

## NOX2, un acteur versatile de la réponse immunitaire, complice de l'infection par le virus de la grippe

Julie Miesch<sup>1</sup>, Irma Segoviano Vilchis<sup>1</sup>, Sophie Dupré<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M1 Biologie Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France ;

<sup>2</sup> Laboratoire de chimie physique, UMR8000, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

[julie.miesch@u-psud.com](mailto:julie.miesch@u-psud.com)

[irma.segoviano-vilchis@u-psud.fr](mailto:irma.segoviano-vilchis@u-psud.fr)

[sophie.dupre@u-psud.fr](mailto:sophie.dupre@u-psud.fr)

> Avec environ cinq millions de personnes infectées par an dans le monde dont 10 % d'infections mortelles, le virus de la grippe constitue une menace sanitaire et sociale majeure [1]. L'infection par le virus de la grippe chez l'homme s'effectue *via* le tractus respiratoire. Si le virus réussit à franchir la barrière de mucus, il va alors infecter en premier les cellules épithéliales pulmonaires, puis les macrophages résidents et les cellules dendritiques situées sous l'épithélium [2]. Dans ces cellules, il est reconnu par différents PRR (*pattern recognition receptors*) et notamment des TLR (*Toll-like receptors*) localisés au niveau des endosomes (TLR3 et TLR7). Ceux-ci reconnaissent l'ARN viral [3]. Eunice E. To, *et al.* - des chercheurs australiens - ont précédemment montré que l'activation des TLR3 et -7 induisait la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase (NOX2) [1]. Cette enzyme, dont la sous-unité catalytique est NOX2, est présente dans les cellules phagocytaires et contribue à la destruction des bactéries et des champignons. Cependant, les effets de la NADPH oxydase restent méconnus dans le cadre d'une infection virale. Plusieurs études suggèrent que les FRO produites par NOX2 favorisent l'infection par le virus de la grippe [4, 5]. Dans un article récent publié dans *Nature Communications*, les chercheurs australiens montrent que NOX2 est activée lors d'une infection par le virus de la grippe (différents sous-types d'*Hemophilus Influenza A*) impliquant TLR7, et

expliquent comment la production de FRO faciliterait l'infection virale [6].

### TLR7 démasque la présence virale et déclenche la production de FRO

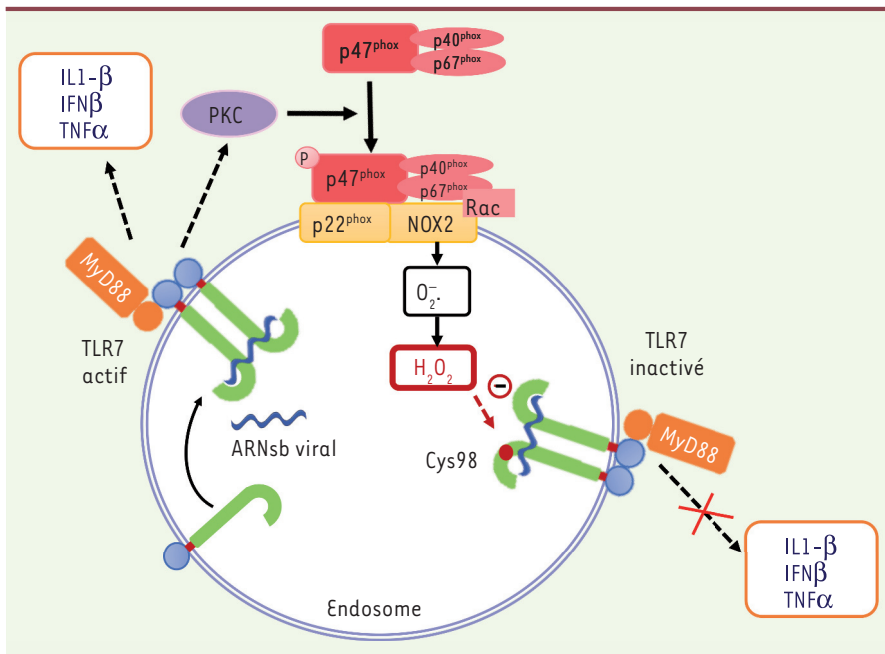
Des expériences d'immunofluorescence dans des macrophages alvéolaires primaires murins ont tout d'abord permis aux auteurs de localiser NOX2 et une partie des nucléoprotéines du virus (associées à l'ARN) dans les endosomes précoces. Puis, l'utilisation d'une sonde, qui est internalisée avec les virus et émet une fluorescence lorsqu'elle est oxydée par les FRO<sup>1</sup>, a révélé qu'il y avait une production de FRO dans les endosomes. Une telle production a aussi été montrée dans des macrophages alvéolaires humains infectés par différentes souches de virus de la grippe qui ont été, par le passé, responsables de pandémies. L'inhibition des pompes V-ATPases endo/lysosomales, responsables de l'acidification des endosomes, bloque la production de FRO ; cette dernière n'est cependant pas nécessaire à l'internalisation du virus. Au niveau des endosomes, l'ARN du virus est reconnu par TLR7 [7]. Les auteurs observent effectivement une colocalisation des nucléoprotéines associées à l'ARN viral et de TLR7, ainsi que de TLR7 et NOX2. De plus, la délétion (invalidation génétique) de TLR7, ou celle de la protéine adaptatrice MyD88, abolissent la production des FRO endosomales. Les auteurs ont ensuite cherché

