



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 18022

To cite this version :

Soulié, Dimitri. *Contribution des réactifs oxygénés à la réponse immunitaire innée contre le virus Influenza*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 75 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

CONTRIBUTION DES REACTIFS OXYGENES A LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ANTIVIRALE CONTRE LE VIRUS INFLUENZA

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

SOULIE, Dimitri
Né, le 31/12/1991 à AGEN (47)

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Romain VOLMER
M. Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

DEDICACES

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Doyen de la Faculté des sciences pharmaceutiques

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Département des sciences pharmaceutiques, Université de Toulouse III

Département de virologie, CHU de Toulouse

Qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse,

Veillez accepter mes hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie-Infectiologie

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Veillez accepter mes plus sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Romain Volmer

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie-Infectiologie

Qui m'a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,

Pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien,

Sincères remerciements

SOMMAIRE

Table des figures	5
Table des graphiques	6
Table des tableaux	7
Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	10
PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. L'immunité innée lors d'infections par le virus Influenza.....	12
II. Les réactifs oxygénés dans les cellules eucaryotes	14
1. Présentation générale des réactifs oxygénés	14
2. Les ROS dans la mitochondrie	15
a. La chaîne respiratoire mitochondriale : élément de départ de la production.....	15
i. Rappel sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	15
ii. Production de $O_2\cdot$	16
b. Les ROS issus de $O_2\cdot$	18
c. Dégradation des ROS	18
3. Régulation de la production des ROS.....	19
i. Diminution de la production.....	19
ii. Augmentation de la production	20
4. ROS et régulation de la physiologie cellulaire.....	21
a. Les ROS ont une action directe	21
b. Les ROS comme messagers secondaires	22
i. Régulation de l'adaptation à l'hypoxie.....	22
ii. Régulation de la mort cellulaire	23
iii. Régulation de la différenciation cellulaire.....	24
III. Liens entre les ROS et la réponse immunitaire innée.....	24
1. ROS et agents pathogènes.....	24
a. ROS et défense antibactérienne dans le phagosome	24
b. Autres mécanismes contribuant à l'élimination de l'agent pathogène (effet anti-pathogène).....	26
i. Les ROS favorisent l'élimination des pathogènes par autophagie	26

ii.	Les ROS induisent une réponse antivirale en inhibant la voie des mTOR (mammalian target of rapamycin)	26
iii.	Les ROS favorisent les NETs (neutrophil extracellular traps)	26
iv.	Les ROS : chémoattracteurs pour les phagocytes	27
c.	Mécanismes permettant la dissémination de l'agent pathogène (effet pro-pathogène).....	27
i.	Les ROS induisent une défense antioxydante qui est favorable aux microbes.....	27
ii.	Les ROS interfèrent avec le métabolisme lipidique.....	28
d.	Mécanismes pouvant être pro ou anti-pathogène	28
i.	Les ROS favorisent la mort cellulaire dans les réservoirs viraux	28
ii.	Les ROS interfèrent avec le stockage du fer et sa mobilisation	29
iii.	Les ROS interfèrent avec les cellules dendritiques	29
2.	Les ROS et la modulation de la signalisation lors de la réponse immunitaire innée	30
3.	L'immunité innée entraîne la production de ROS mitochondriaux	32
4.	ROS et pathogénicité.....	32
DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE		34
I.	Etude 1 : Influence d'UCP2 sur l'immunité antivirale.....	35
1.	UCP2 : une protéine qui influe sur la production de ROS	35
a.	Présentation de la protéine UCP2 et rôles non immunitaires	35
b.	UCP2 régule la production de ROS	36
c.	UCP2 influe sur la réponse immunitaire	37
2.	Protocole expérimental	38
a.	Obtention de cellules A549 mutantes par la technique CRISPR/Cas9	38
b.	Analyse de la réplication virale et de la réponse immunitaire innée	38
3.	Résultats et interprétation	40
a.	Analyse de l'expression d'UCP2 par Western Blot.....	40
b.	Séquençage du gène UCP2 dans l'ADN des clones de cellules transfectées	40
c.	RT-qPCR et niveau d'expression d'IFN β	41
d.	RT-PCR et réplication virale	42
4.	Discussion	43
II.	Etude 2 : évaluation des conséquences du traitement à la metformine chez des souris infectées par le virus Influenza.....	44
1.	Utilisation thérapeutique de la metformine.....	44

a.	Une molécule très utilisée en médecine humaine	44
b.	Activité anti-inflammatoire de la metformine.....	45
c.	Une molécule miracle contre le virus Influenza ?	46
2.	Etude de l'effet de la metformine sur l'infection de souris par le virus Influenza	46
a.	Protocole expérimental.....	47
i.	Infection des souris	47
ii.	Echantillonnage des souris	48
iii.	Traitement mis en place.....	48
iv.	Suivi clinique	48
v.	Test d'inhibition d'hémagglutination	49
b.	Résultats	49
i.	Quantité moyenne d'eau bue par souris	49
ii.	Survie des souris	50
iii.	Score clinique	52
iv.	Test d'inhibition d'hémagglutination	52
c.	Discussion.....	53
d.	Conclusion	54
3.	Etude de l'effet de la metformine pour des doses différentes en virus.....	54
a.	Protocole expérimental.....	54
i.	Infection des souris	55
ii.	Echantillonnage des souris	55
iii.	Traitement.....	55
iv.	Suivi clinique	55
b.	Résultats	56
i.	Quantité moyenne d'eau bue par souris	56
ii.	Survie des souris	57
iii.	Score clinique	59
iv.	Poids des souris.....	61
c.	Discussion.....	63
	Conclusion.....	65
	Bibliographie.....	66
	Annexe 1.....	71
	Annexe 2.....	72
	Annexe 3.....	73

