et NA sont finalement transportées avec M2, vers les radeaux lipidiques de la membrane plasmique apicale de la cellule. Après leurs assemblages dans le noyau, les vRNPs sont maintenant prêts à se déplacer avec les protéines M1 et NEP nouvellement synthétisées, vers le site d'assemblage où se sont accumulées HA, NA et M2. Le regroupement de HA et NA provoque ensuite une déformation de la membrane cellulaire et déclenche le bourgeonnement des virions. M1 forme un pont liant les vRNPs avec le côté interne de la membrane plasmique (**étape 8**: accumulation et bourgeonnement). La libération des virions est enfin réalisée par l'action de la neuraminidase qui clive les acides sialiques pour détacher HA (**étape 9**: relâchement des virions) (Bouvier et Palese, 2008; Chenavas et al., 2013) (**Figure 3**).

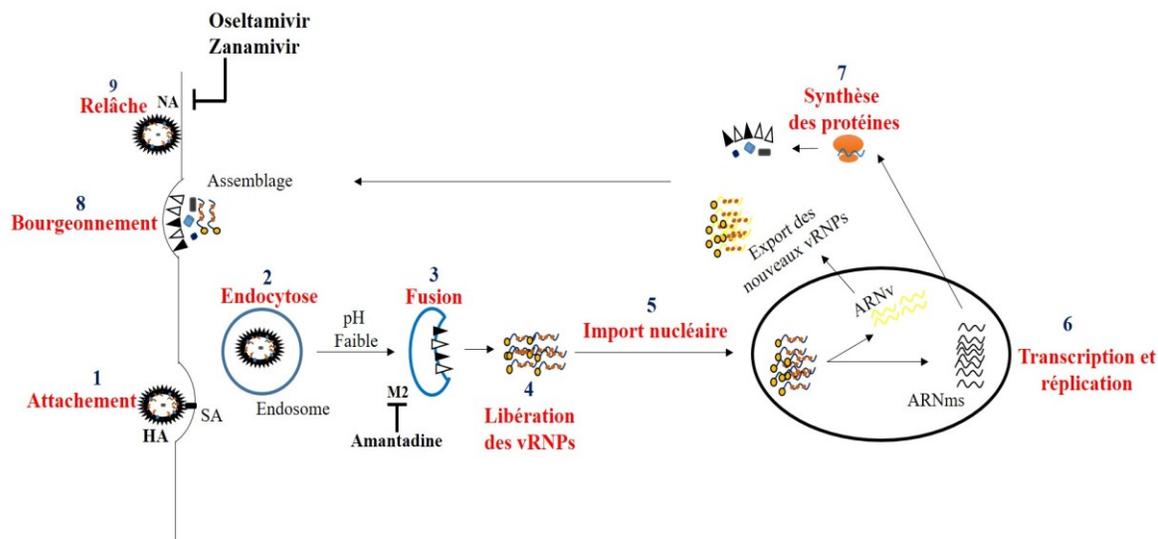


Figure 3: Cycle de réplication du virus influenza et mécanismes d'actions des traitements antiviraux reconnus. 1) La liaison de l'hémagglutinine virale à l'acide sialique (étape 1) permet l'internalisation du virus (étape 2). L'acidification et le changement de conformation de l'hémagglutinine permet la fusion des membranes (étape 3). Cette fusion permet le relâchement et l'importation du génome viral vers le noyau (étapes 4 et 5). La réplication du matériel génétique et la synthèse des protéines virales sont initiées (étapes 6 et 7). Toutes les composantes virales vont s'assembler à la surface cellulaire, entraînant ainsi le bourgeonnement et le relâchement de nouveaux virions capables d'infecter d'autres cellules (étapes 8 et 9). Les principaux antiviraux reconnus peuvent bloquer la réplication virale en inhibant l'action du canal viral M2 impliqué dans l'acidification des virus (Amantadine et Rimantadine). Les inhibiteurs de la neuraminidase virale (Zanamivir et Oseltamivir) peuvent également empêcher le relâchement des virions. Adaptée de (von Itzstein, 2007).

1.5. Symptômes typiques de la grippe

Les infections grippales sans complication sont limitées à l'attachement et à la réplication virale dans les voies respiratoires supérieures. Généralement dans ces cas, les symptômes sont une fièvre accompagnée de céphalées, de frissons, de myalgies, d'une congestion et un écoulement nasal, de maux de gorge et de la toux. De plus, les symptômes peuvent comprendre des malaises gastro-intestinaux tels que des vomissements, des douleurs abdominales et la diarrhée (Eccles, 2005). Les complications de l'infection grippale sont plus fréquemment observées chez les personnes affaiblies, telles que les enfants, les personnes âgées, les immunodéprimées et celles atteintes des maladies pulmonaires chroniques (par exemple l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique, MPOC) (Haq et McElhaney, 2014a; CDC, 2010; Ramos et Fernandez-Sesma, 2015). Ces

complications commencent lorsque l'infection virale atteint l'épithélium alvéolaire des voies respiratoires inférieures, où des dommages tissulaires sévères peuvent survenir et affecter les échanges gazeux (Fukuyama et Kawaoka, 2011). Au niveau des tissus alvéolaires, les pneumocytes tapissant l'intérieur des alvéoles forment avec les cellules endothéliales, la barrière alvéolo-capillaire. C'est à travers cette barrière que s'effectue les échanges gazeux pulmonaires (Guillot et al., 2013). Par conséquent, les dommages de l'épithélium alvéolaire conduisent à des complications dangereuses tels qu'une pneumonie et un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Nicholls, 2013). Ce dernier se produit souvent dans les cas sévères de la grippe (Imai, 2015).

Les complications de la grippe sont également associées fréquemment à des infections bactériennes secondaires. Cette susceptibilité aux infections bactériennes peut être causée par une série de changements au niveau de l'épithélium pulmonaire induits lors de l'infection par le virus influenza. Ceci facilite l'adhésion et l'invasion bactérienne. Par exemple, diverses études ont démontré que suite à une infection par le virus influenza, le nombre de macrophages alvéolaires diminue. Ces cellules immunitaires innées résidant dans les poumons constituent une barrière de défense importante contre les pathogènes (Ghoneim et al., 2013; Damjanovic et al., 2012).

1.6. Capacité de mutagenèse et émergence des virus hautement pathogènes

Les virus influenza sont bien connus pour leurs capacités de changements génétiques qui résultent soit d'une accumulation de mutations dans le génome viral durant la réplication (dérive antigénique ou *antigenic drift*), ou soit des réassortiments de gènes entre plusieurs virus différents (saut antigénique ou *antigene shift*). Ces deux processus permettent au virus de s'échapper du système immunitaire. Ce qui rend donc l'être humain susceptible à l'infection par de nouvelles souches du virus, responsables de l'apparition des épidémies et des pandémies de grippe (Kreijtz et al., 2011).

1.6.1. Dérive antigénique

La dérive antigénique est un phénomène de mutations dans le génome viral. Elle s'applique à tous les types de virus influenza et se produit durant la réplication virale dans la cellule infectée. Elle est due à l'infidélité de la polymérase virale et à l'absence de système de réparation lors de la synthèse des ARNs viraux, permettant ainsi une accumulation fréquente de mutations ponctuelles. Ces dernières peuvent influencer les protéines synthétisées par le virus lors de son cycle de réplication. Par exemple, les mutations retrouvées au niveau des protéines de la surface HA et NA ont une répercussion importante étant donné leur reconnaissance par le système immunitaire. Les virions contenant ces protéines virales mutées ne sont plus neutralisés par les anticorps produits par les lymphocytes B, ou les antiviraux utilisés perdent leur efficacité (Yewdell, 2011; Samson et al., 2013). Ces mutations expliquent donc l'émergence de nouvelles souches du virus influenza annuellement contre lesquelles l'homme n'est pas immunisé et les vaccins sont inefficaces. Ce phénomène est aussi responsable de l'apparition des souches virales résistantes aux antiviraux utilisés contre la grippe (Pizzorno et al., 2011).

1.6.2. Saut antigénique

La cassure ou le réassortiment antigénique s'applique principalement aux virus du groupe A. Cela se produit lorsque le même organisme, ou plutôt la même cellule, est infectée à la fois par plus d'une souche d'influenza. Dans ce cas, ces virus peuvent s'échanger des segments de leurs génomes lors de la réplication. La cassure antigénique se produit fréquemment chez le porc puisqu'il peut être infecté autant par des virus humains que par des virus aviaires ce qui peut promouvoir la rencontre de virus différents et leurs réassortiment (Kreijtz et al., 2011; Urbaniak et Markowska-Daniel, 2014). Les virions formés posséderont des caractéristiques différentes de leurs virus parentaux ce qui peut, dans certains cas, leur conférer des avantages pouvant les rendre hautement pathogènes. Ces souches peuvent causer des pandémies entraînant la mort d'un nombre important d'individus comme dans le cas de la grippe Espagnole H1N1 de 1918 (20 à 100 millions de décès), la grippe asiatique H2N2 de 1952 (environ 1,5 millions de décès), la grippe de Hong Kong H3N2 de 1968 (environ 1 million de décès) et la grippe pandémique A (H1N1)

de 2009 (environ 18 000 décès) (Watanabe et Kawaoka, 2011; Josset et al., 2012; Hsieh et al., 2006).

1.7. Protection, prévention et traitement contre la grippe

La vaccination annuelle contre le virus influenza constitue la meilleure méthode prophylactique pour protéger la population. Des antiviraux anti-influenza peuvent être utilisés pour contrôler les symptômes lors d'épidémies ou de pandémies. Ces antiviraux servent toutefois surtout à réduire les symptômes de la maladie chez les personnes infectées et diminuer le risque de complications. Cependant, il existe seulement deux classes d'antiviraux actuellement disponibles pour les infections à l'influenza; et sont les inhibiteurs du canal M2 et les inhibiteurs de la NA (Cross et Wedekind, 2001; Barik, 2012).

1.7.1. Vaccination

Jusqu'à présent, la vaccination constitue la meilleure méthode pour la prévention et le contrôle de l'influenza selon l'OMS. Cette méthode peut réduire la maladie et diminuer la sévérité de l'infection. Le vaccin permet de présenter les antigènes du virus au système immunitaire afin de générer une réponse immunitaire contre au moins trois souches du virus influenza. Cependant, les virus contenus dans le vaccin ne permettent pas d'engendrer une réponse immunitaire forte. C'est pour cette raison que l'ajout d'un adjuvant au vaccin est souvent requis afin d'améliorer la réponse immunitaire, la production d'anticorps ainsi que la génération de cellules mémoires (Houser et Subbarao, 2015). Le rôle de l'adjuvant est d'améliorer la présentation du virus de façon adéquate aux cellules du système immunitaire. Cela permet la formation d'une plus grande quantité d'anticorps, majoritairement dirigés contre HA et de façon accessoire contre NA. Le vaccin favorise également la génération de lymphocytes B mémoires ce qui permet au système immunitaire de réagir plus rapidement et plus efficacement lors d'une rencontre ultérieure avec le même virus ou un virus similaire. C'est pour cela, plus la ressemblance entre les souches de virus présentes dans le vaccin et celles circulant est grande, meilleure sera la protection offerte par le vaccin (Hasegawa et al., 2015; Even-Or et al., 2013). Actuellement, il y a trois classes de vaccins autorisés contre la grippe saisonnière, soit les vaccins inactivés, les vaccins vivants atténués et la HA recombinante. Ces trois types de vaccins sont

multivalents puisqu'ils contiennent les composants de souches de type A/H1N1, A/H3N2 et B qui sont prévus de circuler durant la prochaine saison de la grippe.

Pour préparer le vaccin inactivé, le virus est tout d'abord produit en grande quantité suite à l'inoculation d'embryons de poulet. Par la suite, les particules virales sont inactivées par des techniques spécifiques. Le vaccin atténué contient des virus vivants mais ayant subi des mutations pour atténuer leur réplication. Il est seulement administré aux personnes en bonne santé ayant entre 2 et 49 ans. Le troisième type de vaccin contient des protéines HA recombinantes produites dans les cellules mammifères. Il est utilisé chez les personnes allergiques aux œufs. Le processus de fabrication de ce vaccin est plus court, ce qui serait un précieux avantage lors de la propagation d'une pandémie (Soema et al., 2015; Houser et Subbarao, 2015).

Bien que les vaccins contre la grippe présentent une certaine efficacité, surtout chez les adultes, cette méthode de prévention fait face à plusieurs défis. Parmi ceux-ci on retrouve le besoin d'embryons poulet pour la culture (pour les deux premiers types de vaccins) et le long délai pour la production des vaccins. De plus, l'émergence de virus différents d'un point de vue antigénique rend la vaccination annuelle nécessaire. L'apparition des nouveaux virus pandémiques contre lesquels les vaccins sont inefficaces fait également partie des défis (Soema et al., 2015). De plus, il ne faut pas oublier que les vaccins sont beaucoup moins efficaces chez les nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes immunodéficientes (Haq et McElhaney, 2014b; Pera et al., 2015). Enfin, le défi majeur se situe au niveau de la ressemblance entre les souches vaccinales et celles en circulation afin d'offrir une protection optimale (Monto, 2010; Houser et Subbarao, 2015). En effet, le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC pour *centers for disease control and prevention*) a estimé que l'efficacité du vaccin contre la grippe A pour la saison 2014-2015 était seulement de 18% pour l'hémisphère nord.

1.7.2. Les antiviraux

Jusqu'à présent, il n'existe que deux classes d'antiviraux approuvées pour traiter la grippe. La première classe compte les inhibiteurs de la neuraminidase NA, tels que l'oseltamivir

(Tamiflu®) et le zanamivir (Relenza®) qui sont les plus utilisés. La deuxième classe regroupe la famille des adamantanes qui sont des inhibiteurs du canal ionique M2. On y retrouve l'amantadine et la rimantadine. Les antiviraux peuvent réduire la gravité des symptômes s'ils sont pris peu après le début de l'infection. Lorsqu'utilisés en prophylaxie, ils peuvent également diminuer les risques d'infection. Les inhibiteurs du canal ionique M2 sont efficaces seulement contre le virus influenza de type A. Ils inhibent sa réplication en bloquant l'influx de protons H^+ dans le virus via le canal M2. Cependant, cette classe d'inhibiteurs est maintenant rarement utilisée puisque la majorité des souches influenza A circulantes y sont résistantes à cause des mutations génétiques (sélection par mutations) (Cross et Wedekind, 2001; Shen et al., 2015).

Les inhibiteurs de la NA (INAs) constituent la principale classe d'antiviraux utilisée contre le virus influenza. Les INAs sont efficaces contre les virus A et B. La structure des INAs mime celle de l'acide sialique qui est un substrat naturel de la NA. En effet, leurs structures sont basées sur la structure de l'acide 2-désoxy-2,3-didéhydro-N-acétylneuraminique. Ils possèdent une affinité pour la NA plus élevée que celle de l'acide sialique, empêchant ainsi le clivage de ce dernier durant la réplication virale (Samson et al., 2013). Ils bloquent ainsi le relâchement des virions et la propagation de l'infection à d'autres cellules. On trouve dans cette classe l'oseltamivir (Tamiflu®-Roche; administration orale), le zanamivir (Relenza®-GlaxoSmithKline; inhalation), le peramivir (Rapivab®-BioCryst Pharmaceuticals; intraveineux) et le laninamivir (Inavir®-Daiichi Sankyo; inhalation). Ces médicaments peuvent être administrés en prophylaxie ou comme traitement tôt après le début de l'infection (24 à 72h suivant le début des symptômes). Ils peuvent alors réduire les symptômes d'environ 1 à 3 jours ainsi que le risque de complications, d'hospitalisations et de transmissions. L'oseltamivir, le plus utilisé vu sa facilité d'administration, a longtemps été considéré comme étant le composé le moins susceptible au développement de résistances. Mais actuellement, un nombre croissant de souches résistantes contre ce médicament est enregistré. En effet, la quasi-totalité des souches H1N1 circulant aux États-Unis et en Europe lors de la saison 2008-2009, était résistante à l'oseltamivir. Néanmoins, pour la saison 2013-2014, le nombre de souches en circulation résistantes à l'oseltamivir était très faible (Samson et al., 2013; von Itzstein, 2007). Il est donc primordial de

promouvoir le développement d'autres stratégies pour le traitement de la grippe compte tenu de l'apparition rapide de souches influenza résistantes aux traitements actuels (comme dans le cas de la saison 2008-2009).

1.7.3. Traitements anti-influenza alternatifs en développement

Pour pallier au problème de génération de résistance sans cesse croissant, le développement d'une autre approche de traitement ciblant la machinerie cellulaire nécessaire dans les différentes étapes du cycle de réplication virale suscite beaucoup d'intérêt. Par exemple, plusieurs études ont démontré que des molécules comme la chloroquine ou la bafilomycine A, inhibant les pompes à protons de type V-ATPase, ainsi que les modulateurs du calcium sont capables de réduire la réplication des virus influenza de genres A et B *in vitro* (Ochiai et al., 1995; Marois et al., 2014). D'autres études visent à réduire par des sialidases l'expression des acides sialiques à la surface de la cellule épithéliale, ou à les bloquer par des anticorps. Ces approches empêcheraient par conséquent la fixation du virus à la cellule (Landers et al., 2002). En outre, le favipiravir (Toyama Chemical; administration orale) est un nucléoside (pyrazine organofluorée) qui bloque efficacement l'activité de la polymérase virale PB1, et par la suite la synthèse de l'ARN viral. Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase III (Strasfeld et Chou, 2010). Cependant il a été approuvé au Japon pour le traitement de l'influenza. Il a été également démontré *in vitro* que l'inhibition de l'activité des kinases de NF- κ B (pour *nuclear factor-kappa B*) réduit efficacement la réplication virale dans les cellules épithéliales en bloquant l'export des vRNPs hors du noyau (Pinto et al., 2011). Ceci suggère donc que des inhibiteurs bloquant cette voie pourraient être testés comme traitements antiviraux alternatifs. C'est dans ce contexte qu'il a été démontré que l'acide acétylsalicylique (aspirine) inhibe NF- κ B et par conséquent réduit la réplication de plusieurs souches de virus influenza. En effet, l'administration d'aspirine permet de protéger 60% des souris contre une infection létale par un virus de type H7N7. Des essais cliniques ont été lancés pour évaluer l'efficacité de l'aspirine sous forme d'aérosols (LASAG pour *lysine acetylsalicylate glycine*) sur la réplication du virus influenza (arrêté prématurément en phase II en 2015) (Herold et al., 2015). Cependant, les enfants et les adolescents présentant des symptômes de la grippe devraient éviter l'utilisation de l'aspirine puisque cela peut conduire au syndrome de Reye, une maladie rare

mais potentiellement mortelle entraînant une encéphalopathie et une hépatomégalie (Mazur et al., 2007). Une autre stratégie consiste à utiliser des inhibiteurs ou des anticorps contre la partie non varilabe de HA afin de bloquer l'étape de fixation du virus à l'acide sialique. Ceci pourrait arrêter l'infection par le virus, mais il ne peut pas empêcher les cellules préalablement infectées de libérer les nouveaux virions (Shen et al., 2013). Enfin, une autre approche thérapeutique intéressante est présentement en développement dans notre laboratoire en collaboration avec d'autres groupes de l'Université de Sherbrooke. L'hémagglutinine du virus influenza a besoin d'être clivée par des protéases exprimées par la cellule hôte pour devenir infectieux. La stratégie consiste donc à développer des inhibiteurs spécifiques contre la famille des sérines protéases transmembranaires TTSPs permettant d'inhiber le clivage de HA, limitant ainsi la réplication et la propagation du virus influenza (Beaulieu et al., 2013).

2. Réponse immunitaire lors d'une infection par le virus influenza

Pour nous protéger contre les bactéries et les virus, tels que celui de la grippe, notre organisme dispose d'un mécanisme de défense, soit le système immunitaire. L'infection des cellules épithéliales du système respiratoire initie la génération d'une réponse par ces cellules et celles du système immunitaire afin d'éliminer les virus.

2.1. Réponse immunitaire innée

Les mécanismes de défense cellulaires initiés pour nous défendre contre un pathogène débutent par la détection de composantes nommés motifs moléculaires associés à des pathogènes PAMPs (pour *pathogen-associated molecular patterns*) par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires PRRs (pour *pattern recognition receptors*). Ces récepteurs font partie du système immunitaire inné et sont exprimés par diverses cellules telles que les cellules épithéliales et immunitaires. Cette reconnaissance enclenche une cascade de signalisation qui résulte en la sécrétion de cytokines inflammatoires, des IFNs de type I ou II (défense antivirale) et des chimiokines (Mogensen, 2009).

2.1.1. Les différents PRRs

Ils existent plusieurs types de PRRs ayant une distribution cellulaire spécifique soit, à la membrane plasmique, dans le cytoplasme ou dans l'endosome. Les PRRs cytoplasmiques comprennent les RLRs (*pour retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors*) et NLRs (*pour nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors*) qui sont des senseurs des acides nucléiques viraux. Ces récepteurs sont particulièrement importants dans le cas des infections virales à influenza (Mogensen, 2009). La famille des RLRs comprend RIG-1, MDA5 (*pour melanoma differentiation-associated protein 5*), et LGP2 (*pour laboratory of genetics and physiology 2*). Cette famille est exprimée par la plupart des types cellulaires et participe à la reconnaissance des ARNs double brins viraux (ARNdb) (Kell et Gale, 2015). En ce qui concerne les NLRs, NLRP3 (*pour NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) est le membre le plus étudié dans le contexte des infections virales. Ce récepteur conduit à l'activation de l'inflammasome. Ceci mène à la maturation de certaines cytokines inflammatoires telles que l'interleukine 1 β (IL-1 β) et l'interleukine 18 (IL-18), en clivant leurs formes non matures via l'activité de la protéase caspase 1. L'inflammasome est donc responsable de l'activation des processus inflammatoires, et peut induire l'apoptose cellulaire (Hosseinian et al., 2015). NLRP3 est exprimé dans les cellules immunitaires d'origine myéloïde telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (DCs *pour dendritic cells*), les neutrophiles ainsi que dans les cellules épithéliales pulmonaires. Durant l'infection par le virus influenza, NLRP3 est activé par différents PAMPs comprenant l'ARNdb, la protéine M2 virale et les espèces réactives de l'oxygène (ROS *pour reactive oxygen species*) produites par les cellules infectées et les cellules immunitaires dont surtout les macrophages et les neutrophiles (van de Sandt et al., 2012). Parmi les PRRs les plus étudiés jouant un rôle important dans l'inflammation, on trouve également les TLRs (*pour Toll-like receptor*). Jusqu'à présent, 13 sous-types de TLRs ont été identifiés chez l'homme et la souris. Certains TLRs, tels que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6, sont situés à la membrane plasmique et sont principalement activés par des lipopolysaccharides bactériens (LPS), des lipides, des protéines et des lipoprotéines oxydées. D'autres TLRs, tels que TLR3, TLR7/8 et TLR9, sont intracellulaires dans l'endosome tardif et reconnaissent les acides nucléiques (Mogensen, 2009). Les TLRs sont fortement exprimés par les cellules épithéliales et par les cellules présentatrices d'antigènes,

telles que les DCs et les macrophages (Lorenz et Anders, 2015). Les TLRs contiennent un domaine extracellulaire LRR (pour *leucine rich repeat*) reconnaissant le ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire TIR (pour *Toll/interleukin-1 receptor*) permettant la signalisation cytoplasmique (Mogensen, 2009). Un dernier type de PRRs regroupe les récepteurs CLR (pour *C-Type Lectin Receptors*) qui reconnaissent les glucides grâce à leurs domaines de reconnaissance des glucides CRDs (pour *carbohydrate-recognition domains*). Les CLR sont divisés en 3 groupes selon leurs structures moléculaires. Ils sont exprimés à la surface de différents types cellulaires dont les cellules présentatrices d'antigènes (Plato et al., 2015).

2.1.2. Reconnaissance des PAMPs du virus influenza par les PRRs

2.1.2.1. Reconnaissance par les TLRs

Lors de l'infection par le virus influenza, ou d'autres virus à ARN, les TLRs les plus importants, impliqués dans la défense immunitaire, sont les TLR3, 7 et 8. Le TLR3 reconnaît les ARNdb qui sont produits durant la réplication virale. Par contre, TLR7 et 8 reconnaissent les ARNs simple brins du virus influenza. Après la reconnaissance des ARNs viraux, les TLRs vont subir des changements de conformation permettant l'interaction au niveau cytoplasmique du domaine TIR avec des molécules adaptatrices. Cinq molécules adaptatrices ont été identifiées, soit TRIF (pour *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), MyD88 (pour *Myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (pour *TIR associated protein*), TRAM (pour *TRIF-related adaptor molecule*) et SARM (pour *sterile α - and armadillo-motif-containing protein*) (Yoo et al., 2013). Ces molécules sont impliquées dans deux voies de signalisation distinctes, soit la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF (Deguine et Barton, 2014; Amarante et Watanabe, 2010).

2.1.2.1.1. TLR3

TLR3 déclenche la signalisation via la voie indépendante de MyD88 en utilisant TRIF comme protéine adaptatrice. TRIF interagit avec TRAF3 (pour *TNF- α receptor associated factor 3*) pour activer les kinases TBK1 (pour *TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1*) et IKKi (pour *non-canonical inhibitor of NF- κ B (I κ B)*)

kinase). Ces kinases phosphorylent directement le facteur de transcription IRF-3 qui se transloque vers le noyau sous forme d'homodimères où il induit l'expression des gènes antiviraux IFN- α et β .

TRIF interagit également avec TRAF6 (pour *tumour necrosis factor- α (TNF- α) receptor associated factor 6*) pour activer la kinase TAK1 (pour *transforming growth factor- β activated kinase-1*). Une fois TAK1 est activée, elle phosphoryle à son tour le complexe IKKs formé des kinases IKK α , IKK β et NEMO. IKKs ensuite phosphorylent *I κ B* qui est une protéine inhibitrice de NF- κ B, causant sa dégradation et permettant ensuite la translocation de NF- κ B vers le noyau (Mogensen, 2009; Fitzgerald et al., 2003; Oganessian et al., 2006) (**Figure 4**). NF- κ B est un hétérodimère formé à partir de cinq sous-unités, soit p50, p52, p65^{RelA}, RelB et c-Rel. Durant la voie d'activation classique par le complexe IKKs, les dimères comprenant les sous-unités p50: p65, Rel-B:c-Rel et Rel-B:p50 sont les formes de NF- κ B qui transloquent le plus souvent vers le noyau. Pour ce qui est de la voie d'activation non classique de NF- κ B, un peu moins étudiée, c'est plutôt le dimère des sous-unités p50:p52 qui est transloqué au noyau. Une fois, dans le noyau, le complexe NF- κ B se fixe sur son élément de réponse présent au niveau des promoteurs de nombreux gènes cibles qui codent pour des cytokines (par exemple IFNs, TNF- α , interleukine 1(IL-1) et interleukine 6 (IL-6)) et des chimiokines (Lawrence, 2009). Ces dernières sont des molécules qui permettent de recruter les cellules immunitaires vers le site d'infection

2.1.2.1.2. TLR7

Contrairement au TLR3, TLR7 utilise la voie dépendante de MyD88 pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires et des IFNs. Suite à la reconnaissance des ARNs du virus influenza, MyD88 forme un complexe de signalisation avec IRAK-1, IRAK-4 (pour *interleukin-1 receptor-associated kinase- 1 et 4* respectivement), TRAF6 et TRAF3. Ce complexe de signalisation permet ensuite d'activer NF- κ B, AP-1 et IRF-7, ce qui régule l'expression des cytokines inflammatoires et des IFNs de type I (Mogensen, 2009) (**Figure 4**). En plus, la voie dépendante de MYD88 active également les kinases de la voie des MAPKs (pour *Mitogen-activated protein kinases*) tels que: ERK1/2 (pour *extracellular signal-regulated kinases 1 et 2*), p38 et JNK (pour *c-Jun N-terminal kinases*)

(Kawai et Akira, 2006). Ces kinases vont ensuite réguler plusieurs fonctions cellulaires. Il est important de mentionner, que les kinases P38 et ERK1/2 sont requises pour l'export des vRNPs durant la réplication du virus influenza (Marjuki et al., 2006; Borgeling et al., 2014).

2.1.2.1.3. TLR4

Contrairement aux autres TLRs, TLR4 est unique quant à sa capacité à signaler à la fois par la voie dépendante et indépendante de MyD88. Une fois TLR4 activé, il recrute TRIF via l'adaptateur TRAM ce qui induit l'expression des réponses antivirales et anti-inflammatoires par la voie indépendante de MyD88 (tel que décrit précédemment pour TLR3). De plus, TLR4 utilise également la protéine adaptatrice TIRAP pour recruter MyD88 à son domaine TIR. Cette stimulation passant par la voie dépendante de MyD88 initie la cascade de signalisation impliquant l'activation séquentielle de kinases conduisant à l'activation des facteurs NF- κ B et AP-1 (comme pour TLR7/8) (Mogensen, 2009) (**Figure 4**).

Cependant, étant donné que TLR4 ne reconnaît pas les acides nucléiques, ce récepteur a été identifié pour jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire tardive durant une infection par le virus influenza (Imai et al., 2008). En effet, il a été démontré que TLR4 fixe les phospholipides oxydés. Ces derniers sont oxydés par les ROS produits lors de l'infection virale. Ceci mène à l'activation supplémentaire de NF- κ B, ce qui augmente de plus la production de cytokines inflammatoires. Selon cette étude, ce phénomène est responsable du développement du SDRA lors des infections sévères causées par les virus H5N1 et H1N1 pandémiques. Ce syndrome est un état grave où la capacité d'échanges gazeux chute d'une façon importante. D'une manière intéressante, l'inhibition de TLR4 ou de TRIF, ainsi que l'atténuation de la production des ROS, permettent de diminuer la sévérité du SDRA chez les souris lors d'une infection par le virus H5N1 (Imai et al., 2008). Une seconde étude a également démontré que l'administration de l'antagoniste de TLR4 «Eritoran» aux souris réduit la mortalité induite par une dose létale du virus H1N1 (A/PR/8/34/H1N1, ou PR8). Ceci était accompagné par une réduction de l'expression des cytokines et des dommages pulmonaires reliés à l'infection (Shirey et al., 2013). Ces

données fournissent de nouvelles perspectives sur la fonction physiopathologique des cytokines et des ROS lors de l'infection par le virus influenza et montrent que lorsqu'ils sont présents en quantité élevée, ils peuvent aggraver la situation et contribuer à l'immunopathologie de la grippe.

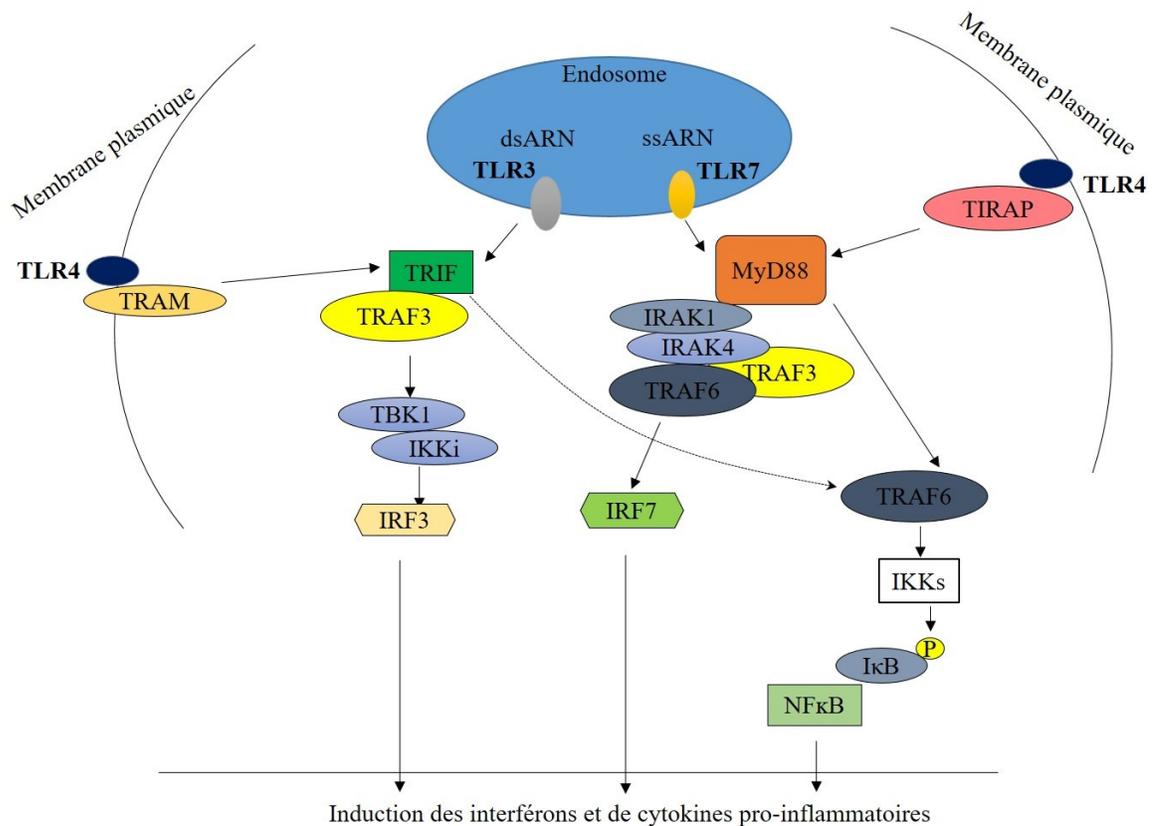


Figure 4: Induction des voies de signalisation des TLRs par l'infection avec le virus influenza. La détection des acides nucléiques viraux par les TLRs 3 et 7 dans l'endosome active des voies dépendantes ou indépendantes de MyD88 ainsi que les facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF κ B. Ces facteurs de transcription migrent au noyau où ils activent la transcription de différents gènes impliqués dans la génération du milieu inflammatoire et antiviral. TLR4 est capable d'activer les deux voies (dépendantes ou indépendantes de MyD88). (Adaptée de (O'Neill et al., 2009)).

2.1.2.2. Reconnaissance par RIG-1

Le récepteur cytoplasmique RIG-I est le senseur principal de l'infection par le virus influenza. Il détecte la présence de l'ARN viral simple brin ou double brin ayant un triphosphate en 5' généré durant la réplication. RIG-1 contient un domaine DEAD, caractérisé par le motif conservé Asp(D)-Glu(E)-Ala(A)-Asp(D) (DEAD). Ce domaine est également retrouvé dans une famille des protéines participant à des processus cellulaires impliquant la liaison à l'ARN et l'altération de sa structure secondaire. Autre que le domaine DEAD, RIG-I contient deux domaines de recrutement des caspases (CARD pour *caspase recruitment domain*) (Mogensen, 2009). Après la reconnaissance de l'ARN viral, le domaine hélicase de RIG-I lie l'ATP, ce qui facilite des changements conformationnels permettant de recruter la protéine adaptatrice MAVS (pour *mitochondrial antiviral-signaling protein*). De plus, l'ubiquitine ligase TRIM25 (pour *tripartite motif-containing protein 25*) est recrutée au niveau du premier domaine CARD de RIG-1 permettant l'ajout d'une ubiquitine au niveau de la lysine 63 de son deuxième domaine CARD. Cette ubiquitination permet une interaction plus efficace entre RIG-1 et MAVS (Hansen et al., 2011; Nicholls, 2013). Cette voie de signalisation permet par une production de cytokines inflammatoires, via l'activation de NF- κ B, et des IFNs de type I, via l'activation d'IRF3.

En résumé, une fois que les composantes du virus influenza sont détectées par les PRRs, les cellules infectées vont générer une réponse antivirale (sécrétion des IFNs de type I et molécules antivirales dont l'expression est associée au IFNs de type I) et inflammatoire (sécrétion des cytokines inflammatoires) pour tenter de contenir l'infection, tandis que les chimiokines vont permettre le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection.

2.1.3. Recrutement séquentiel des cellules du système immunitaire au site d'infection.

Suite à l'infection par le virus influenza et sa réplication dans les poumons, les macrophages alvéolaires sont activés et produisent du TNF- α ainsi que de l'oxyde nitrique (NO) via à l'action de l'enzyme iNOS (pour *inducible nitric oxide synthase*) (Kim et al., 2008). De plus, ces cellules entrent en apoptose massive 2 jours après le début de l'infection en présence d'une quantité importante de virus, ce qui cause un relâchement de

protéases et de chimiokines (Hofmann et al., 1997). La famille des chimiokines est constituée de plus de 40 protéines. Elles sont produites par différents types cellulaires en réponse à une infection. Les chimiokines se lient à leurs récepteurs spécifiques sur la surface des leucocytes. Ceci induit à un changement dans la forme et le comportement cellulaire leur permettant de migrer à travers l'endothélium vasculaire vers le site d'infection ou d'inflammation. Les récepteurs de chimiokines sont exprimés différemment sur la surface de populations leucocytaires distinctes (Sokol et Luster, 2015). Les chimiokines libérées par les cellules épithéliales infectées et les macrophages incluent MCP-1 (pour *monocyte chemoattractant protein-1*; aussi nommé CCL2 pour *chemokine ligand 2*), MCP-3 (pour *monocyte-specific chemokine 3*; aussi nommé CCL7 pour *chemokine ligand 7*), MIP-1 α et β (pour *macrophage inflammatory Proteins-1 α* et β respectivement; aussi nommé CCL3 et CCL4 respectivement pour *chemokine ligand 3* et *4* respectivement) et RANTES (pour *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; aussi nommé CCL5 pour *chemokine ligand 5*), MIP-2 α (pour *macrophage inflammatory protein 2-alpha*; aussi nommé CXCL2 pour *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*), l'interleukine-8 (IL-8; aussi nommé CXCL8 pour *chemokine (C-X-C motif) ligand 8*) et IP-10 (pour *interferon gamma-induced protein 10*; aussi nommé CXCL10 pour *chemokine (C-X-C motif) ligand 10*) (Traboulsi et al., 2015; Cloutier et al., 2012; Marois et al., 2012). Cette libération de différentes chimiokines et la génération du milieu inflammatoire et antiviral par les cellules épithéliales et les macrophages, permettent le recrutement de cellules immunitaires innées au site d'infection telles que les cellules NK, les neutrophiles et les monocytes/macrophages. Ces cellules vont tenter de contrôler l'infection et d'éliminer le virus (**Figure 5**). Bien que l'implication des neutrophiles dans l'élimination virale ne soit pas bien définie et varie selon le type de virus et sa virulence, les cellules NK sont pour leur part des cellules effectrices importantes durant la réponse contre le virus influenza. Elles produisent de l'IFN γ et peuvent reconnaître et lyser les cellules infectées par leurs récepteurs de cytotoxicité NKp44/NKp46 (Gazit et al., 2006; Arnon et al., 2006).

Pour leur part, les macrophages recrutés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, du NO et des ROS. Ils jouent un rôle direct dans la limitation de la propagation virale par la phagocytose des cellules infectées (To et al., 2014; Lyon et Hinshaw, 1993). Ce milieu

inflammatoire et antiviral déclenche rapidement après le début de l'infection, l'activation et la maturation des cellules dendritiques DCs. Ces dernières jouent un rôle clé dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Dans un état non inflammatoire, elles se trouvent dans les voies respiratoires à l'état naïf (**Figure 5**) (McGill et al., 2009). Suite à l'infection, les DCs reconnaissent les motifs des virus par les PRRs, ce qui active ces cellules à produire des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines tels que l'IL-6, IL-12, TNF- α , IL-8, IP-10, RANTES, MIP-1 α et les IFNs de type I. La maturation des DCs permet d'augmenter l'expression à leurs surfaces des molécules de co-stimulation des lymphocytes T (CD40, CD80 et CD86 pour *cluster differentiation 40, 80 et 86* respectivement) ainsi que les complexes majeurs d'histocompatibilité de type II (CMH-II) impliqués dans la présentation des antigènes (Banchereau et Steinman, 1998). Après internalisation des virus dans les DCs, les peptides antigéniques sont ainsi présentés par les CMH-I ou II. Pour la présentation par CMH-I, les protéines du virus influenza sont digérées en peptides dans le cytoplasme. Ils sont ensuite transportés vers le réticulum endoplasmique (RE) pour s'associer aux CMH-I. Le complexe formé est alors transporté par l'appareil de golgi vers la membrane de la cellule dendritique pour présenter l'antigène aux cellules T CD8⁺ cytotoxiques (Howard et Seelig, 1993; Belich et Trowsdale, 1995). Pour la présentation par CMH-II, les protéines virales sont dégradées dans les endosomes/lysosomes et les peptides résultants s'associent aux CMH-II. Les complexes (CMH-II-antigène) sont ensuite transportés vers la membrane plasmique pour activer les cellules T CD4⁺ (Banchereau et Steinman, 1998). Donc, une fois que les DCs ont maturées et reconnaissent les antigènes, elles migrent vers les ganglions lymphatiques drainant les poumons d'une façon dépendante du récepteur CCR7 (pour *C-C chemokine receptor type 7*) exprimé à leurs surfaces. Cette migration, maximale 18 heures après le début de l'infection, est nécessaire pour activer les lymphocytes (Fernandez-Sesma et al., 2006; Banchereau et Steinman, 1998). Pour ce faire, les lymphocytes doivent recevoir trois signaux. Le premier provient du complexe CMH-antigène qui est détecté par les récepteurs TCR (pour *T cell receptor*) présents à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ naïfs. Ces récepteurs sont spécifiques à l'antigène. Le deuxième signal est assuré par des molécules de costimulation, où la protéine CD28 (pour *cluster differentiation 28*), présente à la surface du lymphocyte T, se lie à ses ligands CD80 et CD86, présents à la surface des

DCs. Cette liaison fournit donc aux lymphocytes T le second signal nécessaire à leur activation complète et leur migration vers les poumons ainsi qu'à la formation des lymphocytes T mémoires. Enfin, le troisième signal provient de cytokines présentes dans le site d'infection. Suite à ces 3 signaux, les lymphocytes T sont activés, prolifèrent et se différencient (Kohlmeier et Woodland, 2009). Les lymphocytes T CD4⁺ n'ont pas un effet direct important sur les cellules infectées mais ils sont toutefois importants dans le développement de la réponse immune. Les phénotypes de lymphocytes T CD4⁺ les plus importants sont les lymphocytes T auxiliaires ou Th (pour *T helper*). Différents sous-types de cellules Th sont distingués sur la base de leurs profils d'expression des cytokines. Dans le cas du virus influenza, les T CD4⁺ se différencient plutôt en cellules Th1 due à la sécrétion de l'interleukine-12 (IL-12) et l'IFN- γ . Les Th1 produisent l'interleukine-2 (IL-2), TNF- α et IFN- γ et promeuvent la réponse des lymphocytes B en stimulant leurs proliférations et leur production d'anticorps spécifiques contre les glycoprotéines HA et NA du virus influenza (**Figure 5**). (Belz et al., 2002; Tsitoura et al., 2000; Brown et al., 2004).

En ce qui concerne les lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques à l'antigène, suite à leur activation par les DCs dans les tissus lymphoïdes, ils prolifèrent et se différencient en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs (**Figure 5**). Ils acquièrent une activité cytotoxique et peuvent sécréter différentes cytokines. Dépendamment des cytokines présentes, elles se différencient en CTL (pour *cytotoxic T lymphocytes*) de type Tc1 ou Tc2 (pour *T cell cytotoxic 1 et 2 respectivement*). Les Tc1 sécrètent des cytokines de type 1 (IFN γ et TNF- α) tandis que les Tc2 sécrètent des cytokines de type 2 (IL4 et IL5). Seules les Tc1 sont efficaces pour éliminer le virus influenza étant donné leur migration et leur accumulation rapide dans les poumons environ 6 à 7 jours après le début de l'infection. En effet, à cause de la présence des complexes CMH-I/antigènes à la surface des cellules infectées, les Tc1 spécifiques aux antigènes s'activent afin de tuer directement ces cellules et ainsi éliminer le virus. Leur activité cytotoxique est premièrement caractérisée par la libération de perforine et les granzymes A et B dans la cellule cible (Cerwenka et al., 1999). La perforine perméabilise la membrane de la cellule infectée et par la suite, les granzymes y pénètrent pour induire l'apoptose via l'activation des caspases. L'apoptose peut également être induite

par la liaison des ligands FasL (pour Fas ligand), exprimés à la surface des cellules Tc1, aux récepteurs de mort cellulaire FAS qui sont exprimés sur les cellules infectées cibles. Cette interaction entre Fas et FasL permet le recrutement des protéines FADD (pour *Fas-Associated protein with Death Domain*) et des caspases initiatrices 8 et 10. Elles se fixent au côté cytoplasmique du récepteur Fas, formant ainsi le complexe DISC (pour *death-induced signaling complex*). Les caspases 8 et 10 activent ensuite les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui vont cliver leurs substrats. Le résultat final est l'apoptose de la cellule infectée. Outre ces deux mécanismes, les lymphocytes T $CD8^+$ Tc1 activés produisent des cytokines antivirales ($IFN-\gamma$ et $TNF\alpha$). $IFN-\gamma$ améliore la présentation de l'antigène en stimulant l'expression du CMH-I à la surface des cellules et contribuent donc à l'élimination virale (Kohlmeier et Woodland, 2009; Topham et al., 1997; McMaster et al., 2015). Selon le modèle d'infection, l'élimination complète du virus autour du jour 10 post-infection coïncide environ avec le moment où le nombre de lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs infiltrant les poumons est maximal. Une fois que l'infection est terminée, la plupart des lymphocytes T cytotoxiques meurent par apoptose mais une petite proportion persiste et devient des lymphocytes CTLs mémoires (Thomas et al., 2006). Au cours d'une infection secondaire par la même souche du virus influenza, les CTLs mémoires prolifèrent et permettent une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace (Hikono et al., 2006).