<sup>1</sup> Il s'agit d'albumine bovine couplée à de l'H2HFF (dihydro-2,4,5,6,7,7'-hexafluoro fluorescéine). Cette sonde est internalisée comme les virus et permet donc la détection des FRO dans l'endosome.

à identifier quelle protéine, activée *via* la cascade de signalisation mise en jeu par TLR7, induisait l'activation de la NADPH oxydase. La NADPH oxydase est composée de sous-unités transmembranaires, NOX2 et p22<sup>phox</sup> (*phagocytic oxidase*), de sous-unités cytosoliques (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) et de la protéine G Rac (*Figure 1*). L'assemblage du complexe est nécessaire pour la production de FRO. La phosphorylation de p47<sup>phox</sup> induit un changement de conformation de celle-ci, ce qui permet la translocation du complexe p47<sup>phox</sup>-p40<sup>phox</sup>-p67<sup>phox</sup> à la membrane. Les protéines kinases C (PKC) sont impliquées dans cette phosphorylation [8] et étaient donc de bons candidats. Pour mesurer l'activité de ces kinases, un biosenseur cytoCKAR<sup>2</sup> [9] a été exprimé dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris exposées ultérieurement aux virus. Les auteurs retrouvent bien une augmentation de l'activité de la PKC en présence de virus. Celle-ci ne se produit pas lorsqu'un inhibiteur de l'endocytose est ajouté, ou dans des macrophages de souris dépourvus de TLR7. Cette production endosomale de FRO, dépendante de TLR7, a été également observée pour d'autres virus pénétrant dans la cellule par endocytose.

<sup>2</sup> CytoCAR est un bio-senseur constitué des protéines fluorescentes YFP (*yellow fluorescent protein*) et CFP (*cyanin fluorescent protein*) et lié à un peptide substrat des PKC. Celui-ci est lui-même relié au domaine FHA2 (*forkhead-associated domain*) de la protéine de levure rad53p. En absence de phosphorylation du peptide substrat, un transfert d'énergie de fluorescence de type Förster (FRET) a lieu entre les 2 protéines fluorescentes. La phosphorylation du peptide entraîne sa liaison au domaine FHA2 *via* un changement de conformation qui induit une diminution du FRET entre CFP et YFP.





**Figure 1. NOX2 inhibe la production de cytokines déclenchée en réponse à une infection par le virus de la grippe.** L'ARN simple brin (ARNsb) viral, présent au niveau des endosomes à pH acide, est reconnu par TLR7. L'activation de la voie de signalisation de TLR7, via l'adaptateur MyD88, induit la production d'interféron  $\beta$  (IFN $\beta$ ) et de cytokines pro-inflammatoires : interleukine-6 (IL-6), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) et IL-1 $\beta$ , ainsi que l'activation de la protéine kinase C (PKC). La PKC, à son tour, en phosphorylant notamment p47<sup>phox</sup> induit l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase NOX2. Les FRO produits par NOX2 vont oxyder la cystéine 98 du TLR7 ce qui inhibe l'activation du récepteur et provoque l'arrêt de la production d'IFN $\beta$  et de cytokines pro-inflammatoires.