Annexe 4.....	74
Annexe 5.....	75

Table des figures

Figure 1 : Voies de signalisation des TLR suite à une infection par le virus Influenza.....	13
Figure 2 : Voies de signalisation de RIG-1 lors d'infection par le virus Influenza.....	13
Figure 3 : La production de O_2^- par la CRM	16
Figure 4 : Production de O_2^- par le complexe I.....	17
Figure 5 : Production de O_2^- par le complexe III	17
Figure 6 : La production de ROS à partir de O_2^-	19
Figure 7 : Facteurs augmentant la production de ROS	21
Figure 8 : Rôle des ROS dans le processus d'autophagie	24
Figure 9 : Action directe des ROS sur les pathogènes par des dommages oxydatifs (A), par le relargage d'enzymes (B).....	25
Figure 10 : Rôle des ROS dans l'autophagie.....	26
Figure 11 : Production de NETs par les ROS	27
Figure 12 : Interaction entre les ROS et NRF2	28
Figure 13 : Rôles des ROS dans les cellules dendritiques	30
Figure 14 : Modulation de la réponse immunitaire innée par les ROS mitochondriaux.....	31
Figure 15 : Production de ROS mitochondriaux induite par les TLR	32
Figure 16 : Régulation de la sécrétion d'insuline par UCP2.....	36
Figure 17 : Implication d'UCP2 dans la réponse inflammatoire macrophagique.....	37
Figure 18 : Amorces M52F (A) et M52R (B)	39
Figure 19 : Comparaison entre la séquence d'ADN codant pour la protéine UCP2 chez les cellules sauvages (WT) et homozygotes UCP2 (-/-) (UCP2 KO)	41
Figure 20 : Modèle du mécanisme de la metformine sur le métabolisme du glucose et des lipides.....	45

Table des graphiques

Graphique 1 : Différence de niveau d'expression d'interférons β entre les cellules sauvages (WT) et UCP2 KO en fonction de l'inoculation.....	42
Graphique 2 : Différence de titre viral entre les cellules sauvages (WT) et UCP2 KO.....	43
Graphique 3 : Quantité moyenne d'eau bue par souris en fonction du temps et du traitement.....	50
Graphique 4 : Courbes de survie des groupes non traité (NT) et traité à partir de J0 (T J0).....	51
Graphique 5 : Courbes de survie des groupes non traité (NT) et traité à partir de J2 (T J2).....	51
Graphique 6 : Score clinique moyen des souris en fonction du temps et du traitement.....	52
Graphique 7 : Quantité moyenne d'eau bue par souris en fonction du temps pour les souris infectées avec une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu	57
Graphique 8 : Courbes de survie des souris non traitées et traitées, infectées avec une dose de virus de 2100 pfu	58
Graphique 9 : Courbes de survie des souris non traitées et traitées, infectées avec une dose de virus de 4200 pfu (A) et 8400 pfu (B)	59
Graphique 10 : Moyenne du score clinique des souris en fonction du temps pour une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu.....	61
Graphique 11 : Moyenne du pourcentage du poids initial des souris en fonction du temps pour une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu	63

Table des tableaux

Tableau 1 : Propriétés et cibles de différents ROS	22
Tableau 2 : Schéma de la plaque pour l'analyse par RT-qPCR	41
Tableau 3 : Résultats obtenus par Garcia en 1950	46
Tableau 4 : Résultats du test d'inhibition d'hémagglutination	53

Liste des abréviations

α KGDH : α ketoglutarate deshydrogenase	ETF : electron-transferring-flavoprotein
ABC : ATP binding cassette	FADH/FADH ₂ : couple oxydoréducteur du flavine adénine dinucléotide
ADN : acide désoxyribonucléique	Fe-S : fer-soufre
ADP : adénosine diphosphate	FPM : force proton motrice
AMPK : AMP-activated protein kinase	FPN : ferroportine
ARN : acide ribonucléique	GPDH : glycerol-3-phosphate deshydrogenase
ARN _m : acide ribonucléique messenger	GPx : glutathion peroxydase
ATF3 : activating transcription factor 3	GSH : forme réduite du glutathion
Atg : autophagy related genes	HA : hémagglutinine
ATP : adénosine triphosphate	HDL : lipoprotéine de haute densité
Ca ²⁺ : ion calcium	HIF : hypoxia inducible factor
CARDs : caspase activation and recrutement domains	HO-1 : heme oxygenase 1
Cas9 : CRISPR associated protein 9	IFN β : interféron β
CCL2 : chemokine ligand 2	IL-1 β : interleukine 1 β
cf : <i>confer</i>	IL-6 : interleukine 6
CoQ : coenzyme Q	IL-12 : interleukine 12
CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats	IRF3 : interferon regulatory 3
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale	JNK : c-Jun N-terminal kinases
Da : dalton	K ⁺ : ion potassium
DL ₅₀ : dose létale 50	LC3 : light chain 3
ECSIT : evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway	LPS : lipopolysaccharide
EIM : espace intermembranaire	m : mètre
EPO : érythropoïétine	MAO : monoamine oxydase
ERK : extracellular signal-regulated kinases	MAVS : mitochondrial antiviral signaling adaptator
	mTOR : mammalian target of rapamycin
	NA : neuramidase