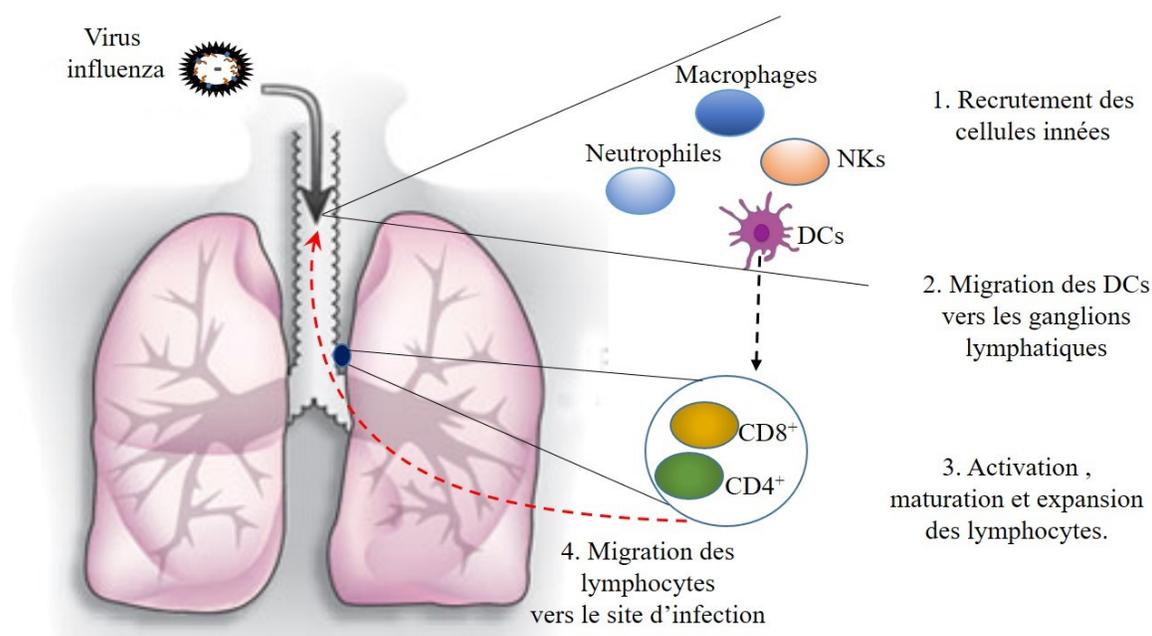


Figure 5: Cinétique de la réponse immunitaire lors d'une infection par le virus influenza. Lors de l'infection par le virus influenza, les cellules infectées ainsi que les macrophages et les DCs permettent la génération de cytokines antivirales et inflammatoires ainsi que de chimiokines induisant l'infiltration massive de cellules NKs, neutrophiles et monocytes pour tenter de contenir l'infection. Pour déclencher la réponse immunitaire adaptative contre le virus, les DCs migrent aux ganglions lymphatiques drainant les poumons afin de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ par les CMH-I et CMH-II respectivement (jour 1 à 3 p.i.). Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs activés, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques au virus (jour 4 à 6 p.i.) et migrent vers les poumons afin d'éliminer le virus par leurs fonctions cytotoxiques (jour 7 à 10 p.i.). Les lymphocytes T CD4⁺ helper participent à la génération et au maintien des lymphocytes T CD8⁺ mémoires en plus d'activer les lymphocytes B pour la production des anticorps spécifiques contre le virus. Adaptée de (Head et Lawrence, 2009).

3. Immunopathologie de l'influenza

L'immunopathologie pulmonaire est une importante cause de la morbidité et de la mortalité associées à une infection sévère par le virus influenza. Lors de l'infection, des mécanismes cytotoxiques sont induits afin de détruire les cellules infectées et d'éliminer le virus. Bien que de tels mécanismes soient nécessaires pour la résolution de l'infection, ils ont aussi le potentiel de provoquer une immunopathologie pulmonaire délétère. En effet, les données histologiques et pathologiques obtenues suggèrent qu'une infection sévère par le virus influenza induit une réponse immunitaire beaucoup plus intense que celle nécessaire pour éliminer le virus. Une surproduction de cytokines (tempête de cytokines) et une infiltration excessive des cellules immunitaires dans les tissus pulmonaires ont été également rapportées, lors de ces infections, pour causer d'importants dommages au niveau des poumons (Damjanovic et al., 2012). Ceux-ci incluent une destruction de l'épithélium au niveau de la trachée et des bronches, des lésions alvéolaires, une thrombose vasculaire et un œdème sous-muqueux. Ces complications peuvent entraîner, dans les cas avancés, un dysfonctionnement respiratoire (SDRA). De plus, les complications de la grippe sont très souvent associées à des infections bactériennes secondaires (Damjanovic et al., 2012; Fukuyama et Kawaoka, 2011; Imai, 2015).

3.1. Rôles de cytokines dans l'immunopathologie de l'influenza

3.1.1 TNF- α

Il est impliqué dans un grand nombre de fonctions, tels que l'activation de la réponse immunitaire innée et adaptative, l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Wajant et al., 2003). Les récepteurs du TNF- α sont le TNF-R1 (pour *TNF receptor 1*), qui est exprimé par la plupart des types cellulaires, et le TNF-R2 (*TNF receptor 2*) qui est exprimé surtout à la surface des cellules du système immunitaire. La liaison de TNF- α à ses récepteurs active plusieurs voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation de la voie NF- κ B, ce qui favorise l'expression d'un grand nombre de gènes inflammatoires (Chen et Goeddel, 2002). La fixation du TNF- α sur son récepteur peut également induire l'apoptose par différents mécanismes. La voie intrinsèque, la plus importante, implique le recrutement de la pro-caspase 8 au domaine FADD associé au récepteur TNF-R1. Ceci conduit à l'activation de la pro-caspase 8 par son auto-clivage, à l'activation de la caspase 3 et enfin, induit l'apoptose. La caspase 8 permet également la sortie du cytochrome c à partir des mitochondries, ce qui contribue à l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque (Chen et Goeddel, 2002). Le TNF- α peut également stimuler la production des ROS qui sont également des inducteurs de l'apoptose et de la nécrose. Par exemple, dans les neutrophiles et les macrophages, TNF- α stimule l'activité de Nox2, une variante de la NADPH oxydase (pour *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase*), ce qui entraîne la génération de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Morgan et al., 2008). Finalement, le TNF- α conduit à l'activation de la kinase JNK (pour *c-jun NH2-terminale kinase*) qui joue également plusieurs rôles tels que dans l'apoptose, la survie et la croissance cellulaire (Morgan et Liu, 2010; Moe et al., 2006). Compte tenu de ces multiples fonctions du TNF- α dans l'inflammation et des dommages tissulaires par apoptose, il a été démontré que l'utilisation de molécules bloquantes du TNF- α est capable d'atténuer l'inflammation induite suite à une infection par le virus influenza. Les souris infectées et traitées avec ces molécules ont montré une inflammation et une morbidité réduites par rapport aux souris contrôles non traitées (Shi et al., 2013).

3.1.2 IL-6

IL-6 possède à la fois des effets pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle est impliquée dans la régulation du métabolisme et dans l'homéostasie osseuse (Scheller et al., 2011). La production d'IL-6 augmente rapidement après l'infection. Dans ce contexte, l'IL-6 est impliquée dans la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes, la stimulation de la réponse adaptative en induisant la différenciation des cellules B et des cellules T CD4⁺ activées, la promotion de la clairance virale par les neutrophiles et la limitation de l'inflammation (Ramos et Fernandez-Sesma, 2015). L'activation de la signalisation par IL-6 peut se faire par la voie classique ou par la voie de transactivation. Pour la première voie, IL-6 se fixe sur son récepteur IL-6R (pour *interleukin-6 receptor*) qui se trouve exprimé à la surface des cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages et certains types de lymphocytes T. Cette voie de signalisation est plus associée avec des effets anti-inflammatoires. Pour ce qui est de la voie de transactivation, IL-6R est soluble et il est associé avec des effets pro-inflammatoires. Les effets opposés de l'IL-6 font de cette cytokine une cible intéressante pour le développement de molécules inhibitrices d'IL-6 pour des raisons thérapeutiques (Scheller et al., 2014). Cependant, durant l'infection par le virus influenza, IL-6 semble avoir un rôle protecteur, au moins dans les modèles murins, en favorisant la clairance virale médiée par les neutrophiles et en protégeant ces cellules de la mort induite par le virus (Dienz et al., 2012). Ce qui suggère que l'inhibition d'IL-6 ne serait pas un traitement adéquat pour réduire l'inflammation au cours de l'infection.

3.1.3 IL-1 α et β

Les membres de la famille d'IL-1 se fixent au récepteur IL1RI (pour *interleukine 1 receptor 1*) conduisant ainsi à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, JNK et p38/MAPK (pour p38 *mitogen activated protein kinase*). Ces facteurs conduisent à l'induction de l'expression de gènes inflammatoires tels que l'IL-1 α et β , TNF- α , IL-6, la cyclooxygénase-2 (COX-2), iNOS et la prostaglandine E-2 (PGE2). Cette expression conduit donc à une boucle d'amplification inflammatoire (Ramos et Fernandez-Sesma, 2015). De plus, la signalisation d'IL-1 β permet d'induire l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (pour *intercellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (pour *vascular-cell adhesion*

molecule-1) à la surface des cellules endothéliales. Ceci favorise l'infiltration de cellules inflammatoires dans l'espace extravasculaire (Wang et al., 1995). En somme, cette famille est composée de cytokines qui renforcent l'inflammation et le recrutement des cellules immunitaires, participant ainsi aux dommages pulmonaires.

3.1.4 Interférons

Tel que mentionné précédemment, la fonction la plus importante des IFNs est d'induire l'activation d'une réponse antivirale. L'interféron- γ , principalement produit par les cellules T et les NKs, joue un rôle important dans la stimulation de la présentation de l'antigène par les DCs et les macrophages, dans l'activation de la réponse cellulaire des Th1 et dans la régulation des fonctions des lymphocytes B (Levy et al., 2011; Schroder et al., 2004). Cependant, l'IFN- γ induit également l'expression du récepteur du TNF- α et l'activation des macrophages et des neutrophiles à libérer des ROS et du NO. Ce mécanisme est donc dommageable pour les tissus infectés et participe dans la pathogénicité de l'infection par le virus influenza (Ramos et Fernandez-Sesma, 2015).

3.2 Rôles des cellules immunitaires dans l'immunopathologie de l'influenza

Les macrophages s'accumulent dans les poumons lors de l'infection, libèrent des cytokines pro-inflammatoires et aident à réduire la charge virale. Cependant, les macrophages peuvent aussi devenir des cellules destructrices et participer à l'immunopathologie des poumons. En effet, les macrophages sont une source importante de TNF- α , des ROS et de l'oxyde nitrique (NO) qui sont responsables de l'immunopathologie (**Figure 6**) (McGill et al., 2009; Damjanovic et al., 2012; Panaro et al., 2003; Slauch, 2011). Un autre mécanisme par lequel les macrophages peuvent contribuer à l'immunopathologie des poumons lors de l'infection, est l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales via le ligand TRAIL (pour *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*). Ce dernier se fixe sur le récepteur DR5 (pour *death receptor 5*) exprimé à la surface des cellules épithéliales, conduit à leur mort et entraîne une augmentation des lésions pulmonaires (Fukuyama et Kawaoka, 2011). Le blocage de CCR2 (pour *C-C chemokine receptor type 2*), le récepteur de la chimiokine CCL2, réduit le recrutement des cellules inflammatoires dérivés des monocytes (macrophages et DCs) suite à une infection par le virus influenza. D'une

manière intéressante, ceci est accompagné par une réduction des lésions pulmonaires, de la morbidité et de la mortalité des souris infectées mais sans effet au niveau de la clairance virale (Lin et al., 2008; Lin et al., 2011).

Comme les monocytes, les neutrophiles sont rapidement recrutés au niveau des voies respiratoires suite à l'infection et jouent un rôle dans le contrôle de la réplication virale (Tate et al., 2008). En effet, la délétion des neutrophiles chez des souris infectées par le virus influenza cause une augmentation de la réplication du virus et de la perte du poids (Tate et al., 2009). De plus, les neutrophiles contribuent d'une façon importante à l'immunopathologie de l'influenza en produisant la myéloperoxydase et des fibres extracellulaires NET (pour *neutrophil extracellular traps*) causant ainsi des lésions tissulaires, alvéolaires et endothéliales (Narasaraju et al., 2011).

Les cellules NK offrent une des premières lignes de défense contre le virus influenza. Elles sont nécessaires pour la résolution de l'infection par la libération d'IFN- γ et la lyse des cellules infectées. Cependant, le recrutement excessif des cellules NK dans les poumons lors d'une infection sévère augmente la pathologie de l'infection. En effet, le blocage de l'antigène NK1.1, un récepteur qui permet l'activité cytotoxique des cellules NKs, réduit la mortalité des souris lors d'une infection sévère par le virus influenza (Arnon et al., 2006).

Les cellules dendritiques, importantes pour la défense contre le virus influenza en activant la réponse adaptative, peuvent également contribuer à l'immunopathologie de la grippe. Par exemple, un type de cellules dendritiques nommées tipDCs (pour *TNF- α /iNOS producing DCs*) est nécessaire pour une activation complète des lymphocytes T CD4⁺ et joue un rôle dans la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus influenza. Les tipDCs, tel que leur nom l'indique, produisent une quantité importante de TNF- α et de NO ce qui participent à l'immunopathologie reliée à l'infection. La réduction partielle du recrutement des tipDCs par des agonistes diminuent la mortalité et la morbidité chez les souris infectées par le virus influenza (Aldridge et al., 2009).

Les lymphocytes T CD8⁺ ont une activité cytotoxique contre le virus et les cellules infectées qui est connue depuis longtemps pour son importance dans l'élimination du virus.

Cependant, comme pour les NKs, une réponse de lymphocytes T CD8⁺ excessive peut conduire à une activité cytotoxique exubérante accompagnée par la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IFN- γ), augmentant ainsi l'immunopathologie des poumons (Flynn et al., 1998). Par exemple, une étude a démontré que la déficience en Qa-1b conduit à augmenter considérablement l'immunopathologie pulmonaire lors d'une infection virale, et ceci d'une façon associée à une activité cytotoxique importante des lymphocytes T CD8⁺. Qa-1b est un ligand pour le récepteur inhibiteur CD159a (pour *cluster differentiation* 159a) qui est présent sur les lymphocytes T CD8⁺, permettant d'inhiber l'activité de ces cellules (Zhou et al., 2008).

En résumé, l'immunopathologie pulmonaire observée au cours de l'infection primaire par le virus influenza ou lors d'une surinfection bactérienne est clairement l'une des principales causes de morbidité et de mortalité liées à la grippe. Cette immunopathologie est associée à une surproduction, par les cellules épithéliales et immunitaires, de cytokines et chimiokines inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-1 α et β , l'IL-6, l'IFN γ , le CCL2 ainsi que les ROS et de NO, surtout produites par les macrophages, les neutrophiles et les tipDCs (**Figure 6**).

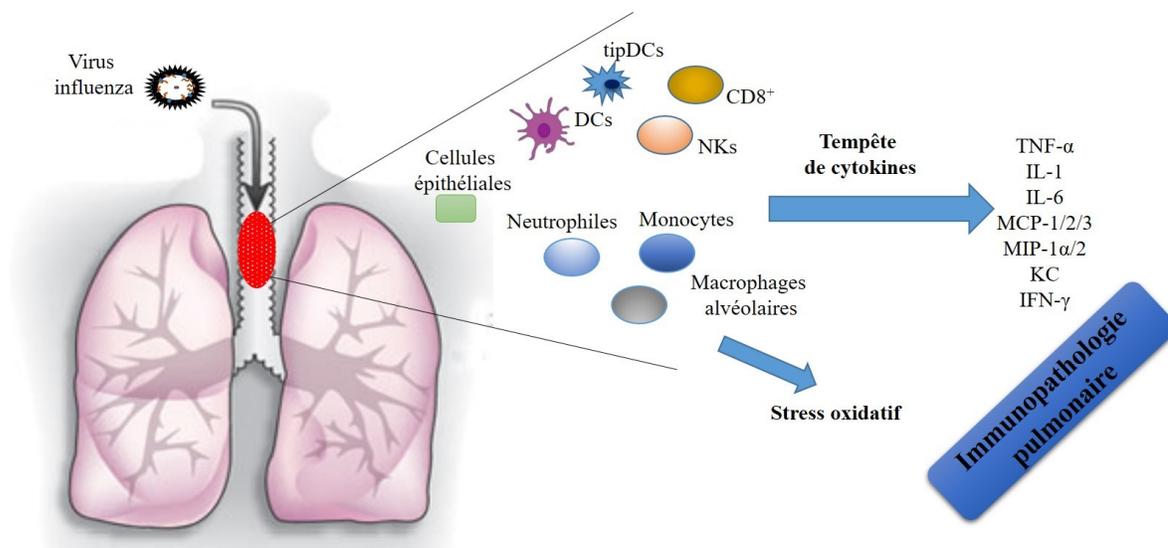
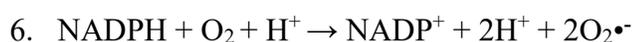


Figure 6: L'immunopathologie de l'influenza est causée par la réponse inflammatoire excessive par l'hôte. La «tempête de cytokines», les cellules immunitaires (les macrophages, les neutrophiles, les DCs, les tipDCs, et les cellules T CD4⁺ et CD8⁺) et le stress oxydatif (ROS) contribuent à l'immunopathologie des poumons suite à une infection sévère par le virus influenza. Adaptée de (Damjanovic et al., 2012).

3.3 Rôle du stress oxydatif dans l'immunopathologie de l'influenza

Les ROS incluent une grande variété de radicaux libres de l'oxygène soit par exemple, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et les radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}). Elles comprennent également des dérivés d'oxygène qui ne contiennent pas d'électrons impairs, tels que l'acide hypochloreux ($HOCl$), le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) et l'ozone (O_3). Ces molécules sont des molécules instables, susceptibles d'initier l'oxydation de diverses composantes cellulaires telles que l'ADN, les lipides et les protéines. Il est possible de suggérer que notre système biologique est continuellement exposé à des oxydants qui sont générés de manière endogène, par exemple par la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries, ou lors de l'activation des cellules phagocytaires par des virus ou parasites (Ray et al., 2012; Torres et al., 2006). De plus, il existe des sources exogènes, tels que les polluants et la fumée de cigarette (Ozguner et al., 2005).

La surproduction de ROS a été observée pour la première fois dans les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les neutrophiles. Ils sont produits par l'enzyme NADPH oxydase (Nox). Cependant, la génération de ROS physiologiques peut se produire aussi en tant que sous-produits biologiques surtout par les mitochondries (Bedard et Krause, 2007). Nox est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydoréductases. Il catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O_2) selon la réaction suivante:



L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le proton (H^+) réagiront pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui pourra réagir avec un autre proton et un ion de chlorure (Cl^-) pour donner de l'acide hypochloreux ($HOCl$).

Chez l'homme, il existe 7 variantes de l'enzyme Nox, soit Nox1, 2, 3, 4, 5 et Duox 1 et 2. Toutes ces variantes sont des protéines transmembranaires permettent le transport des électrons à travers les membranes biologiques pour produire du superoxyde à partir de l'oxygène. Nox2 a été découverte pour la première fois dans les neutrophiles et les macrophages. Cette enzyme est souvent désignée comme étant le NADPH oxydase phagocytaire.

Les phagocytes produisent des quantités élevées d' $O_2^{\bullet-}$ afin de neutraliser et tuer les pathogènes en attaquant et oxydant diverses cibles telles que les protéines, les lipides, l'ADN et l'ARN (Ray et al., 2012). Par exemple, les ions superoxyde réagissent préférentiellement avec les ions sulfure qui se trouvent dans de nombreuses protéines. Le peroxyde d'hydrogène réagit également avec les résidus cystéines présents au sein des protéines et des enzymes telles que les kinases et les phosphatases (Slauch, 2011).

Dans le contexte de l'infection sévère par le virus influenza, Nox2 est fortement exprimé dans les cellules inflammatoires résidentes (macrophages alvéolaires) et recrutées vers les poumons (monocytes et neutrophiles) ainsi que dans les cellules épithéliales infectées par le virus. Cette forte expression de Nox2 génère une forte production de superoxyde qui peut réagir avec des composés comme l'oxyde nitrique, produit par les macrophages, pour former du peroxyde nitrite. Ce dernier est un médiateur inflammatoire et un oxydant important impliqué dans les lésions pulmonaires. Un grand nombre d'études démontrent que, durant une infection par le virus influenza, l'inhibition pharmacologique de l'activité de Nox2, ou la neutralisation des ROS par des antioxydants est bénéfique et protège l'hôte en réduisant l'inflammation et l'apoptose cellulaire induites par les ROS (Vlahos et al., 2011; To et al., 2014; Zhang et al., 2010; Uchida et Toyoda, 2011). Cependant, des travaux récents portant sur d'autres isoformes de NADPH oxydase, soit Nox1 et DUOX, indiquent qu'ils semblent jouer un rôle protecteur pour l'hôte lors d'une infection par le virus influenza (Selemidis et al., 2013; Strengert et al., 2014). C'est dans ce sens que le stress oxydatif mitochondrial (mROS) a récemment été démontré à jouer un rôle dans les mécanismes antiviraux par l'intermédiaire du récepteur RIG-1 et de son adaptateur mitochondrial MAVS. En effet, il a été démontré que les cellules épithéliales respiratoires sont capables de produire un stress oxydatif mitochondrial en réponse à l'infection par le virus influenza. Ce mROS produit potentialise la signalisation par RIG-1, permettant ainsi une activation plus importante des facteurs NF- κ B, IRF3 et IRF7. Cette activation stimule la production d'interférons de type I et de type III nécessaires pour limiter la réplication virale (West et al., 2011). Une autre caractéristique des ROS durant l'infection virale est qu'ils permettent l'activation de la réponse immunitaire. En effet, une étude a démontré que le traitement par des antioxydants

diminue les ROS et inhibe la stimulation et la prolifération des lymphocytes T en présence des cellules présentatrices d'antigènes (Laniewski et Grayson, 2004).

En résumé, selon la nature et l'intensité du stress oxydatif produit, un double rôle est observé dans un contexte d'infection par le virus influenza. Il induit la réponse antivirale via les interférons antiviraux et stimule la réponse immunitaire mais, il peut également participer à l'immunopathologie et à la destruction pulmonaire observées lors des infections sévères.

En conclusion, il existe deux phénomènes majeurs qui contribuent aux lésions pulmonaires aiguës observées lors d'une infection sévère par le virus influenza (**Figure 6**). Le premier est «la tempête de cytokines» qui se caractérise par la production des plusieurs cytokines pro-inflammatoires et apoptotiques (par exemple: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IFN- γ), ainsi que des chimiokines (par exemple : IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 et CXCL10). Il en résulte alors un recrutement massif des cellules immunitaires (par exemple: macrophages, neutrophiles, DCs, lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺) vers les voies respiratoires. Le deuxième phénomène est «l'explosion respiratoire» (*respiratory burst*) qui se traduit par une libération importante, par les cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles) et les cellules épithéliales, des (ROS). Ces derniers stimulent ainsi l'inflammation et participent aux lésions pulmonaires. Ces deux phénomènes inflammatoires excessifs sont donc considérés comme les principaux responsables des complications sévères (par exemple : bronchite, bronchiolite ou SDRA) qui sont observées chez les patients infectés par des virus mortels, y compris les souches pandémiques H1N1 de 1918 et 2009 et le virus de la grippe aviaire H5N1.

Tenant compte de ce fait, le défi actuel dans le traitement de la grippe est de contrôler les réponses inflammatoires et oxydatives, tout en inhibant la réplication virale, afin de permettre à l'organisme de se défendre contre les infections sévères par le virus influenza. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressées à deux voies importantes qui sont connues pour diminuer l'inflammation et le stress oxydatif, soit la voie du récepteur

nucléaire PPAR γ (pour *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) et celle du facteur nucléaire Nrf2 (ou NFE2L2; pour *nuclear factor erythroid derived like 2*).

4. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes-gamma (PPAR γ)

Les récepteurs PPARs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription activés par des ligands spécifiques tels les hormones, la vitamine D et les lipides. Les récepteurs nucléaires ils peuvent être regroupés en 3 familles ou classes selon leurs localisations et leurs modes de fonction. Les PPARs font partie de la deuxième classe dont ils sont localisés dans le noyau même en absence du ligand. Après liaison de leurs ligands, ils forment un hétérodimère avec le récepteur du rétinoïde X (ou RXR pour *retinoid X receptor*) et se lient à l'ADN au niveau de leur élément de réponse PPRE. Ce dernier est défini comme étant composé de deux répétitions de la séquence AGGTCA, plus ou moins conservées, et séparées par un nucléotide (motif DR1 pour *direct repeat 1*). Cependant, les PPARs tout comme les autres récepteurs nucléaires de classe II, ils peuvent se lier à l'ADN en l'absence de leurs ligands. Dans ce cas, ils interagissent avec les corépresseurs qui inhibent la transcription (Ahmadian et al., 2013; Tolon et al., 1998).

Il existe trois types des récepteurs PPARs, soit PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . PPAR α est exprimé dans les tissus ayant un potentiel catabolique important pour les acides gras et principalement dans le foie, le cœur et le tissu adipeux. L'expression de PPAR β/δ est plutôt ubiquitaire. Pour PPAR γ , quatre transcrits différents du gène sont retrouvés chez l'homme dû à l'utilisation de promoteurs différents par l'ARN polymérase et à l'épissage alternatif. Cependant, PPAR γ -1 et 2 sont les plus exprimés. PPAR γ -1 est largement exprimé dans plusieurs cellules (ex: cellules épithéliales et cellules immunitaires), alors que PPAR γ -2 est principalement limité aux adipocytes (Clark, 2002; Gervois et Fruchart, 2003). D'un point de vue structural, les PPARs, comme tous les récepteurs nucléaires, sont constitués de trois domaines, soit le domaine de fixation à l'ADN (ou DBD pour *DNA binding domain*), le domaine de fixation du ligand (ou LBD pour *ligand binding domain*) et le domaine A/B. Ce dernier contient la région d'activation AF-1 (pour *activation function-1*) dont l'action est indépendante de la présence de ligand (**Figure 7**) (Beckett, 2001).

PPAR γ lie naturellement les lipides, mais il existe plusieurs agonistes synthétiques tels que la famille des thiazolidinediones (TZD) comprenant la Rosiglitazone et la Pioglitazone. L'activation de PPAR γ par ses ligands stimule l'expression d'un grand nombre de gènes au niveau des tissus adipeux qui sont impliqués dans l'adipogenèse (différentiation adipocytaire), la thermogénèse (la production de chaleur de l'organisme par les tissus adipeux bruns), le métabolisme lipidique, le métabolisme oxydatif et la biogenèse mitochondriale (Ahmadian et al., 2013). De plus, les études réalisées chez les souris montrent que PPAR γ favorise le métabolisme du glucose en augmentant l'expression des transporteurs du glucose Glut4 (pour *glucose transporter type 4*) au niveau des muscles et celle des substrats des récepteurs de l'insuline IRS 1 et 2 (pour *insulin receptor substrate 1* et *2* respectivement) au niveau du foie. (Niu et al., 2015; Wang et al., 2008). C'est pourquoi, PPAR γ est depuis longtemps considéré comme étant une cible importante pour le traitement de certains diabètes de type 2. Cependant, l'utilisation de TZD augmente le risque d'insuffisance cardiaque et d'infarctus du myocarde. C'est pour cela que la Rosiglitazone a été retirée du marché comme un traitement antidiabétique (Ahmadian et al., 2013).

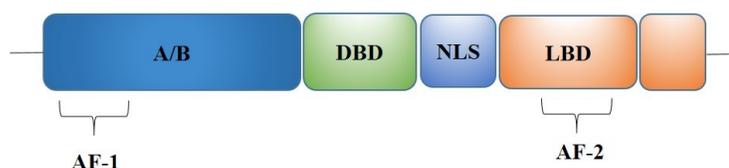


Figure 7: Illustration des différents domaines du récepteur nucléaire PPAR. (1) La région N-terminale A/B contient la fonction d'activation indépendante du ligand AF-1. (2) Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est constitué de deux motifs en doigt de zinc. (3) La région C-terminale comprenant le domaine de liaison du ligand (LBD), contient la fonction d'activation dépendante du ligand AF-2. Adaptée de (Beckett, 2001).

À part le diabète, PPAR γ intervient dans d'autres processus pathologiques, tels que l'athérosclérose, le cancer et l'inflammation. Lors de ces situations inflammatoires, PPAR γ agit comme un répresseur de la transcription de nombreux gènes inflammatoires tels que l'IL-6, l'iNOS et le COX2 (Clark, 2002). En somme, PPAR γ est considéré comme un récepteur nucléaire ayant une activité anti-inflammatoire via la transrépression de divers gènes cibles du facteur NF- κ B. Pour étudier ce mécanisme, un modèle a été proposé dans

les macrophages murins RAW264.7 en réponse à la stimulation par le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Dans ce modèle, la première étape implique une sumoylation au niveau de la lysine 365 (K365) du domaine LBD de PPAR γ . Suite à la sumoylation, PPAR γ est recruté au niveau des promoteurs des gènes inflammatoires cibles d'une façon indépendante de l'élément de réponse PPRE. À ce point, PPAR γ interagit avec le complexe des corépresseurs NCoR1 et HDAC3 (pour *nuclear receptor co-repressor 1* et *histone deacetylase 3* respectivement). Ces interactions empêchent le recrutement du complexe du protéasome et la dégradation des corépresseurs. Ainsi, les coactivateurs ne sont pas recrutés et le gène est maintenu dans un état réprimé (**Figure 8**) (Pascual et al., 2005).

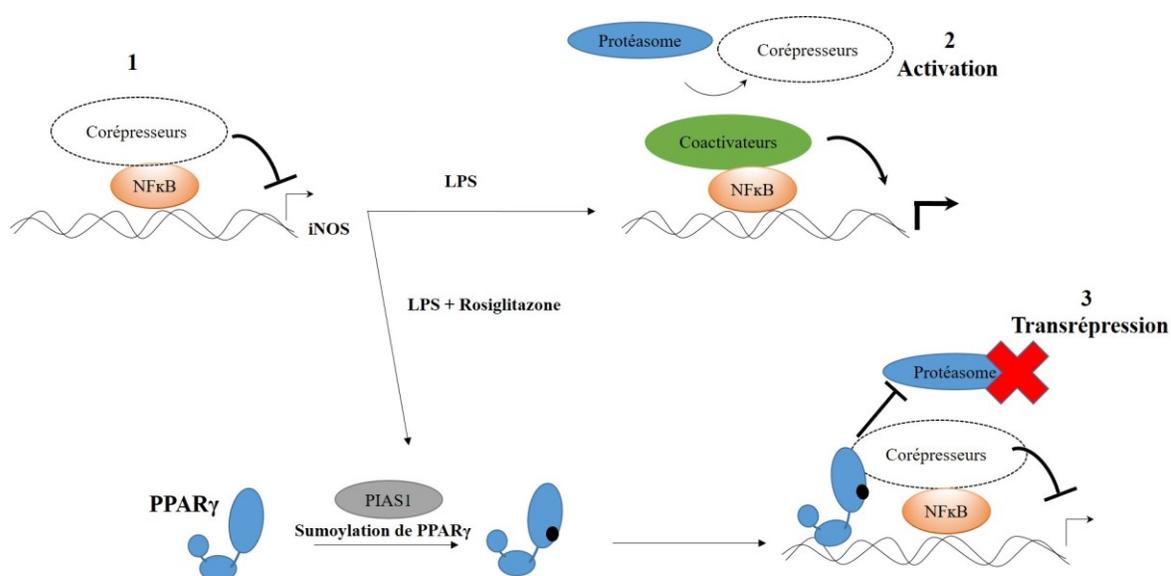


Figure 8: Modèle du mécanisme de la transrépression, dépendante de PPAR γ , du gène iNOS suite à une stimulation par le LPS. 1) Le gène iNOS est réprimé dans les conditions non stimulées à cause de la présence du complexe de corépresseurs NCoR/HDAC3/TBL. 2) La stimulation par le LPS libère le complexe de corépresseurs, permettant le recrutement de NF- κ B (p50/p65) et les coactivateurs, ce qui déclenche la transcription. 3) En présence des ligands de PPAR γ (par exemple, la Rosiglitazone; Ro), son domaine LBD subit une sumoylation, permettant son recrutement vers le promoteur du gène iNOS. Ceci empêche le recrutement du protéasome en réponse au LPS ce qui a pour effet de maintenir le complexe de corépresseurs sur le promoteur du gène qui est ainsi gardé à l'état réprimé. Adaptée de (Pascual et al., 2005).

Le rôle de PPAR γ dans les maladies inflammatoires a été donc largement investigué et plusieurs études ont démontré son importance dans l'inhibition de l'inflammation. En effet, les agonistes de PPAR γ inhibent la maturation des cellules dendritiques ainsi que la

prolifération et l'activation des lymphocytes T. De plus, ils peuvent limiter le recrutement de cellules immunitaires en diminuant l'expression de cytokines et de chimiokines dans les cellules épithéliales et les macrophages, ainsi que l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Yessoufou et Wahli, 2010). Les modèles animaux inflammatoires ont permis d'explorer les effets des agonistes de PPAR γ . Par exemple, il a été montré que lors de la fibrose rénale la thiazolidinedione réduit la cicatrisation rénale ainsi que l'inflammation (Kawai et al., 2009). Dans un modèle d'inflammation cérébrale post-opératoire la rosiglitazone atténue l'expression des marqueurs de cytokines inflammatoires, IL1- β et TNF- α (Hyong et al., 2008). Un autre exemple, il a été montré que l'agoniste de PPAR γ , la 15d-PGJ₂ (pour *15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J₂*), réduit l'expression des cytokines inflammatoires IL-6 et TGF- β (pour *Transforming-Growth-Factor-1 β*) dans un modèle murin de la pancréatite (Yu et al., 2008).

Vu son rôle important dans la résolution de l'inflammation, quelques études, incluant une étude réalisée au sein de notre laboratoire, ont déterminé l'effet de l'activation de PPAR γ lors des infections sévères par le virus influenza. D'une manière intéressante, ces études ont démontré que les agonistes de PPAR γ tels que la Rosiglitazone, la Pioglitazone ou la 15d-PGJ₂ diminuent la morbidité et la mortalité des souris lors d'une infection létale par un virus H1N1. De plus, elles ont également démontré que ces agonistes exercent leurs effets protecteurs en réduisant l'expression de cytokines et chimiokines, ce qui diminue le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection (Cloutier et al., 2012; Moseley et al., 2010; Aldridge et al., 2009). Dans la première étude, les auteurs ont démontré que l'administration de la Pioglitazone réduit l'expression des chimiokines CCL2 (MCP-1) et CCL7 (MCP-3) et par conséquent, diminue le recrutement des cellules dendritiques tipDCs connues pour leur production de TNF- α et de iNOS. Ce traitement protégeait les souris infectées contre l'effet potentiellement mortel du recrutement excessif des tipDCs. Cependant, les résultats de cette étude suggèrent qu'il est seulement nécessaire de réduire le recrutement des tipDCs vers les poumons sans les éliminer complètement pour protéger les souris. Ces cellules présenteraient des antigènes viraux aux lymphocytes, ce qui est requis pour la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au virus influenza dans les poumons et la résolution virale (Aldridge et al., 2009). Dans une deuxième étude

semblable, il a été démontré que l'agoniste de PPAR γ , la Rosiglitazone, protège complètement les souris infectées avec la souche pandémique A/H1N1 hautement pathogène (pmH1N1-2009) (Moseley et al., 2010). Cependant, ces deux études n'ont toutefois pas démontré l'implication directe de PPAR γ dans l'effet protecteur de ces deux agonistes. De plus, notre laboratoire a récemment démontré que des traitements avec la prostaglandine 15d-PGJ₂, un activateur de PPAR γ et un inhibiteur de NF- κ B, diminue la mortalité et la morbidité des souris suite à une infection létale par le virus de l'influenza PR8/H1N1. Ces effets bénéfiques s'expliquent d'une part, par la diminution de la réplication virale dans les poumons des souris et d'autre part, par la réduction de la réponse inflammatoire (Cloutier et al., 2012). En effet, l'expression des cytokines et chimiokines (IL-6, TNF- α , CCL2, CCL3 et CXCL10), est réduite de moitié chez les souris traitées avec la 15d-PGJ₂. De plus, l'effet protecteur de cet agoniste est dépendant de PPAR γ étant donné que le prétraitement des souris avec un antagoniste de PPAR γ (GW9662) avant l'administration quotidienne de la 15d-PGJ₂, élimine tous les bienfaits de celle-ci. L'utilisation de la 15d-PGJ₂ protège uniquement les souris lorsqu'elles sont traitées après le début de l'infection suggérant ainsi que cet agoniste empêche la génération d'une réponse inflammatoire précoce nécessaire à la résolution virale. Lors d'une infection, la 15d-PGJ₂ semble donc être une meilleure option thérapeutique que les autres agonistes PPAR γ testés jusqu'à présent.

En somme, toutes ces études viennent appuyer le fait que l'activation de PPAR γ par des agonistes en fait est une cible prometteuse dans le but de traiter la grippe sévère en diminuant la sévérité de la maladie.

5. Le facteur nucléaire Nrf2

Mis à part ses effets sur PPAR γ , le ligand 15d-PGJ₂ est également connu pour activer le facteur de transcription antioxydant Nrf2 (Kansanen et al., 2009). Ce facteur est impliqué dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif tel que celui produit durant les infections sévères par le virus influenza. Nrf2 est un facteur de transcription, ayant un domaine de type glissière à leucine (bZip pour *basic leucine zipper*), qui permet l'activation de l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines et molécules antioxydantes.

Pour ce faire, Nrf2 se lie à son élément de réponse ARE (pour *antioxidant response element*) retrouvé au sein des promoteurs de ses gènes cibles. La séquence protéique de Nrf2 est caractérisée par la présence de six domaines Neh (pour *Nrf2-ECH homology*) nommés de Neh1 à Neh6. La glissière à leucine qui se fixe sur l'ADN, se retrouve dans le domaine Neh1 en C-terminal. Le domaine Neh2, en N-terminale, contient des motifs ETGE et DLG, qui sont nécessaires pour l'interaction avec une protéine inhibitrice nommée Keap1 (pour *kelch like ECH-associated protein 1*) (**Figure 9A**). Keap1 est une protéine riche en cystéines (27 résidus cystéines dans la séquence humaine). Elle contient dans sa séquence en C-terminale un motif Kelch qui interagit avec Nrf2. On retrouve en N-terminal un domaine BTB (pour *bric-à-brac*) qui peut interagir avec une ubiquitine ligase, Culline-3 (Cul3). La protéine Keap1 contient aussi un troisième domaine important, nommé IVR (pour *intervening region*). Ce domaine contient des cystéines impliquées dans la détection du stress oxydatif (**Figure 9B**) (Kansanen et al., 2013).

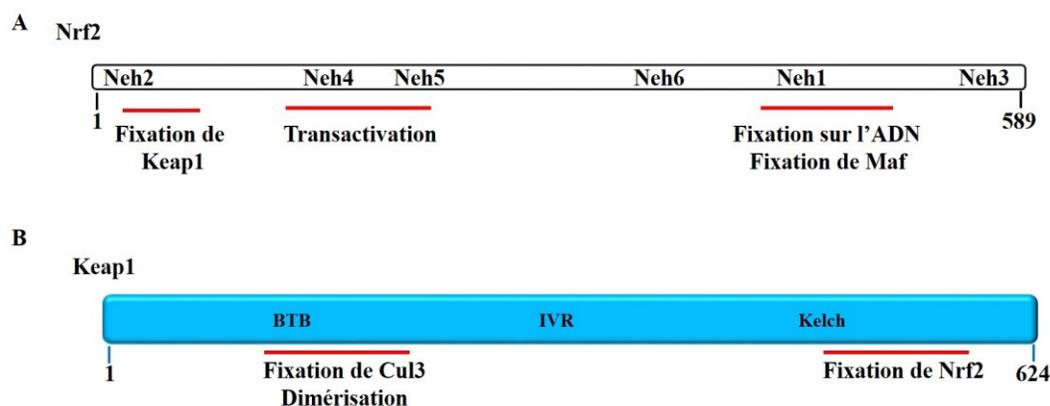


Figure 9: Structures de Nrf2 et Keap1. (A) Nrf2, composé de 589 acides aminés, possède six domaines hautement conservés, soit Neh1-6. Neh1 contient une région basique et un motif bZip servant à reconnaître l'ADN et à se dimériser avec Maf. Neh2 contient des motifs ETGE et DLG, qui sont nécessaires pour l'interaction avec Keap1. (B) Keap1 est composé de 624 acides aminés. Le domaine BTB et la partie N-terminale du domaine IVR, médient l'homodimérisation de Keap1 et son interaction avec Cul3. Le domaine Kelch et la région C-terminale de Keap1 s'interagissent avec le domaine Neh2 de Nrf2. Adaptée de (Kansanen et al., 2013).

Dans les conditions normales, soit en absence du stress oxydatif, Nrf2 se trouve dans le cytoplasme en complexe avec deux molécules de Keap1 et une molécule de Cul3. Cette

dernière assure la polyubiquitination de Nrf2, au niveau de sept lysines (7K) dans le domaine Neh2, permettant ainsi sa dégradation rapide par le protéasome (**Figure 10A**). Lorsque les cellules sont exposées au stress oxydatif, Nrf2 se transloque dans les noyaux et forme un hétérodimère avec des petites protéines Maf (*avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*). L'hétérodimère Nrf2/MAF se lie spécifiquement aux éléments de réponse antioxydant (ARE) et initie la transcription d'une batterie de gènes antioxydants et de détoxification (**Figure 10B**) (Kansanen et al., 2013; Ma, 2013).

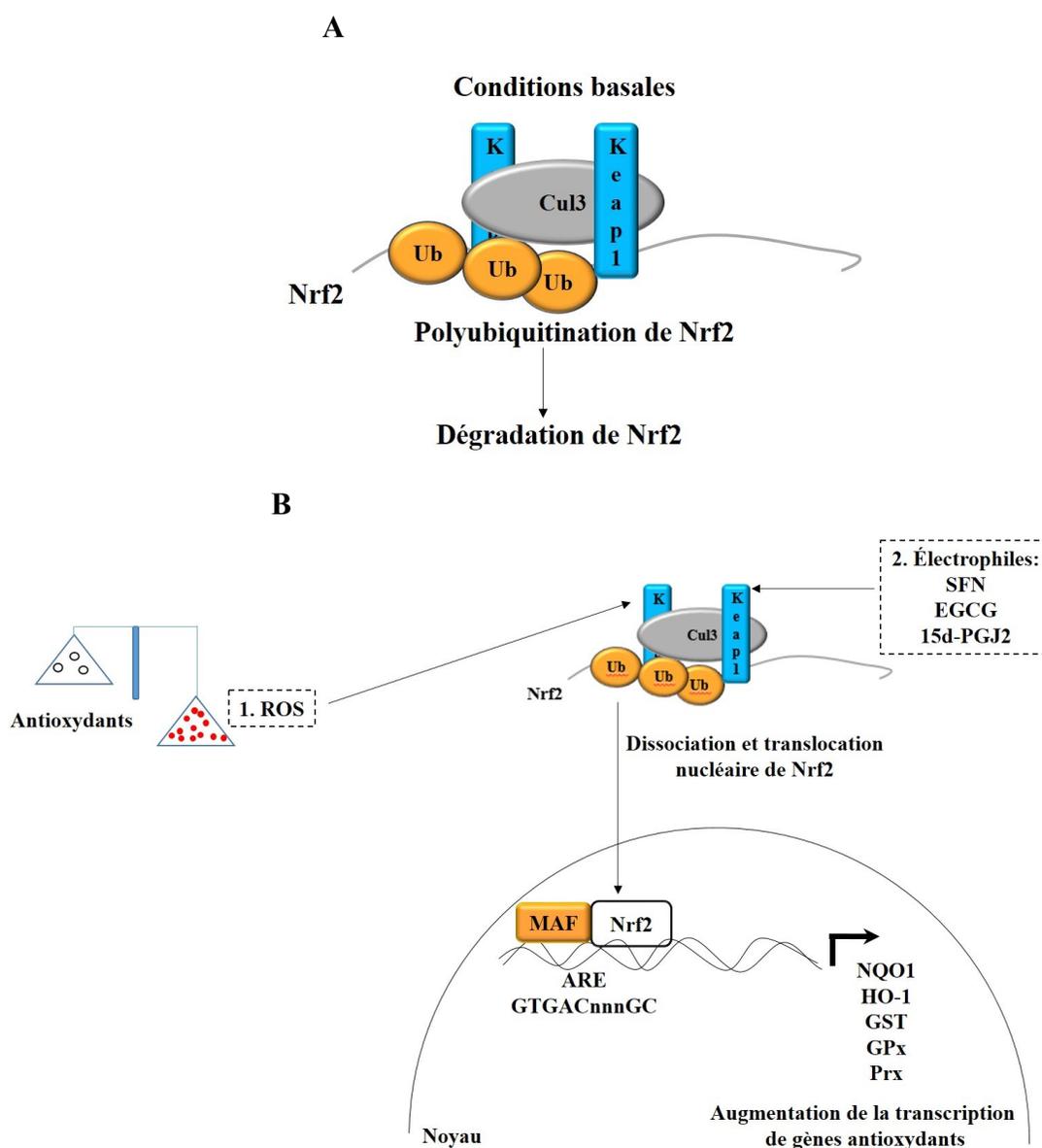


Figure 10: La voie de signalisation Nrf2-Keap1. (A) Dans les conditions basales, deux molécules Keap1 et une molécule Cul3 se lient à Nrf2. Nrf2 est alors poly-ubiquitinylé et

ensuite dégradé rapidement par le protéasome. **(B)** Lors d'une infection par un virus, le stress oxydatif (ROS) produit modifie les cystéines de Keap1 (voie 1) conduisant à la dissociation du complexe Nrf2/Keap1/Cul3. Nrf2 transloque vers le noyau et s'associe avec MAF pour induire l'expression de gènes antioxydants. Des molécules électrophiles (par exemple SFN, EGCG, 15d-PGJ₂) peuvent aussi modifier les cystéines de Keap1 et par conséquent, activer la voie de Nrf2 (voie 2). Adaptée de (Kansanen et al., 2013).

Tel que mentionné précédemment, Keap1 est très riche en cystéines qui sont impliquées dans la détection du stress oxydatif. La plupart de ces cystéines peuvent être modifiées par différentes molécules oxydantes et électrophiles. Trois de ces résidus (C151, C273 et C288), ont été identifiés pour jouer un rôle fonctionnel en modifiant la conformation de Keap1 permettant la translocation nucléaire de Nrf2 (**Figure 10B**). Le mécanisme exact par lequel ces modifications permettent l'activation de Nrf2 n'est pas très bien défini. En effet, seulement deux modèles tentent d'expliquer ce mécanisme (Kansanen et al., 2013). Le premier modèle suggère que les modifications par les ROS au niveau des résidus thiol (SH) des cystéines de Keap1 perturbent son interaction avec Nrf2. Un détachement du motif de DLG de Nrf2 de la première molécule Keap1 est alors observé, tandis que le domaine ETGE de Nrf2 reste attaché à la deuxième molécule Keap1. Ceci provoque donc un mauvais alignement des résidus lysines de Nrf2 vis-à-vis Cul3. Nrf2 ne peut plus être polyubiquitinylé par cette ubiquitine ligase au niveau de ses lysines et peut alors transloquer vers le noyau (**Figure 11A**) (Taguchi et al., 2011). Pour ce qui est du deuxième modèle, les modifications des résidus thiol de cystéines dans le domaine BTB de Keap1 (par exemple C151) permettent la dissociation de Cul3 et Keap1. Cette dissociation empêche donc l'activité ubiquitine ligase de Cul3 sur Keap1, ce qui a pour conséquence de bloquer l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 (**Figure 11B**) (Ma, 2013; Bryan et al., 2013; Kansanen et al., 2013).