### Les FRO produites par NOX2 réduisent TLR7 au silence

Eunice E. To *et al.* se sont ensuite demandé si les FRO produites par NOX2 influençaient la production de cytokines qui résulte de l'activation des TLR7 par l'ARN viral. L'expression d'interféron  $\beta$  (IFN $\beta$ ) et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 (interleukine-6), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) et IL-1 $\beta$  a été analysée par RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) dans des macrophages stimulés par l'imiquimod, un agoniste de TLR7. Les auteurs ont ainsi pu observer qu'en présence d'imiquimod et d'apocynine (un inhibiteur de NOX2), l'expression des cytokines est significativement plus importante qu'en présence d'imiquimod seul. Pour vérifier si cette modulation négative des cytokines par les FRO avait lieu *in vivo*, les chercheurs ont traité des souris sauvages ou déficientes pour NOX2 par de l'imiquimod et ils ont mesuré les ARNm codant les cytokines, 24 h après ce traitement. L'expression des transcrits codant l'IFN $\beta$  et les cytokines pro-inflammatoires était effectivement significativement plus élevée chez les souris déficientes pour NOX2, confirmant l'effet inhibiteur de cette voie. NOX2 produit de l'anion superoxyde qui peut se transformer (dismutation) en peroxyde

d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). C'est ce dernier qui inhibe l'expression des cytokines via son action sur TLR7. Afin de savoir si certaines cystéines de TLR7, exposées lors de son activation dans l'endosome et cruciales pour la régulation de celle-ci, pouvaient être les cibles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les auteurs ont créé une série d'ADNc codant des récepteurs TLR7 dont une ou plusieurs de ces cystéines étaient mutées. La capacité de ces récepteurs TLR7 mutés à restaurer la production de cytokines dans les macrophages TLR7<sup>-/-</sup> a été analysée en réponse à la stimulation de TLR7. Cette approche de complémentation fonctionnelle a permis d'identifier la cystéine 98 comme une cible potentielle d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La cystéine 98 est un résidu très conservé et spécifique du TLR7. TLR7 est clivé dans l'endosome, les 2 parties seraient ensuite liées par un pont disulfure. Ce clivage conditionne le déclenchement de la signalisation lorsque le récepteur est activé [2], et la cystéine 98 est nécessaire à ce clivage et impliquée dans la formation du pont disulfure [10].

### NOX2 facilite l'infection par le virus de la grippe

Les chercheurs ont ensuite déterminé si ce même mécanisme était opérationnel lors de la stimulation de TLR7 non pas

par l'agoniste, mais par le virus de la grippe. L'infection virale par *Influenza* conduit à l'activation de NOX2 via TLR7. La production de FRO par NOX2 qui en résulte conduit-elle également à diminuer l'expression d'IFN $\beta$  et de cytokines pro-inflammatoires ? Celle-ci est effectivement augmentée *in vitro* dans les macrophages alvéolaires de souris déficientes *Nox2<sup>-/-</sup>* et *in vivo* dans les poumons des souris déficientes *Nox2<sup>-/-</sup>* et infectées par *Influenza*. De plus, chez ces souris, l'IFN $\beta$  est détecté en plus grande quantité dans le fluide broncho-alvéolaire et le sérum, 24 h après l'infection. D'autres expériences montrent également une augmentation d'anticorps dans le sérum et le fluide broncho-alvéolaire des souris *Nox2<sup>-/-</sup>* par rapport aux souris sauvages, 7 jours après l'infection virale. Afin de cibler directement la NOX2 endosomale pour en confirmer son rôle, les auteurs ont utilisé l'inhibiteur NOX2ds-TAT<sup>3</sup> [11] qu'ils ont lié, via du polyéthylène glycol, à un stéroïde : le cholestanol. Ils montrent que cet inhibiteur se localise dans les endosomes

<sup>3</sup> NOX2ds-TAT correspond à la fusion de 9 résidus de la protéine TAT du virus de l'immunodéficience humaine avec 9 résidus de NOX2 qui seraient impliqués dans la liaison à p47<sup>phox</sup>.