NAD⁺/NADH : couple oxydoréducteur du nicotinamide adénine dinucléotide

NETs : neutrophil extracellular traps

NF-κB : nuclear factor-kappa B

NK : Natural Killer

NLRP3 : nucleotid oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3

NO : monoxyde d'azote

NOS : oxyde nitrique synthase

NOS2 : oxyde nitrique synthase 2

NOX2 : NADPH-oxydase

NRF2 : nuclear factor-like 2

O₂ : dioxygène

PAMP : pathogen-associated molecular patterns

pfu : plaque-forming unit

PRR : pattern recognition receptor

Prx3 : peroxiredoxin 3

RET : reverse electron transport

RIG-1 : retinoic acid inducible gene-1

RLR : RIG-1-like receptors

ROS : reactive oxygene species

s : seconde

SOD : superoxyde dismutase

STAT 1 : signal transducer and activator of tanscription 1

STAT 2 : signal transducer and activator of tanscription 2

TNFα : tumor necrosis factor α

TRAF6 : tumor necrosis factor receptor associated factor 6

TRIM 25 : tripartite motif 25

UCP2 : uncoupling protein 2

VIH : virus d'immunodéficience humain

Introduction

Le système immunitaire est un ensemble de cellules et de tissus visant à protéger l'organisme des agressions microbiennes et des proliférations malignes via un ensemble de mécanismes. Ce système immunitaire peut être divisé en deux composantes : l'immunité innée présente chez tous les métazoaires et l'immunité adaptative qui n'est présente que chez les vertébrés. Ici, nous nous intéresserons surtout à la première composante sans oublier la deuxième car ces deux immunités coopèrent pour parvenir à l'élimination des agents pathogènes. L'immunité innée est apparue il y a 800 millions d'années, elle est devenue de plus en plus complexe au cours de l'évolution (Espinosa, Chillet 2010). On peut la qualifier aussi d'immunité naturelle ou non spécifique. Les mécanismes de défense de l'immunité innée sont présents dès la naissance et sont hérités génétiquement, donc l'organisme est capable de se défendre immédiatement de manière innée contre les micro-organismes. Les principales caractéristiques de cette immunité sont qu'elle est rapidement mobilisable, toujours prête à intervenir et présente en tout point de l'organisme, qu'elle constitue une première ligne de défense, que ses modes d'action sont invariables et qu'elle ne s'adapte pas aux micro-organismes au cours du temps. Tandis qu'au contraire pour l'immunité adaptative (qualifiée aussi de spécifique ou d'acquise), les mécanismes effecteurs ne préexistent pas, ils s'acquièrent spécifiquement face à un intrus donné, s'y adaptent et permettent sa destruction et ses mécanismes effecteurs sont mis en mémoire. Il faut donc un temps d'apprentissage pour cette immunité. Ces différents mécanismes mis en place lors de l'immunité peuvent être induits par beaucoup de voies de signalisation. Dans ces dernières années, une de ces voies qui a été étudiée lors de l'immunité innée fait intervenir les réactifs oxygénés (ROS). Le rôle de ces molécules est surtout connu lors d'infection bactérienne. Nous avons donc voulu nous intéresser dans ce travail à l'impact des ROS lors d'infection virale. Nous nous sommes donc demandé si les ROS jouaient un rôle dans la réponse immunitaire innée antivirale.

Dans une première partie, nous allons rappeler les mécanismes de l'immunité innée lors d'infection virale. Puis, nous allons présenter les ROS, la production de ces derniers et les différents rôles qu'ils jouent dans les cellules. Enfin, nous allons parler des liens qui existent entre les ROS et la réponse immunitaire innée. Puis, dans une seconde partie expérimentale, nous allons détailler les deux études que nous avons mises en place pour analyser le rôle de ces molécules dans l'immunité innée antivirale contre le virus Influenza.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'immunité innée lors d'infections par le virus Influenza

Lors d'infections virales ou bactériennes, il y a reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Il existe une diversité de PRR qui vont interagir avec tel ou tel PAMP selon leur localisation. Cette reconnaissance va ensuite induire des voies de signalisation qui vont aboutir à une réponse immunitaire innée avec production de cytokines et d'effecteurs antiviraux ou antibactériens (Espinosa, Chillet 2010). Nous allons ici développer l'immunité innée mise en place lors d'infection par le virus Influenza.

Les principaux PRR intervenant lors d'infection par le virus Influenza sont les Toll-like receptor (TLR), le retinoic acid inducible gene-1 (RIG-1) et le nucleotid oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3). Les TLR impliqués sont le TLR7 qui est un récepteur intracellulaire, présent sur la membrane des endosomes, qui reconnaît les acides ribonucléiques (ARN) viraux simple brin, le TLR3 présent, lui aussi sur la membrane endosomale, qui reconnaît les ARN viraux double brin et, le TLR4 qui lui est présent à la surface de la cellule et qui va reconnaître des glycoprotéines virales comme l'hémagglutinine (HA) et la neuramidase (NA) (van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012; Iwasaki, Pillai 2014). Il faut savoir que TLR4 est impliqué dans la réponse antivirale mais que celui-ci est plus connu pour participer à la réponse antibactérienne. En effet, dans la majorité des cas, ce PRR est activé par les motifs lipopolysaccharides (LPS) qui se trouvent à la surface des bactéries. Il n'y a que très peu de temps que l'on sait qu'il peut aussi participer à la réponse immunitaire innée lors d'infections virales. La cascade de signalisation induite par les TLR est résumée dans la figure 1.

A un stade plus avancé de l'infection, RIG-1 va reconnaître aussi les ARN viraux dans le cytoplasme. L'activation de RIG-1 par ces ARN va entraîner un changement de conformation de ce PRR par ubiquitination par la protéine tripartite motif 25 (TRIM 25). Ainsi, les domaines CARDs (caspase activation and recruitment domains) de RIG-1 vont s'associer aux protéines mitochondriales MAVS (mitochondrial antiviral signaling adaptor) ce qui va aboutir *in fine* à l'activation d'IRF3 (interferon regulatory 3) et de NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et donc la production d'interférons de type I (van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012; Iwasaki, Pillai 2014) (Fig.2).

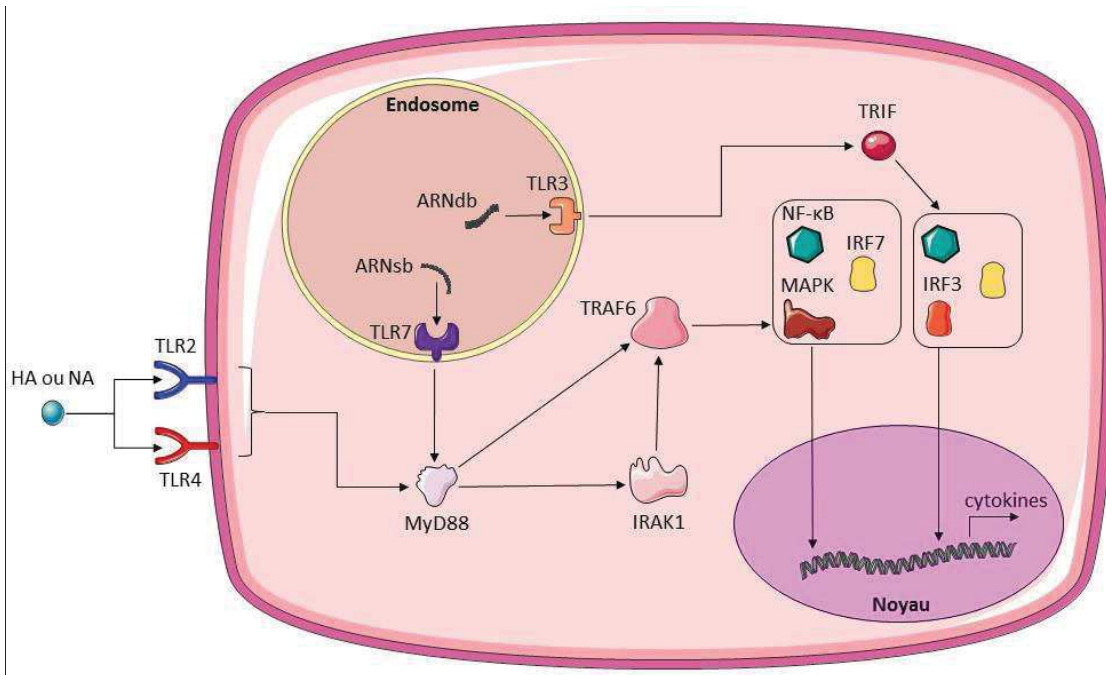


Figure 1 : Voies de signalisation des TLR suite à une infection par le virus Influenza (d'après van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012). ARNsb : ARN viral simple brin, ARNdb : ARN viral double brin, MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88, IRAK 1 : Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, TRAF6 : Tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , MAPK : Mitogen-activated protein kinase, NF- κ B : Nuclear factor-kappa B, IRF : Interferon regulatory factor.