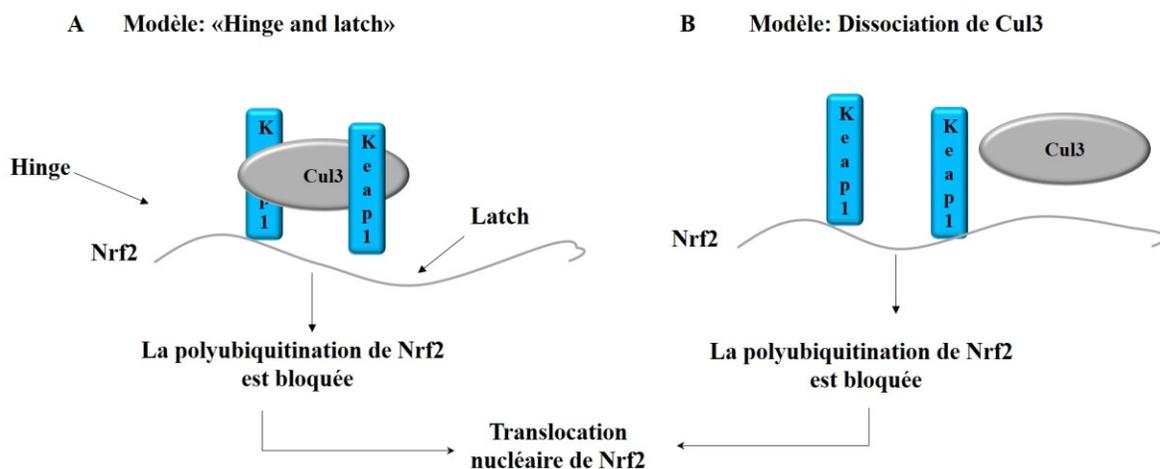
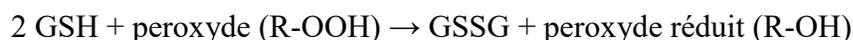


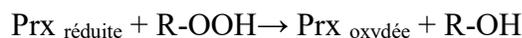
Figure 11: Modèles d'activation de Nrf2. A) Le premier modèle suggère que les modifications des résidus cystéines spécifiques de Keap1 conduisent à des changements de conformation entraînant le détachement du motif DLG de Nrf2 et la première molécule Keap1. B) Le deuxième modèle suggère qu'une fois les cystéines de Keap1 sont modifiées, Cul3 se dissocie du complexe. Dans les deux modèles, l'ubiquitination de Nrf2 est perturbée, empêchant ainsi sa dégradation. Adaptée de (Kansanen et al., 2013).

Dans les deux modèles, les protéines Nrf2 nouvellement synthétisées, contournent Keap1/Cul3 et transloquent au noyau où elles se lient avec MAF à l'élément de réponse ARE afin de stimuler l'expression de divers gènes cibles tels que NQO1 (pour NADPH quinone oxydoréductase 1), HO1 (pour hème oxygénase 1), le glutathion (GSH), le glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase (GST), la peroxyrédoxine (Prx), la sulfirédoxine (Srxn), la catalase, les superoxydes dismutases (SOD), etc (Li et al., 2004; Zhou et al., 2015; Gorrini et al., 2013). L'induction des gènes par Nrf2 permet de réduire l'état oxydatif dans la cellule en intervenant dans un certain nombre de réactions de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Par exemple, les superoxydes dismutases (SOD), sont des métalloprotéines possédant une activité enzymatique permettant de catalyser la dismutation du superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en dioxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est ensuite réduit par la catalase, une oxydoréductase, en eau et dioxygène ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$). D'autres types de peroxydes sont également réduits par des peroxydases telles que la glutathion peroxydase (GPx) et la

peroxyrédoxine (Prx). GPx utilise le glutathion (GSH) pour neutraliser les peroxydes selon la réaction d'oxydoréduction suivante:



Quant à elle, la Prx catalyse la réduction des peroxydes selon la réaction suivante:



NQO1 est une autre protéine dont l'expression est induite par Nrf2. Elle possède une activité enzymatique qui réduit les quinones en hydroquinones, empêchant ainsi leurs oxydations par les électrons (Jeeva et al., 2015).

En somme, Nrf2 est un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes antioxydants et de détoxification afin de protéger la cellule contre le stress oxydatif (et par conséquent, l'inflammation) qui peut se produire lors de diverses conditions physiologiques et pathologiques, comprenant l'infection par le virus influenza.

En outre, Il est également intéressant de souligner que, mis à part son rôle antioxydant, Nrf2 est reconnue pour jouer un rôle antiviral lors d'une infection par le virus influenza. En effet, une étude a démontré que l'activation de Nrf2, par des agonistes électrophiles tels que le sulforaphane (SFN) et le gallate d'épigallocatechine (EGCG) qui permettent de modifier les cystéines de Keap1 et de libérer Nrf2 vers le noyau, diminue la réplication du virus influenza dans les cellules épithéliales nasales. Les auteurs de cet article suggèrent que cette observation est causée par l'augmentation de l'expression de gènes antiviraux tels qu'IFN β et Mx1, suite à l'activation de Nrf2 par ces agonistes. Cependant, ils n'ont pas déterminé si l'expression de ces gènes était dépendante de Nrf2 (Kesic et al., 2011). De plus, jusqu'à présent, aucun élément de réponse de Nrf2 (ARE) n'a été identifié dans les promoteurs de ces gènes. Il serait également pertinent d'investiguer si ce mécanisme antiviral proposé pour Nrf2 est spécifique ou non au type cellulaire. En effet, ces résultats contredisent ceux d'une autre étude montrant que la surexpression de Nrf2 dans des cellules épithéliales alvéolaires réduit la réplication virale sans l'induction de l'expression de gènes antiviraux (par exemple MX1 et IFN β). Cependant, les auteurs n'ont pas expliqué comment la surexpression de Nrf2 diminue la réplication virale dans leur modèle cellulaire. Ils

suggèrent seulement que Nrf2 pourrait protéger les cellules contre les lésions induites par le virus influenza par l'activation de la voie antioxydante cible de Nrf2 (Kosmider et al., 2012). En résumé, Nrf2 réduit la réplication du virus influenza mais son mode d'action dans cette fonction antivirale nécessite toutefois une clarification.

Enfin, et au-delà de ses fonctions antioxydantes, Nrf2 peut aussi réguler la balance protéases/antiprotéases en induisant l'expression d'une petite protéine inhibitrice de protéase nommée SLPI (pour *secretory leukocyte protease inhibitor*). Le gène de cette dernière possède dans son promoteur un élément de réponse ARE, et donc son expression est induite par les antioxydants tels le sulforaphane (SFN) et le gallate d'épigallocatechine (EGCG) qui permettent de modifier les cystéines de Keap1 et de libérer Nrf2 vers le noyau (Iizuka et al., 2005; Kesic et al., 2012; Meyer et Jaspers, 2015; Hu et al., 2011; Na et Surh, 2008). La fonction principale de SLPI est d'inhiber les sérines-protéases telles que la l'élastase neutrophilique (sa cible principale), la cathepsine G, l'élastase, la chymase et la trypsine. Par conséquent, SLPI constitue une ligne de défense pour l'hôte en modulant l'activité des nombreuses protéases. De plus, elle exerce des effets anti-inflammatoires en empêchant l'activation de NF- κ B. SLPI possède également des effets antimicrobiens et antiviraux (Meyer et Jaspers, 2015). Par exemple, SLPI inhibe le virus de l'immunodéficience humaine VIH, le virus du papillome humain ainsi que le virus influenza (Wahl et al., 1997; Kido et al., 1999). En effet, Kido et al., ont démontré que l'administration de la SLPI recombinante humaine a diminué l'infectiosité du virus influenza A/H2N2 d'environ 90% dans les poumons des rats. Les auteurs suggèrent que SLPI pourrait inhiber l'activation de l'hémagglutinine du virus via l'inhibition de la tryptase, et par la suite la réplication virale. Cependant, ils n'ont pas évalué cette hypothèse (Kido et al., 1999). Ceci a mené à l'hypothèse que l'induction de SLPI par des antioxydants activant Nrf2 pourrait avoir un impact bénéfique lors des infections grippales.

En somme, l'ensemble des études présentées ici suggère que PPAR γ et Nrf2 pourraient être deux cibles intéressantes pouvant diminuer à la fois la réplication virale, l'inflammation et le stress oxydatif reliés à l'infection par le virus influenza. Cependant, une meilleure compréhension de l'implication de leurs mécanismes durant une infection par le virus influenza est nécessaire afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur

ces deux facteurs. Par exemple, il serait intéressant d'investiguer si l'utilisation d'un agoniste double pour PPAR γ et Nrf2 permettrait une synergie entre ces deux voies pour protéger contre l'infection. Dans ce contexte, une étude a démontré que l'expression de PPAR γ pouvait être régulée positivement par Nrf2 dans un modèle murin de syndrome de détresse respiratoire aiguë (Cho et al., 2010). Cette étude a identifié pour la première fois l'implication de PPAR γ et NRF2 dans une boucle régulatrice permettant le contrôle des lésions pulmonaires. Cependant, ce n'est pas connu s'il y a une synchronisation entre PPAR γ et Nrf2 pour induire une protection dans d'autres désordres oxydatifs et inflammatoires, telle que durant une infection grippale.

Hypothèse et objectifs :

Les résultats des études précédentes nous mènent à proposer l'hypothèse que les voies de PPAR γ et Nrf2 interagissent fonctionnellement et qu'elles sont impliquées dans la protection contre les dommages pulmonaires induits lors d'infections sévères par le virus influenza. Ce projet de recherche contribue donc à une meilleure compréhension de l'implication de ces facteurs de transcription dans la physiopathologie causée par le virus influenza. Cela pourrait être déterminant pour le développement de traitements anti-inflammatoires et antiviraux, basés sur des molécules activatrices de PPAR γ et Nrf2, qui pourraient diminuer la sévérité de la grippe.

Mes objectifs étaient donc les suivants :

- 1) Étudier l'impact des voies de PPAR γ et Nrf2 dans la limitation de l'inflammation excessive lors d'une infection sévère par le virus influenza (*Article 1*).
- 2) Investiguer en détail le mécanisme d'action antiviral de Nrf2 lors de l'infection par le virus influenza (*Article 2*).
- 3) Déterminer s'il y a une interaction entre les voies de PPAR γ et Nrf2 pour induire une protection durant l'infection par le virus influenza (*Résultats supplémentaires*).

Article 1

The Flavonoid Isoliquiritigenin Reduces Lung Inflammation and Mouse Morbidity during Influenza Infection

Auteurs de l'article: Hussein Traboulsi, Alexandre Cloutier, Kumaraswamy Boyapelly, Marc-André Bonin, Éric Marsault, André M. Cantin, Martin V. Richter

Avant-propos: J'ai réalisé toute l'étude au complet. Alexandre Cloutier a participé dans les expériences *in vivo*. Kumaraswamy Boyapelly et Marc-André Bonin ont synthétisé l'isoliquiritigénine. J'ai rédigé la première version du manuscrit.

Statut de l'article: Publié dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2015**, 59(10), 6317-6327.

Cet article contribue à répondre à l'objectif 1.

Résumé : Lors d'une infection sévère par le virus influenza, l'hôte génère une réponse inflammatoire pulmonaire aiguë et excessive caractérisée par une tempête de cytokines, la génération d'un stress oxydatif ainsi qu'un recrutement massif de cellules immunitaires. La somme de ces événements contribue aux lésions pulmonaires induite par le virus, à la morbidité et à la mortalité observées chez les patients infectés. Basé sur nos travaux antérieurs, dans l'optique de développer de nouvelles stratégies pour réduire la réplication virale et minimiser les effets d'une infection sévère par le virus influenza, nous avons déterminé l'effet sur la réponse inflammatoire et la réplication virale de l'isoliquiritigénine (ILG), composé naturel caractérisé comme agoniste de PPAR γ et de Nrf2. Dans cette étude, nous avons démontré que l'ILG inhibe la réplication virale dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) infectées avec le virus H1N1, avec un EC₅₀ de l'ordre de 24,7 μ M. De plus, nous avons observé que l'ILG inhibe l'expression de cytokines inflammatoires par les cellules infectées d'une façon dépendante de PPAR γ . D'une manière intéressante, l'administration de l'ILG-phosphate (10 mg/kg), diminue d'une manière significative la morbidité des souris lors d'une infection sévère avec le virus H1N1. De plus, cette amélioration était accompagnée avec une réduction de la charge virale pulmonaires, de l'expression de cytokines et chimiokines inflammatoires ainsi que du recrutement des cellules immunitaires innées (neutrophiles, monocytes, NKs et cellules dendritiques). Enfin, nous avons aussi démontré que le recrutement de cellules effectrices T CD8⁺ spécifiques au virus influenza dans les poumons des souris traitées avec ILG-p a été réduit de 60%.

Manuscrit de l'article 1

The Flavonoid Isoliquiritigenin Reduces Lung Inflammation and Mouse Morbidity during Influenza Infection

Hussein Traboulsi^{1,2}, Alexandre Cloutier², Kumaraswamy Boyapelly³, Marc-André Bonin³,
Éric Marsault³, André M. Cantin², Martin V. Richter^{2#}

¹ Graduate Program in Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Department of Medicine, Pulmonary Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, and Centre de recherche du CHUS, Sherbrooke, Québec, Canada.

³ Department of Pharmacology-Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, and Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Sherbooke, Québec, Canada

Corresponding author: Mailing address: Department of Medicine, Pulmonary Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec Canada and Centre de recherche du CHUS, Sherbrooke, Québec Canada.

E-mail: Martin.Richter@USherbrooke.ca

Running title: ILG reduces influenza-induced lung inflammation

Word counts: Abstract = 228 words, Text: 6023 words

ABSTRACT

The host response to influenza virus infection is characterized by an acute lung inflammatory response in which intense inflammatory cell recruitment, hypercytokinemia, and high level of oxidative stress are present. The sum of these events contributes to the virus-induced lung damage that leads to high a level of morbidity and mortality in susceptible infected patients. In this context, we identified compounds that can simultaneously reduce the excessive inflammatory response and the viral replication as a strategy to treat influenza infection. We investigated the anti-inflammatory and antiviral potential activities of isoliquiritigenin (ILG). Interestingly, we demonstrated that ILG is a potent inhibitor of influenza virus replication in human bronchial epithelial cells ($EC_{50}=24.7\mu\text{M}$). In addition, our results showed that this molecule inhibits the expression of inflammatory cytokines induced after the infection of cells with the influenza virus. We demonstrated that the anti-inflammatory activity of ILG in the context of influenza infection is dependent on the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway. Interestingly, ILG-phosphate (ILG-p)-treated mice displayed decreased lung inflammation as depicted by reduced cytokine gene expression and inflammatory cell recruitment. We also demonstrated that influenza-specific $CD8^+$ effector T cell recruitment was reduced up to 60% in the lungs of mice treated with ILG-p (10 mg/kg) compared to saline-treated mice. Finally, we showed that administration of ILG-p reduced lung viral titers and morbidity of mice infected with the PR8/H1N1 virus.

INTRODUCTION

Influenza viruses continue to pose a severe threat worldwide causing hundreds of thousands of deaths every year [1]. Due to the virus' genetic instability, virus variants can become resistant to currently available antivirals. Therefore, the development of novel drugs is an important area of influenza research [2, 3]. Patients with severe infection display a primary viral pneumonia, which is associated with the occurrence of serious lung inflammation and oxygen-derived free radicals causing harmful effects [4-8]. Therefore, a compound that could have anti-viral, anti-inflammatory and antioxidant properties might be a key strategy for the treatment of influenza.

The transcription factor NF- κ B is an important regulator of the expression of the cytokines involved in the inflammatory response to influenza infection. Upon infection, NF- κ B translocates to the nucleus and induces the transcription of proinflammatory mediators such as iNOS, COX-2, TNF- α and IL-1 β , and IL-6 [9, 10]. Although the expression of inflammatory cytokines is essential for the host defense against the virus, their excessive production is associated with high levels of morbidity and mortality during severe influenza infection [5, 8, 11]. Therefore, in the aim of treating influenza infection it is necessary to reduce this exuberant host immune response. Indeed, several *in vivo* studies have found that anti-inflammatory strategies can improve mouse morbidity and increase their survival [12-14]. For instance, Gemfibrozil, a synthetic ligand of the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) significantly protected H2N2-infected mice from developing a fatal disease by inhibiting lung inflammatory cytokine production [15]. Other studies have also shown that the use of PPAR γ ligands such as rosiglitazone or pioglitazone decreased the morbidity and mortality of mice lethally infected with influenza virus [16, 17]. Interestingly, we also showed that the activation of PPAR γ by the 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) protects mice against severe influenza infection [8]. This protection correlated with a reduced lung cytokine and chemokine expression as well as with reduced lung viral titers in treated mice compared to untreated mice.

In this study, we sought to investigate whether more stable PPAR γ ligands could also have a protective effect against influenza infection. One candidate was the natural flavonoid isoliquiritigenin (ILG), a simple chalcone-type flavonoid, derived from the

roots of *Glycyrrhiza* species (licorice). A few studies have revealed that many compounds extracted from Licorice, including ILG, can induce the PPAR γ pathway [18]. Moreover, ILG demonstrated anti-inflammatory properties. For instance, ILG was found to suppress the expression of several inflammatory molecules such as PGE₂, TNF- α and IL-6 in LPS-stimulated murine macrophages through inhibition of NF- κ B activation [19]. In addition, ILG decreased the expression of cell adhesion molecules such as VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells exposed to TNF- α [20]. Interestingly, in vitro studies demonstrated that in addition to its anti-inflammatory properties ILG inhibits influenza neuraminidase activity [21-23]. This viral enzyme is the target of the leading influenza antiviral drug class [24]. Furthermore, ILG was also shown to induce the expression of several phase II antioxidants enzymes through the activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 in various cell lines [25, 26].

Because of the putative properties of ILG, we sought to determine if ILG reduced influenza replication and the virus-induced inflammatory response. In this study, we demonstrated that ILG decreased influenza virus replication in human bronchial epithelial cells. Furthermore, ILG reduced the expression of various inflammatory cytokines in a PPAR γ -dependent manner. We also demonstrated that ILG-phosphate significantly decreased the influenza-induced mouse morbidity through the reduction of the exaggerated lung proinflammatory response and lung viral titers. Therefore, our findings represent an interesting basis for future anti-influenza drug development.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Antibodies were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA) and BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). The influenza A viral peptide epitope NP₃₆₆₋₃₇₄ (ASNENMETM) was purchased from AnaSpec (Fremont, CA). GolgiPlug was purchased from BD Biosciences. Histopaque buffer was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The RNA extraction reagent RiboZol was purchased from Amresco. ILG and ILG-p were synthesized through collaboration with Dr. Éric Marsault (Institut de pharmacologie de Sherbrooke).

Cell lines and virus

Human bronchial epithelial cells (Calu-3; ATCC HTB-55), human alveolar type II epithelial cells (A549; ATCC CCL-185) and Madin-Darby canine kidney cells (MDCK; ATCC CCL-34) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured using standard methods at 37°C in 5% CO₂/95% air in EMEM (Wisent, Canada), supplemented with 10% FBS, antibiotics (streptomycin 100 mg/ml and penicillin 100 U/ml), 5% sodium pyruvate, 5% nonessential amino acids, and 2 mM L-glutamine (complete EMEM). Original viral stocks of the mouse-adapted A/PR/8/34 (H1N1) virus (PR8) were provided by Dr David Topham (URMC, Rochester, NY).

Cell viability assays

For cytotoxicity assays, Calu-3 and A549 cells were seeded (5.0×10^4 and 3.0×10^4 cells/well, respectively in 96-well culture plates) and incubated at 37°C in complete medium for 24h before drug treatment. Cells were cultured for 48h with each compound at various concentrations (0,1µM-300µM). At the end of the incubation period, cell viability was assessed using the XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2 H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay (Invitrogen, Carlsbad, CA). The spectrophotometric absorbance of the samples was measured using a microplate reader (Thermomax microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 450 nm with a reference wavelength of 690 nm. Each measurement was performed in triplicate and the data reported were mean values of at least 2 experiments. Cell viability (%) was

calculated according to the following equation: Cell viability (%) = ($A\lambda_{450}$ of treated wells/ $A\lambda_{450}$ of control wells) \times 100. CC_{50} values were calculated using nonlinear regression curve fit with a variable slope using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Luciferase assays

The day before transfection, A549 cells (1×10^5) were plated in 24-well tissue culture treated plates. Cells were transiently transfected with 0.1 μ g of PPRE-luc (PPAR response element), ARE-luc (Nrf2 response element) or NF- κ B-luc plasmids using FuGENE®6 transfection reagent (Promega, Madison, WI). The day after transfection, cells were treated with ILG (50 μ M), 15d-PGJ₂ (5 μ M) or rosiglitazone (10 μ M) for 24 hours. For the NF- κ B luciferase assays, ILG and TNF- α (5 ng/ml) were added to the medium at the same time. To evaluate the effect of ILG on influenza induced NF- κ B activation, transfected cells were infected with PR8 at an MOI of 1, and one-hour post-infection (p.i.), the medium was changed and the cells were incubated with ILG (20 μ M) for 24 hours. Cell lysates were assayed for luciferase activity using the luciferase assay system from Promega (Madison, WI).

In vitro antiviral activity and viral plaque assays

Calu-3 cells were infected with PR8 (3×10^3 PFU/ml) for 1 hour, washed with PBS and then treated with increasing concentrations of ILG. After 2 days, supernatants were collected and 10-fold serial dilutions were used to infect MDCK cells seeded in 24-well plates for 1 h. MDCK cells were then washed with PBS and incubated with EMEM containing Avicel 1.8% and 1 μ g/ml of TPCK-treated trypsin. After 48 h at 37°C 5% CO₂, cells were washed and fixed with Carnoy fixative (methanol: acetic acid, 3:1) for 20 min at 4°C. Viral plaques were revealed by staining with 1% crystal violet solution in 20% methanol. Viral plaques were counted, and lung viral titers were calculated based on the dilution factor.

Real-time Polymerase Chain Reaction Analyses

For each experimental condition, total RNA was extracted from lung homogenates, or Calu-3 cells, using Ribozol reagent according to the manufacturer's protocol. 500 ng of the resulting RNA was then reverse transcribed using iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR kit (Bio-Rad). Real-time polymerase chain reactions were performed with the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Amplification plots were generated using the Rotorgene 6000 Application software version 1.7 (Corbett Research), and fold induction was calculated using the $2^{\Delta\Delta C_t}$ method and using 18S expression for normalization. Primer sequences are detailed in Table 1.

Mouse infection

C57BL/6 mice, 6–8 weeks old, were purchased from Charles River Laboratories and housed in specific pathogen-free conditions at the animal care facility of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke. All experiments were approved by the Institutional Animal Ethics Committee. Mouse infections with influenza were carried out as previously published [8]. Briefly, anesthetized mice were infected intranasal with 50 PFU of PR8 virus in 30 μ L of phosphate-buffered saline (PBS). ILG-p was diluted in saline buffer and mice were treated with ILG-p (10 mg/kg) by intraperitoneal injection, and treatment was initiated on the same day as infection (day 0), and continued daily for the indicated number of days for each experiments.

Lung Viral Titer Determination

Serial 10-fold dilutions of clarified lung homogenates were prepared in incomplete EMEM medium (containing 0.1% bovine serum albumin instead of fetal bovine serum) and were tittered on MDCK cells as described above.

Organ isolation

At indicated times p.i., mice were euthanized by i.p injection of Avertin (720 mg/kg). The trachea was canulated, and three bronchoalveolar lavages (BAL; 3 \times 1 mL EMEM) were performed to collect cells present in the airways. Lungs were purged of blood by injecting 10 ml of PBS in the right ventricle of the heart. Lungs were then removed and placed in EMEM.

Cell isolation

Lung homogenates were obtained by gently rubbing organs over a 200-gauge wire mesh and filtered through a 90- μ m nylon mesh. Lung homogenates were centrifuged at 400 g for 5 min and supernatants were titrated by viral plaque assay (PFU/lungs). Lung lymphocytes were isolated at the interface of EMEM and Histopaque after a centrifugation of 30 min at 800 g without the break step. Lung lymphocytes were then resuspended in EMEM. Airway cells obtained by BAL were centrifuged and resuspended. Lysis of red blood cells in BAL was performed when necessary using red blood cell lysis buffer. Concentrations of all cell suspensions were determined by trypan blue exclusion.

Staining of innate immune cells and flow cytometric analyses

Aliquots of 10^6 cells were seeded in round bottom 96-well plates. Cells were washed and resuspended in a 4% paraformaldehyde solution for fixation during 15 min at 4°C. Cell Fc receptors were then blocked with anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G2, BD Biosciences) for 20 min at 4°C. After blocking, cells were labeled with anti-Ly6G Alexa 647 (clone 1A8, BioLegend), anti-Ly6C APC-Cy7 (clone AL-21, BD Biosciences), anti-CD11b PE (clone M1/70, eBioscience), anti-CD11c PE-Cy7 (clone HL3, BD Biosciences), and anti-F4/80 PercP Cy5.5 (clone BM8, BioLegend), anti-NK1.1 FITC (clone PK136, eBioscience). Cells were analyzed immediately by flow cytometry. Experimental data were collected/analyzed with FACSDiva software (BD Biosciences) using a BD FACSCanto flow cytometer.

Staining of adaptive immune cells and flow cytometric analyses

Cells (1×10^6) were seeded in 96-well plates and were stimulated in 200 μ l complete EMEM containing 1 μ /ml BD Golgi Plug, a protein transport inhibitor (Brefeldin A; BD Biosciences), in the presence or absence of influenza NP or PA viral peptides. Cells were incubated for 6 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were washed with PBS-0.2% BSA for further staining of surface markers on adaptive immune cells. Following stimulation, cells were washed and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 15 min at 4°C. Cell Fc receptors were then blocked with anti-CD16/32 for 20 min at 4°C. Cells were then

washed and labeled with primary antibodies, such as anti-CD8a PerCP-Cy5.5 (clone 56-3.7, BD Biosciences), anti-CD44 PE-Cy7 (clone IM7, BD Biosciences), anti-CD62L APC (Clone MEL-14, eBioscience), for 30 min at 4°C. After cell surface staining and fixation, cells were permeabilized in 100 µl BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences) for 20 min at 4°C. Cells were centrifuged and stained for intracellular IFN- γ (anti-IFN- γ PE, clone XMG1.2, eBioscience ; diluted in Perm/Wash buffer) for 30 min at 4°C. Cells were then washed twice with Perm/Wash buffer, resuspended in PBS-0.2% BSA buffer, and analyzed by flow cytometry using a BD FACS Canto flow cytometer.

Statistical analyses

With the exception of the weight loss data, all the results were represented as means \pm SD. The mouse weight loss data were presented as means \pm SEM and were analyzed using multiple t tests with Holm-Sidak correction for multiple comparisons. Comparison of data from two groups of mice was analyzed using the unpaired Student's t-test with the Welch correction. For comparison of more than two groups, one-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test was performed. GraphPad Prism 6 software was used for all the statistical analyses (GraphPad Software).

RESULTS

Assessment of ILG cellular toxicity

In order to determine the appropriate concentrations of ILG to use during this study, we measured its cellular cytotoxicity using the XTT assay after a 48h incubation with the cells. In the human bronchial epithelial cell line Calu-3, we determined the ILG CC_{50} to be 98.02 μ M; at a concentration up to 50 μ M of ILG, 93.9% of cells were viable, which was statistically indifferent from controls. Using this assay, we showed that viability of A549 cells was more affected by ILG (CC_{50} = 81.74 μ M). Indeed, at a concentration of 50 μ M of ILG, only 56.3% of the A549 cells were viable whereas greater than 90% of the cells were viable at a concentration of 20 μ M.

ILG activates PPAR γ and Nrf2 and inhibits NF- κ B activity in vitro

First, we sought to determine the effect of ILG on the activity of the anti-inflammatory factor PPAR γ and the antioxidant factor Nrf2. Human alveolar type II epithelial cells (A549) were transfected with either the PPRE-luciferase reporter (contains PPAR γ response element) or ARE-luciferase reporter (contains Nrf2 response element) plasmids followed by a treatment with ILG (20 μ M). We observed that ILG was able to activate PPAR γ -dependent-luciferase transactivation (6.5-fold), which was superior to the activity achieved by rosiglitazone and 15d-PGJ₂, two previously characterized PPAR γ agonists (Figure 1A). Moreover, and as opposed to rosiglitazone, ILG, like 15d-PGJ₂, also activated Nrf2 (5-fold; Figure 1B). Furthermore, in order to test whether or not ILG inhibits NF- κ B activity, A549 cells were transfected with the NF- κ B-luciferase reporter plasmid and were treated with TNF- α in presence or absence of 20 μ M ILG. Interestingly, we observed that ILG inhibited TNF- α -induced NF- κ B activation (-19.0%; Figure 1C), whereas rosiglitazone had no effect.

This result prompted us to determine if ILG was able to inhibit NF- κ B activity during influenza infection. To do so, A549 cells transfected with the NF- κ B-luciferase reporter were infected with influenza A/PR/8/34 H1N1 (PR8) virus at an MOI of 1 in presence or absence of ILG (20 μ M) for 24 hours. As expected, influenza infection increased NF- κ B-dependent-luciferase transactivation by 2-fold (Figure 1D; PR8). However, in presence of ILG, NF- κ B activity was reduced compared to DMSO-treated cells (-25.0%; Figure 1D;

PR8 vs PR8 + ILG). Together, these results suggest that ILG has potential anti-inflammatory and antioxidant properties.

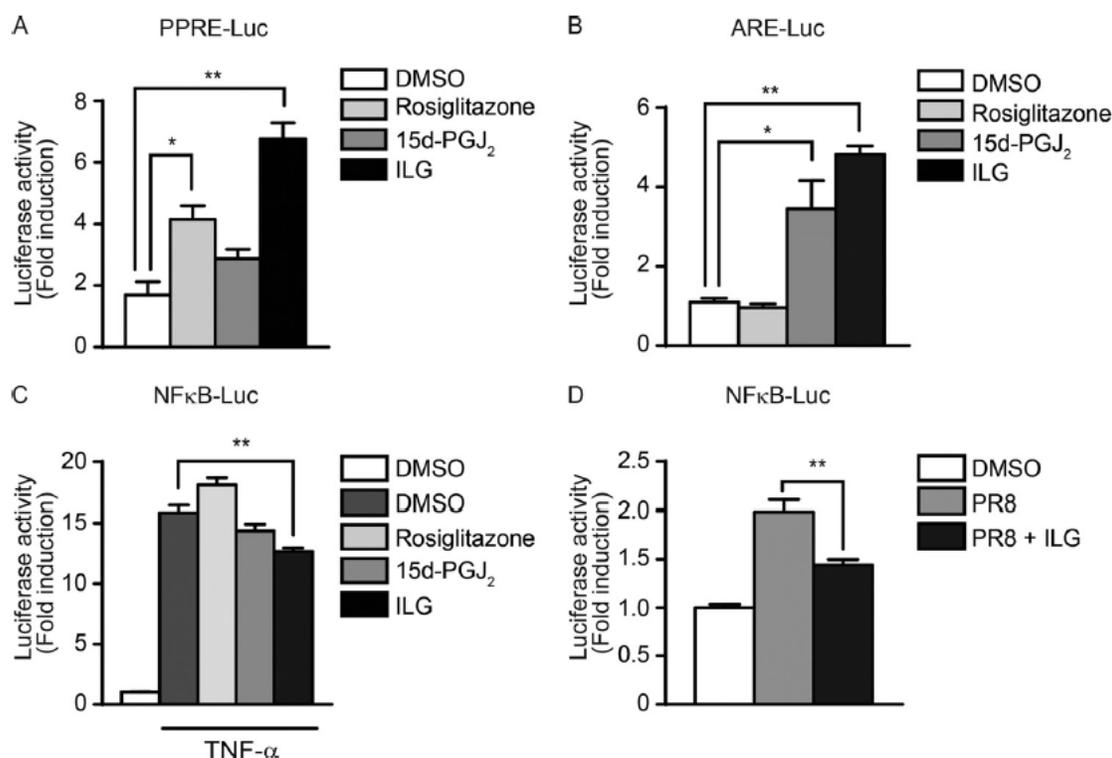


Figure 1: Isoliquiritigenin (ILG) activates PPAR γ , Nrf2 and inhibits NF- κ B activation induced by TNF- α . Human lung epithelial cells (A549) were transfected with either PPRE (A) or ARE (B) luciferase reporter plasmid. Cells were then treated with DMSO, rosiglitazone (10 μ M), 15d-PGJ₂ (5 μ M) or ILG (20 μ M) for 24 hours prior to cell lysis and luciferase activity measurement. C) A549 cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter plasmid. Cells were then incubated in the presence of TNF- α (5ng/ml) and rosiglitazone (10 μ M), 15d-PGJ₂ (5 μ M) or ILG (20 μ M) for 24 hours prior to cell lysis and luciferase activity measurement. D) A549 cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter plasmid. Cells were then infected with PR8 (MOI 1) and treated with ILG (20 μ M) for 24 hours, prior to cell lysis and luciferase activity measurement. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

ILG has an antiviral and anti-inflammatory effect in vitro

Because it has been demonstrated that ILG is a potential inhibitor of influenza neuraminidase [21-23], we asked whether ILG reduced influenza replication in human lung epithelial cells. The human bronchial epithelial cell line Calu-3 was infected with

MOI of 0.001 influenza and were then either left untreated or were treated with increasing concentrations of ILG (10 to 50 μ M). Our results showed that ILG reduced viral plaque formation in a dose-dependent manner starting at 20 μ M. Indeed, a 2-log reduction in viral replication was observed with 50 μ M ILG. These results demonstrated that ILG has considerable antiviral activity in vitro against influenza virus infection (Figure 2).

As the excessive inflammatory response is in part responsible for the illness during a severe influenza infection, we examined whether ILG treatment might inhibit or down-regulate the production of inflammatory genes after infection. To do so, Calu-3 cells were infected with PR8 influenza at an MOI of 2 in presence or absence 50 μ M of ILG. After 24 hours, the cellular expression of several cytokines involved in the generation of the inflammatory and antiviral states were measured by quantitative PCR. As expected, the expression of inflammatory cytokines was strongly induced 24 hours post infection (p.i) in infected cells compared to uninfected cells.

Indeed, we observed increased mRNA expression of cytokines such as TNF- α (10.0-fold), IL-6 (5.0-fold), IFN- α (4.0-fold), and IFN- β (16.0-fold) (Figure 3A-3D, respectively). Interestingly, the expression of these cytokines was completely inhibited in ILG-treated cells compared to untreated cells (Figure 3A-3D, bar 2 vs bar 4).

Interestingly, in additional experiments performed at high MOI (2-5), no viral titer reduction was observed in ILG-treated cells whereas cytokine reduction was readily observed.

These results argue in favor of a direct anti-inflammatory action of ILG that is not a consequence of viral titer reduction.

Since, we previously showed that the anti-inflammatory effect of 15d-PGJ₂ depends on the activation of the PPAR γ pathway [8], we evaluated whether this pathway was involved in the anti-inflammatory properties of ILG. Calu-3 cells were treated either with ILG alone or with ILG after PR8 infection, in the presence of the PPAR γ antagonist GW9662 during 24 hours.

The quantification of cytokine gene expression by qPCR showed that treatment with GW9662 partially abolished the anti-inflammatory effect of ILG. Indeed, increased expressions of the cytokines: TNF- α (8.0-fold), IL-6 (2.7-fold) and IFN- β (7.3-fold) were

observed when the cells were treated simultaneously with ILG and GW9662 compared to the cells treated with ILG alone (Figure 3A, B and D; bar 4 vs bar 5). Treatment with the antagonist GW9662 alone did not show a significant difference compared with untreated cells (Figure 3A-3D; bar 2 vs bar 3). Together, these results suggest that ILG is an antiviral and anti-inflammatory molecule that reduces the expression of influenza-related inflammatory cytokines, partially through the activation of PPAR γ pathway.

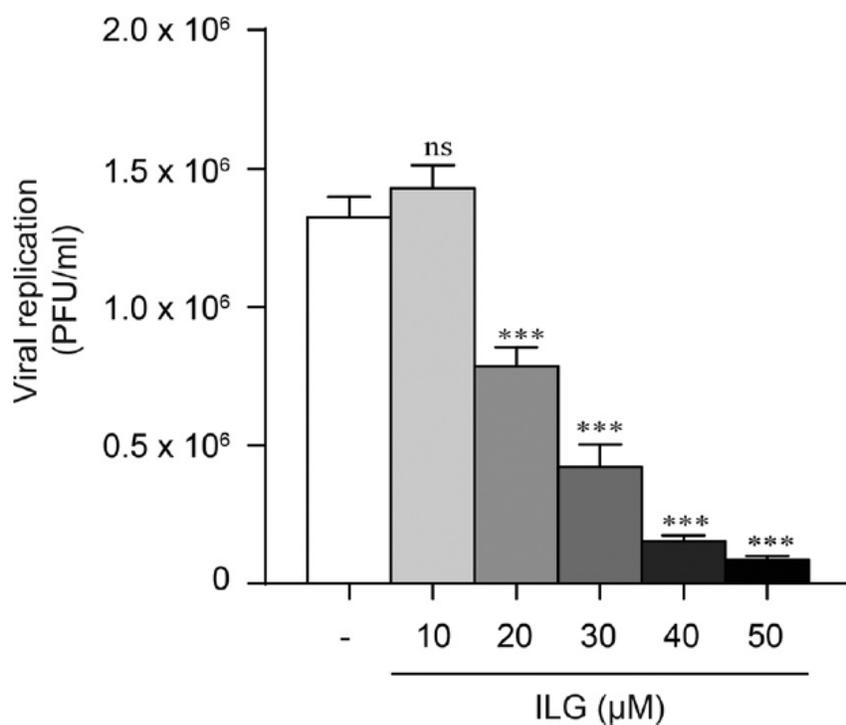


Figure 2: Antiviral activity of isoliquiritigenin against influenza virus PR8/H1N1 in human bronchial epithelial cells. Calu-3 cells were infected with PR8/H1N1 virus (MOI 0.01). After 1 hour, infected cells were treated either 1% of DMSO (-) or increasing concentrations of ILG (10 to 50 μM). After 48 hours, the supernatants were collected and the viral titers were determined using viral plaque assays in MDCK cells. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments (*** p < 0.001).

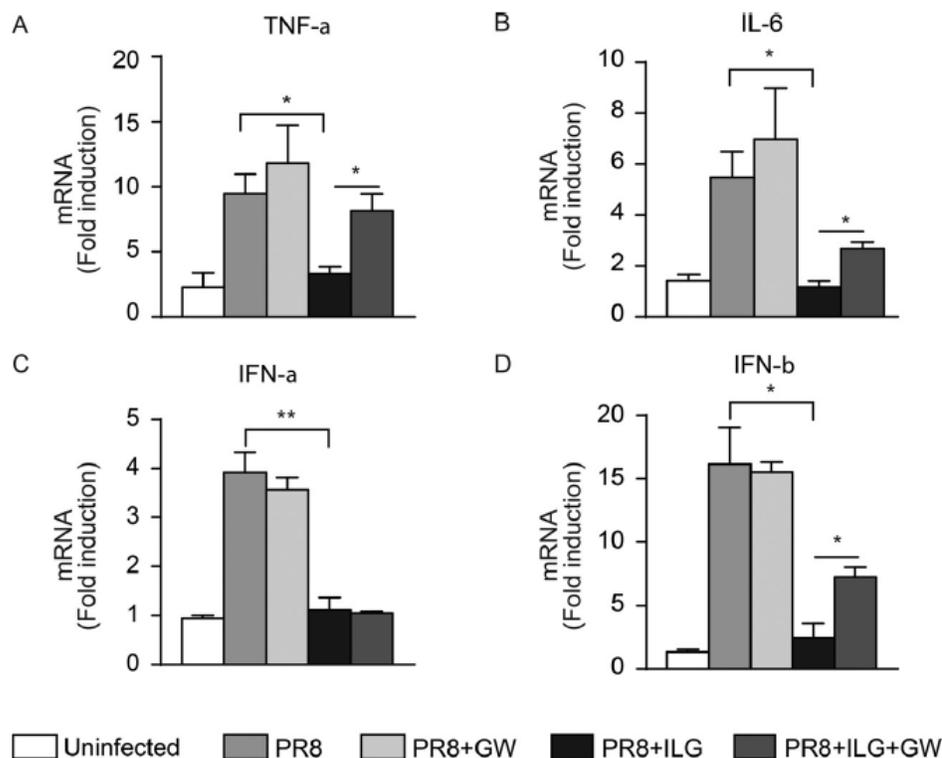


Figure 3: The anti-inflammatory effect of isoliquiritigenin (ILG) depends on the PPAR γ pathway. Calu-3 cells were infected with H1N1/PR8 influenza virus (MOI 2). After 1 hour, the infected cells were incubated with ILG (50 μ M) for 24 hours in absence or presence of GW9662, a PPAR γ antagonist (GW). RNA was extracted and real-time polymerase chain reactions were performed with specific primers to quantify inflammatory cytokine gene expression: TNF- α (A), IL-6 (B) IFN- α (C) and IFN- β (D). Data shown represent the mean \pm SD of two independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

ILG-p administration ameliorates mouse morbidity and decreases the viral load in the lungs of infected mice

Because ILG showed important anti-inflammatory and antiviral properties in vitro, we sought to investigate whether it had the same effects in vivo and whether it protected mice from influenza infection. Due to low solubility of ILG in aqueous buffer, a cleavable phosphate group was added to the ILG molecule (ILG-p) to improve its solubility and avoid the use of toxic solvents (Figure S1). Although ILG-p retained some activity in vitro, it was less active compared to ILG. However, of interest therapeutically, ILG-p was completely and rapidly converted into ILG in mouse plasma (less than 30 min; Boyapelly K et al., Figure S2).

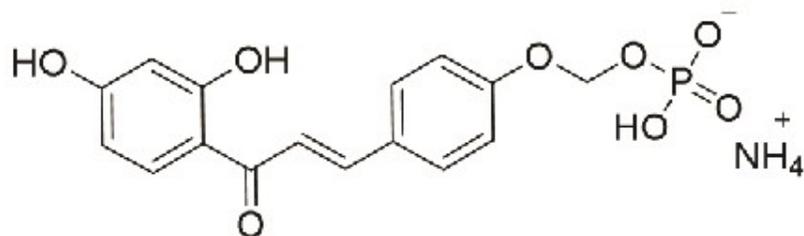


Figure S1: Structure of ILG-p.

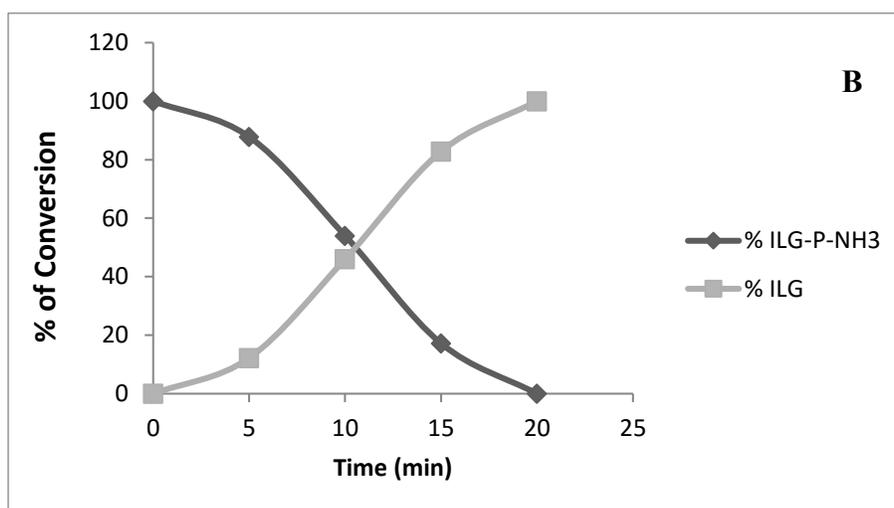


Figure S2: % conversion of ILG-p-NH₃ to ILG in mouse lung extract [1 mM] at 37 °C.

In addition, ILG-p in comparison to ILG showed less toxicity *in vitro* (Calu-3 cells $CC_{50} = 0.96\text{mM}$, and in A549 cells $CC_{50} = 0.624\text{ mM}$). To evaluate the therapeutic efficacy of ILG-p against H1N1 virus, C57BL/6 mice were infected with 50 PFU of PR8 influenza virus. Groups of mice were either mock-treated (sterile saline; PR8 group) or treated with ILG-p (10 mg/kg; PR8 + ILG-p group) from day 0 to day 7 post-infection. Infected and ILG-p-treated mice showed overall reduced weight loss compared to untreated mice. Statistically, the differences between the two groups were significant at day 5 and 6 p.i. and between day 10 and day 16 p.i. For instance, a weight loss of 31.4 % was observed for the PR8 group versus 23.4 % for the PR8 + ILG-p group at day 11 post-infection (Figure 4). After the peak of disease morbidity, mice in the ILG-p-treated group recovered approximately 3 days earlier than mock treated animals. Because ILG-p ameliorated the weight loss of infected mice, we asked whether it had antiviral effects

against influenza virus *in vivo*. To determine the effect of ILG-p on H1N1 virus replication *in vivo*, we determined lung viral titers in mice at day 3 post-infection. Interestingly, treatment of mice with ILG-p significantly reduced the lung viral load compared to mock-treated mice (-48.0 %; Figure 4B; PR8 vs PR8 + ILG-p).

These results suggested that ILG-p might have an antiviral effect *in vivo* similar to what was observed in Calu-3 cells.