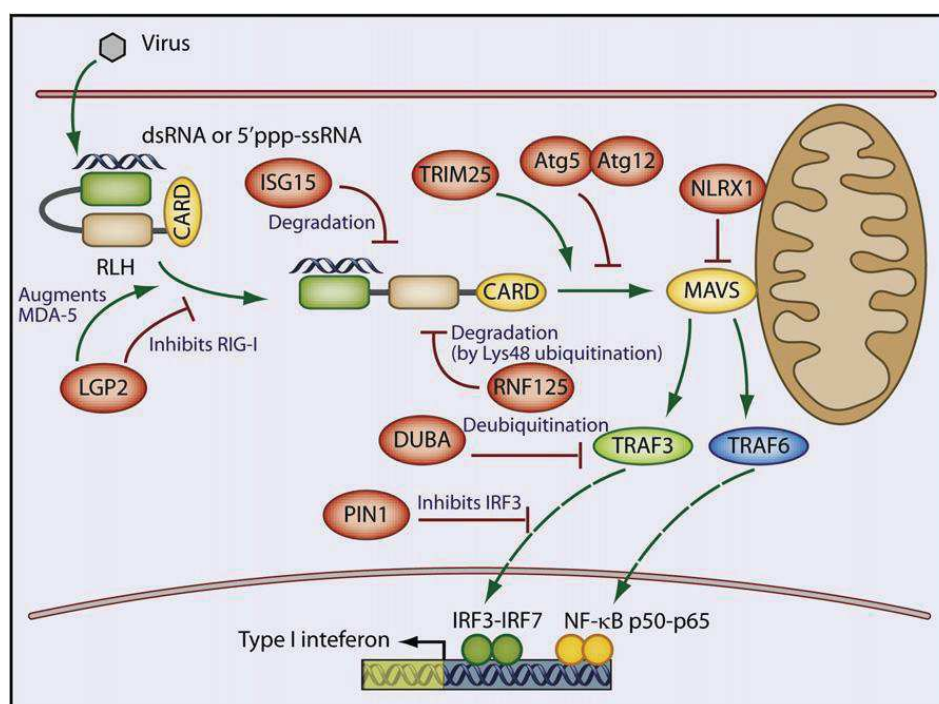


Figure 2 : Voies de signalisation de RIG-1 lors d'infection par le virus Influenza (Moore, Ting 2008).

NLRP3 est une protéine appartenant à l'inflammasome. Cette dernière va être activée par les ARN viraux double brin ce qui va activer des caspases qui vont permettre la maturation protéolytique de certaines interleukines (van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012; Allen et al. 2009).

Toutes ces voies de signalisation induisent la synthèse de cytokines, chimiokines, et d'interférons ce qui engendre une réponse immunitaire antivirale, le recrutement des neutrophiles, l'activation des macrophages et la maturation des cellules dendritiques. De plus, parmi les interférons produits, il y a les interférons de type I qui vont induire un état antiviral des cellules voisines de la cellule infectée productrice de ces interférons. En effet, les cellules possèdent des récepteurs aux interférons qui, quand ils vont se lier à ceux-ci, vont activer une cascade de signalisation qui va aboutir à la transcription de plus de 300 gènes qui codent pour des protéines antivirales ce qui va limiter la réplication virale au sein de la cellule (van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012).

Au niveau des cellules entrant en jeu lors de l'immunité innée, on a tout d'abord les macrophages qui vont eux aussi produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6) et facteur de nécrose tumorale α (TNF α). Ils ont aussi un effet direct sur la propagation du virus en phagocytant les cellules infectées en apoptose. Ces macrophages sont activés grâce à la sécrétion de chemokine ligand 2 (CCL2) par les cellules infectées. Ces derniers peuvent aussi avoir un effet négatif lors d'infection par le virus Influenza car leur activation va permettre aussi la synthèse d'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2) donc la production de monoxyde d'azote (NO) en parallèle de TNF α qui peuvent contribuer aux phénomènes immunopathologiques induits par le virus. De plus, les cellules Natural Killer (NK) vont lyser les cellules infectées. Ces cellules NK vont reconnaître l'HA exprimée à la surface des cellules contenant des virus Influenza pour les détruire. Enfin, le dernier type de cellule est les cellules dendritiques qui forment un pont entre l'immunité innée et adaptative car elles ont pour rôle de présenter les antigènes aux lymphocytes T et C (van de Sandt, Kreijtz, Rimmelzwaan 2012).

II. Les réactifs oxygénés dans les cellules eucaryotes

1. Présentation générale des réactifs oxygénés

Le terme « réactifs oxygénés » regroupe beaucoup de molécules qui sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), le radical peroxy (RO_2^{\cdot}), le radical alkoxy (RO^{\cdot}), le radical hydroperoxy (H_2O^{\cdot}), l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet (1O_2) (Paiva, Bozza 2014; Lambert, Brand 2009). Toutes ces molécules dérivent du dioxygène (O_2) qui par différentes réactions va aboutir à tel ou tel réactif oxygéné. C'est pour cela que l'on appelle aussi toutes ces molécules les dérivés réactifs de l'oxygène. Tous ne sont pas importants dans la réponse immunitaire. Néanmoins, la particularité de ces ROS est qu'ils sont très réactifs car ils sont dans un état instable d'où une durée de vie très courte,

inférieure à la milliseconde (à l'exception de H_2O_2 qui est un peu plus stable, donc moins réactif) (Espinosa, Chillet 2010).

2. Les ROS dans la mitochondrie

a. La chaîne respiratoire mitochondriale : élément de départ de la production

i. Rappel sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

La principale fonction de la mitochondrie est de fabriquer de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir du dioxygène via la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Cette chaîne est composée de 5 complexes (complexes I, II, III, IV et V) au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Les complexes I et II vont permettre l'oxydation de substrats, NADH et $FADH_2$ respectivement, ce qui va permettre aux électrons issus de ces réactions de passer au complexe III via le coenzyme Q (CoQ) et au complexe IV via le cytochrome c. Les électrons ainsi arrivés au complexe IV vont réagir avec du dioxygène pour former de l'eau. Tout ceci permet de créer un gradient de concentration de protons entre l'espace intermembranaire (EIM) et la matrice mitochondriale qui génère une force proton motrice (FPM). En effet, ce transport d'électrons dans la chaîne va permettre au complexe I, III et IV de pomper des protons H^+ de la matrice vers l'EIM. Le gradient électrochimique ainsi généré va être utilisé par le complexe V ou ATP synthase pour phosphoryler de l'adénosine diphosphate (ADP) et produire de l'ATP grâce à une réaction de phosphorylation oxydative (Fig.3). De plus, la GPDH (glycerol-3-phosphate deshydrogenase) qui est une enzyme de la membrane interne peut transférer des électrons au CoQ grâce à la réaction qu'elle catalyse et ces électrons vont ensuite continuer leur route dans la chaîne (Fig.3).

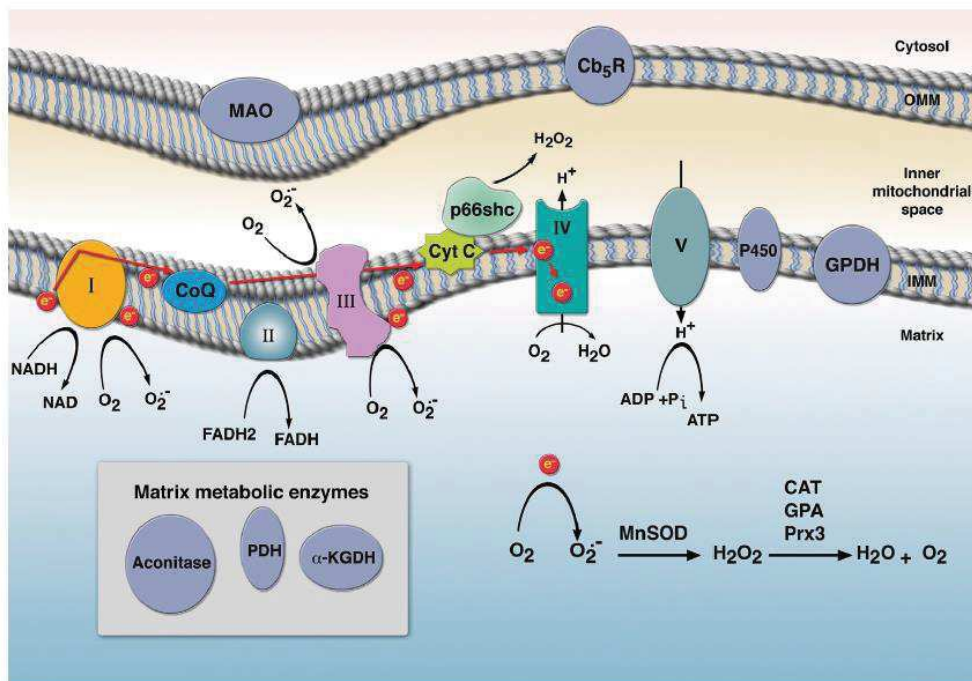


Figure 3 : La production de $O_2\cdot$ par la CRM (Finkel 2011)

ii. Production de $O_2\cdot$

Pour que la production de $O_2\cdot$ soit possible, il faut que les électrons s'échappent prématurément de la chaîne respiratoire pour aller réagir avec une molécule de dioxygène. Il existe de nombreux sites de production mitochondriaux mais la majeure partie de cette production se fait au niveau des complexes I et III.

Parlons dans un premier temps du complexe I. En effet, en mettant des mitochondries isolées en présence de roténone, qui est un inhibiteur spécifique du complexe I, la production de ROS diminue (Lambert, Brand 2009; Murphy 2009). Le complexe I est une protéine d'1 MDa environ composée d'une partie hydrophile dans la matrice et d'une partie hydrophobe intramembranaire. La partie extramembranaire est composée entre autre d'un cofacteur FMN qui est le point d'entrée des électrons suite à l'oxydation de NADH et de 7 centres Fer-Soufre qui permettent le transport des électrons jusqu'à la partie hydrophobe où se trouve le site de réduction du CoQ (Murphy 2009) (Fig.4). On sait que le cofacteur FMN est un site de production de $O_2\cdot$ car en isolant des complexes I en présence de NADH, on a observé une production de $O_2\cdot$ et lorsque ces complexes sont incubés avec de la roténone qui bloque le site de réduction du CoQ en se liant à ce dernier, il y a encore une production de $O_2\cdot$ qui est donc exclusivement due au cofacteur FMN vu que le CoQ est inhibé (Murphy 2009) (Fig.4).

L'autre site de production au niveau du complexe I est le site de réduction du CoQ. La production au niveau de ce site dépend de la force proton motrice et du ratio $CoQH_2/CoQ$. L'augmentation d'un de ces deux paramètres ou des deux induit une

augmentation de la production de $O_2^{\cdot -}$ par ce site. Quel que soit le site de production, le complexe I relargue $O_2^{\cdot -}$ dans la matrice mitochondriale.

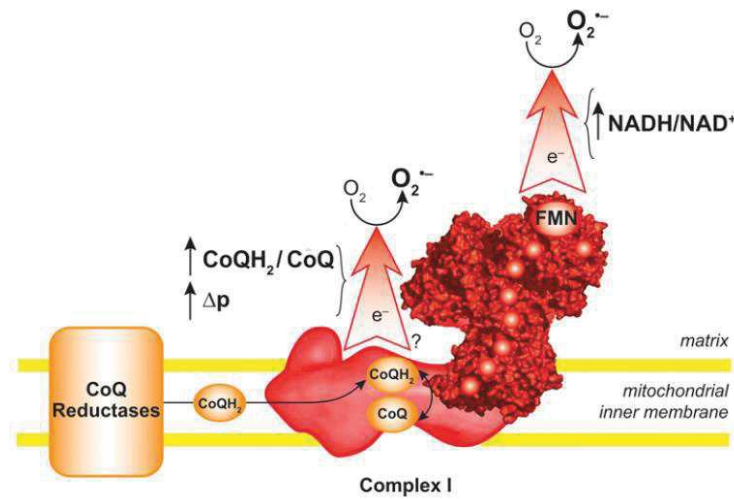


Figure 4 : Production de $O_2^{\cdot -}$ par le complexe I (Murphy 2009)

Le complexe III intervient aussi dans la production de $O_2^{\cdot -}$. Ce complexe est un assemblage de 240 kDa environ comprenant 11 polypeptides, trois hèmes et un centre Fer-Soufre. Il interagit avec le CoQ aux sites Q_i et Q_o. La production de superoxyde par le complexe III est moins importante que celle du complexe I (Lambert, Brand 2009; Murphy 2009). Cette production se fait au niveau du site Q_o (Fig.5) et il semblerait qu'elle soit dépendante de la force proton motrice. De plus, le complexe III relargue $O_2^{\cdot -}$ dans les deux compartiments jouxtant la membrane interne de la mitochondrie soit dans la matrice et dans l'EIM (Lambert, Brand 2009) (Fig.3 page 16).