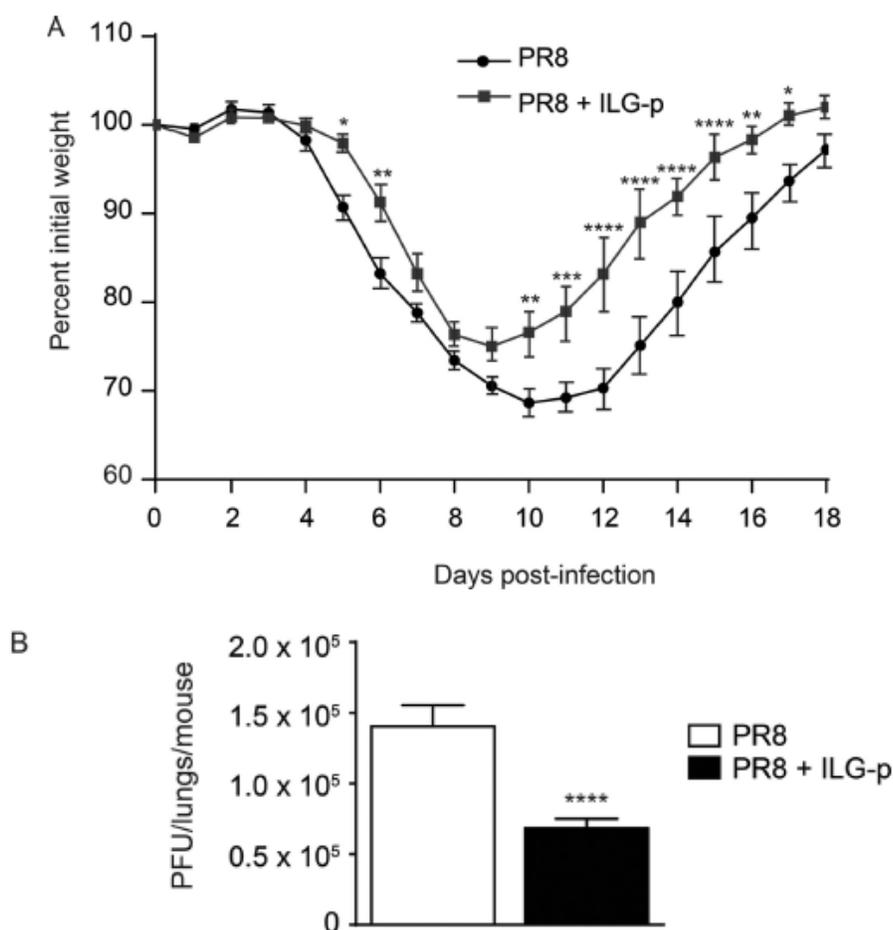


Figure 4: Reduced morbidity and viral titers in mice treated with ILG-p after influenza infection. Mice were infected with 50 PFU of PR8 virus and then either mock treated (PR8) or treated with ILG-p (10 mg/kg; PR8 + ILG-p) until day 3 p.i (viral titers) or day 7 p.i (weight loss). A) Weight loss was monitored daily for 18 days. The data shown represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed with three or four mice/group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$). B) Viral titers were determined in the lungs of mice 3 days p.i. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments performed with three to four mice/group (unpaired Student's t-test, **** $p < 0.0001$).

Anti-inflammatory effect of ILG-p on the innate immune response to influenza

Severe infection by influenza viruses induces excessive inflammatory responses, such as production of high levels of chemokines and cytokines and infiltration of the lungs with immune cells, which contribute to the morbidity and mortality of animals and humans [5, 27]. Therefore, an interesting feature of a treatment would be the reduction of this excessive inflammation in order to reduce the symptoms of infection. In that sense, we examined whether ILG-p treatment might downregulate cytokine and chemokine production in the lungs of infected mice. We measured the expression of multiple cytokines by qPCR from mRNA extracted from lung homogenates of either uninfected, infected (PR8) or infected and ILG-p-treated mice (PR8 + ILG-p). As shown in Figure 5, the expression of cytokines in lungs was strongly induced on day 3 after infection of mice (PR8) compared with uninfected mice. Indeed, the expression of the cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- β was increased 4, 6 and 7.2 fold, respectively (Figure 5A-5C). Moreover, the expression of chemokines was also strongly increased after influenza infection: 71-fold for CCL2, 6.8-fold for CCL3, 2.0-fold for CCL5, 175.0-fold for CXCL10 and 12.8-fold for MIP-2 (Figure 5D-5H). Interestingly, treatment of mice with ILG-p markedly reduced the expression of these influenza-induced cytokines and chemokines in the lungs compared with mock-treated mice. Indeed, our results show an important reduction of the expression of TNF- α (-72.9 %), IL-1 β (-77.4 %), IFN- β (-59.5 %), CCL2 (-70.4 %), CCL3 (-54.7 %), CCL5 (-66.6 %), CXCL10 (-76.1 %) and MIP-2 (-61.9 %) in the lungs of mice of the PR8 + ILG group (Figure 5A-5K; PR8 vs PR8 + ILG). Given that ILG-p had a marked effect on lung viral titers, and notably on inflammatory cytokine and chemokine gene expression, we sought to determine if this effect translated to reduced recruitment of innate immune cells to the lungs of infected mice. Cells from the airways (BAL) and lung parenchyma of PR8 infected mice, and infected and ILG-p-treated mice were isolated at day 3 p.i. (uninfected mice were used as controls).

The number of NK cells (CD11b^{lo} CD11c^{lo} NK1.1⁺), monocytes (CD11b^{hi} CD11c^{lo} Ly6C⁺), neutrophils (CD11b^{hi} CD11c^{lo} Ly6G⁺), dendritic cells DCs (CD11c^{hi} CD11b^{hi} Ly6G⁺), and recruited macrophages (CD11c^{hi} F4/80⁺ CD11b^{hi}) was determined by flow cytometry.

As expected, we observed a massive recruitment of NK cells (Lungs; 5.6×10^4 in ctrl mice vs 8×10^5 cells in PR8-infected mice), monocytes (BAL; 6.3×10^4 in ctrl mice vs 7.5×10^6 in PR8-infected mice and lungs; 1.9×10^5 in ctrl mice vs 1.5×10^6 in PR8-infected mice), neutrophils (BAL; 5.0×10^4 in ctrl mice vs 1.9×10^7 in PR8-infected mice and lungs; 1.4×10^5 vs 9.5×10^5), DCs (BAL; none in ctrl vs 6.3×10^4 in PR8-infected mice and lungs; 2.2×10^4 in ctrl mice vs 1.6×10^5 in PR8-infected mice) and macrophages (BAL; 9.8×10^3 in ctrl mice vs 2.1×10^5 in PR8-infected mice and lungs; 4.3×10^4 in ctrl mice vs 1.0×10^5 in PR8-infected mice) after 3 days of infection with PR8 compared to the uninfected mice (Figure 6; uninfected vs PR8). More importantly, the recruitment of all these cell types was lower in the airways of the ILG-p treated mice (Figure 6, PR8 vs PR8 + ILG-p). Indeed, in the ILG-p-treated group we observed a significant inhibition of the recruitment of: neutrophils (-88.4% and -45%; BAL and lung respectively), monocytes (-91.5 % and -61.1%; BAL and lung respectively), NK cells (-75.7%; BAL), recruited macrophages (-80.5 %; BAL), and DCs (-41 %; lung) (Figure 6 and B, PR8 vs PR8 + ILG-p). These results show that ILG-p, in addition to its antiviral properties, also functioned in vivo as an anti-inflammatory molecule and reduced inflammation during severe influenza challenge.

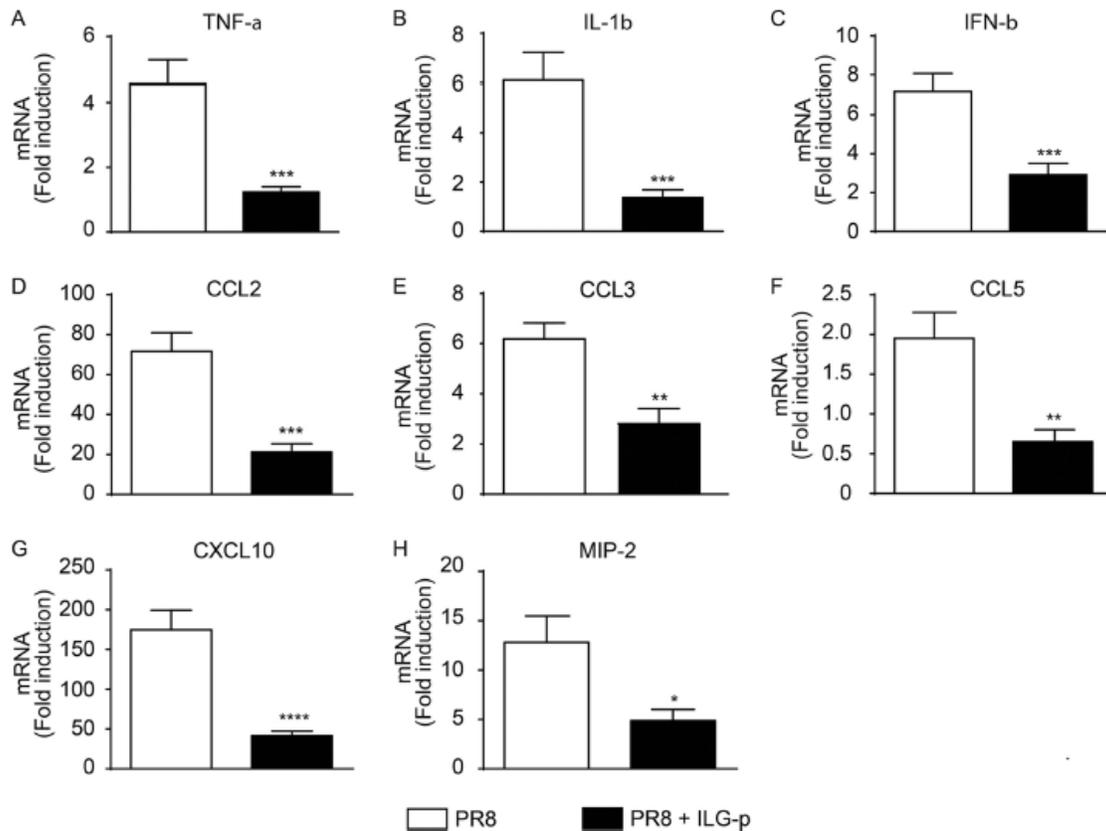


Figure 5: The administration of ILG-p reduces inflammatory cytokine gene expression in the lungs of infected mice. At 3 days p.i., the lungs were harvested, homogenized in RiboZol RNA extraction reagent. RNA was extracted and real-time polymerase chain reactions were performed to quantify the gene expression of TNF- α (A), IL-1 β (B), IFN- β (C), CCL2 (D), CCL3 (E), CCL5 (F), CXCL10 (G) and MIP-2 (H) in the lungs of mice from the different treatment groups. Data shown represent the n-fold changes of gene expression relative to uninfected mice after normalization to expression of ribosomal 18S RNA for each sample. Data represent the means \pm SD of three independent experiments performed with three to four mice per group (unpaired Student's t-test, * p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 and **** p < 0.0001).

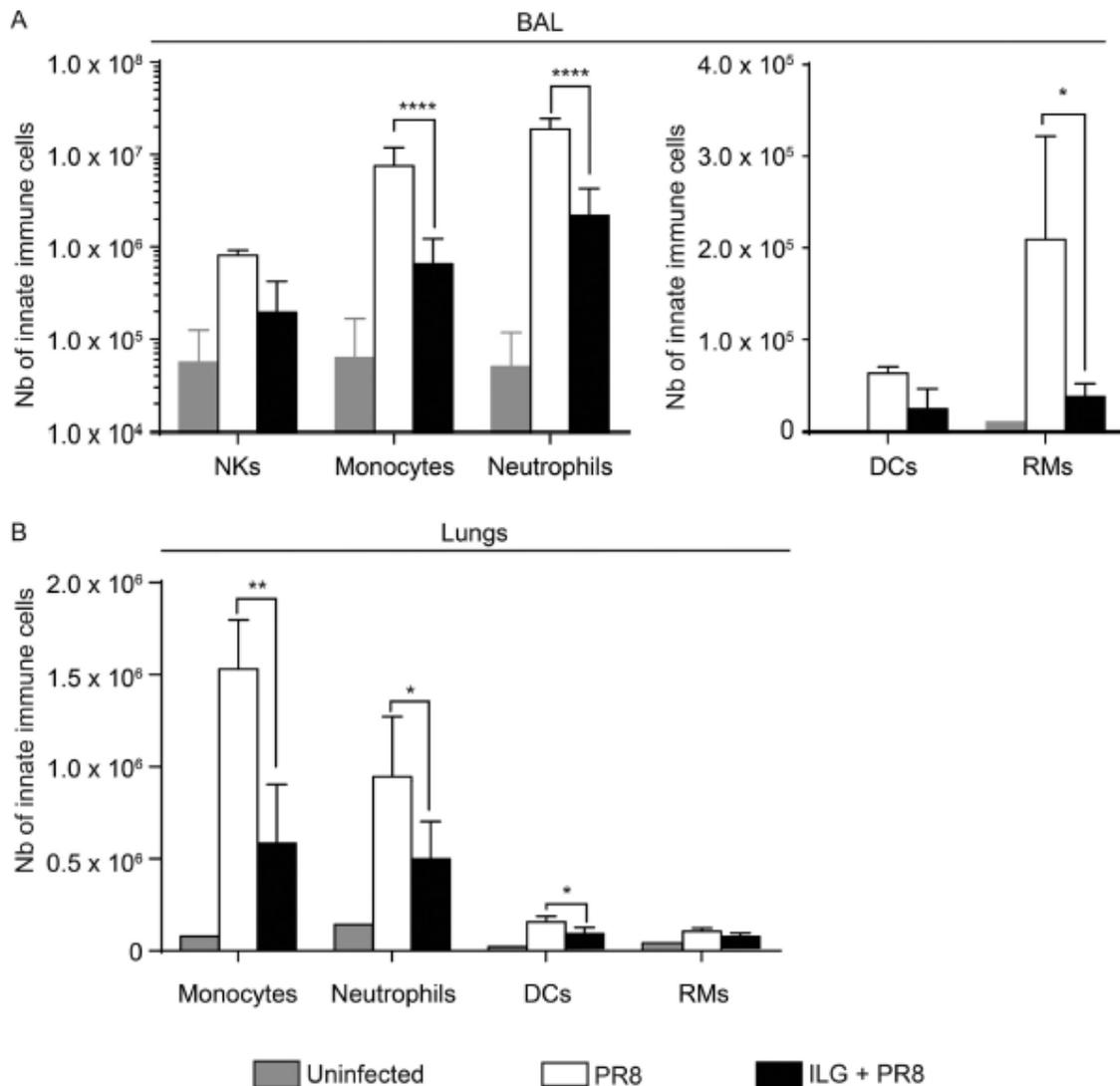


Figure 6: ILG-p treatment reduces the recruitment of inflammatory cells into the airways of infected mice after influenza infection. Innate immune cell populations were characterized in the respiratory tract (airways (BAL) and lungs) of mock-treated (PR8) and ILG-p-treated mice (PR8 + ILG-p) by flow cytometry. Neutrophils (CD11b^{hi} CD11c^{lo} Ly6G⁺), monocytes (CD11b^{hi} CD11c^{lo} Ly6C⁺), NK cells (CD11b^{lo} CD11c^{lo} NK1.1⁺), DCs (CD11c^{hi} CD11b^{hi} Ly6G⁺) and recruited macrophages (CD11c^{hi} F4/80⁺ CD11b^{hi}) were identified on day 3 p.i. Data shown represent the means \pm SD of two independent experiments performed with three to four mice per group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and $p < 0.0001$):

Effect of ILG-p on the adaptive immune response to influenza

Because ILG-p had an important effect on viral titers, cytokine and chemokine expression and innate cells recruitment, we asked whether ILG-p also had an effect on the adaptive immune response. Recruitment of influenza specific CD8⁺ T cells to the

lungs of infected mice depends on the expression of chemokines, such as CCL3, CCL4, CCL5; and CXCL10 [28]. Therefore, we first evaluated the relative gene expression of these chemokines and that of other inflammatory cytokines. Our results showed an increased expression of TNF- α (7.7-fold), IL1- β (3.2-fold), IFN- γ (50.2-fold), CCL3 (33.4-fold), CCL4 (25.9-fold), CCL5 (44.4-fold) and CXCL10 (195.0-fold) at day 8 p.i. We also observed that ILG-p treatment significantly decreased the expression of IFN- γ (-45 %) and CCL5 (-25 %) in the lungs of infected mice (Figure S3-C and F, respectively; PR8 vs PR8 + ILG-p). However, we did not observe differences in the expression of the other measured cytokines and chemokines: TNF- α , IL-1 β , CCL3, CCL4 and CXCL10; (Figure S3 A, B, D, E and G; PR8 vs PR8 + ILG-p). We next examined the impact of ILG-p treatment on the recruitment of activated effector CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}) T cells into lungs and airways of mice at day 8 p.i. Flow cytometry analyses revealed an important recruitment of total effector CD8⁺ T cells into the airways (BAL; 3.0×10^7 cells) and lungs (2.4×10^7 cells) of mice infected with PR8 compared with uninfected mice (BAL; 9.9×10^4 cells and lungs; 2.1×10^5 cells) (Figure 7 A and B, respectively; uninfected vs PR8). Interestingly, treatment with ILG-p led to a significant decrease of effector CD8⁺ T cells recruited into the BAL (-40 %) and the lungs (-63 %) (Figure 7 and B, respectively; PR8 vs PR8 + ILG-p). We next determined whether ILG-p also influenced the recruitment of influenza-NP specific effector CD8⁺ T cells to the site of infection. Indeed, Figure 7 shows that IFN- γ NP-specific effector CD8⁺ T cells were recruited in greater numbers into the airways of mock-treated mice (BAL; 1.7×10^7 cells and lungs; 2.9×10^5 cells) in comparison with the ILG-p treated mice (BAL; 1.0×10^7 cells and lungs; 1.0×10^5 cells).

These results indicate that ILG reduce the influenza specific immune response and this could partially explain the reduce morbidity observed in treated-mice.

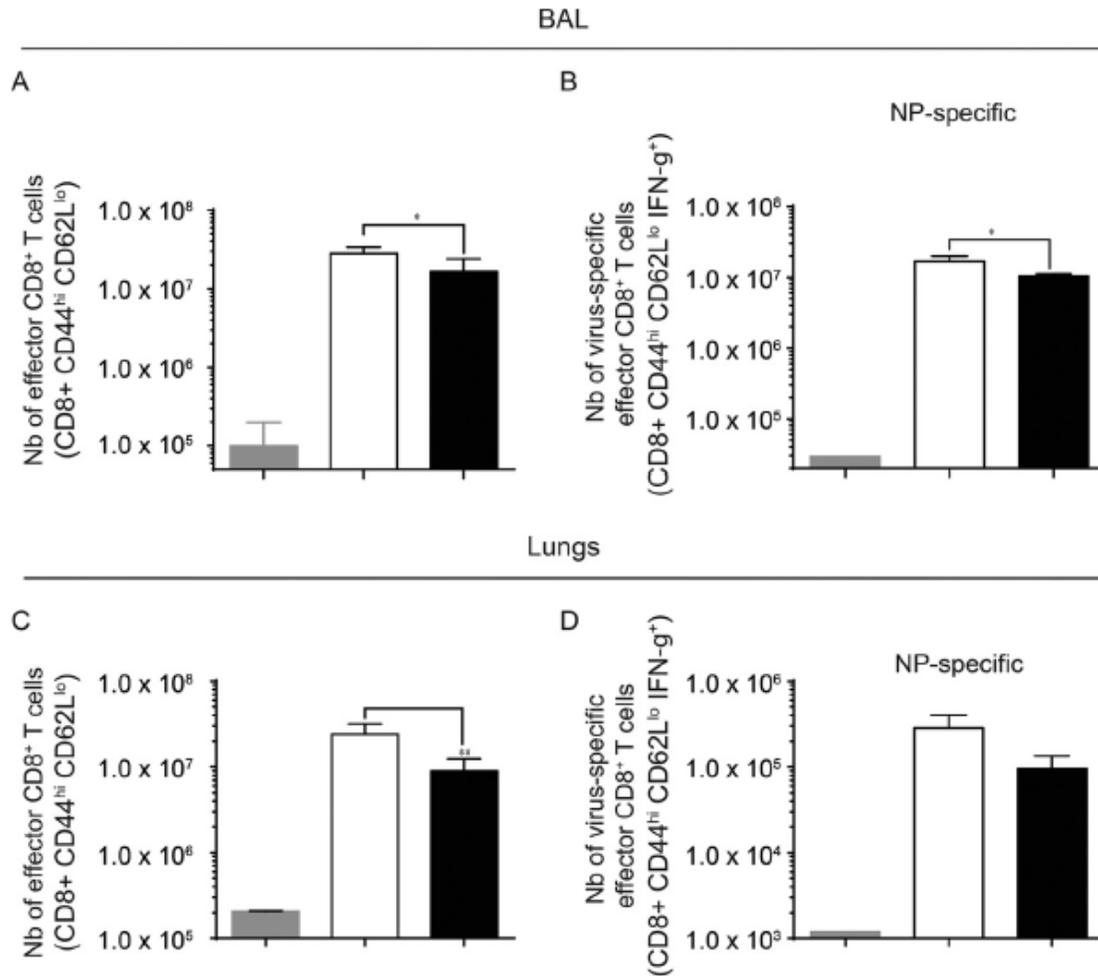


Figure 7: ILG-p reduces the number of effectors CD8⁺ T cells in the respiratory tract of infected mice. At day 8 p.i., CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}) and the virus NP-specific effectors cells (CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo} IFN γ ⁺) were analyzed in the BAL and lungs of mock-treated (PR8) and ILG-p treated mice (PR8 + ILG-p) by flow cytometry. Data shown represent the means \pm SD of two independent experiments performed with three to four mice per group (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

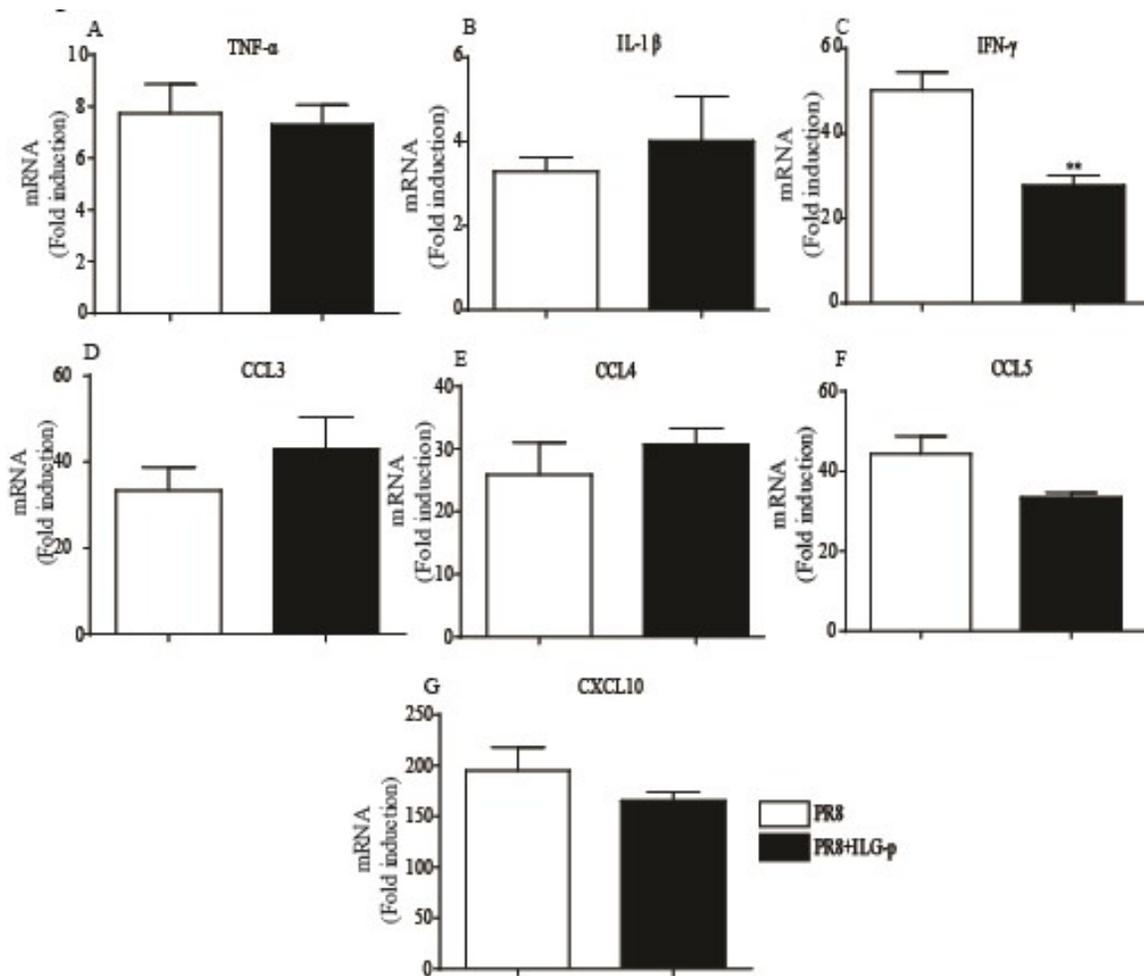


Figure S3: The administration of ILG-p reduces IFN- γ expression in the lungs of infected mice. At 8 days p.i., the lungs were harvested, homogenized in Ribozol RNA extraction reagent. RNA was extracted and real-time polymerase chain reactions were performed to quantify the gene expression of TNF- α (A), IL-1 β (B), IFN- γ (C), CCL3 (D), CCL4 (E), CCL5 (F) and CXCL10 (G) in the lungs of mice from the different treatment groups. Data shown represent the n-fold changes of gene expression relative to uninfected mice after normalization to expression of ribosomal 18S RNA for each sample. Data represent the means \pm SD of three independent experiments performed with three to four mice per group (unpaired Student's t-test, ** $p < 0.01$).

DISCUSSION

Having previously demonstrated that 15d-PGJ₂, a PPAR γ and Nrf2 agonist, protects mice against severe influenza infection; in this study we investigated whether a more stable PPAR γ /Nrf2 ligand could have a similar or better protective effect with the added benefits of having antiviral activity [8]. Using the mouse model of H1N1 influenza infection, we show that isoliquiritigenin (ILG) significantly reduces the severity of the infection as shown by significant reduction in morbidity and lung viral titers. Similar to 15d-PGJ₂, ILG treatment also reduced the gene expression of several overexpressed inflammatory cytokines and chemokines induced by influenza infection in the lungs of treated-mice. This is of particular interest since hypercytokinemia is considered as one of the main detrimental contributing factors in severe influenza infection outcome [11, 29, 30].

Several studies have described the anti-inflammatory and antioxidant properties of ILG in various cell lines and several experimental conditions [19, 20, 25]. In this study, we observed that ILG is a dual agonist for the nuclear receptor PPAR γ and the antioxidant factor Nrf2. In addition, we also show that ILG inhibits NF- κ B activation induced by TNF- α stimulation. These findings are supported by other studies that have independently shown that ILG induces PPAR γ and Nrf2 activation and reduces NF- κ B nuclear translocation [18, 20, 26]. However, this study is the first to show that ILG is also able to inhibit NF- κ B dependent gene transactivation during influenza infection.

Thus, suggesting that ILG could inhibit the expression of NF- κ B-dependent inflammatory cytokines induced after infection.

Using purified recombinant influenza neuraminidases, ILG has previously been shown to have potent inhibitory activity on these enzymes in vitro ($IC_{50} = 9.0 \mu\text{M}$) [21]. However, it remained unknown whether ILG had antiviral activity against the whole virus in an infectious setting. Our data clearly show that ILG reduced influenza replication in human bronchial epithelial Calu-3 cells ($EC_{50} = 24.7 \mu\text{M}$). To our knowledge, this is the first demonstration that ILG reduces influenza virus replication. Thus, this study adds evidence of the antiviral activity of this molecule.

Among the signalling pathways activated by ILG, the Nrf2 pathway is of great interest. Indeed, this pathway regulates the expression of key antioxidant enzymes that are

involved in the neutralization of oxidants generated during viral infections. In addition, the Nrf2 pathway has also been demonstrated to exert antiviral effect against viruses such as hepatitis C, RSV and influenza viruses [31-35]. Interestingly, some studies showed that Nrf2 activators such as sulforaphane and epigallocatechin gallate significantly decrease influenza virus entry and replication in nasal and alveolar epithelial cells [32, 36]. In this study, we clearly demonstrated that ILG activates the Nrf2 pathway and it is therefore conceivable that the activation of this pathway participates in the antiviral action of ILG. Precisely how this happens requires further investigation, but it could be mediated by some end products of antioxidant enzymes, whose expression is controlled by the Nrf2 transcription factor such as heme oxygenase 1 (HO-1) and NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO-1). For instance, HO-1 has been shown to regulate the immune response induced following influenza infection and to decrease lung tissue injury [37, 38]. Interestingly, the end products of the HO-1 (carbon monoxide and biliverdin) have been shown to possess potent antiviral activity [34, 39].

Because excessive cytokine production contributes to the severity of influenza infection, we investigated the anti-inflammatory potential of ILG on the host lung response. Airway epithelial cells are the primary targets for influenza infection and upon infection they produce important levels of inflammatory cytokines [40]. Interestingly, the treatment of human bronchial epithelial cells with ILG significantly reduced the expression of the inflammatory cytokines induced after influenza infection. To our knowledge, this is the first observation of the anti-inflammatory role of ILG in the context of a viral infection. Our *in vitro* results indicate that the antiviral properties of ILG have minor consequence on the anti-inflammatory effect of ILG. In addition, our results clearly demonstrated that the PPAR γ pathway mediated, at least in part, the anti-inflammatory effect of ILG. In a similar manner to what we observed with 15d-PGJ₂ in a previous study, our results showed for the first time that the activation of PPAR γ is a key molecular event by which ILG reduced influenza-induced cytokine gene expression [8].

Because of the potent antiviral and anti-inflammatory activities of ILG *in vitro*, we used a mouse model of influenza infection to validate our results *in vivo*. We found that treatment of mice with ILG reduced the morbidity caused by PR8/H1N1 influenza infection. Indeed, our results clearly demonstrated that administering a soluble form of

ILG (ILG-p) to mice on day 0 until day 5 significantly reduced the weight loss of treated-mice. The difference became apparent at day 5 post-infection but was more sustained after day 10 p.i. and up to day 17 p.i. This suggests that ILG modulates cellular and molecular events that allow a better recovery of infected mice. We believe that dampening the inflammatory response might be one of the mechanism by which ILG acted. Indeed, treatment of mice with ILG significantly decreased the mRNA expression of several inflammatory cytokines, namely TNF- α , IL1- β , and chemokines: CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 and MIP-2.

The virus-induced cytokine response is necessary for the activation of the immune system and to eliminate the viruses, but as previously discussed, hypercytokinemia can also lead to host lung damage [5, 41]. Therefore, its dampening to lower levels would reduce the severity of the damages and lower the mortality. Indeed, and in agreement with our findings, we and others have showed that the activation of PPAR γ by 15d-PGJ₂ or rosiglitazone protected mice against influenza infection by reducing the inflammatory response induced after infection [8, 16]. However, because of its intrinsic antiviral activity, ILG in contrast to 15d-PGJ₂ and rosiglitazone, may have inhibited the influenza virus replication in the lungs of infected mice. Therefore, the antiviral, the anti-inflammatory and the antioxidant properties of ILG, together might have contributed to the beneficial effect of this molecule. Thus, this molecule acts as a cocktail-like drug in the treatment of influenza infection.

The reduction observed in lung cytokine gene expression after ILG-p treatment prompted us to verify if it also attenuated the infiltration of immune cells into the lungs. We first evaluated this hypothesis by performing flow cytometric analyses of the innate immune cell populations recruited into the airways of infected mice 3 days post-infection. The administration of ILG in infected mice led to an important reduction in the numbers of neutrophils, NK, monocytes, dendritic cells and macrophages. During viral infections, this acute inflammatory cell response is necessary to contain pathogens, but on the other hand, the infiltrated leukocytes also contribute to the production of cytokines, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide that can cause lung damages.

Although CD8⁺ CTLs play an important role in clearing virus infected cells, it is well known that they also can exacerbate pathology and cause mortality at higher viral doses of infection.

Indeed, an improper recruitment of effector CD8⁺ T cells with high cytolytic activity can significantly contribute to the immunopathology caused by the influenza virus [42-45]. The activation of CD8⁺ T cells occurs in the lymph nodes following antigen recognition through the TCR. This leads to the downregulation of CD62L expression on CD8⁺ T cells and to the upregulation of the CD44 surface marker [46]. Effector CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}) then migrate to the lungs governed by gradients of chemokines such as CCL3 and CXCL10, which act through CCR5 and CXCR3 receptors expressed on the surface of the T cells [28]. In this study, we demonstrated that mouse treatment with ILG-p reduced the number of effector CD8⁺ T cells (CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}) and the virus-specific effectors (NP-CD8⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo} IFN γ ⁺) that migrate into the airways of infected mice. The analyses of the gene expression of several chemokines in the lungs of the mice at day 8 p.i revealed that only the expression of chemokine CCL5 was reduced in the airways of ILG-p-treated mice compared to untreated mice. We did not observe any significant decrease in the expression of other chemokines such as CCL3 and CXCL10 in the lungs of treated mice (Figure S3). Thus, the lower number of CD8⁺ T cells in the airways of ILG-p-treated mice seems unlikely to be mediated through the reduced expression of chemokines, unless CCL5 is an essential mediator for CD8⁺ T cell migration. This chemokine is known to be involved in the recruitment of T cells into the lungs during influenza infection, but whether its expression is essential is unknown. Although the reduced number of CD8⁺ T cells is more likely attributable to the early reduction in lung viral loads in ILG-treated mice, the analysis of chemokine gene expression at day 6 p.i., might provide further explanations of the lower number of effector CD8⁺ T cells. In agreement with this hypothesis, a previous study has shown that the PPAR γ agonist pioglitazone decreased the early expression of CCL2 and CCL7 chemokines and ultimately the recruitment of tipDCs to the airways, which translated into reduced morbidity of infected mice.

These tipDCs were shown to play an important role in the proliferation of influenza-specific CD8⁺ T cells and their recruitment in infected lungs [17]. Thus, our study

revealed that reducing the hyperactivity of the immune system with the immunomodulatory properties of ILG-p can attenuate the severity of the infection. The decrease in effector CD8⁺ T cells in the lungs of treated mice correlated with a reduced expression of IFN- γ , a cytokine characteristically produced by activated virus-specific CD8⁺ T cells during influenza infection [47]. This reduction in IFN- γ gene expression is unlikely to affect the clearance of the virus since lung viral titers have already considerably decreased by this time point during influenza infection.

Collectively, our study demonstrated that ILG is a dual PPAR γ and Nrf2 agonist with antiviral and anti-inflammatory properties that protects against influenza virus infection. Specifically, we showed that a treatment with a more soluble form of ILG led to reduced morbidity, viral titers, inflammatory cytokine and chemokine expression, and recruitment of inflammatory cells into the airways of infected mice. Therefore, our results add value to previous published studies suggesting that targeting PPAR γ has beneficial effects during influenza challenge. Moreover, our results suggest that novel influenza antiviral drugs could be developed based on the intrinsic activities of ILG that combines antiviral, anti-inflammatory and antioxidant properties. Finally, it is worth considering that targeting the PPAR γ pathway with drugs such as ILG to treat other inflammatory or infectious disorders where excessive immune responses contribute to the pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Isabelle Marois (Université de Sherbrooke) for expert technical assistance.

Table 1. PCR primer sequences used for gene expression analysis

Gene name	Primer sequence
Human TNF- α	Fw: 5'-TCTCGAACCCCGAGTGACAA-3' Rv: 5'-TGAAGAGGACCTGGGAGTAG-3'
Human IFN- α	Fw: 5'-AGCCATCTCTGTCCTCCATGA-3' Rv: 5'-CATGATTTCTGCTCTGACAACC-3'
Human IFN- β	Fw: 5'-GCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCAC-3' Rv: 5'-CAATAGTCTCATTCCAGCCAGTGC-3'
Mouse TNF- α	Fw: 5'-CCAAAGGGATGAGAAGTTCC-3' Rv: 5'-CTCCACTTGGTGGTTTGCTA-3'
Mouse IL-1- β	Fw: 5'-AAGGAGAACCAAGCACGACAAAA-3' Rv: 5'-TGGGGA ACTCTGCAGACTCAA ACT-3'
Mouse IL-6	Fw: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACAA-3' Rv: 5'-GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC-3'
Mouse IFN- β	Fw: 5'-AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT-3' Rv: 5'-GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT-3'
Mouse IFN- γ	Fw: 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' Rv: 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
Mouse CCL2	Fw: 5'-GCTCTCTCTTCCCTCCACCA-3' Rv: 5'-GCGTTAACTGCATCTGGCT-3'
Mouse CCL3	Fw: 5'-ACTGCCTGCTGCTTCTCCTAC-3' Rv: 5'-AGGAAAATGACACCTGGCTGG-3'
Mouse CCL5	Fw: 5'-TCGTGCCACGTCAAGGAGTATTT-3' Rv: 5'-TCTTCTCTGGGTTGGCACACACTT-3'
Mouse CXCL10	Fw: 5'-GGATGGCTGTCCTAGCTCTG-3' Rv: 5'-TGAGCTAGGGAGGACAAGGA-3'
Mouse MIP2	Fw: 5'-AGTGA ACTGCGCTGTCAATGC-3' Rv: 5'-AGGCAA ACTTTTTGACCGCC-3'
Human/Mouse 18S	Fw: 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' Rv: 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'

REFERENCES

1. Stohr, K., *Preventing and treating influenza*. BMJ, 2003. **326**(7401): p. 1223-4.
2. Both, G.W., et al., *Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites*. J Virol, 1983. **48**(1): p. 52-60.
3. Treanor, J., *Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift*. N Engl J Med, 2004. **350**(3): p. 218-20.
4. Mina, M.J. and K.P. Klugman, *The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(9): p. 750-763.
5. Damjanovic, D., et al., *Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe*. Clin Immunol, 2012. **144**(1): p. 57-69.
6. Reshi, M.L., Y.C. Su, and J.R. Hong, *RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death*. Int J Cell Biol, 2014. **2014**: p. 467452.
7. Schwarz, K.B., *Oxidative stress during viral infection: a review*. Free Radic Biol Med, 1996. **21**(5): p. 641-9.
8. Cloutier, A., et al., *The prostanoid 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin-j2 reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection*. J Infect Dis, 2012. **205**(4): p. 621-30.
9. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 86.
10. Lee, I.T. and C.M. Yang, *Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 791231.
11. de Jong, M.D., et al., *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1203-7.
12. Walsh, K.B., et al., *Suppression of cytokine storm with a sphingosine analog provides protection against pathogenic influenza virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12018-23.
13. Hussell, T., A. Pennycook, and P.J. Openshaw, *Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology*. Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2566-73.
14. Perrone, L.A., et al., *Mice lacking both TNF and IL-1 receptors exhibit reduced lung inflammation and delay in onset of death following infection with a highly virulent H5N1 virus*. J Infect Dis, 2010. **202**(8): p. 1161-70.
15. Budd, A., et al., *Increased survival after gemfibrozil treatment of severe mouse influenza*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(8): p. 2965-8.
16. Moseley, C.E., R.G. Webster, and J.R. Aldridge, *Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice*. Influenza Other Respir Viruses, 2010. **4**(5): p. 307-11.
17. Aldridge, J.R., Jr., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5306-11.
18. Zhou, L., et al., *Separation, characterization and dose-effect relationship of the PPARgamma-activating bio-active constituents in the Chinese herb formulation 'San-Ao decoction'*. Molecules, 2009. **14**(10): p. 3942-51.

19. Kim, J.Y., et al., *Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages*. Eur J Pharmacol, 2008. **584**(1): p. 175-84.
20. Kumar, S., et al., *Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(10): p. 1602-12.
21. Ryu, Y.B., et al., *Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(3): p. 971-4.
22. Dao, T.T., et al., *Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from Glycyrrhiza inflata*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(1): p. 294-8.
23. Hung, H.C., et al., *Aurintricarboxylic acid inhibits influenza virus neuraminidase*. Antiviral Res, 2009. **81**(2): p. 123-31.
24. Samson, M., et al., *Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors*. Antiviral Res, 2013. **98**(2): p. 174-85.
25. Lee, S.H., et al., *Isoliquiritigenin, from Dalbergia odorifera, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages*. Inflamm Res, 2009. **58**(5): p. 257-62.
26. Chen, H., et al., *Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation*. Cell Biol Int, 2013. **37**(11): p. 1215-24.
27. Marois, I., et al., *Initial infectious dose dictates the innate, adaptive, and memory responses to influenza in the respiratory tract*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(1): p. 107-21.
28. Fadel, S.A., et al., *CXCR3-deficiency protects influenza-infected CCR5-deficient mice from mortality*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3376-87.
29. Kash, J.C., et al., *Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus*. Nature, 2006. **443**(7111): p. 578-81.
30. Wang, Z., et al., *Early hypercytokinemia is associated with interferon-induced transmembrane protein-3 dysfunction and predictive of fatal H7N9 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 769-74.
31. Cho, H.Y., et al., *Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(2): p. 138-50.
32. Kosmider, B., et al., *Nrf2 protects human alveolar epithelial cells against injury induced by influenza A virus*. Respir Res, 2012. **13**: p. 43.
33. Yageta, Y., et al., *Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 4679-90.
34. Chen, W.C., et al., *Lucidone suppresses hepatitis C virus replication by Nrf2-mediated heme oxygenase-1 induction*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(3): p. 1180-91.
35. Lee, J.C., et al., *Andrographolide exerts anti-hepatitis C virus activity by up-regulating haeme oxygenase-1 via the p38 MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(1): p. 237-52.
36. Kesic, M.J., et al., *Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 444-53.

37. Hashiba, T., et al., *Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice*. *Gene Ther*, 2001. **8**(19): p. 1499-507.
38. Cummins, N.W., et al., *Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice*. *FASEB J*, 2012. **26**(7): p. 2911-8.
39. Lehmann, E., et al., *The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 398-404.
40. Kedzierski, L., et al., *Suppressor of cytokine signaling 4 (SOCS4) protects against severe cytokine storm and enhances viral clearance during influenza infection*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(5): p. e1004134.
41. Liu, Q., et al., *Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A (H1N1) virus infection*. *Acta Pharmacol Sin*, 2013. **34**(8): p. 1075-83.
42. Hogan, R.J., et al., *Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections*. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 1813-22.
43. Woodland, D.L. and J.E. Kohlmeier, *Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 153-61.
44. Moskophidis, D. and D. Kioussis, *Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model*. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 223-32.
45. Wiley, J.A., et al., *Production of interferon-gamma by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(1): p. 119-30.
46. Cerwenka, A., T.M. Morgan, and R.W. Dutton, *Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial*. *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5535-43.
47. Belz, G.T., W. Xie, and P.C. Doherty, *Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8+ T cell responses*. *J Immunol*, 2001. **166**(7): p. 4627-33.

Article 2

Nrf2 Activation Leads to Reduction of Influenza Virus Replication through SLPI-Dependent Inhibition of TMPRSS2 Activity in Human Airway Epithelial Calu-3 Cells

Auteurs de l'article : Hussein Traboulsi, Alexandre Cloutier, Martin V. Richter

Avant-propos : J'ai réalisé toutes les expériences et j'ai rédigé la première version du manuscrit. Alexandre Cloutier a corrigé le manuscrit.

Statut de l'article : Soumis dans Journal of virology le 20 juin 2016.

Cet article contribue à répondre à l'objectif 2.

Résumé : Les protéases de type trypsine du tractus respiratoire telles que les protéases à sérines transmembranaires de type II (TMPRSS2) sont impliquées dans l'activation protéolytique de l'hémagglutinine du virus influenza, un processus qui est indispensable pour rendre le virus infectieux. Quelques études ont indiqué que l'utilisation des antioxydants (agonistes de Nrf2) peut moduler l'activité de ces protéases. Cependant, si Nrf2 est impliqué dans le rôle antiviral de ces molécules, son mécanisme n'est pas bien défini. Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois la relation entre l'activation de la voie Nrf2, l'induction de l'inhibiteur des protéases SLPI et l'inhibition de l'activité de la TMPRSS2 (une des protéases clés dans l'activation du virus influenza) par SLPI, dans la protection contre l'infection par le virus influenza. En effet, nous avons observé que l'activation de la voie Nrf2 par son agoniste synthétique CDDO-me induit l'expression de l'antiprotéase SLPI, ce qui diminue l'activité des protéases à sérine, et par conséquent réduit la réplication du virus dans les cellules épithéliales bronchiques humaines Calu-3. De plus, nous avons montré qu'en supprimant l'expression de Nrf2 et de SLPI, avec des siRNA dirigés contre ces deux gènes, l'activité antivirale de CDDO-me est complètement abrogée.

Enfin, nous avons démontré que le traitement avec la protéine SLPI humaine recombinante réduit la réplication du virus influenza dans les Calu-3 et dans les cellules MDCK sur-exprimant la protéase TMPRSS2. En conclusion, cette étude décrit un mécanisme par lequel des activateurs de Nrf2 protègent les cellules épithéliales contre une infection par le virus de la grippe. En effet, nous dévoilons la relation entre l'activation de la voie Nrf2, l'induction de l'antiprotéase SLPI, l'inhibition de l'activité de la TMPRSS2 par SLPI et la diminution de la réplication virale. Cette étude pourrait donc favoriser le développement des nouvelles stratégies pour le traitement de la grippe basées sur les agonistes de Nrf2.

Manuscrit de l'article 2

Nrf2 Activation Leads to Reduction of Influenza Virus Replication through SLPI-Dependent Inhibition of TMPRSS2 Activity in Human Airway Epithelial Calu-3 Cells

Hussein Traboulsi¹, Alexandre Cloutier¹, Martin V. Richter^{1#}

¹ Department of Medicine, Pulmonary Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, and Centre de recherche du CHUS, Sherbrooke, Québec, Canada.

Corresponding author: Martin Richter, Department of Medicine, Pulmonary Division, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, and Centre de recherche du CHUS, 3001, 12e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

E-mail: Martin.Richter@USherbrooke.ca

Running title: SLPI inhibits TMPRSS2-dependent IAV replication

Word counts: Abstract = 231 words, Importance = 134 words, Text: 6309 words

ABSTRACT

Trypsin-like serine proteases of the respiratory tract such as type II transmembrane serine proteases are involved in the proteolytic activation of influenza A virus (IAV) hemagglutinin, a process that is indispensable for virus infectivity. Reports suggest that the induction of antiproteases such as secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) with antioxidant molecules can reduce IAV replication in vitro. Other studies have demonstrated that the antioxidant factor Nrf2 exhibits antiviral activity during IAV challenge. In this study, we demonstrated for the first time the relationship between the activation of the Nrf2 antioxidant pathway and the induction of the antiprotease SLPI, and the inhibition of TMPRSS2 activity by SLPI in the protection against influenza virus infection. Indeed, we demonstrated that the induction of the Nrf2 pathway using bardoxolone (CDDO-me) potently inhibits IAV replication in human bronchial epithelial Calu-3 cells in an SLPI-dependent manner. We showed that Nrf2 knockdown with siRNA suppressed CDDO-me antiviral activity. We further demonstrated that SLPI knockdown also abolished the antiviral activity of CDDO-me. Furthermore, we demonstrated that Nrf2 activation leads to the induction of SLPI expression, which in turn decreases the proteolytic activity of TMPRSS2 resulting in decreased IAV replication. Finally, we showed that treatment with recombinant SLPI reduced IAV replication in human bronchial epithelial cells and in TMPRSS2-overexpressing MDCK cells. Our study thus defines a mechanism by which Nrf2 activators protect human bronchial epithelial cells against influenza virus infection.