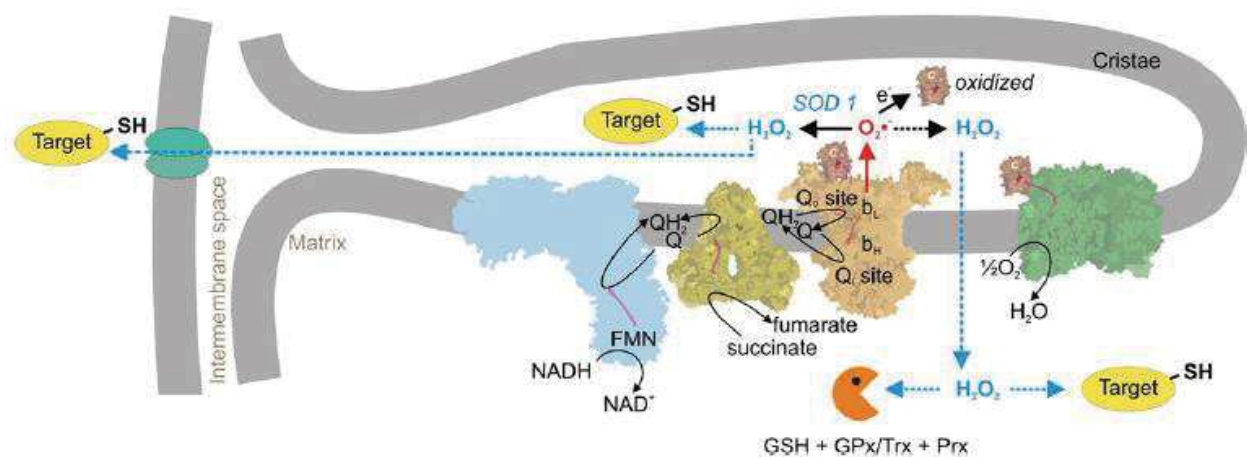


Figure 5 : Production de $O_2^{\cdot -}$ par le complexe III (Bleier, Dröse 2013)

D'autres enzymes mitochondriales sont capables de produire des superoxydes mais cette production reste mineure par rapport à celle des deux complexes précédents. On retrouve des enzymes de la membrane interne telle que ETF:CoQ (electron-transferring-flavoprotein:Coenzyme Q), qui est activée par la bêta-oxydation des lipides et permet le transfert d'électrons de ETF vers le CoQ, et le cytochrome p450. On retrouve aussi des enzymes dans la membrane externe comme le cytochrome b5 réductase et la monoamine oxydase (MAO). Enfin, il y a aussi des enzymes matricielles comme la α KGDH (α ketoglutarate deshydrogenase), qui contient une flavine qui produirait $O_2\cdot$ lorsque son receveur d'électrons NAD^+ est limitant (Murphy 2009), la GPDH et des pyruvate déshydrogénases (PDH) (Finkel 2011) (Fig.3 page 16). Les mécanismes de ces différentes enzymes sont encore méconnus ou mal connus et il existe peut-être encore d'autres entités mitochondriales productrices de superoxyde. Dans tous les cas, pour qu'il y ait production de $O_2\cdot$, il faut un transfert d'électrons pour que ces derniers puissent réagir avec du dioxygène.

b. Les ROS issus de $O_2\cdot$

$O_2\cdot$ est le point de départ de la production des différents ROS que l'on peut trouver dans une cellule. La majorité de $O_2\cdot$ produit va être transformée en H_2O_2 . Cette réaction peut se faire dans 3 compartiments : l'EIM, la matrice mitochondriale où les superoxydes sont produits par les complexes I et III, ou dans le cytoplasme. Dans ce dernier cas, les superoxydes vont devoir sortir de l'EIM grâce à des canaux voltage-dépendants. La réaction de transformation des superoxydes en peroxyde d'hydrogène est catalysée par des superoxydedismutases (MnSOD ou CuZnSOD) (Fig.6). Le peroxyde d'hydrogène peut aussi être produit à partir du cytochrome c qui va s'oxyder sous l'effet du facteur de croissance p66shc (Tang et al. 2014) (Fig.6), mais cette production reste minime par rapport à la première. Les particularités du peroxyde d'hydrogène sont qu'il peut passer plus facilement les membranes que les superoxydes (il n'a pas besoin de transporteur) et qu'il est plus stable que ces derniers, sa durée de vie est donc supérieure.

Les superoxydes peuvent aussi réagir avec du monoxyde d'azote (NO) produit par des NO synthases pour donner des peroxynitrites ($ONOO^-$) qui sont une forme très réactive de ROS.

De plus, H_2O_2 peut réagir avec des métaux tels que l'ion fer (II) Fe^{2+} ou l'ion Cu^+ lors de la réaction de Fenton pour donner le radical hydroxyle ($OH\cdot$) qui est la forme la plus réactive des ROS (Brand et al. 2004). L'acide hypochloreux ($HOCl$) va lui être produit à partir de H_2O_2 grâce à une myeloperoxydase (Espinosa, Chillet 2010).

c. Dégradation des ROS

Le peroxyde d'hydrogène va être transformé en eau par différentes enzymes. Au niveau de la matrice mitochondriale et de l'EIM, ce sont des glutathion peroxidase

(GPx) et des peroxiredoxin 3 (Prx3) alors que dans le cytoplasme ce sont des catalases qui vont catalyser ces réactions (Tang et al. 2014) (Fig.6). Une autre enzyme de type GPx permet de dégrader le radical hydroxyle OH[·] en eau (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007).

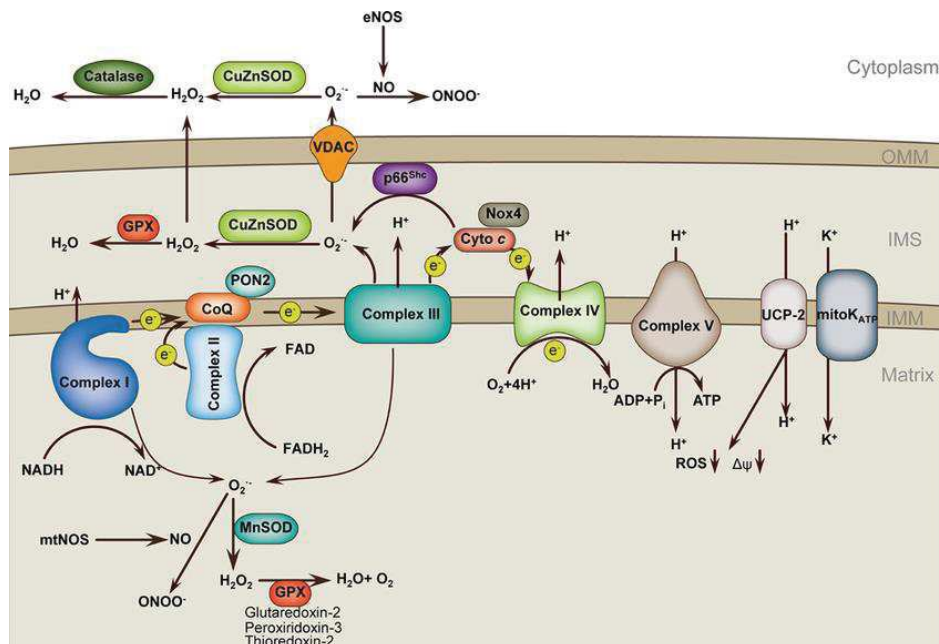


Figure 6 : La production de ROS à partir de O₂^{·-} (Tang et al. 2014)

3. Régulation de la production des ROS

Il faut noter tout d'abord que cette production dépend fortement de la FPM produite par la chaîne respiratoire. Cette FPM a deux composantes : une composante chimique (gradient de protons) et une composante électrique (le potentiel de membrane). Plus cette FPM est importante, plus la production de ROS le sera aussi (Sena, Chandel 2012).

i. Diminution de la production

Pour réguler cette production de ROS, il y a tout d'abord les enzymes antioxydantes que l'on vient de citer : SOD, PRx, catalases. Il existe aussi une multitude de molécules antioxydantes naturelles présentes dans les cellules et dans la mitochondrie. Parmi toutes ces molécules, deux d'entre elles paraissent les plus importantes : la vitamine E et l'ubiquinone. Ces dernières vont agir avec un cation et vont donc s'accumuler dans la matrice mitochondriale du fait du potentiel de membrane négatif qui se trouve à l'intérieur de cet organite (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007). Ainsi, lorsque les ROS vont être produits, ils vont de suite réagir avec les antioxydants qui sont présents dans la matrice. Le GSH (forme réduite du glutathion) a aussi un rôle important mais

il ne va pas agir directement sur les ROS car le GSH est le donneur d'électrons pour l'enzyme GPx ce qui va permettre de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007).

Les protéines découplantes présentes dans la membrane interne mitochondriale agissent aussi sur la production de ROS. En effet, ces protéines diminuent la FPM en permettant le passage de protons de l'EIM vers la matrice. La FPM étant diminué alors la production de ROS l'est aussi (cf paragraphe I de la partie expérimentale : Influence d'UCP2 sur l'immunité antivirale p.35) (Esteves, Brand 2005).

Des molécules externes peuvent aussi agir sur la chaîne respiratoire. Par exemple, la roténone inhibe le complexe I et l'antimycine A, le complexe III, qui ne peuvent donc plus transférer d'électrons au dioxygène d'où une production réduite.

Les conditions de vie de la cellule peuvent aussi influencer négativement cette production, par exemple, lors d'hypoxie chronique, pour éviter les dommages cellulaires trop importants que peuvent provoquer les ROS à long terme (Sena, Chandel 2012). De plus, la chronicité de l'hypoxie engendre une disponibilité moindre en oxygène, élément essentiel pour la production de ROS. L'hypoxie peut aussi agir sur des protéines qui vont inhiber la chaîne respiratoire.

ii. Augmentation de la production

Les conditions métaboliques et d'oxydoréduction de l'environnement cellulaire vont influencer fortement la production de ROS. En effet, dans des conditions qui favorisent l'état réduit des porteurs d'électrons, tels que NADH ou le CoQ, et lorsque l'on a une forte FPM, les complexes I et III vont produire plus de ROS (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007). L'hypoxie aiguë peut aussi entraîner une augmentation des ROS dans la mitochondrie (Sena, Chandel 2012). Cette augmentation de ROS va se produire lors d'une hypoxie aiguë lorsque l'oxygène est encore disponible pour les cellules. En revanche, comme décrit au paragraphe précédent, la production de ROS est diminuée lors d'hypoxie chronique.

Une multitude d'autres facteurs peuvent permettre une augmentation de la production de ROS (Fig.7) : une activité réduite de la mitophagie, des adjuvants (Alum sur la figure 7), des ARN (exemple de l'*Alu* ARN sur le schéma qui est un ARN non codant), des cristaux d'urate monosodique (MSU), la nigericine qui est une toxine bactérienne.

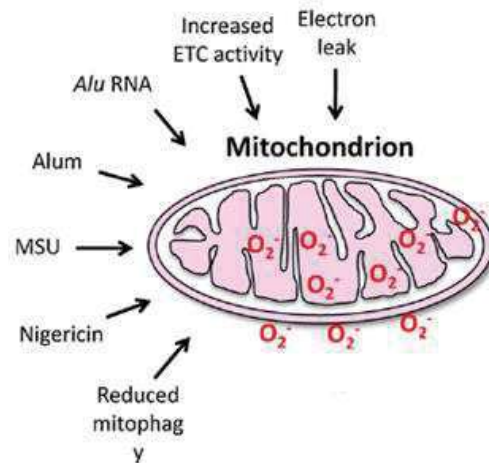


Figure 7 : Facteurs augmentant la production de ROS (Pelletier et al. 2012)

4. ROS et régulation de la physiologie cellulaire

Dans cette partie, nous n'allons pas simplement nous cantonner aux ROS mitochondriaux mais à tous les ROS qui peuvent être produits par la cellule et nous allons détailler les rôles non immunitaires que l'on connaît de ces molécules.