IMPORTANCE

Year after year, influenza viruses continue to pose a threat to humans. To become infectious and establish infection in the host, the influenza virus needs to be activated through the cleavage of its surface hemagglutinin by host cell proteases. Therefore, understanding how the activity of these host proteases is regulated might help to identify novel therapeutic molecules. In this study, we show for the first time that CDDO-me inhibits influenza virus replication by activating the antioxidant Nrf2 pathway, which induces the expression of the antiprotease SLPI in lung epithelial cells. Finally, we demonstrate that SLPI inhibits the activity of the protease TMPRSS2, which cleaves the influenza virus hemagglutinin and promotes virus replication. Collectively, our results revealed the Nrf2-SLPI pathway as a potential therapeutic target to interfere with influenza activation and to control influenza infection.

INTRODUCTION

Influenza A viruses (IAV) represent a worldwide threat to global public health and are responsible for seasonal epidemics and pandemics. The World Health Organization estimates 3 to 5 million cases of severe illness and up to 500 000 deaths worldwide to be caused by the virus each year. Due to the genetic mutations of influenza virus that occur during replication, the virus can produce variants that can escape from the immune system and that can become resistant to current antivirals (1-3). Therefore, it is primordial to understand how the virus interacts with its host and the basic mechanisms involved in host defense against the virus in order to identify new molecules or approaches that could lead to the development of new therapeutic drugs for influenza treatment.

Upon virus entry in airway epithelial cells, the proteolytic cleavage of influenza hemagglutinin HA₀ into subunits HA₁ and HA₂ occurs and is essential for influenza virus infectivity. This cleavage is mediated by host trypsin-like serine proteases expressed by epithelial cells (4). Several studies have identified specific host proteases expressed in the respiratory epithelium such as type II transmembrane serine proteases (TTSPs) that are involved in influenza HA activation and viral infectivity. These TTSPs include transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS 2), TMPRSS4, human airway trypsin-like protease (HAT), mosaic serine protease large-form (MSPL) and matriptase (5-10). TTSP activity can be reduced by endogenous protease inhibitors such as secreted serpins (α_1 -antitrypsin; serpinA1, anti-thrombin III; serpinC1, plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1; serpinE1) and α_2 -antiplasmin; serpinF2) and by the hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) (11-13). Interestingly, the secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) has been shown to inhibit the activity of serase-1B, a splice variant of polyserase-1/TMPRSS9 (14). SLPI is constitutively expressed and secreted in the mucosal surfaces of various tissues and limits the acute inflammatory response during host defense and protects epithelial tissues from the action of serine proteases (15-17). SLPI was shown to inhibit influenza replication in vitro as well as in a rat model of influenza infection but the target proteases inhibited in vivo remain to be identified (18-20).

The Nrf2 antioxidant pathway has been shown to decrease influenza replication and to reduce inflammation and cell injury upon infection (21-23). Nrf2 is a ubiquitously expressed transcription factor belonging to the basic leucine zipper family and in the lungs is found

predominantly in the epithelium and in alveolar macrophages (24, 25). The Nrf2 protein has a high turnover with a half-life of approximately 10–20 min because Nrf2 is sequestered in the cytosol by a Keap1 homodimer, which targets Nrf2 for constitutive degradation (26, 27). In the literature, molecules that interact with Keap1, promote the release of Nrf2 and that block Nrf2 degradation are commonly called Nrf2 activators (28). The gene expression of several phase II antioxidant enzymes is regulated by Nrf2 through its binding to antioxidant response elements (AREs) found on their promoters (29). In a mouse model of influenza infection, Nrf2 was shown to be protective under oxidative stress conditions induced by cigarette smoke exposure (CS) (30). The rate of mortality, lung inflammation and the extent of lung damages were higher in Nrf2-deficient mice infected and exposed to CS compared to wild-type mice suggesting that Nrf2 is crucial factor for protection against the infection and in the resolution of the disease. However, it is not clear by which mode of action Nrf2 exerts its antiviral activity. For instance, two independent studies showed that the epigallocatechin gallate (EGCG), a well-known Nrf2 activator, reduced influenza replication in MDCK cells by inhibiting influenza virus neuraminidase activity and by disrupting the integrity of the viral envelope (31, 32). In addition, EGCG was shown to affect influenza virus entry and to increase the expression of antiviral mediators such RIG-I, IFN- β , and MxA in nasal epithelial cells (22). In contrast, Nrf2 overexpression did not induce the expression of antiviral genes in alveolar type I-like cells but rather activated antioxidant mechanisms responsible for the cellular protection against IAV (21). Therefore, in this study, we sought to elucidate the mechanisms mediating the antiviral activity of Nrf2. For this purpose, we tested the antiviral activity of the triterpenoid methyl 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)dien-28-oate (CDDO-me or bardoxolone), a potent synthetic Nrf2 activator, against influenza viruses in human bronchial epithelial cells (33, 34). Here, we show that CDDO-me increased the expression of the protease inhibitor SLPI, in an Nrf2-dependent manner, which in turn decreased the activity of the TMPRSS2 protease leading to reduction of IAV replication in human bronchial epithelial Calu-3 cells. We also demonstrated that Nrf2 or SLPI knockdown abolished the antiviral activity of CDDO-me. Finally, we show that recombinant SLPI reduced influenza replication in human bronchial epithelial cells and in TMPRSS2-overexpressing MDCK cells. Taken together, our findings show that modulation of the antiprotease SLPI expression using Nrf2 activators such as CDDO-me could be an interesting therapeutic strategy to reduce influenza infection.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and products

Methyl 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)dien-28-oate (CDDO-me) was purchased from Cayman Chemical. Sulforaphane (SFN) was purchased from Alexis Biochemical. CDDO-me and sulforaphane were dissolved in DMSO. The RNA Extraction Reagent RiboZol was purchased from Amresco. Recombinant human SLPI was purchased from Life Technologies (10343-H07B-25). Recombinant HAT was a generous gift of Dr. Richard Leduc (Institut de pharmacologie de Sherbrooke).

Cell lines and viruses

Human bronchial epithelial cells (Calu-3; HTB-55), Madin Darby canine kidney cells (MDCK; CCL-34) and human embryonic kidney cells (293T; CRL-3216) were obtained from American Type Culture Collection. Cells were cultured using standard methods at 37°C in 5% CO₂/95% air in EMEM (Calu-3 and MDCK) or DMEM (293T) supplemented with 10% FBS, antibiotics (streptomycin 100 mg/ml and penicillin 100 U/ml), 5% sodium pyruvate, 5% nonessential amino acids, and 2 mM L-glutamine (complete EMEM; Wisent Inc.). For air-liquid culture of Calu-3, cells were seeded in Transwell inserts (0.4- μ m-pore-size membrane) and cultured initially with EMEM (added in upper and lower chambers). Upper chamber medium was removed 24h after seeding. Cells were cultured for 10 days to reach confluence and to allow tight-junction formation. The MDCK cell line expressing human TMPRSS2 (MDCK-TMPRSS2) was generated by transfecting MDCK cells with the pcDNA3.1-TMPRSS2-myc-His plasmid, which contains the cDNA encoding the human transmembrane protease serine 2 isoform 2 (NM_005656). MDCK cells were transfected using the Amaxa Nucleofector II device (Lonza) using the A-024 program. Transfectants were selected with G418 (500 μ g/ml; Wisent Inc.) and then further cultivated in medium containing this antibiotic. Original viral stocks of the mouse-adapted strains A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) and A/Hong Kong/X-31 (H3N2; X-31) were provided by Dr. David Topham (University of Rochester Medical Center). X-31 and PR8 viruses were amplified in 10-day-old embryonated hens' eggs as described previously (35). p2009/H1N1 (A/California/7/2009-like) was an isolate of the 2009 H1N1 pandemic virus that was obtained from Hugues Charest (Institut National de Santé Publique du Québec) and was propagated in MDCK cells.

Luciferase assays

The day before transfection, 293T cells (1.5×10^5) were plated in 24-well tissue culture-treated plates. Cells were transiently transfected with the 0.1 μg of hQR41-Luc plasmid (which contains a single copy of ARE derived from the human NQO1 promoter; kindly provided by Dr. Jeffrey Johnson, University of Wisconsin) using FuGENE®6 transfection reagent (Promega) (36). The day after transfection, cells were treated with SFN (10 μM) or CDDO-me (0.1 μM) for 24 h. The cell lysates were then assayed for luciferase activity using the luciferase assay system from Promega.

Immunoblotting

Calu-3 cells were harvested at 48 h post-treatment with DMSO or CDDO-me and cell lysates were prepared using lysis buffer (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 137mM, Triton X-100 0.5%, Leupeptin 10 µg/ml, Aprotinin 10 µg/ml, Pepstatin 10 µg/ml and PMSF 1mM). After centrifugation, total protein concentrations were determined by Bradford protein assay (Bio-Rad). 25 or 50 µg of cellular lysates were subjected to 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare). Proteins were detected using specific antibodies to Nrf2 (#12721 (D1Z9C); Cell Signaling Technology Inc.), SLPI (4249; ProSci) and GAPDH (AM4300; Ambion). Antigen-antibody complexes were stained with anti-rabbit or anti-mouse, horseradish peroxidase-conjugated antibodies (1:10000, GE Healthcare) and detected with Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Films were scanned using a dual lens Epson Perfection v700 Photo scanner and the EPSON Scan Ver. 3.25A software (Epson). Quantification of protein-band intensities was performed by densitometric analysis using NIH ImageJ software. Densitometry results are presented as fold induction where the ratio of each Nrf2 or SLPI lane to its GAPDH lane is normalized to the ratio of the control (vehicle-treated cells).

Real-time polymerase chain reaction analyses

Total RNA was extracted from Calu-3 cells using Ribozol reagent according to the manufacturer's protocol. 500 ng of the resulting RNA was then reverse transcribed using iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR kit (Bio-Rad). Real-time polymerase chain reactions were performed with the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Amplification plots were generated using the Rotorgene 6000 Application software version 1.7 (Corbett Research), and fold induction was calculated using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method using 18S expression for normalization. The sequence of primers used are: 18S: Fw: 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' and Rv: 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'; SLPI: Fw: 5'-TGCCTGGATCCTGTTGACAC-3' and Rv: 5'-CAGGAATCAAGCTTTCACAGGG-3'; TNF- α : Fw: 5'-TCTCGAACCCCGAGTGACAA-3' and Rv: 5'-TGAAGAGGACCTGGGAGTAG; IL-1 β : Fw: 5'-TTCTTCGACACATGGGATAACG -3' and Rv: 5'-TGGAGAACACCACTTGTTGCT-3'; IL-6: Fw: 5'-TAATGGGCATTCCTTCTTCT-3' and Rv: TGTCCTAACGCTCATACTTTT.

ELISA analysis of SLPI protein

Calu-3 cells were stimulated with DMSO or CDDO-me and cell supernatants were harvested at 24h or 48 h post-treatment and stored at -70°C. Cell supernatants were analyzed for SLPI protein content using commercially available ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's instruction.

Cell viability assays

For cytotoxicity assays, Calu-3 were seeded (5.0×10^4 cells/well in 96-well culture plates) and incubated at 37°C in complete medium for 24 h before drug treatment. Cells were cultured for 48h with CDDO-me at various concentrations (0,01 μ M-1 mM). At the end of the incubation period, cell viability was assessed using the XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4- nitro-5-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay (Life Technologies). The spectrophotometric absorbance of the samples was measured using a microplate reader (Thermomax microplate reader, Molecular Devices) at 450 nm with a reference wavelength of 690 nm. Each measurement was performed in triplicate and the data reported were mean values of at least 2 experiments. Cell viability (%) was calculated according to the following equation: Cell viability (%) = ($A_{\lambda 450}$ of treated wells/ $A_{\lambda 450}$ of control wells) \times 100. CC_{50} values were calculated using nonlinear regression curve fit with a variable slope using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc.).

Measurement of trypsin-like serine protease activity

Fluorogenic substrate containing the consensus cleavage site for trypsin-like serine proteases (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC) (R&D systems) was used to quantify the activity of proteases in the supernatants of CDDO-me- or SLPI-treated Calu-3 cells. To this end, Calu-3 cells were treated either with DMSO, CDDO-me (0.3 μ M) or recombinant human SLPI (rhSLPI, 125 or 500 nM). The supernatants were then collected 12 h post-treatment (for SLPI treatment) or 24 h (for CDDO-me treatment). Enzyme activities were monitored by measuring the release of fluorescence (excitation, 360 nm; emission, 441 nm) from Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (200 μ M, Bachem Biosciences) induced by the proteases contained in 90 μ l of cell supernatant for 20 min at 37 °C in a FLX-800 TBE microplate reader (Bio-Tek Instruments). The effect of recombinant human SLPI on TMPRSS2 activity was also assessed using supernatant of MDCK-TMPRSS2 cells, which only expressed human TMPRSS2 as type II transmembrane serine protease. The

effect of recombinant human SLPI on HAT activity was also assessed using recombinant HAT. The results shown represent the velocity of the reaction (mFU/min).

siRNA knockdown of Nrf2 and SLPI

Nrf2 and SLPI were knocked down using specific siRNAs. Briefly, 2.5×10^5 Calu-3 cells were seeded into 24-well plates in complete EMEM. After 24 h, siRNAs targeting Nrf2 (sc-37030, Santa Cruz Biotechnology Inc.) or SLPI (sc-42977, Santa Cruz Biotechnology Inc.) were then used to knockdown the expression of these two proteins. The AllStars Negative Control siRNA was purchased from Qiagen and was used as control. siRNA transfections (20 nM) were carried out using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Cells were incubated for 72 h and then treated with DMSO or CDDO-me for 24 h. At this point, knockdown of Nrf2 or SLPI was determined by immunoblotting using specific antibodies. In separate experiments, cells were infected 72 h post-siRNA transfection with PR8 virus (MOI of 0.01) to assess the role of Nrf2 and SLPI in CDDO-me-mediated inhibition of influenza replication. Supernatants were collected 48 h p.i. and titrated as described below.

In vitro antiviral assay

Calu-3 cells were infected with PR8 (3×10^3 PFU/ml) for 1 hour and then treated with DMSO (vehicle control), CDDO-me (0.3 μ M) or the indicated concentrations of recombinant human SLPI (rhSLPI). After 2 days, supernatants were collected and diluted 10-fold in series. To titrate the virus in supernatants, serial dilutions were used to infect MDCK cells seeded in 24-well plates for 1 h. MDCK were then washed with PBS and incubated in EMEM containing Avicel 1.8% (FMC Biopolymer) and 1 μ g/ml of TPCK-treated trypsin. After 48 h at 37°C 5% CO₂, cells were washed and fixed with Carnoy fixative (methanol: acetic acid, 3:1) for 20 min at 4°C. Viral plaques were revealed by staining with 1% crystal violet solution in 20% methanol/water, 5–10 min. Numbers of viral plaques were counted, and lung viral titers were calculated based on the dilution factor.

Statistical analyses

Comparison of data from two groups was analyzed using the unpaired Student's t test. For comparison of more than two groups, one-way ANOVA (column data) or two-way ANOVA (grouped data) analyses were performed followed by the appropriate post-hoc test using GraphPad Prism 6 software. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant (* *p* < 0.05;

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$). Results are shown as means \pm standard deviation (SD).

RESULTS

CDDO-me activates Nrf2 and increases SLPI expression

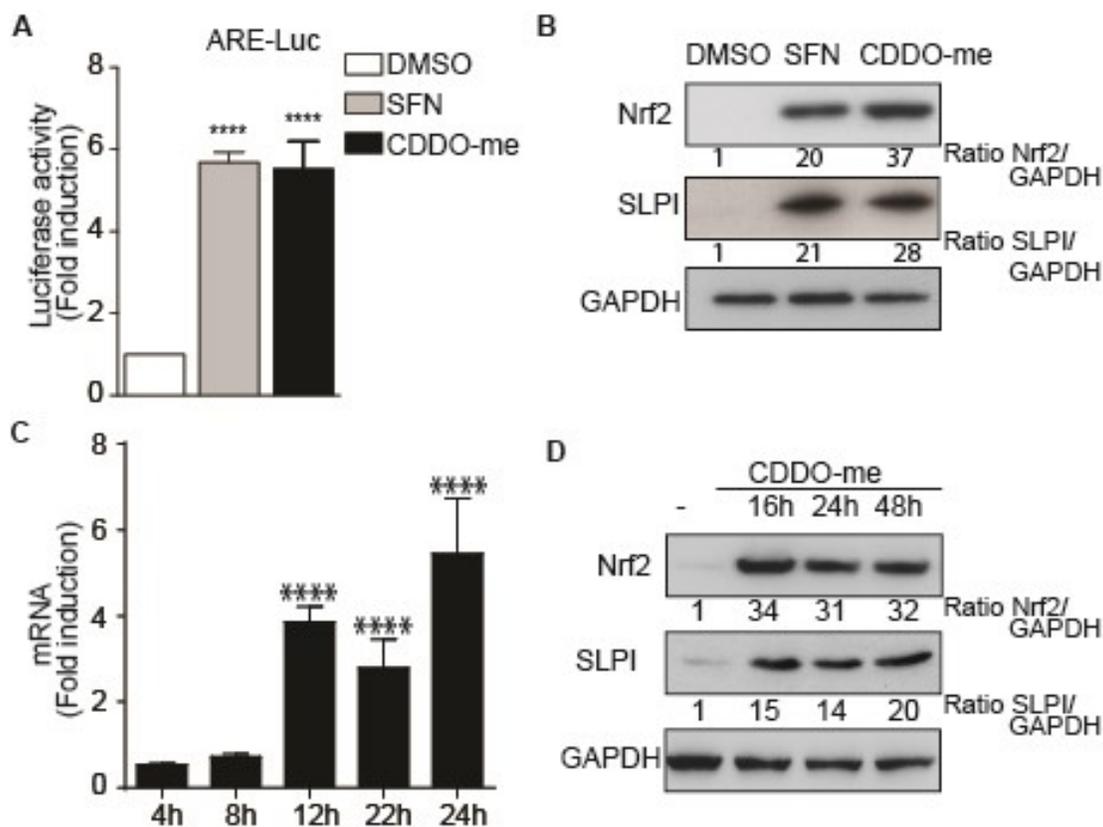
To clarify the antiviral mechanism mediated by Nrf2 activation during IAV replication, we used molecules that are known to release Nrf2 from its inhibitor Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), thereby promoting Nrf2 translocation to the nucleus. First, we chose two known Nrf2 activators: sulforaphane (SFN) and CDDO-me (37, 38). To compare the efficacy of the two compounds to promote Nrf2 activation, human embryonic kidney 293 cells (293T) were transfected with an ARE-luciferase reporter plasmid containing the Nrf2 response element. The next day after transfection, cells were treated with vehicle control (DMSO), SFN (10 μ M) or CDDO-me (0.1 μ M) for 24 h. While the two compounds were able to induce ARE-driven luciferase activity, CDDO-me was the most potent activator. Indeed, a 100-fold lower concentration of CDDO-me compared to SFN led to similar promoter activation (5.5-fold for CDDO-me vs 5.6-fold for SFN; Fig. 1A).

Given the crucial role of the respiratory proteases during IAV replication and knowing that Nrf2 can regulate the protease/antiprotease balance in the lungs, we evaluated if Nrf2 activation increased the expression of SLPI in human bronchial epithelial (Calu-3) cells (17). Calu-3 cells originate from a human pulmonary adenocarcinoma and have been well characterized as human bronchial epithelial cells with a mixed phenotype derived from submucosal gland serous cells (39, 40). Indeed, the Calu-3 cell line has been found to be the most appropriate cell line for studying bronchial epithelium, due to its closest resemblance to this epithelium *in vivo* (41). Treatment of Calu-3 cells with CDDO-me (0.3 μ M) as well as with SFN (10 μ M) for 24 h induced Nrf2 protein synthesis by 37-fold and 20-fold, respectively (Fig. 1B). This result was expected since Nrf2 can autoregulate its own expression through ARE-like cis-elements found in its promoter (42). Interestingly, CDDO-me and SFN treatments also induced the expression of the antiprotease SLPI protein (Fig. 1B, 28-fold and 21-fold, respectively), but did not affect the expression of proteases such as TMPRSS2 and HAT in Calu-3 cells (Fig. S1).



Figure S1: CDDO-me treatment does not modify the expression of TMPRSS2

These results therefore suggest that Nrf2 activation affects the protease/antiprotease balance by inducing the expression of the antiprotease SLPI in Calu-3 cells. To gain more insight into Nrf2-mediated regulation of SLPI, we analyzed SLPI mRNA and protein levels at different time points after CDDO-me treatment. SLPI gene expression increased by 3.6-fold at 12 h post-treatment and reached a maximum of 5.4-fold at 24 h post-treatment (Fig. 1C). Accordingly, SLPI intracellular protein level increased by 15-fold at 16 h post-treatment and increase up to 20-fold 48 h post-treatment (Fig. 1D). Furthermore, CDDO-me treatment induced SLPI protein level in Calu-3 cell supernatants. Indeed, SLPI concentration in cell supernatants reached 3.2 ng/ml (2.9-fold increase compared to untreated cells) and 6 ng/ml (6-fold increase), 24 and 48 h post-treatment, respectively (Fig. 1E). It is noteworthy to mention that CDDO-me at concentrations lower than $1\mu\text{M}$ did not have any cytotoxic effect in Calu-3 cells as well as in 293T cells. Using the XTT assay, we determined that the CC_{50} of CDDO-me is $2.86\mu\text{M}$ in 293T cells and $4.87\mu\text{M}$ in Calu-3 cells after a 48-h incubation (Fig. 1F). Thus, these results demonstrate that CDDO-me treatment increases Nrf2 gene expression, induces Nrf2 stabilization and increases SLPI expression in human bronchial epithelial cells.



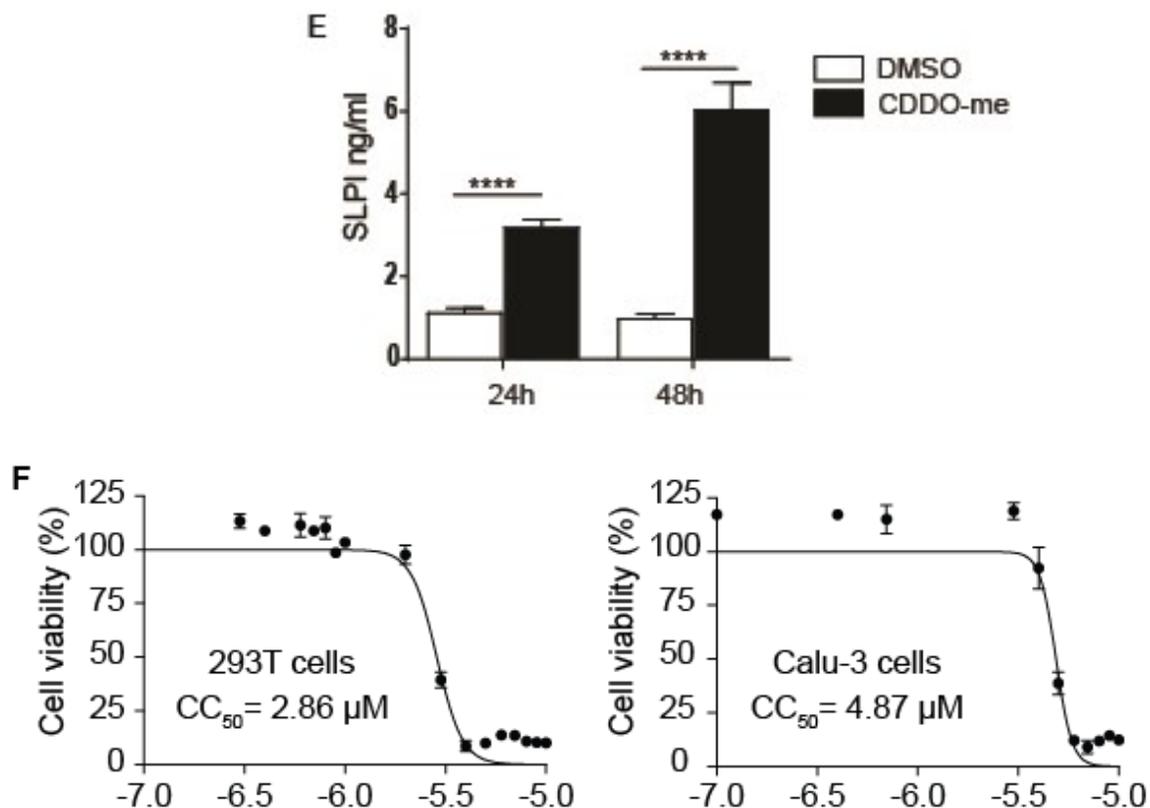


Figure 1: CDDO-me activates Nrf2 and increases SLPI expression. **A)** Human Embryonic kidney 293 T cells (293T) were transfected with 0.1 μg of ARE-luciferase reporter plasmid. Cells were then treated with DMSO (vehicle control), sulforaphane (SFN, 10 μM) or CDDO-me (0.1 μM) for 24 h prior to cell lysis and luciferase activity measurement. **B)** Human bronchial epithelial cells (Calu-3) were treated with SFN (10 μM) or CDDO-me (0.3 μM) for 24 h. Total cell extracts were then prepared and analyzed for the expression of Nrf2 and SLPI proteins by immunoblotting. GAPDH protein expression was used as a loading control. Nrf2 and SLPI expression was normalized to GAPDH by densitometry, and results are reported as fold change over untreated cell ratio, which was set to 1. **C)** Calu-3 cells were treated with 0.3 μM of CDDO-me for the indicated times. RNA was isolated and real-time polymerase chain reactions were performed to quantify SLPI gene expression. mRNA levels were normalized to ribosomal 18S expression and the results are presented as n-fold induction relative to DMSO-treated cells. **D)** Calu-3 cells were treated with CDDO-me (0.3 μM) for 16, 24, and 48 h. Total cell extracts were prepared and analyzed for the expression of Nrf2 and SLPI proteins by immunoblotting. Nrf2 and SLPI expression was normalized to GAPDH by densitometry, and results are reported as fold change over untreated cell ratio, which was set to 1. **E)** Calu-3 cells were stimulated with DMSO or CDDO-me and SLPI protein level in the supernatants was analyzed by ELISA assay at the indicated after stimulation. **F)** Cytotoxicity assessed by XTT cell viability assay in 293T and Calu-3 cells. CDDO-me concentrations reducing cell viability by 50% (CC₅₀) were determined from dose-response curves. Data shown in the figure represent the mean \pm SD of 3-5 independent experiments (**** $p < 0.0001$).

CDDO-me and SLPI decreases the activity of trypsin-like serine proteases

Since CDDO-me treatment led to Nrf2 activation and increased SLPI expression, we next sought to evaluate if the activity of trypsin-like serine proteases was affected by this treatment in human bronchial epithelial cells. To answer this question, we quantified trypsin-like serine protease activity in the supernatant of treated Calu-3 cells using a fluorogenic substrate containing the consensus cleavage site for these proteases (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC) (12). First, Calu-3 cells were treated with 0.3 μM of CDDO-me and the activity of trypsin-like serine proteases was quantified in the supernatants. Treatment with CDDO-me reduced trypsin-like serine protease activity by 52%. Indeed, while the velocity of the reaction was 6.4×10^4 fluorescence units (FU) min^{-1} in the supernatant from mock-treated cells, it was 2.7×10^4 FU min^{-1} in the supernatant of CDDO-me-treated cells (Fig. 2A). Furthermore, when Calu-3 cells were treated with 125 nM or 500 nM of recombinant human SLPI, trypsin-like serine protease activity was reduced by 27% and 56%, respectively (Fig. 2B). Next, we sought to identify which trypsin-like serine proteases expressed by Calu-3 cells was inhibited by SLPI treatment. Among this class of proteases, TMPRSS2, a TTSP, is strongly expressed in Calu-3 cells and has been shown to proteolytically activates influenza viruses and promote its replication in vivo (5, 43). In order, to assess if the activity of this enzyme was affected by SLPI, we generated an MDCK cell line that only expressed (MDCK-TMPRSS2). In MDCK-TMPRSS2 cell supernatant, an important trypsin-like serine protease activity was observed (6.4×10^4 FU min^{-1}). When MDCK-TMPRSS2 cell supernatant was incubated with recombinant human SLPI (125 nM or 500 nM), the trypsin-like serine protease activity was significantly reduced by 12% and 34%, respectively (Fig. 2C). In contrast, SLPI did not inhibit the activity of recombinant HAT (Fig. 2D).

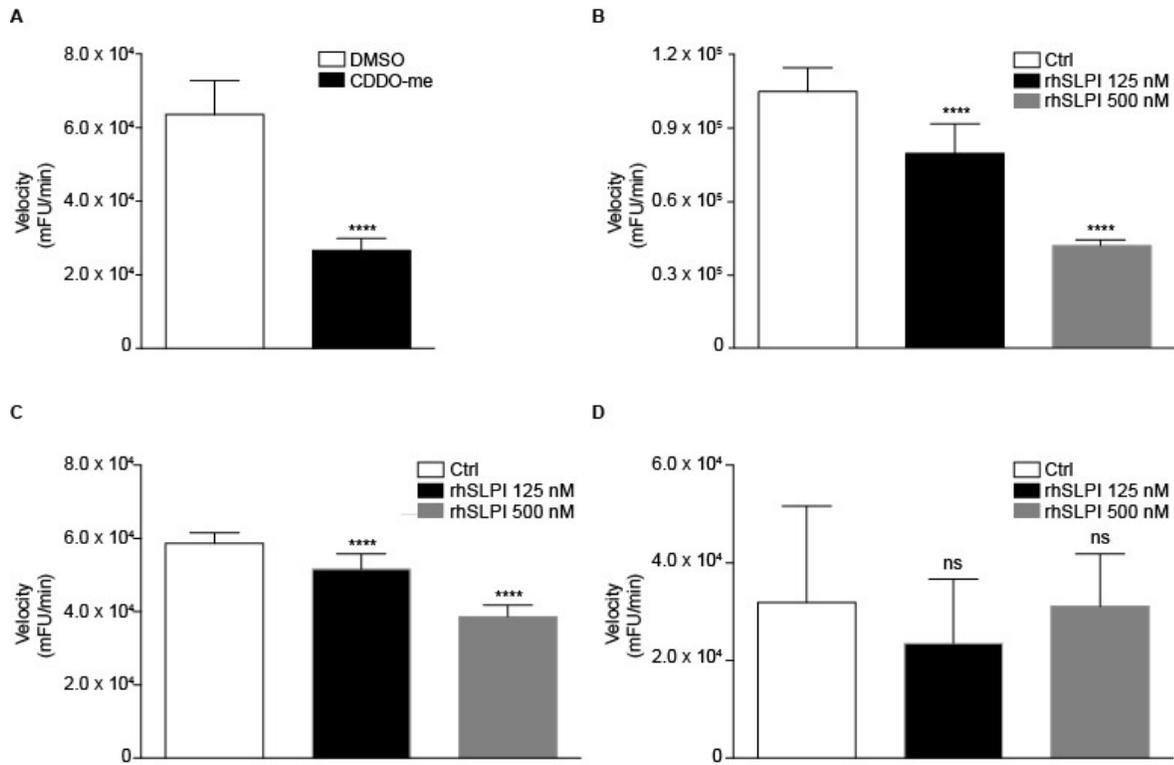


Figure 2

Figure 2: CDDO-me and SLPI treatments decrease trypsin-like serine protease activity in human bronchial epithelial cells. Calu-3 cells were treated with CDDO-me (0.3 μ M; **A**) or recombinant human SLPI (125 or 500 nM) **B**). Cell supernatants were collected 12h post-SLPI treatment or 24 h post-CDDO-me treatment and trypsin-like serine protease activity was examined using the fluorogenic substrate for trypsin-like proteases (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC). **C**) The effect of recombinant human SLPI on TMPRSS2 activity was also assessed using supernatant of MDCK-TMPRSS2 cells. Cell supernatants were incubated with recombinant SLPI (125 and 500nM) and trypsin-like serine protease activity was analyzed. **D**) The effect of recombinant human SLPI (125 and 500nM) on HAT activity was also assessed using recombinant HAT. The velocity (mFU/min) of substrate hydrolysis was determined using an FLX-800 TBE microplate reader at an excitation wavelength of 360 nm and emission wavelength of 441 nm for 20 min. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments (**** $p < 0.0001$).

CDDO-me treatment reduces influenza virus replication and inflammatory cytokine gene expression in human bronchial epithelial cells

Influenza A virus require the proteolytic activation of its hemagglutinin by host proteases such as HAT, TMPRSS2, TMPRSS4 and matriptase to become infectious (4, 5, 7). Therefore, we next sought to investigate whether the induction of SLPI expression by CDDO-me treatment could interfere with IAV replication. For this purpose, submerged Calu-3 cells were infected with either

influenza PR8 (H1N1), X-31 (H3N2) or p2009/H1N1 viruses at an MOI of 0.01 and then treated with CDDO-me (0.3 μ M) or the vehicle (DMSO) for 48 h. Viral titers in the supernatants were determined by standard viral plaque assays. CDDO-me treatment reduced the replication of all influenza strains tested (Fig. 3A). The PR8 virus was the most affected by CDDO-me treatment (87.4% viral titer reduction). CDDO-me treatment reduced X-31 and p2009/H1N1 replication by 55% and 65%, respectively. Because IAV replication induces the production of type I interferons (IFN- α and - β) as well as many pro-inflammatory cytokines in epithelial cells (44, 45), we next evaluated if the production of these cytokines was affected by CDDO-me treatment in PR8-infected Calu-3 cells. We observed that viral titer reduction caused by CDDO-me treatment was accompanied with a significant decrease in TNF- α (-45%; $p = 0.0334$), IL-1 β (-42%; $p = 0.0354$) and IL-6 (-36%; $p = 0.0150$) gene expression (Fig. 3B). However, in contrast to previous reports studying the effect of Nrf2 activators in other cell types, we did not observe any further induction of type I interferon after CDDO-me treatment in infected Calu-3 cells (Fig. S2). This indicates that the CDDO-me antiviral effect is not mediated through increased production of type I IFN.

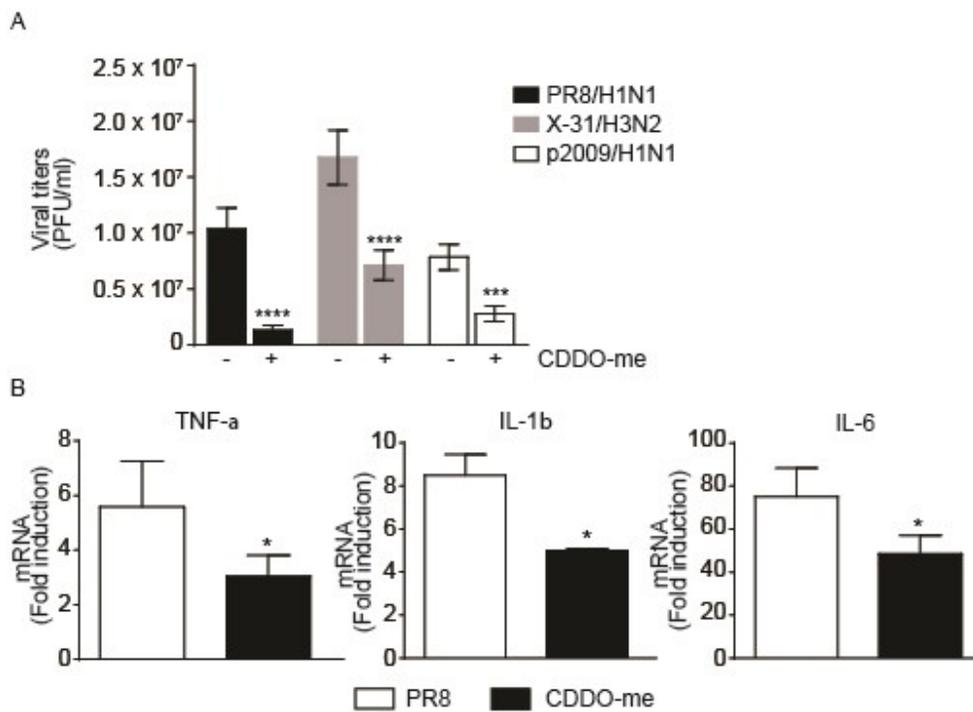


Figure 3

Figure 3. CDDO-me exhibits antiviral and anti-inflammatory activities upon IAV infection. **A)** Calu-3 cells were infected with the PR8, X-31 or p2009/H1N1 viruses at an MOI of 0.01. After 1 h, infected cells were treated either DMSO (-) or CDDO-me (+; 0.3 μ M). Supernatants were collected 48 h later and viral titers were determined by viral plaque assays. **B)** Calu-3 cells were infected with PR8 virus at an MOI of 1. After 1 hour, cells were treated with DMSO (-) or

CDDO-me (+; 0.3 μ M) for 24 h. RNA was isolated and real-time polymerase chain reactions were performed with specific primers to quantify inflammatory cytokine gene expression. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

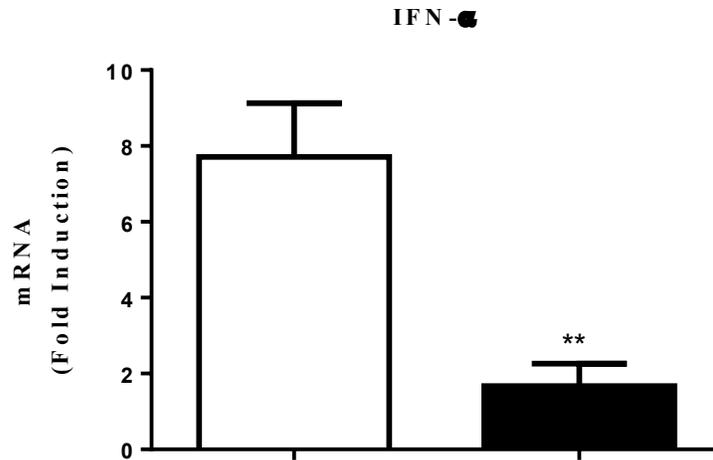


Figure S2: CDDO-me treatment decreases the expression of IFN- α

Since the bronchial epithelium is polarized and is directly exposed to air in vivo, we evaluated if our findings with submerged cells could be translated in Calu-3 grown at an air-liquid interface (ALI) culture. Calu-3 cells cultured at an ALI undergo extensive mucociliary differentiation and reproduces the in vivo distribution of the airway lining where the epithelial cells face the airway lumen, and the basal pole of the cells is attached to the filter membrane. We first demonstrated that the treatment of differentiated polarized Calu-3 cells with CDDO-me induced the intracellular Nrf2 and SLPI protein expression. Indeed, Nrf2 and SLPI intracellular protein levels increased by 15-fold and 9-fold, respectively, 24h post-treatment (Fig. 4A). Accordingly, the level of secreted SLPI increased by 3-fold at the apical surface of polarized Calu-3 cells (Fig. 4B). Then, we evaluated if CDDO-me treatment could interfere with IAV replication in differentiated polarized Calu-3 cells. To do so, cells grown at air-liquid interface on Transwell inserts were pre-treated either with CDDO-me or DMSO (vehicle) in the basal compartment or left untreated. Cells were then infected 24h later with PR8 influenza virus at an MOI of 0.01. After the adsorption period, the untreated group was treated with CDDO-me (0.3 μ M). Viral titers at the apical surface were determined by standard viral plaque assays 48 h post-infection. The result demonstrated that a 24h pre-treatment or a treatment with CDDO-me immediately after the infection significantly reduced the replication of PR8 influenza virus in differentiated

polarized Calu-3 cells (Fig. 4C). Indeed, CDDO-me pre-treatment resulted in a 97.6% viral titer reduction, whereas CDDO-me post-infection treatment led to an 86.6% viral titer reduction.

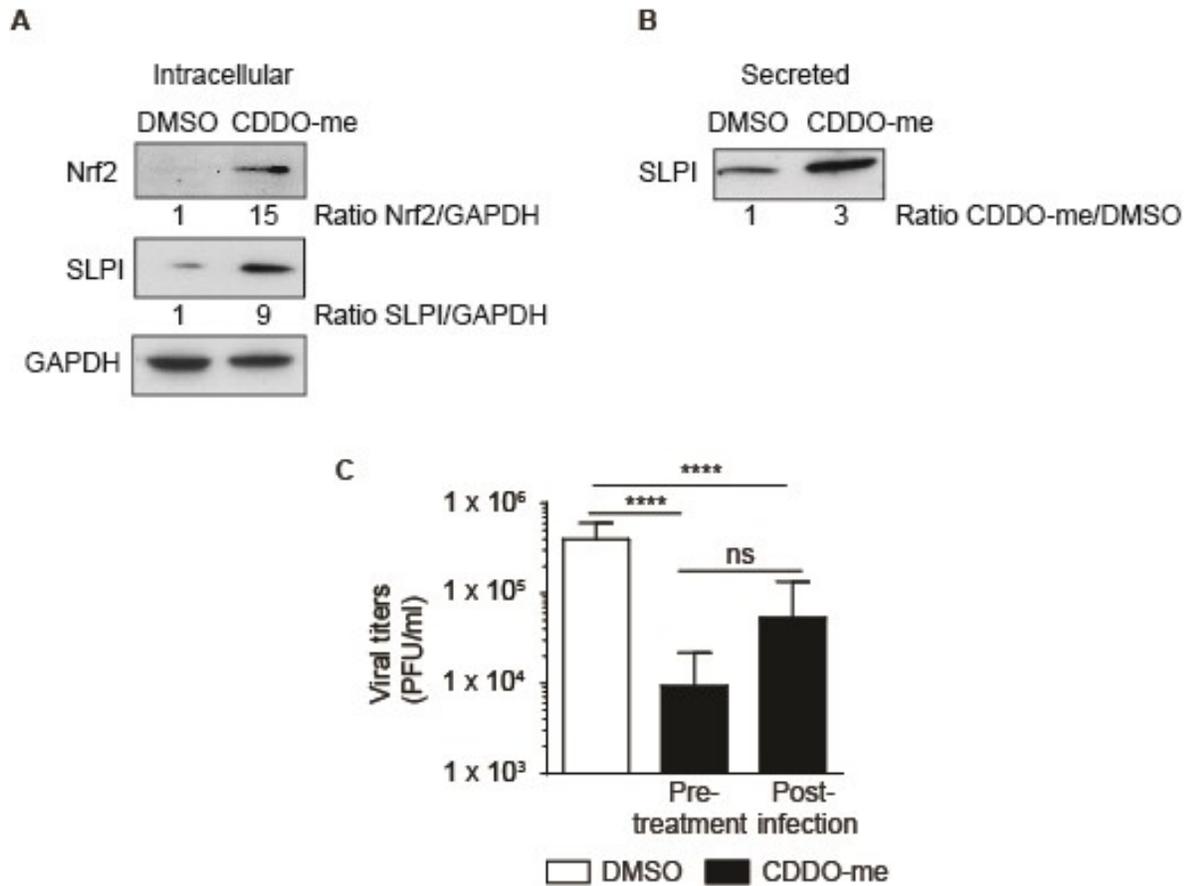


Figure 4 CDDO-me induces Nrf2, increases SLPI expression and reduces influenza replication in polarized Calu-3 cells grown at an air-liquid interface (ALI) **A**) Polarized Calu-3 cells cultured for 10 days at the air-liquid interface (ALI). At this time, cells were treated either with DMSO or CDDO-me in the basal compartment. Intracellular Nrf2 and SLPI protein expression were analyzed 24 h post-treatment by Western blots using total cellular lysates. GAPDH protein expression was used as a loading control. **B**) Secreted SLPI protein levels were also analyzed 24 h post-treatment following a PBS wash of the apical surface. **C**) Polarized Calu-3 cells were treated with DMSO or CDDO-me (0.3 μ M; pre-treatment) for 24 h or left untreated. Cells were then infected with PR8 virus at an MOI of 0.01. After the 1-hour adsorption period, cells were washed and the cells from the untreated group were exposed to CDDO-me (0.3 μ M; post-infection). The apical surface of the monolayer was washed with incomplete medium 48 h post-infection and viral titers were determined by viral plaque assays. Data shown represent the mean \pm SD of three independent experiments (**** $p < 0.0001$).

CDDO-me antiviral activity is dependent on Nrf2 and SLPI expression

To further demonstrate that the antiviral activity of CDDO-me treatment is mediated by the activation of Nrf2 and the induction of SLPI, Calu-3 cells were transfected with either scrambled

nonspecific siRNA (siRNA Ctrl) or Nrf2-specific siRNA (siRNA Nrf2). Transfected cells were treated with CDDO-me 72 h after transfection. Western blot analyses confirmed that Nrf2-specific siRNA transfection resulted in complete Nrf2 knockdown before CDDO-me stimulation (Fig. 5A). As mentioned above, a 24h-treatment with CDDO-me strongly induced SLPI protein expression in scrambled siRNA transfected cells (23-fold). In contrast, the induction of SLPI protein expression was significantly reduced in absence of Nrf2 (siRNA Nrf2, 2.2-fold; Fig. 5A). This result confirmed that Nrf2 is a key regulator of SLPI gene expression in Calu-3 cells. Next, we evaluated if the antiviral effect of CDDO-me is dependent on Nrf2. For this purpose, siRNA Ctrl- or siRNA Nrf2-transfected Calu-3 cells were infected with PR8 for 48 h in presence or absence of CDDO-me. As expected, CDDO-me decreased PR8 replication by approximately 1-log in siRNA Ctrl-transfected cells. However, the antiviral effect of CDDO-me was completely abrogated when Nrf2 expression was silenced (Fig. 5B). Finally, to evaluate if the antiviral activity of CDDO-me is dependent on SLPI expression, Calu-3 cells were transfected with an SLPI-specific siRNA and complete SLPI knockdown was confirmed by immunoblotting (Fig. 5C). SLPI knockdown completely abolished the inhibition of PR8 replication caused by CDDO-me treatment (Fig. 5D).

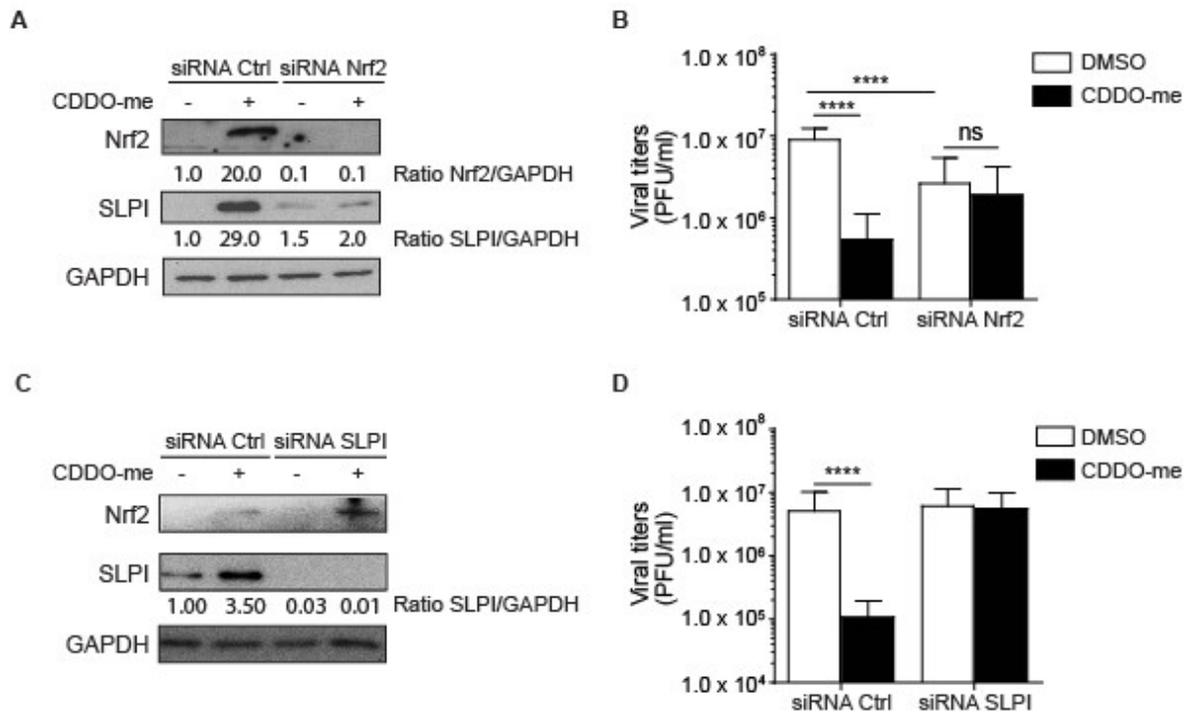


Figure 5. The antiviral activity of CDDO-me depends on Nrf2 and SLPI expression.

A) Calu-3 cells were transfected with either scrambled siRNA (siRNA Ctrl) or siRNA against Nrf2 (siRNA Nrf2). After 72 h, cells were treated with DMSO (-) or CDDO-me (+; 0.3 μ M) for 24 h. Total cell extracts were analyzed for the expression of Nrf2 and SLPI proteins by immunoblotting and quantified by densitometry. **B)** Calu-3 cells were transfected with either scrambled siRNA (siRNA Ctrl) or siRNA against Nrf2 (siRNA Nrf2). After 72 h, the cells were infected with the PR8 virus at a MOI of 0.01 for 1 h. Infected cells were then treated either DMSO (-) or CDDO-me (+; 0.3 μ M) for 48 h. Supernatants were collected and viral titers were determined using viral plaque assays. **C)** Calu-3 cells were transfected with either scrambled siRNA (siRNA Ctrl) or siRNA against SLPI (siRNA SLPI). After 72 h, cells were infected with the PR8 virus at a MOI of 0.01. After 1 h, infected cells were treated either DMSO (-) or CDDO-me (0.3 μ M) for 48 h and supernatants were collected to quantify viral titers using viral plaque assays. Experiments were repeated three times and data represent the mean \pm SD (***) $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Recombinant SLPI decreases IAV replication in epithelial cells

To evaluate the role of SLPI in the inhibition of host proteases and in the inhibition of influenza replication in human bronchial epithelial cells, Calu-3 cells were infected with PR8 at an MOI of 0.01 and treated simultaneously with recombinant human SLPI (rhSLPI; 500 nM) for 48 h. The analysis of viral titers in cell supernatants revealed that the addition of rhSLPI significantly reduced viral replication (-51%, $p < 0.0001$; Fig. 6A). Interestingly, the addition of SLPI 24h post-infection resulted in a similar reduction in viral replication (-49.3%, $p < 0.0001$; Fig. 6B). Next, we sought to identify which trypsin-like serine proteases expressed by Calu-3 cells was inhibited by SLPI treatment. Among the TTSPs, TMPRSS2 is strongly expressed in Calu-3 cells and has been shown to proteolytically activates influenza viruses and promote its replication in vivo (5, 43). In order, to assess if the activity of this enzyme was affected by SLPI, we generated a TMPRSS2-overexpressing MDCK cell line. As opposed to the standard MDCK cell line that necessitates the addition of exogenous enzyme to promote influenza replication, the TMPRSS2-overexpressing MDCK cell line readily promote influenza infection upon infection. Interestingly, we observed that treatment of these cells with rhSLPI significantly decreased viral titers in a dose-dependent manner (-24.6% at 125 nM, $p = 0.0010$; -34.5% at 250 nM, $p = 0.0029$; and -63.0% at 500 nM, $p < 0.0001$; Fig 6C). To evaluate if SLPI could also inhibit another protease involved in IAV replication, standard MDCK cells were infected with the PR8 virus and treated with exogenous recombinant HAT in presence or not of rhSLPI. This protease has been reported to be expressed in human airway epithelial cells and has been shown to be capable of cleaving HA (6). The addition of HAT on MDCK infected cells promoted multicycle influenza replication

(Fig. 6D). However, in contrast to what was observed in TMPRSS2-overexpressing MDCK cells, no significant difference in HAT-induced influenza replication was observed between untreated and SLPI-treated cells (Fig. 6D). Thus, these results identify TMPRSS2, but not HAT, as a target of the antiprotease SLPI during IAV replication.

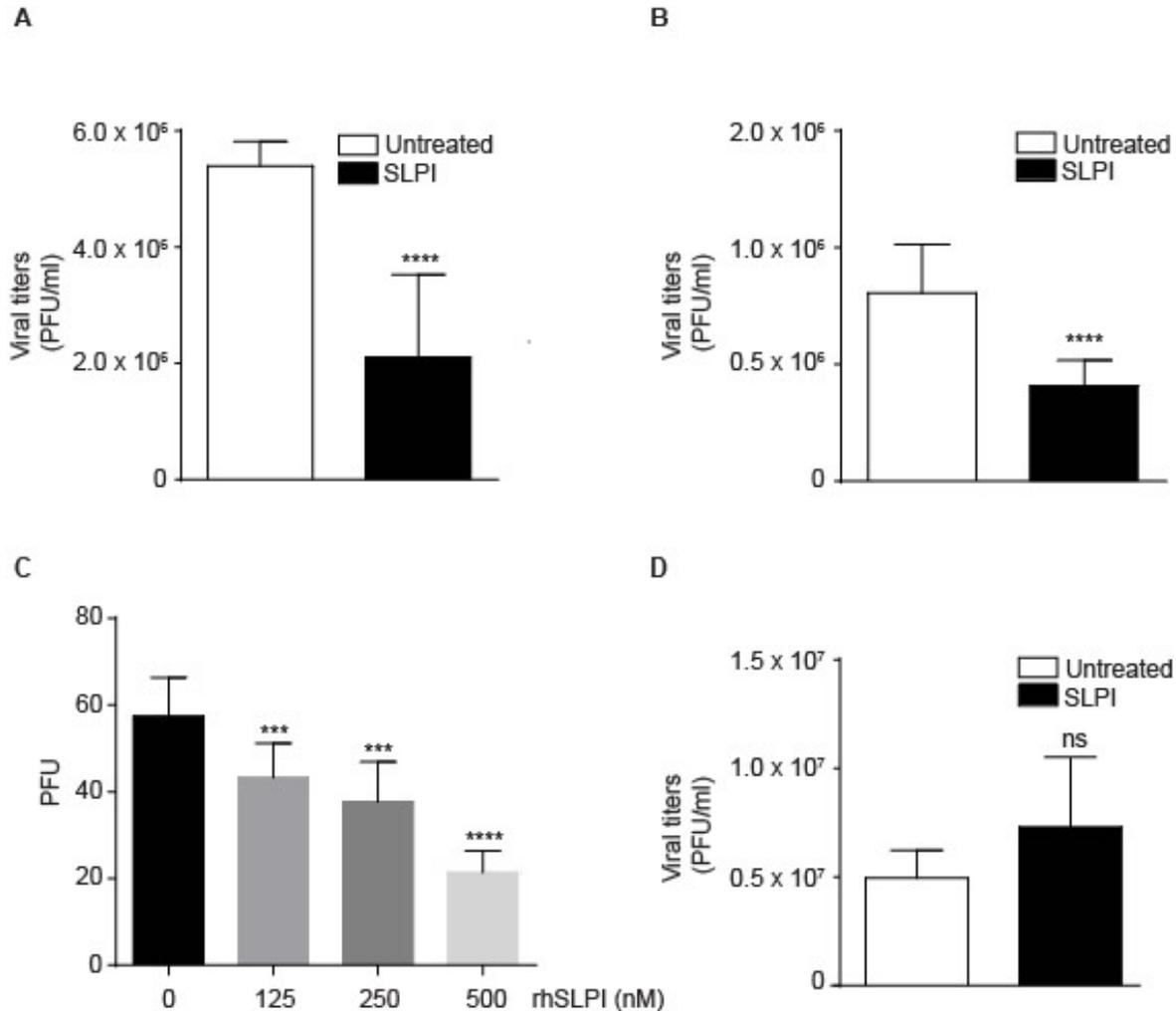


Figure 6: Recombinant human SLPI decreases IAV replication by interfering with TMPRSS2 activity. **A)** Calu-3 cells were infected with the PR8 virus at an MOI of 0.01 for 1 h. The infected cells were then left either untreated (-) or treated with rhSLPI (500 nM). After 48 h, supernatants were collected and viral titers were determined using viral plaque assays. **B)** Calu-3 cells were infected with the PR8 virus at an MOI of 0.01 for 1 h. After 24h, infected cells were either left untreated (-) or treated with rhSLPI (500 nM). The supernatants were collected 48h post-infection and viral titers were determined using viral plaque assays. **C)** MDCK cells overexpressing TMPRSS2 were infected with 25 PFU of PR8 virus for 1 h. Cells were either left untreated (-) or treated with the indicated concentrations of rhSLPI in Avicel-containing overlay medium. After 48 h, viral plaques were counted using standard viral plaque assays. **D)** Standard MDCK cells were infected with PR8 virus at an MOI of 0.05. After 1 h, the infected cells were either left untreated (-) or treated with rhSLPI (500 nM) in presence of 50 nM of recombinant

HAT. After 48 h, the supernatants were collected and the viral titers were determined using viral plaque assays in MDCK cells. The data represent the mean of three independent experiments \pm SD (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

DISCUSSION

Nrf2 is a multifunctional transcription factor that contributes to normal and pathophysiological function in the airways (46). Nrf2 expression is particularly essential since the respiratory system is continuously exposed to environmental stresses such as cigarette smoke, allergens, viruses and environmental pollutants (23, 47). There is evidence that antioxidant molecules that activate Nrf2 confer protection against IAV infection and reduce its replication *in vitro* (21, 22, 48). However, before considering targeting this pathway as an eventual therapeutic strategy, the mechanism by which Nrf2 exerts its antiviral activity needs to be clarified. Indeed, Nrf2 activation has been implicated in the induction of antiviral gene expression, in the reduction of viral entry, and in oxidative stress response during *in vitro* influenza infection (21, 22). A report showed that exposure of nasal epithelial cells to oxidative stress promotes IAV replication by increasing the expression of TTSPs proteases (TMPRSS2 and HAT) and by decreasing the level of the antiprotease SLPI (19). Our group and other have previously demonstrated that TTSPs promote the activation and replication of diverse strains of influenza A viruses (5-8). Interestingly, it has been shown that Nrf2 activation induced SLPI expression in alveolar macrophages through Nrf2 binding to the antioxidant response element in the SLPI promoter (17). Because of the important protective role of Nrf2 during oxidative stress exposure and influenza infection, we first evaluated if SLPI expression was induced upon Nrf2 activation in human bronchial epithelial cells. We showed that treatment of human bronchial epithelial cells with SFN or CDDO-me significantly increased SLPI production. Moreover, we determined that the induction of SLPI expression by these molecules is dependent on the Nrf2 antioxidant pathway using a siRNA-based approach in these cells.

Interestingly, SLPI was previously reported to inhibit influenza virus replication *in vitro* (18, 19). However, these studies were conducted using MDCK cells in presence of exogenous proteases such as trypsin and trypsinase clara to allow viral entry and replication. In our study, we showed that recombinant human SLPI (rhSLPI) significantly reduced influenza virus replication in human bronchial epithelial cells, which readily promote influenza replication without the addition of exogenous proteases. Since TMPRSS2 protease has been reported as an important HA-activating protease in the respiratory tract and that it is strongly expressed in human bronchial epithelial cells, we evaluated if TMPRSS2 could be a direct target of the action of the antiprotease SLPI (43, 49, 50). To do so, we performed experiments using MDCK cells that

exclusively express TMPRSS2 as the HA-activating protease. We demonstrated that rhSLPI inhibited TMPRSS2 activity and decreased the replication of influenza virus in these cells in a dose-dependent manner. Moreover, TTSP activity in the cellular supernatant was considerably reduced in SLPI-treated Calu-3 cells. These results demonstrate for the first time that SLPI is a potent TMPRSS2 inhibitor. In contrast, we determined that influenza virus replication promoted by HAT protease as well as HAT enzymatic activity was unaffected by SLPI treatment. Our results are in agreement with the published literature, which demonstrated that a 10- μ M concentration of SLPI only slightly inhibited HAT activity *in vitro* (less than 5% reduction) (51). Moreover, HAT inhibition by SLPI *in vivo* is unlikely to occur because high concentrations of SLPI are not likely to be found in human sputum or bronchial secretion (52). Overall, our results suggest that the antiprotease SLPI can inhibit proteolytic activation of influenza HA mediated by proteases such as TMPRSS2 that are expressed and/or secreted by lung epithelial cells resulting in reduced influenza virus replication. Interestingly, results of replication assay in Calu-3 cells treated immediately after viral adsorption or 24 h post-infection suggest that SLPI induced upon CDDO-me treatment acts after the initial round of replication by blocking TTSP-mediated HA cleavage of progeny viruses and thus, impedes further round of viral replication. Although we did not evaluate this, it is possible that CDDO-me treatment could also affect influenza infectivity by regulating other host cell factors involved in virus binding, viral fusion and viral entry. Interestingly, Kido et al. reported that the repeated intranasal administration of recombinant SLPI in rats resulted in a 3-log lung viral titer reduction in a rat model of H2N2 influenza infection (20). Interestingly, the residual progeny viruses found in the lungs of SLPI-treated rats were almost all in a non-infectious precursor form (HA₀). Although the authors seem to point towards *in vivo* inhibition of tryptase Clara or mini-plasmin by SLPI, which have been demonstrated to be HA-activating proteases in rat lungs, they did not identify which HA-activating protease was inhibited by SLPI administration *in vivo* (53, 54). We cannot exclude such a scenario but recent evidence suggests that TTSPs such as TMPRSS2 are important in the activation of influenza HA *in vivo* (49, 50). Therefore, based on the results provided herein, it is conceivable that TMPRSS2 or others TTSPs could represent SLPI targets *in vivo*.

In addition to identifying a detailed mechanism by which Nrf2 activation leads to reduction of influenza replication, we also demonstrated for the first time in this study that CDDO-me is a potent inhibitor of influenza A virus replication. Using a siRNA-based approach, we showed that

the antiviral effect of CDDO-me observed against PR8 virus is largely dependent on the Nrf2 antioxidant pathway. Our results also demonstrated that Nrf2-induced SLPI gene expression is essential for the antiviral effect of CDDO-me treatment, which suggest that SLPI is a major effector by which Nrf2 activators reduce IAV replication. Concerning the activation of the Nrf2 pathway by CDDO-me, our results demonstrated that CDDO-me is a strong activator of the Nrf2 pathway, significantly more potent than SFN, since a 10-fold lower concentration led to a similar transactivation of an Nrf2-dependent promoter. This result is likely explained by the fact that CDDO-me contains two electrophilic sites that can interact with 2 cysteine residues within Keap1 (Nrf2 inhibitor) causing its dissociation from Nrf2 (55, 56). In contrast, SFN contains only one electrophilic site that can trap only 1 cysteine residue within Keap1 (57).

Interestingly, our results revealed that influenza virus strains differed in their sensitivity to CDDO-me treatment. Although CDDO-me efficiently reduced the replication of the three strains tested, the PR8 (H1N1) virus was more affected by the treatment compared to X-31 (H3N2) or p2009/H1N1 viruses (1-log reduction vs \approx 50% inhibition). The differences in the magnitude of CDDO-me antiviral effect might be the consequence of differential actions of various influenza strains on the Nrf2 oxidative stress response. In a recent paper, Simon et al. suggested that infection with H5N1 viruses, and to a lesser extent with H7N9 viruses, inhibits Nrf2 function (58). In contrast, this inhibitory effect was not observed during infections with seasonal or pandemic H1N1 viruses. Thus, it is possible that different influenza strains can affect the Nrf2 response to a varying degree and this could contribute to the pathogenicity of the strains. Therefore, it is conceivable that antioxidant molecules such as CDDO-me or SFN could have more or less impact on the replication of a particular strain based on the action of this strain towards the Nrf2 pathway. Concerning the antiviral role of Nrf2, we observed a small but significant reduction in influenza replication in untreated Calu-3 cells transfected with Nrf2 siRNA (Figure 3A), compared to cells transfected with control siRNA, which contrasts with a previous report using nasal epithelial cells (22). One explanation could be that in absence of Nrf2 expression, reactive oxygen species overproduction occurred upon infection in Calu-3 cells since antioxidant mechanisms cannot be induced in absence of Nrf2, therefore ROS could have had a direct antiviral effect and reduced influenza replication (40-42). This hypothesis is supported by results from another study that detected higher ROS generation in human alveolar epithelial cells

transfected with Nrf2 siRNA followed by infection with PR8 virus in comparison with IAV alone (21).

As mentioned above, we show that treatment of human bronchial epithelial cells with CDDO-me decreases influenza replication as well as the intensity of inflammation induced by influenza virus infection. In contrast to the results obtained with the Nrf2 activator EGCG in nasal epithelial cells (22), we found that CDDO-me treatment did not increase the expression of antiviral mediators such as IFN- α and β in human bronchial epithelial cells (Fig. S2). Our results are in agreement with another report that found that Nrf2 overexpression does not lead to an increased expression of antiviral genes in PR8-infected cells (21). However, it remains unclear whether the differences between these studies, including ours, is due to the different activators or strategies used to activate or overexpress Nrf2 or to the cell type studied. Whether activation of the Nrf2 pathway by CDDO-me is directly responsible for the anti-inflammatory effect of the compound is unknown in the context of influenza infection. However, it is possible that CDDO-me might also affect other cellular signaling pathways. Indeed, synthetic oleanane triterpenoids such as CDDO-me mediated their potent pharmacological effects in part through interactions with cellular nucleophiles such as discrete, redox-sensitive sulfhydryl groups of cysteine residues on proteins via reversible Michael addition (56). Therefore, synthetic oleanane triterpenoids could have many cellular protein-binding partners depending on the cellular context and the nucleophilicity of specific cysteine residues in individual targets. In fact, a study using a proteomic approach has identified more than 500 putative targets of a CDDO derivative (CDDO-Im) (59). Other studies have validated a few of those targets as real CDDO-derivative binding partners. For instance, synthetic oleanane triterpenoids were reported to interact with proteins involved in NF- κ B, JAK/STAT, PTEN/PI3K and AMPK pathways (59). Interestingly, studies have demonstrated that CDDO derivatives inhibit I κ B kinase thus preventing I κ B- α phosphorylation and degradation, which blocks NF- κ B activation (60, 61). Therefore, as a master regulator of inflammatory gene expression, the NF- κ B pathway is likely an excellent target for the anti-inflammatory activity of CDDO-me observed during influenza infection. Other Nrf2 activators such as 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and related cyclopentenone prostaglandins have also been reported to reduce lung inflammation in the context of influenza infection. For instance, we have previously demonstrated that 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ reduces lung

inflammation and protects mice against lethal influenza infection (35). Although the role of the Nrf2 pathway was not investigated in that study, we found that the activation peroxisome-activated receptor γ pathway was essential to reduce lung inflammation in infected mice. Interestingly, initial screening studies to determine specific targets for CDDO and related derivatives have shown that these molecules also bind to peroxisome-activated receptor γ . CDDO was shown to act as an agonist whereas as CDDO-me act as an antagonist (62). In our experiments, CDDO-me did not activate the PPAR γ pathway but inhibited NF- κ B activation in a luciferase reporter assays (Fig. S3). Therefore, in contrast to 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, the anti-inflammatory action of CDDO-me in the context of influenza infection is unlikely mediated through PPAR γ activation. Although we cannot exclude Nrf2 involvement in the anti-inflammatory action of CDDO-me, it is more likely due to NF- κ B inhibition.

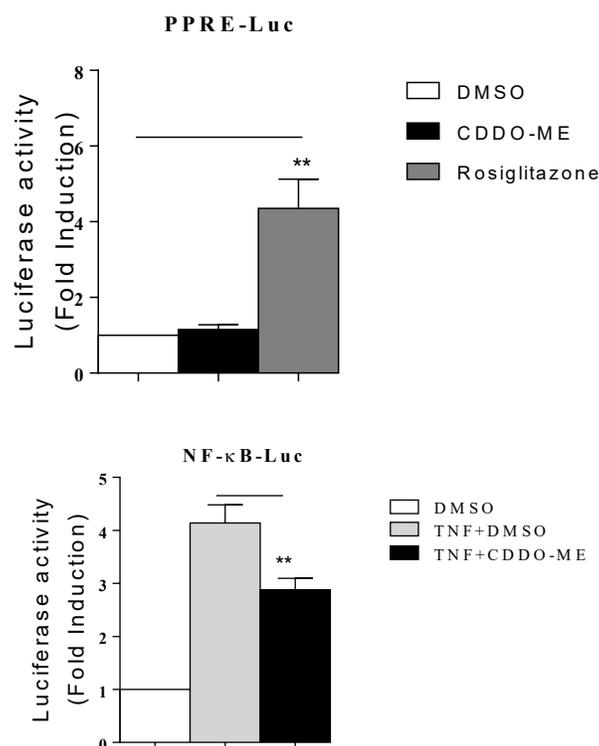


Figure S3: CDDO-me inhibits NF- κ B activation induced by TNF- α but does not activate PPAR γ . A) HEK 293T were transfected with 0.1 μ g of PPRE luciferase reporter plasmid. Cells were then treated with DMSO (vehicle control), Rosiglitazone (10 μ M) or CDDO-me (0.3 μ M). B) HEK293T cells were transfected with NF- κ B-luciferase reporter plasmid. Cells were then incubated in the presence of TNF- α (5 ng/ml) and DMSO (vehicle control) or CDDO (0.3 μ M) for 24 h prior to cell lysis and luciferase activity measurement. Data represent the means SD from three independent experiments (**, P 0.01).

Beyond its direct antiprotease activity, SLPI has also been shown to attenuate inflammatory cytokine production (63). Indeed, TNF- α production induced upon detection of apoptotic cells is inhibited in presence of SLPI in murine macrophages. Moreover, human SLPI has been demonstrated to prevent NF- κ B activation by inhibiting I κ B- β degradation (64). SLPI can also up-regulate macrophage production of the anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-10 (65). Although SLPI can have anti-inflammatory actions in some infectious or inflammatory settings, it is unlikely responsible for the anti-inflammatory effect of CDDO-me observed in our in vitro model of infection since the reduction of inflammatory cytokine gene expression occurs before SLPI protein induction. However, the anti-inflammatory properties of SLPI could have contributed to the observed protective effect in the rat model of influenza infection.

Overall, our study strengthens the rationale that a pharmacological intervention inducing Nrf2 and/or SLPI may serve as an important strategy to protect against IAV infection. Although studies are needed, our results suggest that treatment with Nrf2 activators such as CDDO-me might be protective against influenza infection in vivo. However, before translating these results in vivo, further studies are required using pre-clinical models. CDDO-me has been shown to be effective in many pre-clinical models of diseases as well as in clinical studies. The main mechanism of the preventive action of CDDO-Me was believed to be the anti-inflammatory feature that was attributed to the activation of Nrf2, inhibition of NF- κ B, and decreased oxidative stress in chronic kidney disease as well as in lung fibrosis (66, 67). Interestingly, a nutritional intervention with broccoli sprout homogenate, which is a source of the Nrf2 activating molecule sulforaphane, was shown to increase SLPI levels in nasal lavage fluids, to reduce virus-induced markers of inflammation, and to reduce virus quantity during vaccination with live attenuated influenza virus (68). Collectively, our findings links Nrf2 activation with induction of SLPI production, TMPRSS2 inhibition and decreased influenza virus replication in human airway epithelial cells. Specifically, we showed that SLPI gene expression is induced through Nrf2 activation upon CDDO-me treatment. SLPI inhibited TMPRSS2 activity, which in turn resulted in the reduction of influenza replication. Taken together, this study further supports the concept that targeting Nrf2 pathway while decreasing host cell protease activity is a promising approach to reduce influenza infection. Finally, it is also worth considering targeting the Nrf2/SLPI

pathway with drugs that induces Nrf2 such as CDDO-me to treat other infectious diseases that depend on TMPRSS2 activity such as coronavirus infection (SARS-CoV) (69).

FUNDING INFORMATION

Grants from Canadian Institutes of Health Research (Grant # MOP-102670) and NSERC (Discovery grant # 418127-2012) to MVR supported this research. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Isabelle Marois for expert technical assistance and Isabelle Meunier for reviewing the manuscript. We would also like to thank Antoine Désilets for the cloning, production and purification of recombinant HAT.

REFERENCES

1. **Webster RG, Govorkova EA.** 2014. Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci* **1323**:115-139.
2. **Jefferson T, Doshi P.** 2014. [Multisystem failure: the story of antinfluenza drugs]. *Recenti Prog Med* **105**:187-190.
3. **Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G.** 2013. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* **98**:174-185.
4. **Bottcher-Friebertshauser E, Freuer C, Sielaff F, Schmidt S, Eickmann M, Uhlenendorff J, Steinmetzer T, Klenk HD, Garten W.** 2010. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **84**:5605-5614.
5. **Beaulieu A, Gravel E, Cloutier A, Marois I, Colombo E, Desilets A, Verreault C, Leduc R, Marsault E, Richter MV.** 2013. Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol* **87**:4237-4251.
6. **Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M.** 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **80**:9896-9898.
7. **Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, Pohlmann S.** 2009. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **83**:3200-3211.
8. **Okumura Y, Takahashi E, Yano M, Ohuchi M, Daidoji T, Nakaya T, Bottcher E, Garten W, Klenk HD, Kido H.** 2010. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol* **84**:5089-5096.
9. **Hamilton BS, Gludish DW, Whittaker GR.** 2012. Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by matriptase reveals both subtype and strain specificities. *J Virol* **86**:10579-10586.
10. **Baron J, Tarnow C, Mayoli-Nussle D, Schilling E, Meyer D, Hammami M, Schwalm F, Steinmetzer T, Guan Y, Garten W, Klenk HD, Bottcher-Friebertshauser E.** 2013. Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol* **87**:1811-1820.
11. **Tseng IC, Chou FP, Su SF, Oberst M, Madayiputhiya N, Lee MS, Wang JK, Sloane DE, Johnson M, Lin CY.** 2008. Purification from human milk of

- matriptase complexes with secreted serpins: mechanism for inhibition of matriptase other than HAI-1. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C423-431.
12. **Beliveau F, Desilets A, Leduc R.** 2009. Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J* **276**:2213-2226.
 13. **Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, Wilson SJ, Crotta S, Yu Y, Flatley B, Xiao JW, Casanova JL, Wack A, Bieniasz PD, Rice CM.** 2015. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza A virus maturation. *Cell* **160**:631-643.
 14. **Okumura Y, Hayama M, Takahashi E, Fujiuchi M, Shimabukuro A, Yano M, Kido H.** 2006. Serase-1B, a new splice variant of polyserase-1/TMPRSS9, activates urokinase-type plasminogen activator and the proteolytic activation is negatively regulated by glycosaminoglycans. *Biochem J* **400**:551-561.
 15. **Lucey EC, Stone PJ, Ciccolella DE, Breuer R, Christensen TG, Thompson RC, Snider GL.** 1990. Recombinant human secretory leukocyte-protease inhibitor: in vitro properties, and amelioration of human neutrophil elastase-induced emphysema and secretory cell metaplasia in the hamster. *J Lab Clin Med* **115**:224-232.
 16. **Smith CE, Johnson DA.** 1985. Human bronchial leucocyte proteinase inhibitor. Rapid isolation and kinetic analysis with human leucocyte proteinases. *Biochem J* **225**:463-472.
 17. **Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, Morishima Y, Hegab AE, Homma S, Nomura A, Sakamoto T, Shimura M, Yoshida A, Yamamoto M, Sekizawa K.** 2005. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells* **10**:1113-1125.
 18. **Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H.** 1997. Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. *J Biochem* **121**:309-316.
 19. **Kesic MJ, Meyer M, Bauer R, Jaspers I.** 2012. Exposure to ozone modulates human airway protease/antiprotease balance contributing to increased influenza A infection. *PLoS One* **7**:e35108.
 20. **Kido H, Okumura Y, Yamada H, Le TQ, Yano M.** 2007. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharm Des* **13**:405-414.
 21. **Kosmider B, Messier EM, Janssen WJ, Nahreini P, Wang J, Hartshorn KL, Mason RJ.** 2012. Nrf2 protects human alveolar epithelial cells against injury induced by influenza A virus. *Respir Res* **13**:43.

22. **Kesic MJ, Simmons SO, Bauer R, Jaspers I.** 2011. Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **51**:444-453.
23. **Deramautd TB, Dill C, Bonay M.** 2013. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Med Mal Infect* **43**:100-107.
24. **Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Amara N, Crestani B, Fournier M, Leseche G, Soler P, Boczkowski J, Bonay M.** 2008. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* **63**:916-924.
25. **Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Iizuka T, Hegab AE, Hosoya T, Nomura A, Sakamoto T, Yamamoto M, Sekizawa K.** 2005. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *J Immunol* **175**:6968-6975.
26. **Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M.** 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* **8**:379-391.
27. **Alam J, Killeen E, Gong P, Naquin R, Hu B, Stewart D, Ingelfinger JR, Nath KA.** 2003. Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**:F743-752.
28. **Sporn MB, Liby KT.** 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* **12**:564-571.
29. **Itoh K, Tong KI, Yamamoto M.** 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* **36**:1208-1213.
30. **Yageta Y, Ishii Y, Morishima Y, Masuko H, Ano S, Yamadori T, Itoh K, Takeuchi K, Yamamoto M, Hizawa N.** 2011. Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice. *J Virol* **85**:4679-4690.
31. **Song JM, Lee KH, Seong BL.** 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res* **68**:66-74.
32. **Kim M, Kim SY, Lee HW, Shin JS, Kim P, Jung YS, Jeong HS, Hyun JK, Lee CK.** 2013. Inhibition of influenza virus internalization by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Antiviral Res* **100**:460-472.
33. **Liby KT, Sporn MB.** 2012. Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease. *Pharmacol Rev* **64**:972-1003.
34. **Wang YY, Yang YX, Zhe H, He ZX, Zhou SF.** 2014. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Des Devel Ther* **8**:2075-2088.

35. **Cloutier A, Marois I, Cloutier D, Verreault C, Cantin AM, Richter MV.** 2012. The prostanoid 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin-j2 reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J Infect Dis* **205**:621-630.
36. **Moehlenkamp JD, Johnson JA.** 1999. Activation of antioxidant/electrophile-responsive elements in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* **363**:98-106.
37. **Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, Fujii H, Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Horio F, Itoh K, Iida K, Yamamoto M, Uchida K.** 2002. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem* **277**:3456-3463.
38. **Zhang DD.** 2013. Bardoxolone brings Nrf2-based therapies to light. *Antioxid Redox Signal* **19**:517-518.
39. **Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH.** 1994. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* **266**:L493-501.
40. **Finkbeiner WE, Carrier SD, Teresi CE.** 1993. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) phenotypic analysis of cell cultures of human tracheal epithelium, tracheobronchial glands, and lung carcinomas. *Am J Respir Cell Mol Biol* **9**:547-556.
41. **Kreft ME, Jerman UD, Lasic E, Hevir-Kene N, Rizner TL, Peternel L, Kristan K.** 2015. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *Eur J Pharm Sci* **69**:1-9.
42. **Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW.** 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* **22**:2883-2892.
43. **Bottcher-Friebertshauer E, Stein DA, Klenk HD, Garten W.** 2011. Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *J Virol* **85**:1554-1562.
44. **Zeng H, Goldsmith C, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Zaki S, Tumpey TM, Katz JM.** 2007. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *J Virol* **81**:12439-12449.
45. **Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, Peiris JS.** 2005. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* **6**:135.

46. **Cho HY, Kleeberger SR.** 2014. Noblesse oblige: NRF2 functions in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**:844-847.
47. **Cho HY, Kleeberger SR.** 2010. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* **244**:43-56.
48. **Yageta Y, Ishii Y, Morishima Y, Ano S, Ohtsuka S, Matsuyama M, Takeuchi K, Itoh K, Yamamoto M, Hizawa N.** 2014. Carbocysteine reduces virus-induced pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**:963-973.
49. **Tarnow C, Engels G, Arendt A, Schwalm F, Sediri H, Preuss A, Nelson PS, Garten W, Klenk HD, Gabriel G, Bottcher-Friebertshauer E.** 2014. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *J Virol* **88**:4744-4751.
50. **Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.** 2014. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol* **88**:5608-5616.
51. **Yasuoka S, Ohnishi T, Kawano S, Tsuchihashi S, Ogawara M, Masuda K, Yamaoka K, Takahashi M, Sano T.** 1997. Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**:300-308.
52. **Kramps JA, Franken C, Dijkman JH.** 1984. ELISA for quantitative measurement of low-molecular-weight bronchial protease inhibitor in human sputum. *Am Rev Respir Dis* **129**:959-963.
53. **Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N.** 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* **267**:13573-13579.
54. **Murakami M, Towatari T, Ohuchi M, Shiota M, Akao M, Okumura Y, Parry MA, Kido H.** 2001. Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur J Biochem* **268**:2847-2855.
55. **Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, Holtzclaw WD, Gao X, Suh N, Williams C, Risingsong R, Honda T, Gribble GW, Sporn MB, Talalay P.** 2005. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4584-4589.

56. **Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW.** 2011. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J Nat Prod* **74**:537-545.
57. **Ahn YH, Hwang Y, Liu H, Wang XJ, Zhang Y, Stephenson KK, Boronina TN, Cole RN, Dinkova-Kostova AT, Talalay P, Cole PA.** 2010. Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:9590-9595.
58. **Simon PF, McCorrister S, Hu P, Chong P, Silaghi A, Westmacott G, Coombs KM, Kobasa D.** 2015. Highly Pathogenic H5N1 and Novel H7N9 Influenza A Viruses Induce More Profound Proteomic Host Responses than Seasonal and Pandemic H1N1 Strains. *J Proteome Res* doi:10.1021/acs.jproteome.5b00196.
59. **Yore MM, Kettenbach AN, Sporn MB, Gerber SA, Liby KT.** 2011. Proteomic analysis shows synthetic oleanane triterpenoid binds to mTOR. *PLoS One* **6**:e22862.
60. **Yore MM, Liby KT, Honda T, Gribble GW, Sporn MB.** 2006. The synthetic triterpenoid 1-[2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole blocks nuclear factor-kappaB activation through direct inhibition of IkappaB kinase beta. *Mol Cancer Ther* **5**:3232-3239.
61. **Ahmad R, Raina D, Meyer C, Kharbanda S, Kufe D.** 2006. Triterpenoid CDDO-Me blocks the NF-kappaB pathway by direct inhibition of IKKbeta on Cys-179. *J Biol Chem* **281**:35764-35769.
62. **Wang Y, Porter WW, Suh N, Honda T, Gribble GW, Leesnitzer LM, Plunket KD, Mangelsdorf DJ, Blanchard SG, Willson TM, Sporn MB.** 2000. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Endocrinol* **14**:1550-1556.
63. **Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A.** 2003. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol* **171**:1507-1514.
64. **Lentsch AB, Jordan JA, Czermak BJ, Diehl KM, Younkin EM, Sarma V, Ward PA.** 1999. Inhibition of NF-kappaB activation and augmentation of IkappaBbeta by secretory leukocyte protease inhibitor during lung inflammation. *Am J Pathol* **154**:239-247.
65. **Sano C, Shimizu T, Sato K, Kawauchi H, Tomioka H.** 2000. Effects of secretory leukocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* **121**:77-85.

66. **Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND.** 2013. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int* **83**:1029-1041.
67. **Kulkarni AA, Thatcher TH, Hsiao HM, Olsen KC, Kottmann RM, Morrissette J, Wright TW, Phipps RP, Sime PJ.** 2013. The triterpenoid CDDO-Me inhibits bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis. *PLoS One* **8**:e63798.
68. **Meyer M, Kesic MJ, Clarke J, Ho E, Simmen RC, Diaz-Sanchez D, Noah TL, Jaspers I.** 2013. Sulforaphane induces SLPI secretion in the nasal mucosa. *Respir Med* **107**:472-475.
69. **Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pohlmann S.** 2014. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol* **88**:1293-1307.

Résultats supplémentaires

Afin de valider nos résultats obtenus *in vitro* avec la CDDO-me, nous avons voulu tout d'abord évaluer l'effet thérapeutique de l'activation de Nrf2 par CDDO-me *in vivo* dans un modèle murin d'infection par le virus influenza. Nos résultats ont montré que le traitement avec la CDDO-me (1 mg/kg/jour) réduit d'une façon nette la morbidité des souris infectées avec le virus PR8/H1N1 (50 PFU). Cette amélioration était significative surtout après le jour 10 p.i. Ainsi que le traitement semble accélérer de 2 jours la récupération du poids des souris (Figure 12).

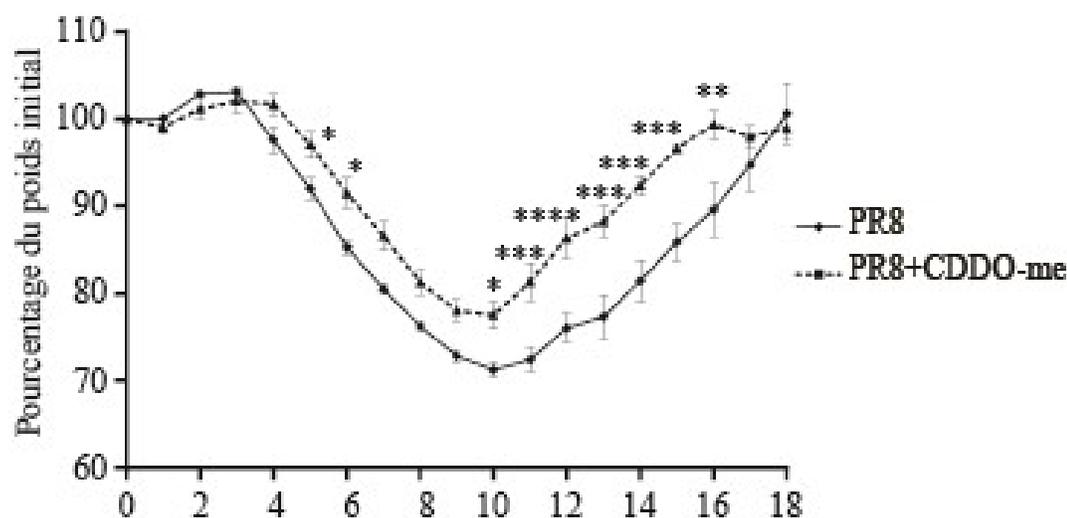


Figure 12: La CDDO-me réduit la morbidité des souris infectées avec le virus influenza. Les souris ont été infectées avec 50 PFU du virus PR8 et ensuite elles ont été traitées avec du véhicule (PR8) ou avec de la CDDO-me (PR8+CDDO-me) jusqu'au jour 7 après l'infection (p.i.). Le poids des souris a été mesuré quotidiennement pendant 18 jours. Les données indiquées représentent 3 expériences indépendantes réalisées avec trois souris par groupe.

Afin d'établir le rôle plus précis de Nrf2 *in vivo*, il faudra examiner l'effet de la CDDO-me sur la réplication virale ainsi que sur la réponse inflammatoire dans les poumons des souris infectées. Il serait aussi intéressant d'analyser l'expression de gènes cibles de Nrf2, tels que SLPI et les enzymes antioxydantes.

Comme perspective à long terme, il serait intéressant d'utiliser la CDDO-me pour mieux étudier le rôle anti-inflammatoire de Nrf2 dans le contexte d'une infection par le virus influenza. En effet, il a été démontré que Nrf2 réduit l'activité de NF- κ B ainsi que

l'inflammation pulmonaire chez les souris infectées par le virus influenza lorsqu'elles étaient exposées à de la fumée de cigarette simultanément à l'infection (Yageta et al., 2011). Par contre, les auteurs de cette étude ne démontrent pas par quel(s) mécanisme(s) Nrf2 diminue l'inflammation pulmonaire.

Une interrelation entre les voies PPAR γ et Nrf2 pour réguler la réponse antiinflammatoire

D'une manière intéressante, une étude en 2010 a démontré que Nrf2 protège contre l'inflammation pulmonaire oxydative en régulant positivement l'expression de PPAR γ . De plus, cette étude a démontré que l'expression de PPAR γ est réduite chez les souris transgéniques n'exprimant pas Nrf2 (Nrf2^{-/-}). Cette expression altérée de PPAR γ était associée à une inflammation plus exacerbée lorsque les souris étaient soumises à des conditions d'hyperoxie (95% d'oxygène) (Cho et al., 2010). Ceci n'est pas surprenant surtout lorsqu'on connaît le rôle important de PPAR γ dans la résolution de l'inflammation (Clark, 2002). Les expériences effectuées ont démontré que Nrf2 régule l'expression de PPAR γ à cause de l'existence de deux éléments de réponse (ARE) dans la séquence de promoteur de PPAR γ (positions: - 916 et -784) (Cho et al., 2010). En accord avec ces études, nos résultats préliminaires ont démontré que le traitement avec la CDDO-me (0.3 μ M) augmente légèrement l'expression protéique de PPAR γ dans les Calu-3 d'une façon dépendante de Nrf2. En effet, en comparant avec les cellules contrôles, nous avons observé que l'expression de PPAR γ est réduite de 50% dans les cellules transfectées avec un siRNA contre Nrf2 (siNrf2). Ceci a été observé dans les conditions basales et même après traitement avec la CDDO-me (**Figure 13**). Ceci suggère que l'induction de l'expression de PPAR γ par CDDO-me est dépendante de Nrf2.

D'autre part, certaines études ont montré que l'expression de Nrf2 est atténuée dans les poumons des souris transgéniques exprimant des faibles niveaux de PPAR γ (Park et al., 2004). De plus, des éléments de réponse de PPAR γ (PPRE) ont été identifiés dans le promoteur de Nrf2. Il n'est donc pas surprenant que certaines études montrent que divers agonistes de PPAR γ induisent l'expression de Nrf2 (Cho et al., 2010). L'ensemble de ces études suggère donc l'existence d'une boucle de rétroaction positive entre ces deux facteurs dans le contrôle des lésions pulmonaires inflammatoires.

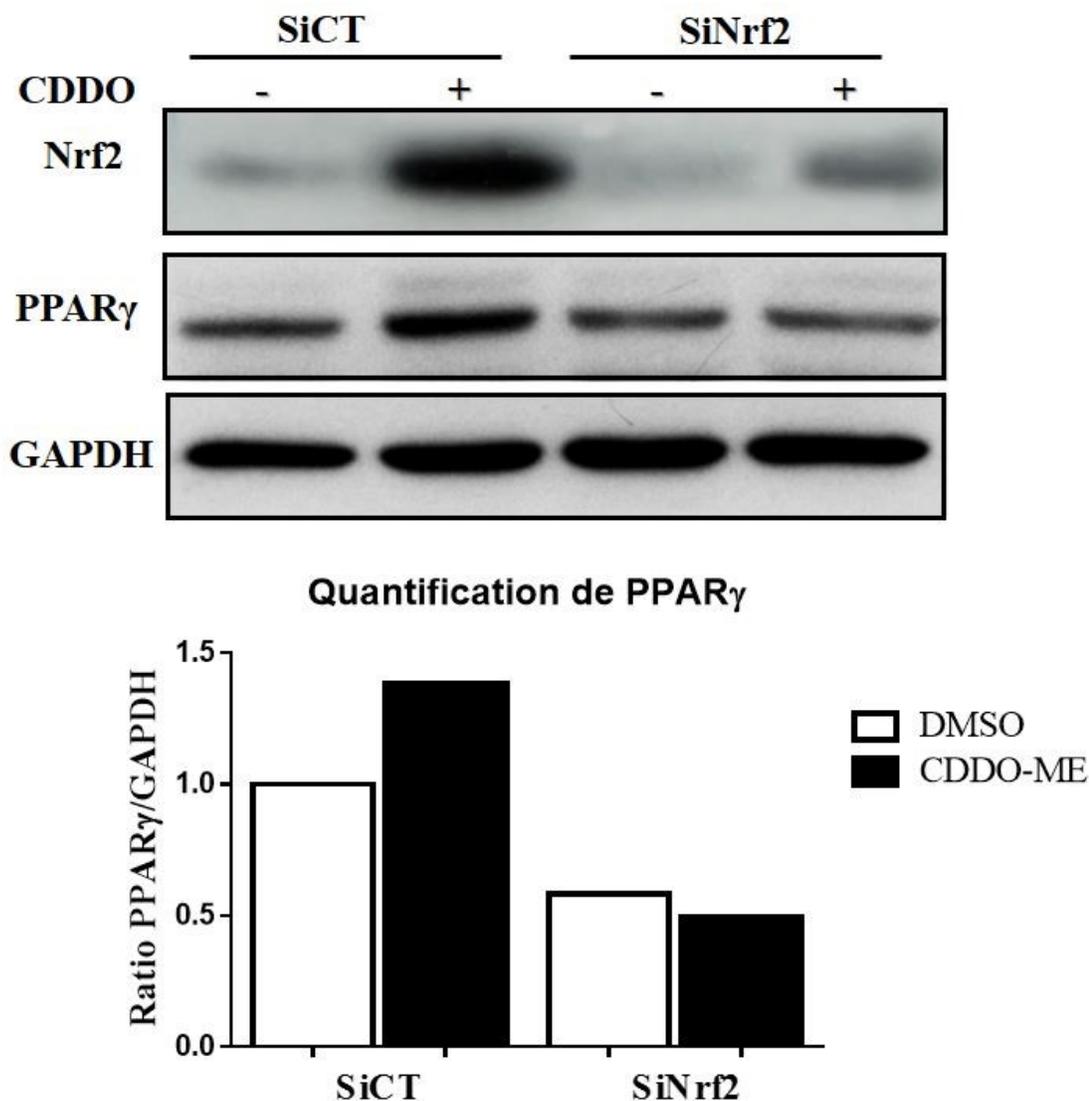


Figure 13: CDDO-me induit l'expression de PPAR γ d'une façon dépendante de Nrf2. Les cellules Calu-3 ont été traitées avec la CDDO-me (0,3 μ M) pendant 48 h. Les extraits cellulaires totaux ont été préparés et analysés pour l'expression de protéines Nrf2 et PPAR γ par western blot. L'expression de PPAR γ a été normalisée à celle de GAPDH par densitométrie, et les résultats montrent le changement d'expression par rapport aux cellules contrôles (SiCT) en absence du traitement, qui a été fixé à 1.

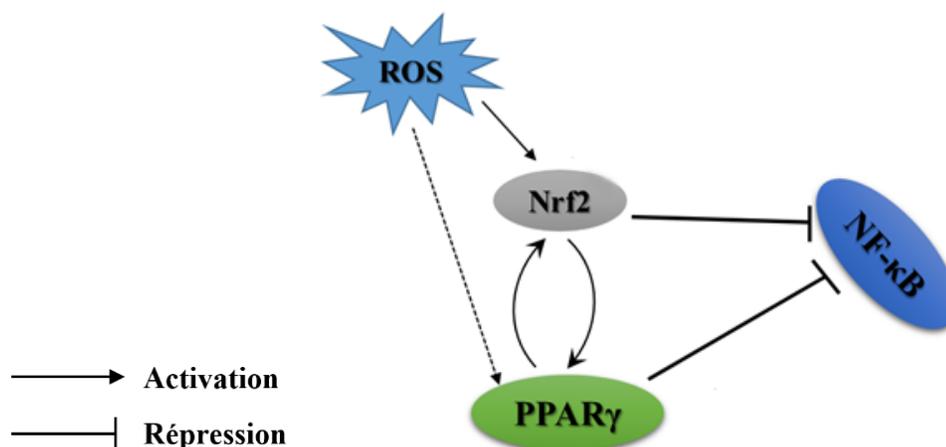
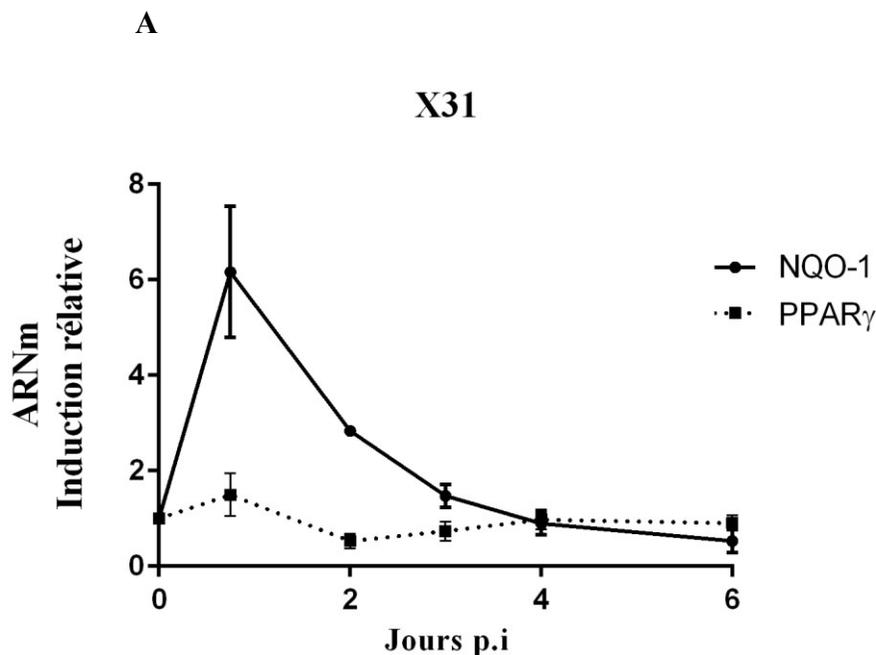


Figure 14: Interrelation entre les voies de PPAR γ et de Nrf2 en réponse au stress oxydatif (ROS). Les ROS activent Nrf2 et PPAR γ qui sont liés par une boucle de rétroaction positive maintenant leurs expressions. Le résultat de cette interaction mène à un blocage de l'activité de NF- κ B. Adapté du (Polvani et al., 2012)

Ce circuit peut expliquer, en partie, les effets anti-inflammatoires associés à Nrf2. En effet, de Nrf2 diminue l'expression de gènes inflammatoires contrôlés par NF- κ B en modulant les voies de signalisation aboutissant à l'activation de ce dernier. Ce contrôle de la voie inflammatoire par Nrf2 est assuré par sa capacité de maintenir l'état homéostatique d'oxydo-réduction (Thimmulappa et al., 2006). En somme, l'induction de Nrf2 par PPAR γ peut dans un premier temps augmenter l'activité anti-inflammatoire de PPAR γ . Et à l'inverse, l'induction de PPAR γ par Nrf2 peut contribuer à l'activité anti-inflammatoire de Nrf2 (**Figure 14**). Aussi, PPAR γ peut également induire l'activation de nombreux gènes antioxydants qui sont connus d'être sous le contrôle de Nrf2 (Kronke et al., 2007; Park et al., 2004). Par exemple, il a été mis en évidence que dans le promoteur du gène codant pour l'enzyme antioxydante GSTA2 (pour *Glutathione S-transférase 2*), il y a présence d'éléments PPRE et ARE et qu'il existe une synergie entre PPAR γ et Nrf2 dans la transactivation du GSTA2 (Park et al., 2004).

L'ensemble de ces données citées nous a mené à proposer que la voie anti-inflammatoire de PPAR γ et la voie antioxydante de Nrf2 interagissent dans le contrôle de la réponse anti-inflammatoire et/ou antivirale lors d'une infection avec le virus influenza. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tenté de déterminer si Nrf2 induit l'expression de PPAR γ suite à l'infection par le virus influenza. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de PPAR γ

dans les poumons des souris infectées avec les virus PR8/H1N1 (50 PFU) et HK-X31/H3N2 (250x10³ PFU) à différents jours après l'infection. PR8 a une pathogénicité plus élevée que X31. Ceci nous a permis de déterminer si Nrf2 et PPAR γ se comportent différemment selon la sévérité de l'infection. Nous avons observé que l'infection avec X31 induit l'expression de gènes antioxydants cibles de Nrf2 tels que NQO-1 et HO-1 (**Figure 15**). Cependant, l'infection avec PR8 n'induisait pas l'expression de ces gènes. Une explication possible de ce phénomène est qu'il est connu que le virus X31 infecte beaucoup mieux les macrophages que PR8 (Reading et al., 2000). Donc nous pouvons imaginer que l'infection avec X31, contrairement à PR8, produit plus du stress oxydatif par les macrophages infectés directement. Ensuite, contrairement à ce que nous attendions, nous n'avons pas observé une induction significative de l'expression de PPAR γ dans les poumons des souris infectées avec PR8 ou X31 tout le long de l'infection. Ces résultats laissent supposer que si Nrf2 est activé suite à l'infection, PPAR γ n'est pas parmi ses gènes cibles dans ce modèle.



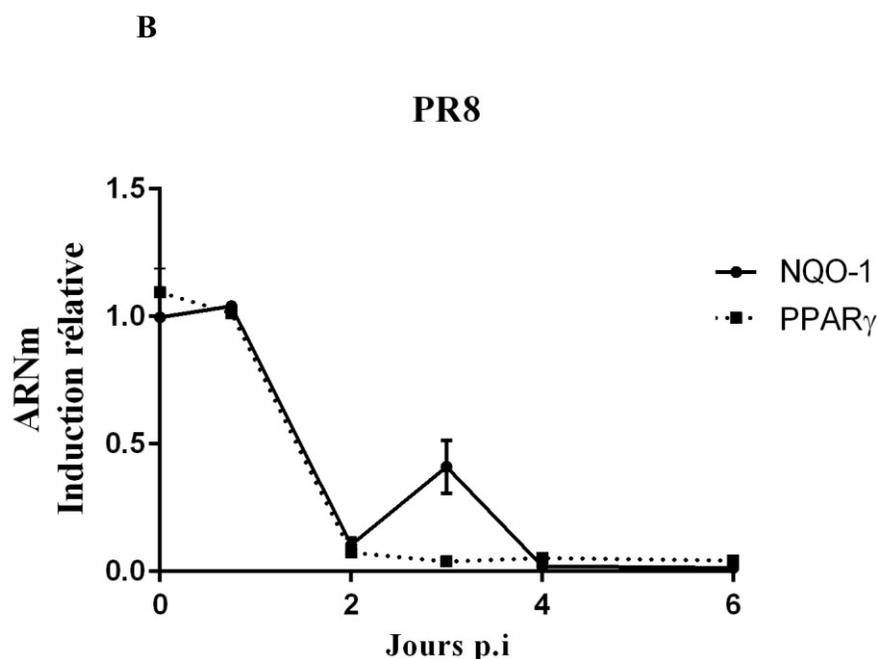


Figure 15: L'infection avec X31/H3N2 induit l'expression de NQO1 mais pas de PPAR γ . Les souris ont été infectées avec les virus X31/H3N2 (250 000 PFU; **A**) ou PR8/H1N1 (50 PFU; **B**). L'expression de gènes dépendants de NQO1 et de PPAR γ a été quantifiée par qPCR dans les poumons de souris à différents temps après infection. Les données représentent les moyennes \pm écart-type de deux expériences indépendantes réalisées avec trois à quatre souris par groupe.

Alternativement, nous avons utilisé les lignées cellulaires épithéliales humaines bronchiques Calu-3 et les lignées cellulaires de macrophages murines RAW 264.7. Par cette approche, il a été plus facile d'étudier le profil d'expression de PPAR γ suite à l'infection. De façon semblable à ce que nous avons observé chez les souris, l'infection avec différentes souches du virus A (PR8/H1N1, X31/H3N2, et H1N1 pandémique de 2009) et avec différentes multiplicités d'infection MOI (pour *multiplicity of infection*) n'induisait pas l'expression de PPAR γ . De plus, la quantité protéique de PPAR γ n'a pas changé de manière significative même après 48h p.i. dans les deux lignées cellulaires Calu-3 et RAW 264.7. En outre, nos expériences ont montré que la translocation de Nrf2 vers le noyau était faible. Ceci suggère que notre modèle d'infection n'induit pas une activation importante de Nrf2. Alors comment expliquer l'induction des gènes NQO1 et HO-1 (cibles de Nrf2) dans les poumons des souris infectées avec le virus X31/H3N2 (**Figure 15.A**)? En

fait, l'expression de gènes qui codent pour des antioxydants est modulée en plus de Nrf2 par d'autres facteurs transcriptionnels. Parmi ces facteurs, on retrouve PPAR γ , NF- κ B, AP-1 et AhR (pour *aryl hydrocarbon receptor*) (Dalton et al., 2002; Ferguson et al., 2009; Camhi et al., 1995; Morgan et Liu, 2011; Polvani et al., 2012). Donc ces facteurs, surtout NF- κ B, pourraient être responsables cette induction de NQO1 et HO-1.

En outre, des travaux publiés en 2015 supportent nos observations. Dans cette étude, et d'une façon similaire à ce qu'on a obtenu dans les Calu-3, les auteurs n'ont pas observé une translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules épithéliales alvéolaires A549 infectées avec le virus PR8 (MOI=10) (Simon et al., 2015). Par conséquent, nos résultats suggèrent qu'en absence d'une activation extrinsèque par ses agonistes, la voie antioxydante de Nrf2 n'est pas activée lors d'une infection par le virus influenza. Il n'est pas surprenant alors qu'une étude en 2011 ait montré que l'activité de NF- κ B et l'expression de TNF- α dans les poumons ainsi que la morbidité liée à l'infection sont similaires entre les souris de type sauvage et les souris Nrf2^{-/-} suite à une infection avec le virus PR8 (250 PFU). En effet, les auteurs de cette étude ont observé que l'inflammation pulmonaire est plus exacerbée chez les souris Nrf2^{-/-} infectées seulement lorsqu'elles étaient exposées à la fumée des cigarettes simultanément à l'infection (Yageta et al., 2011). Ceci suggère que le stress oxydatif exogène, comme la fumée de cigarette, active Nrf2 d'une façon plus importante que le stress oxydatif endogène libéré suite à l'infection. Par conséquent, il est difficile, dans notre modèle d'infection, d'évaluer le lien entre Nrf2 et PPAR γ . Alternativement, il serait possible d'utiliser un modèle d'infection accompagné de stress oxydatif exogène (ex: fumée de cigarettes). Il pourrait aussi être intéressant d'utiliser d'autres virus qui sont connus pour induire la production de stress oxydatif endogène à des niveaux élevés; tels que le virus H5N1. En effet, une étude intéressante a montré que l'infection avec le virus hautement pathogène H5N1 induit la production de ROS par les macrophages beaucoup plus que H1N1. De plus, cette étude suggère que ces ROS libérées causent l'oxydation des phospholipides et induisent par conséquent le développement des lésions pulmonaires aiguës chez les souris (Imai et al., 2008). Tenant compte de cette étude, il est alors concevable que lors d'une infection avec le virus H5N1, il y aura une activation plus importante de Nrf2 que par H1N1, à cause des ROS libérées par les macrophages. Il serait donc intéressant de tester la validité de cette hypothèse et de vérifier si l'infection avec

H5N1 induit, ou non, PPAR γ via Nrf2. Ceci permettrait de déterminer si ces deux voies interagissent pour réguler la réponse anti-inflammatoire lors d'infections avec les virus influenza hautement pathogènes, comme H5N1.

Discussion

Au-delà des infections des voies respiratoires relativement bénignes (ex: rhume), il existe de nombreuses maladies respiratoires d'origine infectieuse posant un réel problème de santé publique, dont la plus courante et mortelle est la grippe. Dans le cas de la grippe saisonnière, cette dernière affecte plusieurs millions d'individus dans le monde annuellement. En général, elle entraîne des complications graves et un nombre élevé de décès surtout chez les personnes fragiles, comme les personnes âgées, les nouveau nées et les personnes immunodéprimées (Trombetta et al., 2015). Toutefois, dans les cas de pandémie où les infections sont beaucoup plus sévères, les virus hautement pathogènes vont entraîner l'hospitalisation voire le décès des patients qui n'avaient pas de problèmes de santé sous-jacents. En effet, les diverses données semblent indiquer que la réponse inflammatoire excessive est le facteur de risque majeur durant la grippe pandémique. Quand l'infection est grave, il y aura une infiltration massive des cellules immunitaires déclenchant la surproduction de cytokines pro-inflammatoires et la mort des cellules épithéliales respiratoires (Fukuyama et Kawaoka, 2011; Damjanovic et al., 2012). Par exemple, des taux plasmatiques élevés en cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8, CCL2) ont été observées chez des patients infectés avec le virus pandémique sévère de 2009 (A(H1N1)pdm09). Ceci était en corrélation avec le développement d'une pneumonie suite à l'infection (Lee et al., 2011). D'une façon similaire, les virus pandémiques H1N1/1918 et H5N1 sont associés à une mobilisation excessive et précoce de macrophages et de neutrophiles dans les poumons, ce qui entraîne une augmentation de la production de cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) (Perrone et al., 2008). Bien que les inhibiteurs de la neuraminidase (NAIs) sont utiles pour améliorer et réduire la durée des symptômes cliniques s'ils sont administrés tôt aux patients, des complications pulmonaires sévères peuvent toujours arriver. Ceci est souvent à cause de la résistance des virus contre ce traitement. Les taux élevés de résistance aux NAIs actuels sont inquiétants et suggèrent que d'autres options thérapeutiques sont nécessaires (McKimm-Breschkin, 2013; Samson et al., 2013). Compte tenu de ces faits, l'utilisation d'agents qui ciblent la réponse inflammatoire de l'hôte plutôt que le virus a été proposée pour le traitement des infections sévères par le virus influenza. Ceci pourrait s'avérer efficace comme traitement et ce, indépendamment de l'évolution antigénique du virus.

Différentes stratégies ont été proposées pour lutter contre l'inflammation excessive lors d'une infection sévère par le virus influenza. Par exemple, London et al., ont investigué l'approche de renforcer la barrière vasculaire afin de renverser les dommages pulmonaires induites par la tempête de cytokines lors d'une infection sévère par le virus H5N1. Les auteurs ont montré que le traitement des souris avec une protéine nommée Slit augmentait l'expression de la cadhérine à la surface cellulaire, ce qui renforçait les interactions entre les cellules endothéliales. Ceci réduisait la perméabilité vasculaire au niveau des poumons, et par conséquent, diminuait la fuite vasculaire et l'infiltration des cellules immunitaires (London et al., 2010). Malgré que cela puisse être une démarche thérapeutique intéressante, les auteurs suggèrent qu'elle doit être appliquée en prophylaxie, sans quoi l'atteinte vasculaire sera trop importante pour pouvoir être réparée. De plus, d'autres recherches devront être menées pour que de tels concepts d'immunomodulation puissent être appliqués en clinique. D'autres études ont proposé que les immunomodulateurs utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires puissent être utiles pour réduire la tempête de cytokines pendant une infection sévère par le virus influenza. Parmi les immunomodulateurs les plus connus et les plus utilisés sont ceux de la famille des corticostéroïdes qui inhibent l'inflammation via l'activation du récepteur des glucocorticoïdes GR (pour *glucocorticoid receptor*) (Smoak et Cidlowski, 2004). Au fil des années, un certain nombre d'essais contrôlés et randomisés ont suggéré que les corticostéroïdes systémiques peuvent améliorer les résultats cliniques et la durée d'hospitalisation des patients qui subissent une pneumonie acquise en communauté. Cependant, dans le cas de l'influenza, un nombre croissant des études indiquent que les corticostéroïdes peuvent conduire à une issue défavorable. En effet, une étude observationnelle chez des adultes hospitalisés pour une infection avec le virus saisonnier H3N2 a conclu que l'administration des corticostéroïdes a prolongé la durée nécessaire pour la clairance virale (Lee et al., 2009). D'une façon similaire, de nombreuses données ont montré que lors d'une infection par le virus influenza H1N1, l'utilisation précoce d'une thérapie systémique de corticostéroïdes est associée à un risque accru de décès. Ceci est surtout observé en l'absence de traitement avec les NAI conventionnels ou si le traitement avec les corticostéroïdes est initié 4 à 5 jours après le début de la maladie (Martin-Loeches et al., 2011; Brun-Buisson et al., 2011; Kim et al., 2011; Han et al., 2011). En somme, ces

études ne fournissent aucune preuve d'un effet bénéfique des corticostéroïdes chez les patients souffrant des complications pulmonaires, infectés avec le virus influenza. Au contraire, ils peuvent être très nocifs. Pour cette raison, il est primordial d'évaluer d'autres stratégies anti-inflammatoires potentiell'activation les pour le traitement de l'influenza.

Une autre classe de médicaments ayant des effets anti-inflammatoires est celle des agonistes des récepteurs nucléaires PPARs, y compris ceux de PPAR γ . L'effet important de ce récepteur nucléaire sur l'inflammation et la réponse immunitaire a incité de nombreuses études sur son rôle dans les maladies inflammatoires au cours des dernières années. Plusieurs études ont montré que l'administration des ligands de PPAR γ , y compris les thiazolidinediones (TZD), chez la souris et l'homme, est bénéfique dans plusieurs modèles des maladies inflammatoires (Clark, 2002). Au niveau des poumons, PPAR γ est exprimé dans l'épithélium des voies respiratoires, la sous-muqueuse bronchique, les cellules des muscles lisses vasculaires et les cellules endothéliales. De plus, les cellules immunitaires, y compris les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages expriment fortement PPAR γ (Bassaganya-Riera et al., 2010). Les agonistes de PPAR γ peuvent donc cibler la majorité des types cellulaires impliqués dans l'immunopathologie induite par le virus de l'influenza. En conséquence, ils pourraient exercer des effets prophylactiques et thérapeutiques pendant les infections sévères par le virus.

Au sein de notre laboratoire, nous avons montré que l'administration du 15d-PGJ₂ protège les souris contre une infection létale par le virus influenza (Cloutier et al., 2012). En plus d'activer PPAR γ , cette prostaglandine est aussi un activateur de la voie antioxydante Nrf2 (Kansanen et al., 2009). L'activation du facteur transcriptionnel Nrf2 est importante pour réduire le stress oxydatif induit lors de l'infection avec le virus de l'influenza. Le rôle de Nrf2 dans l'action protectrice de la 15d-PGJ₂ contre l'infection par le virus influenza n'a toutefois pas été investigué dans cette précédente étude.

1. Cibler PPAR γ et Nrf2 est une stratégie prometteuse afin de limiter l'inflammation liée à l'infection

Considérant l'importance de limiter l'inflammation et le stress oxydatif lors d'infections sévères par le virus influenza, nous avons cherché à cibler ces deux voies dans le but de

minimiser la morbidité induite par l'infection. Dans ce contexte, nous avons identifié l'isoliquiritigénine (ILG) comme ligand de PPAR γ et Nrf2. L'isoliquiritigénine (ILG) est un flavonoïde naturel connu pour ses activités anti-inflammatoires et antioxydantes (Peng et al., 2015). ILG a été sélectionnée parce qu'elle active PPAR γ et Nrf2 en plus d'inhiber NF- κ B, un facteur de transcription clé pour l'expression des cytokines inflammatoires (Gong et al., 2015; Zhou et al., 2009; Park et Youn, 2010). De plus, ILG possède une activité inhibitrice de la neuraminidase récombinante du virus A/Brevig Mission/1/18/H1N1 avec un EC50 de l'ordre de 9 μ M (Ryu et al., 2010). En comparant avec cette étude, nous avons montré pour la première fois que l'ILG inhibe la réplication du virus PR8/H1N1 dans les cellules épithéliales avec un EC50 de l'ordre 24,7 μ M. Ceci suggère que la diminution de la réplication virale par l'ILG serait due à son effet anti-neuraminidase. Cependant, nous ne savons pas si la différence d'EC50 observée est attribuable à la souche virale ou à la technique utilisée.

En somme, parmi les agonistes potentiels de PPAR γ et Nrf2, ILG représente un candidat idéal en vertu de ces fonctions anti-inflammatoires, antioxydantes et antivirales. Effectivement, l'immunomodulateur idéal pour le traitement de la grippe réduirait l'immunopathologie induite par l'inflammation tout en conservant un environnement antiviral nécessaire pour la clairance virale. En accord avec cette hypothèse, des études précédentes ont suggéré que l'utilisation d'immunomodulateurs en combinaison avec des antiviraux (ex: oseltamivir) augmente l'efficacité du traitement antiviral lors d'infections à l'influenza (Sharma et al., 2013; Ottolini et al., 2003).

Dans cette étude, en utilisant le modèle murin d'infection par le virus H1N1, nous avons montré que l'ILG réduit significativement les titres viraux pulmonaires ainsi que la morbidité liée à l'infection. D'une façon semblable à la 15d-PGJ₂, l'ILG également inhibe l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires induites par l'infection. De plus, le traitement réduit le recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives au site d'infection. Ceci est particulièrement intéressant puisque cette réponse inflammatoire exacerbée est considérée comme l'un des principaux facteurs responsables de la gravité de la maladie (Fukuyama et Kawaoka, 2011).

Nous avons montré ici que l'activation de PPAR γ par l'ILG réduit la réponse inflammatoire dans les Calu-3 en réponse à l'infection par le virus influenza. L'utilisation de l'antagoniste de PPAR γ (GW9662) nous a permis de confirmer que l'activité anti-inflammatoire de l'ILG est médiée en partie par ce récepteur. Ceci confirme le concept que l'activation de la voie de ce récepteur pourrait être bénéfique pour limiter l'inflammation durant l'infection par le virus influenza (Cloutier et al., 2012).

De plus, et en utilisant l'essai de luciférase, nous avons observé que l'ILG active la voie antioxydante de Nrf2 dans les cellules A549. Il est utile de mentionner que ces cellules A549 possèdent des mutations dans la séquence IVR de Keap1, diminuant ainsi sa capacité de retenir Nrf2 dans le cytoplasme (Zhan et al., 2012). Ceci pourrait réduire la réplication du virus ainsi que la réponse inflammatoire dans ces cellules lors de l'infection par le virus influenza. Pour cette raison, ces cellules ont été utilisées seulement pour l'essai de luciférase parce qu'il est difficile de transfecter les Calu-3.

Il a été montré que l'activation de Nrf2 protège les cellules contre les lésions induites par les espèces réactives à l'oxygène durant l'infection par le virus influenza (Kosmider et al., 2012). Ceci suggère que l'ILG peut réduire, via Nrf2, le stress oxydatif produit durant l'infection (Vlahos et al., 2011). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

Ayant démontré ces propriétés importantes de l'ILG *in vitro*, nous avons voulu les valider dans un modèle murin d'infection par le virus influenza. Une limitation importante de l'utilisation de l'ILG était sa faible solubilité dans les solutions aqueuses. Dans cette étude, nous proposons donc une modification chimique de l'ILG (ILG-p) afin de rendre cette molécule soluble dans les solutions aqueuses et de bénéficier de cette molécule pour les expériences *in vivo* sans utiliser des solvants toxiques. Il s'agit de l'ajout du groupement phosphate à l'hydroxyle (OH) en position C4 de la molécule. Les expériences ont montré que ce phosphate ajouté est clivé après 4 heures dans le plasma, mais seulement après 30 minutes dans les extraits des poumons de souris. Ceci est important à noter, parce qu'une étude en 2010 a montré que les modifications en position C4 dans la molécule d'ILG (position de l'ajout du phosphate) diminuent d'une manière significative son activité inhibitrice de la neuraminidase *in vitro* (Ryu et al., 2010). Par conséquent cette étude

suggère que la position C4 de l'ILG joue un rôle central dans l'inhibition de de cette enzyme, en interagissant avec son site hydrophile. Alors, afin de garder son activité antivirale, il est important que le phosphate ajouté sur l'ILG soit clivé rapidement dans l'organisme, et surtout au niveau pulmonaire. Étant donné que l'ILG-p est métabolisé en ILG rapidement *in vitro* dans l'homogénat des poumons, l'activité antivirale de l'ILG-p est fort probablement conservée suite à l'administration par voie i.p. chez les souris. En effet, à jour 3 après l'infection, on a observé une réduction significative de la réplication virale dans les poumons des souris infectées et traitées avec l'ILG-p. L'ILG, contrairement à la 15-PGJ₂ et à la rosiglitazone, a une activité antivirale intrinsèque. Donc cette activité peut expliquer, du moins en partie, l'inhibition de la réplication du virus influenza.

Il a été suggéré que la 15-PGJ₂ réduit la réplication virale dans les poumons des souris infectées en réduisant l'inflammation, ce qui facilite l'élimination du virus (Cloutier et al., 2012). L'ILG aussi pourrait agir de cette façon. Le traitement des souris infectées avec l'ILG diminuait d'une manière importante l'expression de cytokines inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires au site d'infection. De plus, la morbidité était aussi moins élevée chez les souris ayant reçu l'ILG-p par rapport aux souris contrôles. En effet, nos résultats ont clairement démontré que l'administration de l'ILG-p a réduit d'une façon significative la perte de poids chez les souris infectées. La différence est apparue au jour 5, mais a été plus soutenue après le jour 10 et jusqu'à 17 jours après l'infection. Ceci suggère que l'ILG module des événements cellulaires et moléculaires permettant une meilleure récupération du poids des souris infectées. Ces effets bénéfiques s'expliquent, d'une part, par la diminution de la charge virale et, d'autre part, par la réduction de la réponse inflammatoire.

Nous croyons que l'effet anti-inflammatoire de l'ILG observé chez les souris est médié par l'activité de PPAR γ . En effet, nos expériences réalisées *in vitro* ont montré que l'inhibition de l'expression de cytokines par l'ILG est dépendante de PPAR γ . Cependant, nous ne pouvons pas négliger qu'une partie de cette activité pourrait également être médiée par une inhibition directe de la voie de NF- κ B. Surtout qu'une étude a montré que l'ILG (50 μ M) peut inhiber la phosphorylation d'I κ B et sa dégradation stimulée par le LPS, et donc la translocation de NF- κ B vers le noyau dans les cellules RAW 264.7 (Park et Youn, 2010).

Néanmoins, nous n'avons pas pu observer une inhibition de la dégradation d'I κ B par l'ILG (50 μ M) lors de l'infection par le virus influenza ou après une stimulation par le TNF- α . Et ceci dans les cellules A549 et les cellules RAW 264.7. Par conséquent, le mode d'action de l'ILG peut varier selon le type de stimulus et/ou le modèle cellulaire utilisé.

Des expériences supplémentaires permettraient de déterminer l'implication de PPAR γ dans la protection conférée par l'ILG *in vivo*. De plus, il serait intéressant d'investiguer *in vivo* le mécanisme exact par lequel agit PPAR γ pour réduire l'inflammation. Aldridge et al, ont montré que le traitement avec le ligand de PPAR γ , la pioglitazone, exerce un effet protecteur contre une infection sévère en réduisant l'expression de CCL2 et CCL7, et par conséquent le recrutement des cellules dendritiques tipDCs productrices de TNF- α et exprimant iNOS. Cependant, ceci n'était pas traduit en diminution de l'expression de iNOS dans les poumons. De plus, les auteurs ne confirment pas si cet effet est dépendant de PPAR γ surtout que plusieurs agonistes de PPAR γ ciblent d'autres voies impliquées dans l'inflammation. En outre, les auteurs n'expliquent pas pourquoi la pioglitazone réduisait seulement l'expression de ces deux chimiokines entre autres (Aldridge et al., 2009). D'autres expériences sont aussi nécessaires pour déterminer sur quel(s) type(s) cellulaire(s) PPAR γ agit pour réduire l'expression de cytokines lors de l'infection. L'utilisation des souris transgéniques conditionnelles pour PPAR γ pourrait permettre de répondre à cette question et d'élucider la spécificité cellulaire et le mécanisme d'action de cette voie.

En conclusion, l'ILG, tout comme la 15d-PGJ₂ ou d'autres agonistes PPAR- γ , pourrait diminuer la sévérité de l'infection et donc être efficace pour soigner les patients infectés.

Comme perspective de l'objectif 1, il serait intéressant d'investiguer *in vivo* si l'activation potentielle de Nrf2 par l'ILG a participé à la protection des souris infectées. Dans ce contexte, plusieurs études, incluant une étude réalisée dans notre laboratoire, ont montré *in vitro* que l'activation de Nrf2 par ses agonistes est bénéfique durant une infection par le virus influenza. En effet, Nrf2 est un outil moléculaire intéressant pour combattre et neutraliser les espèces réactives à l'oxygène produites durant les infections. De plus, Nrf2 est connu pour avoir un rôle antiviral, *in vitro*, contre le virus influenza. À l'heure actuelle, il y a cependant peu des études réalisées *in vivo* (chez les souris) qui ont étudié le rôle protecteur de Nrf2 durant l'infection par le virus influenza. Une de ces études a évalué

l'effet de la carbocisteine, un agoniste de Nrf2, sur la survie, la morbidité et la réplication virale dans les poumons des souris infectées avec le virus PR8/H1N1 (50 PFU). Le traitement avec la carbocisteine (100 mg/kg/jour) a diminué de manière significative le taux de la protéine virale NP dans les poumons des souris. Ce résultat indique que cet agoniste de Nrf2 a un effet antiviral *in vivo* contre le virus influenza. Malgré cela, la carbocisteine, contrairement à l'ILG, avait un effet très modeste sur la morbidité des souris infectées et ce, seulement à jour 6 et 7 après l'infection (Yageta et al., 2014). Ceci suggère que le ciblage de PPAR γ en plus de Nrf2 (par des molécules comme l'ILG) est une meilleure approche pour limiter la morbidité liée à l'inflammation et au stress oxydatif. Puisque l'ILG active la voie Nrf2, il est concevable que l'activation de cette voie participe à l'effet protecteur de cette molécule observé *in vivo*, comme dans le cas de la carbocisteine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions évaluer l'effet de l'ILG-p contre l'infection virale chez les souris transgéniques n'exprimant pas Nrf2 (Nrf2^{-/-}). Par exemple, si les souris Nrf2^{-/-} infectées et traitées avec l'ILG-p présentent des lésions pulmonaires et des signes d'inflammation plus élevées que les souris de type sauvage, cela pourrait signifier que Nrf2 fait partie des cibles de l'ILG nécessaire pour la protection contre l'influenza.

De plus, des mises au point sont nécessaires afin de déterminer si l'activation de PPAR γ et de Nrf2 par l'ILG-p est capable d'assurer une protection complète lors d'une infection létale par le virus influenza. Pour ce faire, nous avons évalué l'effet de l'administration de l'ILG-p (50 mg/kg/jour) sur le taux de survie chez des souris infectées avec 100 PFU du virus PR8/H1N1 (dose létale). Malheureusement, et contrairement à quoi nous aurions pu nous attendre, la morbidité et le taux de survie n'était pas significativement différents entre les souris contrôles et les souris traitées avec l'ILG-p. Les mauvaises caractéristiques pharmacocinétiques de cette molécule pourraient cependant expliquer ce phénomène. En effet, une première étude en 2008 a montré que l'ILG est modifié rapidement dans le foie par glucuronidation au niveau des hydroxyles. Cette modification permet donc l'élimination rapide de la molécule dans l'urine (Guo et al., 2008). D'une façon similaire, une étude récente a décrit le profil pharmacocinétique de l'ILG dans le plasma du rat et a montré qu'elle présente une faible biodisponibilité après une administration par voie orale (dose: 0.468 g/kg). En outre, le temps de l'élimination (demi-vie), l'aire sous la courbe (ASC_{0- ∞}) et la concentration maximale (C_{max}) de l'ILG étaient de: 3.04 \pm 0.22 (heures);

2.10 ± 0.09 ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) et 0.28 ± 0.01 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivement. Donc, ces données, surtout la C_{max} et l' $\text{ASC}_{0-\infty}$ qui représente la concentration plasmatique de l'ILG en fonction du temps, montrent clairement que l'ILG a une faible biodisponibilité, et ceci, comme les auteurs de l'étude suggèrent, probablement à cause d'un métabolisme rapide de l'ILG dans l'intestin et le foie (Wu et al., 2013). Par conséquent, il faudrait comparer la pharmacocinétique de l'ILG-p avec l'ILG et ainsi voir si l'absence de protection par l'ILG-p lors d'une infection létale est due à ce facteur. De plus, nous proposons d'investiguer d'autres voies d'administrations de l'ILG-p qui pourraient éviter le métabolisme rapide de cette molécule par le foie. En effet, nous pensons que l'administration de l'ILG-p par voie nasale pourrait offrir une protection plus importante lors d'une infection létale par le virus influenza. Cette route d'administration cible directement le site d'infection et évite donc l'excrétion rapide de l'ILG-p. Ceci pourrait augmenter l'efficacité du traitement. De plus, et d'un point de vue thérapeutique, il est intéressant de synthétiser des formes plus stables de l'ILG qui pourraient avoir des meilleures caractéristiques pharmacocinétiques. Par exemple, l'ILG pourrait être conjugués à des polymères hydrophiles. Une telle modification est connue pour augmenter la solubilité des médicaments dans l'eau ainsi que pour prolonger leurs demi-vies *in vivo* (Larson et Ghandehari, 2012).

En outre, il serait intéressant de valider l'effet protecteur d'ILG dans un autre modèle d'infection. En effet, et parce que la souris n'est pas un hôte naturel du virus influenza il est nécessaire d'adapter le virus à la souris. En revanche, la pathologie et la transmission du virus ne sont pas comparables à ce que l'on observe chez l'homme. Malgré tout, la souris reste le premier choix pour l'étude de la réponse immunitaire liée à l'infection et le développement de traitements antiviraux.

Enfin, il serait intéressant d'investiguer le ciblage de $\text{PPAR}\gamma$ et Nrf2 avec l'ILG pour traiter d'autres atteintes inflammatoires ou infectieuses où la réponse immunitaire et le stress oxydatif excessifs contribuent à la pathologie.

2. Nrf2 diminue le stress oxydatif, l'inflammation, modifie la balance de protéases/antiprotéases et protège contre l'infection par le virus influenza

En plus de son rôle antioxydant et anti-inflammatoire, Nrf2 contrôle l'expression de plusieurs protéases et antiprotéases impliquées dans divers processus physiologiques et

régule donc l'équilibre protéases/antiprotéases. Tout d'abord, Nrf2 a été démontré pour être un régulateur négatif de l'expression de la protéase TMPRSS2 d'une façon dépendante du récepteur de l'androgène AR (pour *androgen receptor*) dans certaines lignées cellulaires cancéreuses de prostate (Schultz et al., 2014). D'un autre côté, il a été démontré que Nrf2 induit l'expression de l'antiprotéase SLPI. Par ailleurs, en absence de Nrf2, l'exposition à la fumée de cigarettes induit une inflammation et des lésions pulmonaires plus importantes chez les souris. Ces lésions pulmonaires sont associées avec une activité accrue des protéases se trouvant dans l'espace extracellulaire pulmonaire (Iizuka et al., 2005). Sur la base des données résumées ci-dessus, il a été proposé que Nrf2 exerce une activité antivirale contre le virus influenza selon une approche au moins à deux volets: 1) en induisant SLPI, qui diminue la réplication virale dans les cellules épithéliales, et 2) en diminuant la sécrétion de TMPRSS2, ce qui diminue l'activation de HA₀ du virus et donc la réplication virale. Devant cette hypothèse, le groupe d'Illona Jaspers a démontré que le traitement des cellules épithéliales nasales avec l'EGCG, qui est un agoniste de Nrf2 ayant un effet antiviral, augmentait le niveau de l'antiprotéase SLPI. Cependant, ils n'ont pas vérifié si cette induction de SLPI est responsable ou non de l'activité antivirale de ce composé (Kesic et al., 2012). Dans ce contexte, un autre groupe de recherche a montré en 2013 qu'EGCG réduit la pénétration du virus A/H3N2 dans les cellules MDCK. Cette étude suggère également que cet agoniste de Nrf2 supprime légèrement l'activité de la NA virale, ce qui peut réduire la réplication du virus (Kim et al., 2013). Ceci suggère que malgré que l'EGCG induise l'expression de SLPI via Nrf2, un autre mécanisme pourrait aussi être impliqué dans son action antivirale. En conséquence, l'EGCG n'est pas un bon agoniste à utiliser afin d'évaluer l'effet antiviral de Nrf2. En résumé, le mécanisme exact par lequel l'activation de Nrf2 réduit la réplication du virus influenza n'est pas complètement élucidé. On ne sait pas s'il implique seulement SLPI ou s'il nécessite d'autres antiprotéases. De plus, on ne connaît pas la protéase endogène activant la HA₀ du virus qui est inhibée par SLPI.

Dans ma seconde publication, nous avons clarifié le lien entre Nrf2, SLPI et TMPRSS2 dans l'inhibition de la réplication du virus influenza. Dans cette étude, nous avons choisi la Bardoxolone (CDDO-méthyle ester ou CDDO-me) qui est un triterpénoïde synthétique et inducteur puissant de la voie Nrf2 comme outil d'investigation. Étant donné ses effets

antioxydants et anti-inflammatoires, il a été étudié en clinique afin d'évaluer ses propriétés anti-cancéreuses et son efficacité pour le traitement de l'insuffisance rénale chronique. De nombreux travaux ont montré que la CDDO-me est un agoniste de Nrf2 qui présente des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques dans les poumons des souris (Boffa et al., 2012; Kulkarni et al., 2013). Nous avons donc proposé d'utiliser la CDDO-me afin d'investiguer le mécanisme d'action antivirale de Nrf2.

Nous montrons ici que le traitement des Calu-3 avec la CDDO-me augmente l'expression de SLPI d'une façon dépendante de Nrf2 et réduit la réplication du virus influenza. Pour la première fois, et en utilisant un siRNA dirigé contre SLPI, nous avons montré que l'induction de SLPI est responsable de la diminution de la réplication virale par les agonistes de Nrf2. Ce qui suggère, au moins dans notre modèle cellulaire, que c'est le principal mécanisme antiviral de l'activation de Nrf2. Cependant, des expériences dans d'autres types cellulaires ou chez les souris sont nécessaires pour valider nos résultats et confirmer notre modèle. De plus, il serait intéressant de confirmer ces résultats par d'autres activateurs de Nrf2, tels que l'ILG. Cependant, vu que l'ILG inhibe directement la neuraminidase, il serait difficile de dissocier entre son effet antiviral direct et son effet antiviral potentiel médié par l'activation de Nrf2.

Il a été rapporté que SLPI peut inhiber la réplication du virus influenza *in vitro*. Toutefois, ces études ont été réalisées dans les cellules MDCK en présence de la trypsine comme protéase exogène pour permettre l'entrée et la réplication virale. Dans notre étude, nous avons montré que la protéine recombinante humaine SLPI réduit de manière significative la réplication du virus influenza dans les cellules Calu-3, qui favorisent facilement la réplication de la grippe sans addition de protéases exogènes. De plus, pour la première fois, nos résultats démontrent que SLPI est capable d'inhiber l'activité de TMPRSS2 et donc la réplication virale dépendante de cette protéase (**Figure 16**).

Contrairement au groupe de Debasis Mondal (Schultz et al., 2014), nous n'avons pas observé une diminution de l'expression de TMPRSS2 suite à l'activation de Nrf2. Cette observation pourrait être due au type cellulaire utilisé. Il a été rapporté que le traitement avec l'EGCG de cellules épithéliales nasales humaines différenciées réduit la sécrétion extracellulaire de HAT et de TMPRSS2. Toutefois, les quantités intracellulaires de ces

protéases sont restées inchangées. Les auteurs de cette étude suggèrent que c'est un effet dépendant de Nrf2, mais ils n'ont pas déterminé comment Nrf2 pourrait modifier la sécrétion de ces protéases sans agir sur leurs expressions (Kesic et al., 2012; Meyer et Jaspers, 2015).

Les études ont montré que les souris déficientes en TMPRSS2 sont protégées contre les infections avec les virus de type H1N1 et H7N9. Ceci démontre le rôle clé de TMPRSS2 dans le cycle de réplication de ces virus. Au contraire, ces souris étaient sensibles aux infections avec le virus H3N2. Ces résultats suggèrent qu'au niveau du système respiratoire, le clivage de l'hémaglutinine de H3N2 est favorisé par d'autres protéases (Garten et al., 2015). En accord avec cette hypothèse, il a été montré récemment que la HA₀ du virus H3N2 est clivée par TMPRSS4 en plus de TMPRSS2 dans les poumons des souris infectées (Kuhn et al., 2016). Dans notre étude, nous avons observé que l'activation de Nrf2 induit SLPI et inhibe le virus PR8/H1N1 avec une meilleure efficacité qu'avec les virus H3N2 et H1N1 pandémique de 2009. De plus, nos résultats montrent que SLPI inhibe la réplication dépendante de TMPRSS2 mais pas de HAT. Nos résultats sont en accord avec une ancienne étude montrant qu'une concentration de 10 μ M de SLPI inhibait très légèrement l'activité de HAT (moins du 5% de réduction) (Yasuoka et al., 1997). Il est concevable que SLPI ne soit pas capable d'inhiber la TMPRSS4. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'induction de SLPI par Nrf2 inhibait moins efficacement le virus H3N2. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Les virus pandémiques possèdent un site multibasique au niveau de la HA ce qui permet leur clivage par des protéases ubiquitaires comme la furine et les proprotéines convertases (Fukuyama et Kawaoka, 2011). Ceci expliquerait pourquoi SLPI est moins efficace pour inhiber le virus pandémique de 2009.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'antiprotéase SLPI peut inhiber l'activation protéolytique de l'hémaglutinine du virus influenza médiée par des protéases qui sont exprimées par les cellules épithéliales pulmonaires, telles que TMPRSS2. Le ciblage de la voie Nrf2 est donc une stratégie prometteuse pour réduire l'infection par le virus influenza. Cette approche est intéressante parce qu'au lieu de cibler le virus, elle cible des protéines

appartenant à l'hôte. Ce qui pourrait éviter le problème de la résistance acquise due à des mutations dans l'ARN viral influençant les protéines synthétisées.

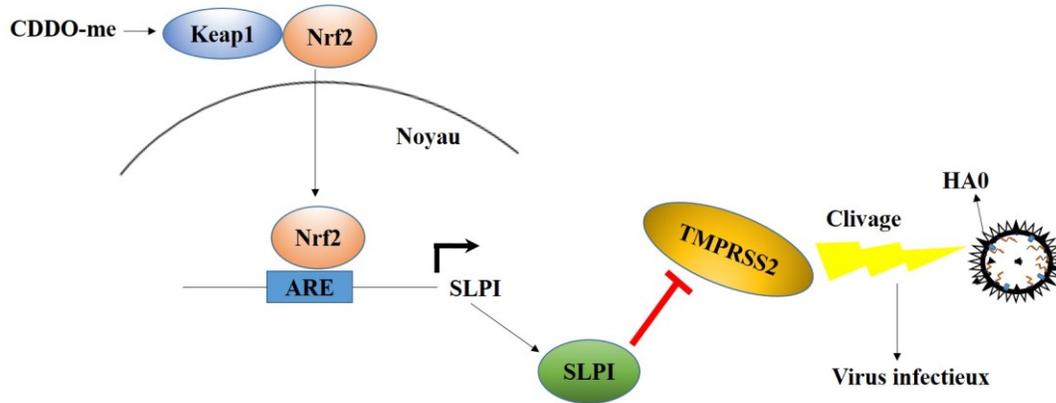


Figure 16: L'activation de Nrf2 par la CDDO-me inhibe la réplication virale via SLPI. Le traitement avec la CDDO-me induit la translocation de Nrf2 vers le noyau. Nrf2 induit l'expression de SLPI via son élément de réponse antioxydant ARE. SLPI inhibe l'activité de la protéase TMPRSS2 et donc le clivage de l'hémagglutinine virale HA0. Ceci par conséquence inhibe la réplication du virus influenza.

Chapitre IV : Conclusion

Premièrement, nous avons démontré que l'isoliquiritigénine (ILG) est un agoniste de PPAR γ et Nrf2 et un inhibiteur de la réplication du virus influenza. De plus, nos résultats ont montré que cette molécule inhibe l'inflammation liée à l'infection, en partie d'une façon dépendante PPAR γ . L'administration d'ILG réduit la réplication virale ainsi que l'expression de cytokines inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires vers les poumons et par conséquent protège les souris contre une infection sévère par le virus H1N1.

Deuxièmement, nous avons démontré pour la première fois la relation entre l'activation de Nrf2 et l'induction de l'antiprotéase SLPI, et l'inhibition de l'activité TMPRSS2 par SLPI dans la diminution de la réplication virale dans les cellules épithéliales. Dans cette étude, nous avons démontré que la CDDO-me induit l'expression de l'antiprotéase SLPI d'une façon complètement dépendante de Nrf2. Nous avons aussi démontré que SLPI inhibe l'activation de l'hémagglutinine HA0 du virus influenza par la protéase TMPRSS2. Ceci diminue par conséquent la réplication virale à l'intérieur des cellules. Notre étude définit ainsi un mécanisme par lequel des activateurs de Nrf2 protègent les cellules épithéliales bronchiques humaines contre une infection par le virus de la grippe.

En conclusion, nos résultats ont démontré que le fait de cibler les deux voies moléculaires PPAR γ et Nrf2, permet une inhibition significative de l'inflammation et de la réplication du virus influenza. Ainsi, cette étude pourrait être fondamentale pour le développement de nouveaux traitements anti-inflammatoires et antiviraux, basés sur des molécules activatrices de PPAR γ et Nrf2, comme l'ILG et la CDDO-me. Ces traitements pourraient diminuer la sévérité de la grippe sans que le virus développe une résistance, étant donné qu'il n'est pas ciblé directement. Ces agonistes pourraient aussi être utiles pour traiter d'autres maladies caractérisées par une inflammation excessive (arthrite, maladies inflammatoires de l'intestin, etc.). De plus, les agonistes qui ciblent la voie Nrf2 pourraient être une approche prometteuse pour réduire d'autres maladies infectieuses qui dépendent de l'activité de la protéase TMPRSS2; telles que l'infection par le coronavirus (CoV-SRAS).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Martin Richter pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fait confiance. Ses conseils, son support et son intérêt m'ont permis de réaliser ce doctorat. Il a toujours su me conseiller, me guider et discuter avec moi pour résoudre les problèmes rencontrés dans le projet ainsi que pour proposer de nouvelles idées. Son soutien ainsi que sa grande patience ont été grandement appréciés. Je tiens également à remercier tous mes collègues, passés et présents : Alexandre Cloutier, Isabelle Marois, Isabelle Meunier, Dominic Cliche, Émilie Garneau, Olivier Morisseau, Émilie Gravel et Alexandre Beaulieu. Un grand merci à Dr Alexandre Cloutier pour le temps qu'il a sacrifié pour discuter et planifier les expériences ensemble. Je le remercie vivement pour son aide, le partage de ses connaissances et pour la lecture et la correction soigneuse des manuscrits. Je tiens également à souligner son implication dans les nombreuses expériences surtout avec les souris. Un merci spécial à Isabelle Marois pour sa patience, ses encouragements, ses conseils et son aide mais aussi, pour les agréables discussions que j'ai partagées avec elle. Je lui suis reconnaissant pour l'attention qu'elle a portée durant la lecture de ce document. Je tiens également à la remercier pour les délicieux gâteaux confectionnés pour mon anniversaire pendant ces quatre années. Merci aussi à Isabelle Meunier pour toute l'aide fournie et les conversations. Elle était toujours présente pour répondre à mes questions et me conseiller. Je tiens également à remercier chaleureusement Dominic Cliche pour toute l'aide qu'il m'a donnée. C'est une personne très agréable avec qui j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à discuter de divers sujets. Merci à Olivier et Émilie pour leur présence et leur aide. L'enthousiasme de tous m'a permis de travailler dans un milieu formidable. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont supporté, conseillé et aidé de près ou de loin. Je désire porter une attention plus particulière à ma famille (ma mère et mon frère) pour leur patience et leur support. Je remercie énormément ma fiancée. Elle a toujours été là pour m'encourager et me supporter dans toutes les situations. Un immense merci pour avoir toujours eu confiance en moi.

Finalement, je remercie les membres de mon jury de thèse: Professeur Simon Rousseau de l'Université McGill, et les professeurs de l'Université de Sherbrooke Klaus Klarskov (pharmacologie, président de jury) et Claude Asselin (anatomie et biologie cellulaire) qui ont accepté de prendre de leurs temps pour évaluer cette thèse.

Bibliographie

- AHMADIAN, M., SUH, J. M., HAH, N., LIDDLE, C., ATKINS, A. R., DOWNES, M. & EVANS, R. M. 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19, 557-66.
- AKARSU, H., BURMEISTER, W. P., PETOSA, C., PETIT, I., MULLER, C. W., RUIGROK, R. W. & BAUDIN, F. 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J*, 22, 4646-55.
- ALDRIDGE, J. R., JR., MOSELEY, C. E., BOLTZ, D. A., NEGOVETICH, N. J., REYNOLDS, C., FRANKS, J., BROWN, S. A., DOHERTY, P. C., WEBSTER, R. G. & THOMAS, P. G. 2009. TNF/ i NOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5306-11.
- AMARANTE, M. K. & WATANABE, M. A. 2010. Toll-like receptor 3: involvement with exogenous and endogenous RNA. *Int Rev Immunol*, 29, 557-73.
- ARNON, T. I., MARKEL, G. & MANDELBOIM, O. 2006. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol*, 16, 348-58.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BARIK, S. 2012. New treatments for influenza. *BMC Med*, 10, 104.
- BARON, J., TARNOW, C., MAYOLI-NUSSLE, D., SCHILLING, E., MEYER, D., HAMMAMI, M., SCHWALM, F., STEINMETZER, T., GUAN, Y., GARTEN, W., KLENK, H. D. & BOTTCHE-FRIEBERTSHAUSER, E. 2013. Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol*, 87, 1811-20.
- BASSAGANYA-RIERA, J., SONG, R., ROBERTS, P. C. & HONTECILLAS, R. 2010. PPAR- γ activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections. *Viral Immunol*, 23, 343-52.
- BEAULIEU, A., GRAVEL, E., CLOUTIER, A., MAROIS, I., COLOMBO, E., DESILETS, A., VERREAULT, C., LEDUC, R., MARSAULT, E. & RICHTER, M. V. 2013. Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol*, 87, 4237-51.
- BECKETT, D. 2001. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J Mol Biol*, 314, 335-52.
- BEDARD, K. & KRAUSE, K. H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- BELICH, M. P. & TROWSDALE, J. 1995. Proteasome and class I antigen processing and presentation. *Mol Biol Rep*, 21, 53-6.
- BELZ, G. T., WODARZ, D., DIAZ, G., NOWAK, M. A. & DOHERTY, P. C. 2002. Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol*, 76, 12388-93.
- BISWAS, S. K. & NAYAK, D. P. 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*, 68, 1819-26.
- BOFFA, J. J., DUSSAULE, J. C., RONCO, P. & CHATZIANTONIOU, C. 2012. [Chronic kidney disease, new therapeutic approaches]. *Rev Prat*, 62, 72-5.
- BORGELING, Y., SCHMOLKE, M., VIEMANN, D., NORDHOFF, C., ROTH, J. & LUDWIG, S. 2014. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs

- influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J Biol Chem*, 289, 13-27.
- BOTTCHER-FRIEBERTSHAUSER, E., FREUER, C., SIELAFF, F., SCHMIDT, S., EICKMANN, M., UHLENDORFF, J., STEINMETZER, T., KLENK, H. D. & GARTEN, W. 2010. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol*, 84, 5605-14.
- BOTTCHER-FRIEBERTSHAUSER, E., KLENK, H. D. & GARTEN, W. 2013. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathog Dis*, 69, 87-100.
- BOUVIER, N. M. & PALESE, P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4, D49-53.
- BRIEDIS, D. J. & LAMB, R. A. 1982. Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *J Virol*, 42, 186-93.
- BRIEDIS, D. J., LAMB, R. A. & CHOPPIN, P. W. 1982. Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. *Virology*, 116, 581-8.
- BROWN, D. M., ROMAN, E. & SWAIN, S. L. 2004. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol*, 16, 171-7.
- BRUN-BUISSON, C., RICHARD, J. C., MERCAT, A., THIEBAUT, A. C. & BROCHARD, L. 2011. Early corticosteroids in severe influenza A/H1N1 pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 183, 1200-6.
- BRYAN, H. K., OLAYANJU, A., GOLDRING, C. E. & PARK, B. K. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol*, 85, 705-17.
- BUI, M., WHITTAKER, G. & HELENIUS, A. 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, 70, 8391-401.
- CAMHI, S. L., ALAM, J., OTTERBEIN, L., SYLVESTER, S. L. & CHOI, A. M. 1995. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 13, 387-98.
- CDC 2010. Estimates of deaths associated with seasonal influenza --- United States, 1976-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59, 1057-62.
- CERWENKA, A., MORGAN, T. M., HARMSSEN, A. G. & DUTTON, R. W. 1999. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J Exp Med*, 189, 423-34.
- CHAKRABARTI, A. K. & PASRICHA, G. 2013. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology*, 440, 97-104.
- CHEN, G. & GOEDDEL, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 1634-5.
- CHEN, W., CALVO, P. A., MALIDE, D., GIBBS, J., SCHUBERT, U., BACIK, I., BASTA, S., O'NEILL, R., SCHICKLI, J., PALESE, P., HENKLEIN, P., BENNINK, J. R. & YEWDELL, J. W. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 7, 1306-12.

- CHENAVAS, S., MONOD., A., RUIGROK., R. W. H. & CRÉPIN., T. 2013. Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales. *Virologie*, 17, 10.
- CHO, H. Y., GLADWELL, W., WANG, X., CHORLEY, B., BELL, D., REDDY, S. P. & KLEEBERGER, S. R. 2010. Nrf2-regulated PPAR $\{\gamma\}$ expression is critical to protection against acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 182, 170-82.
- CLARK, R. B. 2002. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol*, 71, 388-400.
- CLOUTIER, A., MAROIS, I., CLOUTIER, D., VERREAULT, C., CANTIN, A. M. & RICHTER, M. V. 2012. The prostanoid 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin-j₂ reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J Infect Dis*, 205, 621-30.
- COLMAN, P. M., VARGHESE, J. N. & LAVER, W. G. 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*, 303, 41-4.
- CONENELLO, G. M. & PALESE, P. 2007. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe*, 2, 207-9.
- CROSS, J. & WEDEKIND, C. A. 2001. Advances in pharmacology. New treatments for influenza: neuraminidase inhibitors. *Med Health R I*, 84, 209-11.
- DALTON, T. P., PUGA, A. & SHERTZER, H. G. 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact*, 141, 77-95.
- DAMJANOVIC, D., SMALL, C. L., JEYANATHAN, M., MCCORMICK, S. & XING, Z. 2012. Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe. *Clin Immunol*, 144, 57-69.
- DE CLERCQ, E. 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 1015-25.
- DEGUINE, J. & BARTON, G. M. 2014. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep*, 6, 97.
- DIENZ, O., RUD, J. G., EATON, S. M., LANTHIER, P. A., BURG, E., DREW, A., BUNN, J., SURATT, B. T., HAYNES, L. & RINCON, M. 2012. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol*, 5, 258-66.
- ECCLES, R. 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis*, 5, 718-25.
- EVEN-OR, O., SAMIRA, S., ELLIS, R., KEDAR, E. & BARENHOLZ, Y. 2013. Adjuvanted influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 12, 1095-108.
- FERGUSON, H. E., THATCHER, T. H., OLSEN, K. C., GARCIA-BATES, T. M., BAGLOLE, C. J., KOTTMANN, R. M., STRONG, E. R., PHIPPS, R. P. & SIME, P. J. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands induce heme oxygenase-1 in lung fibroblasts by a PPARgamma-independent, glutathione-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, L912-9.
- FERNANDEZ-SESMA, A., MARUKIAN, S., EBERSOLE, B. J., KAMINSKI, D., PARK, M. S., YUEN, T., SEALFON, S. C., GARCIA-SASTRE, A. & MORAN, T. M. 2006. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol*, 80, 6295-304.
- FITZGERALD, K. A., MCWHIRTER, S. M., FAIA, K. L., ROWE, D. C., LATZ, E., GOLENBOCK, D. T., COYLE, A. J., LIAO, S. M. & MANIATIS, T. 2003.

- IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 4, 491-6.
- FLYNN, K. J., BELZ, G. T., ALTMAN, J. D., AHMED, R., WOODLAND, D. L. & DOHERTY, P. C. 1998. Virus-specific CD8⁺ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. *Immunity*, 8, 683-91.
- FUKUYAMA, S. & KAWAOKA, Y. 2011. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol*, 23, 481-6.
- GARCIA-SASTRE, A. 2001. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, 279, 375-84.
- GARTEN, W., BRADEN, C., ARENDT, A., PEITSCH, C., BARON, J., LU, Y., PAWLETKO, K., HARDES, K., STEINMETZER, T. & BOTTCHER-FRIEBERTSHAUSER, E. 2015. Influenza virus activating host proteases: Identification, localization and inhibitors as potential therapeutics. *Eur J Cell Biol*, 94, 375-83.
- GAZIT, R., GRUDA, R., ELBOIM, M., ARNON, T. I., KATZ, G., ACHDOUT, H., HANNA, J., QIMRON, U., LANDAU, G., GREENBAUM, E., ZAKAY-RONES, Z., PORGADOR, A. & MANDELBOIM, O. 2006. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat Immunol*, 7, 517-23.
- GERVOIS, P. & FRUCHART, J. C. 2003. [PPAR gamma: a major nuclear receptor in adipogenesis]. *Med Sci (Paris)*, 19, 20-2.
- GHONEIM, H. E., THOMAS, P. G. & MCCULLERS, J. A. 2013. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J Immunol*, 191, 1250-9.
- GONG, H., ZHANG, B. K., YAN, M., FANG, P. F., LI, H. D., HU, C. P., YANG, Y., CAO, P., JIANG, P. & FAN, X. R. 2015. A protective mechanism of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*): isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation. *J Ethnopharmacol*, 162, 134-9.
- GORRINI, C., HARRIS, I. S. & MAK, T. W. 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 931-47.
- GUILLOT, L., NATHAN, N., TABARY, O., THOUVENIN, G., LE ROUZIC, P., CORVOL, H., AMSELEM, S. & CLEMENT, A. 2013. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2568-73.
- GUO, J., LIU, A., CAO, H., LUO, Y., PEZZUTO, J. M. & VAN BREEMEN, R. B. 2008. Biotransformation of the chemopreventive agent 2',4',4'-trihydroxychalcone (isoliquiritigenin) by UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 36, 2104-12.
- HAN, K., MA, H., AN, X., SU, Y., CHEN, J., LIAN, Z., ZHAO, J., ZHU, B., FONTAINE, R., FENG, Z. & ZENG, G. 2011. Early Use of Glucocorticoids Was a Risk Factor for Critical Disease and Death From pH1N1 Infection. *Clin Infect Dis*, 53, 11.
- HANSEN, J. D., VOJTECH, L. N. & LAING, K. J. 2011. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol*, 35, 886-97.
- HAQ, K. & MCELHANEY, J. E. 2014a. Ageing and respiratory infections: the airway of ageing. *Immunol Lett*, 162, 323-8.
- HAQ, K. & MCELHANEY, J. E. 2014b. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol*, 29, 38-42.
- HASEGAWA, H., VAN REIT, E. & KIDA, H. 2015. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*, 386, 371-80.

- HEAD, J. L. & LAWRENCE, B. P. 2009. The aryl hydrocarbon receptor is a modulator of anti-viral immunity. *Biochem Pharmacol*, 77, 642-53.
- HEROLD, S., BECKER, C., RIDGE, K. M. & BUDINGER, G. R. 2015. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J*, 45, 1463-78.
- HIKONO, H., KOHLMEIER, J. E., ELY, K. H., SCOTT, I., ROBERTS, A. D., BLACKMAN, M. A. & WOODLAND, D. L. 2006. T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev*, 211, 119-32.
- HOFMANN, P., SPRENGER, H., KAUFMANN, A., BENDER, A., HASSE, C., NAIN, M. & GEMSA, D. 1997. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *J Leukoc Biol*, 61, 408-14.
- HORVATH, C. M., WILLIAMS, M. A. & LAMB, R. A. 1990. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J*, 9, 2639-47.
- HOSSEINIAN, N., CHO, Y., LOCKEY, R. F. & KOLLIPUTI, N. 2015. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases. *Ther Adv Respir Dis*, 9, 188-97.
- HOUSER, K. & SUBBARAO, K. 2015. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, 17, 295-300.
- HOWARD, J. C. & SEELIG, A. 1993. Antigen processing. Peptides and the proteasome. *Nature*, 365, 211-2.
- HSIEH, Y. C., WU, T. Z., LIU, D. P., SHAO, P. L., CHANG, L. Y., LU, C. Y., LEE, C. Y., HUANG, F. Y. & HUANG, L. M. 2006. Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc*, 105, 1-6.
- HU, C., EGGLEER, A. L., MESECAR, A. D. & VAN BREEMEN, R. B. 2011. Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol*, 24, 515-21.
- HU, Y., REN, X., LI, L., XIAO, Y., DONG, J., SUN, L., ZHU, Y., YANG, F., ZHANG, X. & JIN, Q. 2015. Rapid genome sequencing and characterization of novel avian-origin influenza A H7N9 virus directly from clinical sample by semiconductor sequencing. *J Clin Virol*, 73, 84-88.
- HYONG, A., JADHAV, V., LEE, S., TONG, W., ROWE, J., ZHANG, J. H. & TANG, J. 2008. Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents. *Brain Res*, 1215, 218-24.
- IIZUKA, T., ISHII, Y., ITOH, K., KIWAMOTO, T., KIMURA, T., MATSUNO, Y., MORISHIMA, Y., HEGAB, A. E., HOMMA, S., NOMURA, A., SAKAMOTO, T., SHIMURA, M., YOSHIDA, A., YAMAMOTO, M. & SEKIZAWA, K. 2005. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells*, 10, 1113-25.
- IMAI, Y. 2015. [Pathogenicity of influenza virus and development of the ARDS]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 145, 117-21.
- IMAI, Y., KUBA, K., NEELY, G. G., YAGHUBIAN-MALHAMI, R., PERKMANN, T., VAN LOO, G., ERMOLAEVA, M., VELDHUIZEN, R., LEUNG, Y. H., WANG, H., LIU, H., SUN, Y., PASPARAKIS, M., KOPF, M., MECH, C., BAVARI, S., PEIRIS, J. S., SLUTSKY, A. S., AKIRA, S., HULTQVIST, M., HOLMDAHL, R., NICHOLLS, J., JIANG, C., BINDER, C. J. & PENNINGER, J. M. 2008. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*, 133, 235-49.

- JEEVA, J. S., SUNITHA, J., ANANTHALAKSHMI, R., RAJKUMARI, S., RAMESH, M. & KRISHNAN, R. 2015. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, 7, S331-3.
- JOSSET, L., BELSER, J. A., PANTIN-JACKWOOD, M. J., CHANG, J. H., CHANG, S. T., BELISLE, S. E., TUMPEY, T. M. & KATZE, M. G. 2012. Implication of inflammatory macrophages, nuclear receptors, and interferon regulatory factors in increased virulence of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus after host adaptation. *J Virol*, 86, 7192-206.
- KANSANEN, E., KIVELA, A. M. & LEVONEN, A. L. 2009. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Free Radic Biol Med*, 47, 1310-7.
- KANSANEN, E., KUOSMANEN, S. M., LEINONEN, H. & LEVONEN, A. L. 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*, 1, 45-9.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13, 816-25.
- KAWAI, T., MASAKI, T., DOI, S., ARAKAWA, T., YOKOYAMA, Y., DOI, T., KOHNO, N. & YORIOKA, N. 2009. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest*, 89, 47-58.
- KELL, A. M. & GALE, M., JR. 2015. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, 479-480, 110-21.
- KESIC, M. J., MEYER, M., BAUER, R. & JASPERS, I. 2012. Exposure to ozone modulates human airway protease/antiprotease balance contributing to increased influenza A infection. *PLoS One*, 7, e35108.
- KESIC, M. J., SIMMONS, S. O., BAUER, R. & JASPERS, I. 2011. Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 51, 444-53.
- KHATUA, B., ROY, S. & MANDAL, C. 2013. Sialic acids siglec interaction: a unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens. *Indian J Med Res*, 138, 648-62.
- KIDO, H., MURAKAMI, M., OBA, K., CHEN, Y. & TOWATARI, T. 1999. Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells*, 9, 235-44.
- KIM, H. M., LEE, Y. W., LEE, K. J., KIM, H. S., CHO, S. W., VAN ROOIJEN, N., GUAN, Y. & SEO, S. H. 2008. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J Virol*, 82, 4265-74.
- KIM, M., KIM, S. Y., LEE, H. W., SHIN, J. S., KIM, P., JUNG, Y. S., JEONG, H. S., HYUN, J. K. & LEE, C. K. 2013. Inhibition of influenza virus internalization by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Antiviral Res*, 100, 460-72.
- KIM, S. H., HONG, S. B., YUN, S. C., CHOI, W. I., AHN, J. J., LEE, Y. J., LEE, H. B., LIM, C. M. & KOH, Y. 2011. Corticosteroid treatment in critically ill patients with pandemic influenza A/H1N1 2009 infection: analytic strategy using propensity scores. *Am J Respir Crit Care Med*, 183, 1207-14.
- KOCHS, G., GARCIA-SASTRE, A. & MARTINEZ-SOBRIDO, L. 2007. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol*, 81, 7011-21.
- KOHLMEIER, J. E. & WOODLAND, D. L. 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol*, 27, 61-82.

- KOSMIDER, B., MESSIER, E. M., JANSSEN, W. J., NAHREINI, P., WANG, J., HARTSHORN, K. L. & MASON, R. J. 2012. Nrf2 protects human alveolar epithelial cells against injury induced by influenza A virus. *Respir Res*, 13, 43.
- KREIJTZ, J. H., FOUCHIER, R. A. & RIMMELZWAAN, G. F. 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*, 162, 19-30.
- KRONKE, G., KADL, A., IKONOMU, E., BLUML, S., FURNKRANZ, A., SAREMBOCK, I. J., BOCHKOV, V. N., EXNER, M., BINDER, B. R. & LEITINGER, N. 2007. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1276-82.
- KRUG, R. M. 2015. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr Opin Virol*, 12, 1-6.
- KUHN, N., BERGMANN, S., KASNITZ, N., LAMBERTZ, R. L., KEPPNER, A., VAN DEN BRAND, J. M., POHLMANN, S., WEISS, S., HUMMLER, E., HATESUER, B. & SCHUGHART, K. 2016. The proteolytic activation of A (H3N2) Influenza virus hemagglutinin is facilitated by different type II transmembrane serine proteases. *J Virol*.
- KULKARNI, A. A., THATCHER, T. H., HSIAO, H. M., OLSEN, K. C., KOTTMANN, R. M., MORRISSETTE, J., WRIGHT, T. W., PHIPPS, R. P. & SIME, P. J. 2013. The triterpenoid CDDO-Me inhibits bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis. *PLoS One*, 8, e63798.
- LAMB, R. A., LAI, C. J. & CHOPPIN, P. W. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 4170-4.
- LANDERS, J. J., CAO, Z., LEE, I., PIEHLER, L. T., MYC, P. P., MYC, A., HAMOUDA, T., GALECKI, A. T. & BAKER, J. R., JR. 2002. Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J Infect Dis*, 186, 1222-30.
- LANIEWSKI, N. G. & GRAYSON, J. M. 2004. Antioxidant treatment reduces expansion and contraction of antigen-specific CD8⁺ T cells during primary but not secondary viral infection. *J Virol*, 78, 11246-57.
- LARSON, N. & GHANDEHARI, H. 2012. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chem Mater*, 24, 840-853.
- LAWRENCE, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a001651.
- LEE, N., CHAN, P. K., HUI, D. S., RAINER, T. H., WONG, E., CHOI, K. W., LUI, G. C., WONG, B. C., WONG, R. Y., LAM, W. Y., CHU, I. M., LAI, R. W., COCKRAM, C. S. & SUNG, J. J. 2009. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis*, 200, 492-500.
- LEE, N., WONG, C. K., CHAN, P. K., CHAN, M. C., WONG, R. Y., LUN, S. W., NGAI, K. L., LUI, G. C., WONG, B. C., LEE, S. K., CHOI, K. W. & HUI, D. S. 2011. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. *PLoS One*, 6, e26050.
- LEVY, D. E., MARIE, I. J. & DURBIN, J. E. 2011. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*, 1, 476-86.
- LI, N., ALAM, J., VENKATESAN, M. I., EIGUREN-FERNANDEZ, A., SCHMITZ, D., DI STEFANO, E., SLAUGHTER, N., KILLEEN, E., WANG, X., HUANG, A.,

- WANG, M., MIGUEL, A. H., CHO, A., SIOUTAS, C. & NEL, A. E. 2004. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol*, 173, 3467-81.
- LI, T. C., CHAN, M. C. & LEE, N. 2015. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses*, 7, 4929-44.
- LIN, K. L., SUZUKI, Y., NAKANO, H., RAMSBURG, E. & GUNN, M. D. 2008. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J Immunol*, 180, 2562-72.
- LIN, K. L., SWEENEY, S., KANG, B. D., RAMSBURG, E. & GUNN, M. D. 2011. CCR2-antagonist prophylaxis reduces pulmonary immune pathology and markedly improves survival during influenza infection. *J Immunol*, 186, 508-15.
- LONDON, N. R., ZHU, W., BOZZA, F. A., SMITH, M. C., GREIF, D. M., SORENSEN, L. K., CHEN, L., KAMINOH, Y., CHAN, A. C., PASSI, S. F., DAY, C. W., BARNARD, D. L., ZIMMERMAN, G. A., KRASNOW, M. A. & LI, D. Y. 2010. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med*, 2, 23ra19.
- LORENZ, G. & ANDERS, H. J. 2015. Neutrophils, Dendritic Cells, Toll-Like Receptors, and Interferon-alpha in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol*, 35, 410-26.
- LU, G., GAO, G. F. & YAN, J. 2013. [The receptors and entry of measles virus: a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 29, 1-9.
- LYON, J. A. & HINSHAW, V. S. 1993. Inhibition of nitric oxide induction from avian macrophage cell lines by influenza virus. *Avian Dis*, 37, 868-73.
- MA, Q. 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-26.
- MAEDA, Y., HORIMOTO, T. & KAWAOKA, Y. 2003. [Classification and genome structure of influenza virus]. *Nihon Rinsho*, 61, 1886-91.
- MARJUKI, H., ALAM, M. I., EHRHARDT, C., WAGNER, R., PLANZ, O., KLENK, H. D., LUDWIG, S. & PLESCHKA, S. 2006. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C α -mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem*, 281, 16707-15.
- MARJUKI, H., GORNITZKY, A., MARATHE, B. M., ILYUSHINA, N. A., ALDRIDGE, J. R., DESAI, G., WEBBY, R. J. & WEBSTER, R. G. 2011. Influenza A virus-induced early activation of ERK and PI3K mediates V-ATPase-dependent intracellular pH change required for fusion. *Cell Microbiol*, 13, 587-601.
- MAROIS, I., CLOUTIER, A., GARNEAU, E. & RICHTER, M. V. 2012. Initial infectious dose dictates the innate, adaptive, and memory responses to influenza in the respiratory tract. *J Leukoc Biol*, 92, 107-21.
- MAROIS, I., CLOUTIER, A., MEUNIER, I., WEINGARTL, H. M., CANTIN, A. M. & RICHTER, M. V. 2014. Inhibition of influenza virus replication by targeting broad host cell pathways. *PLoS One*, 9, e110631.
- MARTIN-LOECHES, I., LISBOA, T., RHODES, A., MORENO, R. P., SILVA, E., SPRUNG, C., CHICHE, J. D., BARAHONA, D., VILLABON, M., BALASINI, C., PEARSE, R. M., MATOS, R. & RELLO, J. 2011. Use of early corticosteroid therapy on ICU admission in patients affected by severe pandemic (H1N1)v influenza A infection. *Intensive Care Med*, 37, 272-83.

- MAZUR, I., WURZER, W. J., EHRHARDT, C., PLESCHKA, S., PUTHAVATHANA, P., SILBERZAHN, T., WOLFF, T., PLANZ, O. & LUDWIG, S. 2007. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol*, 9, 1683-94.
- MCGILL, J., HEUSEL, J. W. & LEGGE, K. L. 2009. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol*, 86, 803-12.
- MCKIMM-BRESCHKIN, J. L. 2013. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 1, 25-36.
- MCMASTER, S. R., WILSON, J. J., WANG, H. & KOHLMEIER, J. E. 2015. Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN-gamma Production. *J Immunol*, 195, 203-9.
- MEYER, M. & JASPERS, I. 2015. Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, L1189-201.
- MOE, K. T., AULIA, S., JIANG, F., CHUA, Y. L., KOH, T. H., WONG, M. C. & DUSTING, G. J. 2006. Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells. *J Cell Mol Med*, 10, 231-9.
- MOGENSEN, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22, 240-73, Table of Contents.
- MONTO, A. S. 2010. Seasonal influenza and vaccination coverage. *Vaccine*, 28 Suppl 4, D33-44.
- MORGAN, M. J., KIM, Y. S. & LIU, Z. G. 2008. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res*, 18, 343-9.
- MORGAN, M. J. & LIU, Z. G. 2010. Reactive oxygen species in TNFalpha-induced signaling and cell death. *Mol Cells*, 30, 1-12.
- MORGAN, M. J. & LIU, Z. G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21, 103-15.
- MOSELEY, C. E., WEBSTER, R. G. & ALDRIDGE, J. R. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice. *Influenza Other Respir Viruses*, 4, 307-11.
- NA, H. K. & SURH, Y. J. 2008. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol*, 46, 1271-8.
- NARASARAJU, T., YANG, E., SAMY, R. P., NG, H. H., POH, W. P., LIEW, A. A., PHOON, M. C., VAN ROOIJEN, N. & CHOW, V. T. 2011. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*, 179, 199-210.
- NELSON, M. I. & HOLMES, E. C. 2007. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet*, 8, 196-205.
- NG, A. K., LAM, M. K., ZHANG, H., LIU, J., AU, S. W., CHAN, P. K., WANG, J. & SHAW, P. C. 2012. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J Virol*, 86, 6758-67.
- NG, A. K., ZHANG, H., TAN, K., LI, Z., LIU, J. H., CHAN, P. K., LI, S. M., CHAN, W. Y., AU, S. W., JOACHIMIAK, A., WALZ, T., WANG, J. H. & SHAW, P. C. 2008.

- Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J*, 22, 3638-47.
- NICHOLLS, J. M. 2013. The battle between influenza and the innate immune response in the human respiratory tract. *Infect Chemother*, 45, 11-21.
- NIU, H. S., KU, P. M., NIU, C. S., CHENG, J. T. & LEE, K. S. 2015. Development of PPAR-agonist GW0742 as antidiabetic drug: study in animals. *Drug Des Devel Ther*, 9, 5625-32.
- O'NEILL, L. A., BRYANT, C. E. & DOYLE, S. L. 2009. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*, 61, 177-97.
- OCANA-MACCHI, M., BEL, M., GUZYLACK-PIRIOU, L., RUGGLI, N., LINIGER, M., MCCULLOUGH, K. C., SAKODA, Y., ISODA, N., MATROSOVICH, M. & SUMMERFIELD, A. 2009. Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells. *J Virol*, 83, 12947-55.
- OCHIAI, H., SAKAI, S., HIRABAYASHI, T., SHIMIZU, Y. & TERASAWA, K. 1995. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antiviral Res*, 27, 425-30.
- OGANESYAN, G., SAHA, S. K., GUO, B., HE, J. Q., SHAHANGIAN, A., ZARNEGAR, B., PERRY, A. & CHENG, G. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439, 208-11.
- OHLER, A. & BECKER-PAULY, C. 2012. TMPRSS4 is a type II transmembrane serine protease involved in cancer and viral infections. *Biol Chem*, 393, 907-14.
- OKUMURA, Y., TAKAHASHI, E., YANO, M., OHUCHI, M., DAIDOJI, T., NAKAYA, T., BOTTCHER, E., GARTEN, W., KLENK, H. D. & KIDO, H. 2010. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J Virol*, 84, 5089-96.
- OTTOLINI, M., BLANCO, J., PORTER, D., PETERSON, L., CURTIS, S. & PRINCE, G. 2003. Combination anti-inflammatory and antiviral therapy of influenza in a cotton rat model. *Pediatr Pulmonol*, 36, 290-4.
- OZGUNER, F., KOYU, A. & CESUR, G. 2005. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicol Ind Health*, 21, 21-6.
- PANARO, M. A., BRANDONISIO, O., ACQUAFREDDA, A., SISTO, M. & MITOLO, V. 2003. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 3, 210-21.
- PARK, E. Y., CHO, I. J. & KIM, S. G. 2004. Transactivation of the PPAR-responsive enhancer module in chemopreventive glutathione S-transferase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor heterodimer. *Cancer Res*, 64, 3701-13.
- PARK, S. J. & YOUN, H. S. 2010. Isoliquiritigenin suppresses the Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon-beta (TRIF)-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by targeting TBK1. *J Agric Food Chem*, 58, 4701-5.
- PASCUAL, G., FONG, A. L., OGAWA, S., GAMLIEL, A., LI, A. C., PERISSI, V., ROSE, D. W., WILLSON, T. M., ROSENFELD, M. G. & GLASS, C. K. 2005. A

- SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, 437, 759-63.
- PENG, F., DU, Q., PENG, C., WANG, N., TANG, H., XIE, X., SHEN, J. & CHEN, J. 2015. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phytother Res*, 29, 969-77.
- PERA, A., CAMPOS, C., LOPEZ, N., HASSOUNEH, F., ALONSO, C., TARAZONA, R. & SOLANA, R. 2015. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*, 82, 50-5.
- PERRONE, L. A., PLOWDEN, J. K., GARCIA-SASTRE, A., KATZ, J. M. & TUMPEY, T. M. 2008. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog*, 4, e1000115.
- PIELAK, R. M. & CHOU, J. J. 2011. Influenza M2 proton channels. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 522-9.
- PINTO, R., HEROLD, S., CAKAROVA, L., HOEGNER, K., LOHMEYER, J., PLANZ, O. & PLESCHKA, S. 2011. Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral Res*, 92, 45-56.
- PIZZORNO, A., ABED, Y. & BOIVIN, G. 2011. Influenza drug resistance. *Semin Respir Crit Care Med*, 32, 409-22.
- PLATO, A., HARDISON, S. E. & BROWN, G. D. 2015. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol*, 37, 97-106.
- POLVANI, S., TAROCCHI, M. & GALLI, A. 2012. PPARgamma and Oxidative Stress: Con(beta) Catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res*, 2012, 641087.
- RAMOS, I. & FERNANDEZ-SESMA, A. 2015. Modulating the Innate Immune Response to Influenza A Virus: Potential Therapeutic Use of Anti-Inflammatory Drugs. *Front Immunol*, 6, 361.
- RAY, P. D., HUANG, B. W. & TSUJI, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24, 981-90.
- READING, P. C., MILLER, J. L. & ANDERS, E. M. 2000. Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus. *J Virol*, 74, 5190-7.
- ROSSMAN, J. S. & LAMB, R. A. 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411, 229-36.
- RYU, Y. B., KIM, J. H., PARK, S. J., CHANG, J. S., RHO, M. C., BAE, K. H., PARK, K. H. & LEE, W. S. 2010. Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 971-4.
- SAMSON, M., PIZZORNO, A., ABED, Y. & BOIVIN, G. 2013. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, 98, 174-85.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88.
- SHELLER, J., GARBERS, C. & ROSE-JOHN, S. 2014. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol*, 26, 2-12.
- SCHNELL, J. R. & CHOU, J. J. 2008. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 451, 591-5.

- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SCHULTZ, M. A., HAGAN, S. S., DATTA, A., ZHANG, Y., FREEMAN, M. L., SIKKA, S. C., ABDEL-MAGEED, A. B. & MONDAL, D. 2014. Nrfl and Nrf2 transcription factors regulate androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *PLoS One*, 9, e87204.
- SELEMIDIS, S., SEOW, H. J., BROUGHTON, B. R., VINH, A., BOZINOVSKI, S., SOBEY, C. G., DRUMMOND, G. R. & VLAHOS, R. 2013. Nox1 oxidase suppresses influenza a virus-induced lung inflammation and oxidative stress. *PLoS One*, 8, e60792.
- SHARMA, G., CHAMPALAL SHARMA, D., HWEI FEN, L., PATHAK, M., BETHUR, N., PENDHARKAR, V., PEIRIS, M. & ALTMAYER, R. 2013. Reduction of influenza virus-induced lung inflammation and mortality in animals treated with a phosphodiesterase-4 inhibitor and a selective serotonin reuptake inhibitor. *Emerg Microbes Infect*, 2, e54.
- SHEN, X., ZHANG, X. & LIU, S. 2013. Novel hemagglutinin-based influenza virus inhibitors. *J Thorac Dis*, 5 Suppl 2, S149-59.
- SHEN, Z., LOU, K. & WANG, W. 2015. New small-molecule drug design strategies for fighting resistant influenza A. *Acta Pharm Sin B*, 5, 419-430.
- SHI, X., ZHOU, W., HUANG, H., ZHU, H., ZHOU, P. & JU, D. 2013. Inhibition of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha with etanercept provides protection against lethal H1N1 influenza infection in mice. *Crit Care*, 17, R301.
- SHIREY, K. A., LAI, W., SCOTT, A. J., LIPSKY, M., MISTRY, P., PLETNEVA, L. M., KARP, C. L., MCALEES, J., GIOANNINI, T. L., WEISS, J., CHEN, W. H., ERNST, R. K., ROSSIGNOL, D. P., GUSOVSKY, F., BLANCO, J. C. & VOGEL, S. N. 2013. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*, 497, 498-502.
- SIMON, P. F., MCCORRISTER, S., HU, P., CHONG, P., SILAGHI, A., WESTMACOTT, G., COOMBS, K. M. & KOBASA, D. 2015. Highly Pathogenic H5N1 and Novel H7N9 Influenza A Viruses Induce More Profound Proteomic Host Responses than Seasonal and Pandemic H1N1 Strains. *J Proteome Res*, 14, 4511-23.
- SLAUCH, J. M. 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*, 80, 580-3.
- SMOAK, K. A. & CIDLOWSKI, J. A. 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 125, 697-706.
- SOEMA, P. C., KOMPIER, R., AMORIJ, J. P. & KERSTEN, G. F. 2015. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm*, 94, 251-63.
- SOKOL, C. L. & LUSTER, A. D. 2015. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
- SREENIVASAN, C., THOMAS, M., SHENG, Z., HAUSE, B. M., COLLIN, E. A., KNUDSEN, D. E., PILLATZKI, A., NELSON, E., WANG, D., KAUSHIK, R. S. & LI, F. 2015. Replication and Transmission of the Novel Bovine Influenza D Virus in a Guinea Pig Model. *J Virol*, 89, 11990-2001.
- STRASFELD, L. & CHOU, S. 2010. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect Dis Clin North Am*, 24, 809-33.

- STRENGERT, M., JENNINGS, R., DAVANTURE, S., HAYES, P., GABRIEL, G. & KNAUS, U. G. 2014. Mucosal reactive oxygen species are required for antiviral response: role of Duox in influenza a virus infection. *Antioxid Redox Signal*, 20, 2695-709.
- SUN, X., SHI, Y., LU, X., HE, J., GAO, F., YAN, J., QI, J. & GAO, G. F. 2013. Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. *Cell Rep*, 3, 769-78.
- SUN, X. & WHITTAKER, G. R. 2013. Entry of influenza virus. *Adv Exp Med Biol*, 790, 72-82.
- SZEWCZYK, B., BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K. & KROL, E. 2014. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochim Pol*, 61, 397-401.
- TAGUCHI, K., MOTOHASHI, H. & YAMAMOTO, M. 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16, 123-40.
- TASHIRO, M. 1997. [The role of cleavage activation of the hemagglutinin by host and bacterial proteases in the induction of the pathogenesis of influenza viruses]. *Nihon Rinsho*, 55, 2633-9.
- TATE, M. D., BROOKS, A. G. & READING, P. C. 2008. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respir Res*, 9, 57.
- TATE, M. D., DENG, Y. M., JONES, J. E., ANDERSON, G. P., BROOKS, A. G. & READING, P. C. 2009. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J Immunol*, 183, 7441-50.
- THIMMULAPPA, R. K., LEE, H., RANGASAMY, T., REDDY, S. P., YAMAMOTO, M., KENSLER, T. W. & BISWAL, S. 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest*, 116, 984-95.
- THOMAS, P. G., KEATING, R., HULSE-POST, D. J. & DOHERTY, P. C. 2006. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis*, 12, 48-54.
- TO, E. E., BROUGHTON, B. R., HENDRICKS, K. S., VLAHOS, R. & SELEMIDIS, S. 2014. Influenza A virus and TLR7 activation potentiate NOX2 oxidase-dependent ROS production in macrophages. *Free Radic Res*, 48, 940-7.
- TOLON, R. M., CASTILLO, A. I. & ARANDA, A. 1998. Activation of the prolactin gene by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha appears to be DNA binding-independent. *J Biol Chem*, 273, 26652-61.
- TOPHAM, D. J., TRIPP, R. A. & DOHERTY, P. C. 1997. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol*, 159, 5197-200.
- TORRES, M. A., JONES, J. D. & DANGL, J. L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*, 141, 373-8.
- TRABOULSI, H., CLOUTIER, A., BOYAPELLY, K., BONIN, M. A., MARSAULT, E., CANTIN, A. M. & RICHTER, M. V. 2015. The Flavonoid Isoliquiritigenin Reduces Lung Inflammation and Mouse Morbidity during Influenza Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 6317-27.
- TROMBETTA, C., PICCIRELLA, S., PERINI, D., KISTNER, O. & MONTOMOLI, E. 2015. Emerging Influenza Strains in the Last Two Decades: A Threat of a New Pandemic? *Vaccines (Basel)*, 3, 172-85.

- TSITOURA, D. C., KIM, S., DABBAGH, K., BERRY, G., LEWIS, D. B. & UMETSU, D. T. 2000. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. *J Immunol*, 165, 3484-91.
- UCHIDE, N. & TOYODA, H. 2011. Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications. *Molecules*, 16, 2032-52.
- URBANIAK, K. & MARKOWSKA-DANIEL, I. 2014. In vivo reassortment of influenza viruses. *Acta Biochim Pol*, 61, 427-31.
- VAN DE SANDT, C. E., KREIJTZ, J. H. & RIMMELZWAAN, G. F. 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*, 4, 1438-76.
- VLAHOS, R., STAMBAS, J., BOZINOVSKI, S., BROUGHTON, B. R., DRUMMOND, G. R. & SELEMIDIS, S. 2011. Inhibition of Nox2 oxidase activity ameliorates influenza A virus-induced lung inflammation. *PLoS Pathog*, 7, e1001271.
- VON ITZSTEIN, M. 2007. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 967-74.
- WAHL, S. M., MCNEELY, T. B., JANOFF, E. N., SHUGARS, D., WORLEY, P., TUCKER, C. & ORENSTEIN, J. M. 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I. *Oral Dis*, 3 Suppl 1, S64-9.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K. & SCHEURICH, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
- WANG, X., FEUERSTEIN, G. Z., GU, J. L., LYSKO, P. G. & YUE, T. L. 1995. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 115, 89-98.
- WANG, Z. J., LIU, Q., LI, P. P., ZOU, C. H. & SHEN, Z. F. 2008. Effect of GCP-02, a PPARalpha/gamma dual activator, on glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice. *Eur J Pharmacol*, 580, 277-83.
- WATANABE, T. & KAWAOKA, Y. 2011. Pathogenesis of the 1918 pandemic influenza virus. *PLoS Pathog*, 7, e1001218.
- WEST, A. P., SHADEL, G. S. & GHOSH, S. 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 11, 389-402.
- WORCH, R. 2014. Structural biology of the influenza virus fusion peptide. *Acta Biochim Pol*, 61, 421-6.
- WU, Y., TEFSSEN, B., SHI, Y. & GAO, G. F. 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 22, 183-91.
- WU, Y. P., MENG, X. S., BAO, Y. R. & WANG, S. 2013. Pharmacokinetic study of four flavones of Glycyrrhiza in rat plasma using HPLC-MS. *J Ethnopharmacol*, 148, 266-70.
- YAGETA, Y., ISHII, Y., MORISHIMA, Y., ANO, S., OHTSUKA, S., MATSUYAMA, M., TAKEUCHI, K., ITOH, K., YAMAMOTO, M. & HIZAWA, N. 2014. Carbocysteine reduces virus-induced pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50, 963-73.
- YAGETA, Y., ISHII, Y., MORISHIMA, Y., MASUKO, H., ANO, S., YAMADORI, T., ITOH, K., TAKEUCHI, K., YAMAMOTO, M. & HIZAWA, N. 2011. Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice. *J Virol*, 85, 4679-90.

- YASUOKA, S., OHNISHI, T., KAWANO, S., TSUCHIHASHI, S., OGAWARA, M., MASUDA, K., YAMAOKA, K., TAKAHASHI, M. & SANNO, T. 1997. Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16, 300-8.
- YE, Q., KRUG, R. M. & TAO, Y. J. 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 444, 1078-82.
- YESSOUFOU, A. & WAHLI, W. 2010. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly*, 140, w13071.
- YEWDELL, J. W. 2011. Viva la revolucion: rethinking influenza a virus antigenic drift. *Curr Opin Virol*, 1, 177-83.
- YOO, J. K., KIM, T. S., HUFFORD, M. M. & BRACIALE, T. J. 2013. Viral infection of the lung: host response and sequelae. *J Allergy Clin Immunol*, 132, 1263-76; quiz 1277.
- YU, J. H., KIM, K. H. & KIM, H. 2008. SOCS 3 and PPAR-gamma ligands inhibit the expression of IL-6 and TGF-beta1 by regulating JAK2/STAT3 signaling in pancreas. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 677-88.
- ZHAN, L., ZHANG, H., ZHANG, Q., WOODS, C. G., CHEN, Y., XUE, P., DONG, J., TOKAR, E. J., XU, Y., HOU, Y., FU, J., YARBOROUGH, K., WANG, A., QU, W., WAALKES, M. P., ANDERSEN, M. E. & PI, J. 2012. Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPARgamma expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free Radic Biol Med*, 53, 758-68.
- ZHANG, L., CHENG, Y. X., LIU, A. L., WANG, H. D., WANG, Y. L. & DU, G. H. 2010. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from *Chaenomeles speciosa*. *Molecules*, 15, 8507-17.
- ZHOU, J., MATSUOKA, M., CANTOR, H., HOMER, R. & ENELOW, R. I. 2008. Cutting edge: engagement of NKG2A on CD8+ effector T cells limits immunopathology in influenza pneumonia. *J Immunol*, 180, 25-9.
- ZHOU, L., TANG, Y. P., GAO, L., FAN, X. S., LIU, C. M. & WU, D. K. 2009. Separation, characterization and dose-effect relationship of the PPARgamma-activating bio-active constituents in the Chinese herb formulation 'San-Ao decoction'. *Molecules*, 14, 3942-51.
- ZHOU, Y., DUAN, S., YU, S., WU, J., WU, X., ZHAO, J. & ZHAO, Y. 2015. Sulfiredoxin-1 attenuates oxidative stress via Nrf2/ARE pathway and 2-Cys Prdxs after oxygen-glucose deprivation in astrocytes. *J Mol Neurosci*, 55, 941-50.
- ZMORA, P., MOLDENHAUER, A. S., HOFMANN-WINKLER, H. & POHLMANN, S. 2015. TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. *PLoS One*, 10, e0138380.