En effet, nous avons parlé de la production des ROS par la mitochondrie mais ceux-ci peuvent aussi être fabriqués par une enzyme qui est la NADPH-oxdase (NOX2) située au niveau de la membrane cellulaire des phagosomes. Cette enzyme va oxyder NADPH ce qui va libérer un électron qui va réagir avec du dioxygène pour former des superoxydes. Cette source de ROS est la plus importante source non mitochondriale (Nauseef 2008). Les ROS peuvent être aussi produits par des oxydases dans les peroxysomes par exemple.

a. Les ROS ont une action directe

Les ROS peuvent tout d'abord entraîner des dommages au sein même de la cellule. En effet, durant un stress oxydatif, les principales cibles des ROS sont l'acide désoxyribonucléique (ADN), les ARN, les protéines et les lipides (Tableau 1). Pour ce qui est des lipides, les acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation, ils vont réagir avec le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton. Les modifications de l'ADN vont entraîner la plupart du temps des mutations contribuant à l'apparition de cancer, de maladies neurodégénératives. Cela contribuerait au vieillissement des cellules et donc de l'organisme. Au niveau des protéines, toutes sortes de réactions peuvent se produire comme la fragmentation, l'oxydation de certains acides aminés, etc. Tout ceci entraîne une modification de la structure tertiaire de la protéine ce qui lui fait perdre sa fonction primaire et qui la rend plus susceptible à la protéolyse (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007).

Tableau 1 : Propriétés et cibles de différents ROS (d'après Mittler 2016).

ROS	T _{1/2}	Distance de migration	Mode d'action	Site de production
Superoxyde (O ₂ ^{·-})	1-4 µs	30 nm	Réagit avec les protéines en attaquant cystéine et groupes sulfhydryles Transformé en H ₂ O ₂	Mitochondrie Peroxysome Chaîne respiratoire
Radical hydroxyle (OH [·])	1 ns	1 nm	Extrêmement réactif avec toutes les biomolécules notamment ADN, ARN, lipides et protéines	Réaction de Fenton (H ₂ O ₂ + Métal) en zone périnucléaire
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	>1ms	>1µm	Réagit avec les protéines en attaquant cystéine et méthionine Réagit avec les protéines hème Réagit avec l'ADN	Peroxysome Mitochondrie Cytosol
Oxygène singulet (¹ O ₂)	1-4 µs	30 nm	Oxyde les lipides, les protéines, et les guanines de l'ADN	Membrane Noyau

Les ROS ont aussi des cibles mitochondriales. La première d'entre elles est l'ADN mitochondrial qui va subir les mêmes modifications que la double hélice nucléaire. Cet ADN code pour des protéines essentielles au transport d'électrons et à la production d'ATP. Ainsi, les ROS peuvent entraîner des dommages mortels pour la cellule au niveau de l'ADN mitochondrial car la cellule n'aura pas assez d'énergie suite au manque de production d'ATP. Cette carence en ATP peut aussi être due à l'inactivation des aconitases par les ROS. Ces dernières jouant un rôle important dans le cycle de Krebs alors il y aura un impact final sur la production d'énergie. Ces ROS vont aussi agir sur les lipides mitochondriaux ce qui va nuire au métabolisme de cet organite. Enfin, les ROS vont jouer un rôle sur l'homéostasie de Ca²⁺ dans la mitochondrie en agissant sur des canaux voltage-dépendants (Orrenius, Gogvadze, Zhivotovsky 2007).

b. Les ROS comme messagers secondaires

i. Régulation de l'adaptation à l'hypoxie

En situation d'hypoxie, les cellules vont mettre en place des réponses pour lutter contre cet état et beaucoup de ces réponses sont dues aux ROS mitochondriaux produits en excès lors d'hypoxie aiguë. Les protéines HIF (hypoxia inducible factor) vont favoriser

l'expression de l'EPO (érythropoïétine) pour stimuler la production de globules rouges, de facteurs de croissance vasculaires pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux et d'enzymes glycolytiques pour maintenir un niveau d'ATP convenable. Or, lorsqu'il n'y a pas d'élévation de quantité de ROS mitochondriaux, les protéines HIF ne sont pas actives car elles ne sont pas stables. Ainsi, les ROS permettraient de lutter contre l'hypoxie via ces protéines. De plus, lors d'hypoxie, les ROS vont activer les AMPK (AMP-activated protein kinase) qui vont permettre à terme de conserver l'énergie au sein de la cellule en favorisant l'internalisation des pompes Na/K ATP-dépendantes (Hamanaka, Chandel 2010). Par contre lors d'hypoxie chronique, des cellules n'exprimant pas les protéines HIF maintiennent un niveau de ROS élevé par rapport à des cellules sauvages. Ainsi, les ROS seraient bénéfiques à court terme contre l'hypoxie mais en cas d'hypoxie chronique ils seraient néfastes à cause des dommages qu'ils causent aux cellules (Sena, Chandel 2012).

ii. Régulation de la mort cellulaire

L'autophagie est le processus au cours duquel les cellules vont détruire les protéines et les organites grâce aux lysosomes pour permettre un recyclage de ces composants et de nouvelles biosynthèses. Ce phénomène est la plupart du temps une réponse au stress cellulaire. Une étude a montré que lors de carence en nutriments, la cellule va activer des enzymes qui vont favoriser la production de ROS mitochondriaux qui vont, à leur tour, inactiver la protéase Atg4 (autophagy related genes 4) ce qui va favoriser la lipodation d'Atg8 qui est nécessaire au processus d'autophagie (Fig.8) (Scherz-Shouval et al. 2007). De plus, les ROS mitochondriaux permettent un rétrocontrôle négatif sur leur production en favorisant la mitophagie (réduction du nombre de mitochondries dans la cellule). L'autophagie peut aussi conduire à la mort cellulaire dans certaines conditions. Cette mort cellulaire est induite par une concentration importante de peroxyde d'hydrogène dans la cellule. Ces ROS produits en grande quantité vont alors inactiver des enzymes, les JNK (c-Jun N-terminal kinases) phosphatase, ce qui va conduire à une cascade de signalisation via NF- κ B qui se termine par la production de TNF α (Leeper-Woodford, Detmer 1999) qui peut induire la mort cellulaire (Hamanaka, Chandel 2010).

En résumé, les ROS mitochondriaux jouent une double fonction. A basse concentration, ils vont induire l'autophagie ce qui va permettre la survie de la cellule alors qu'à forte concentration, ils vont induire la mort cellulaire lorsque la survie ne semble plus possible (Sena, Chandel 2012).

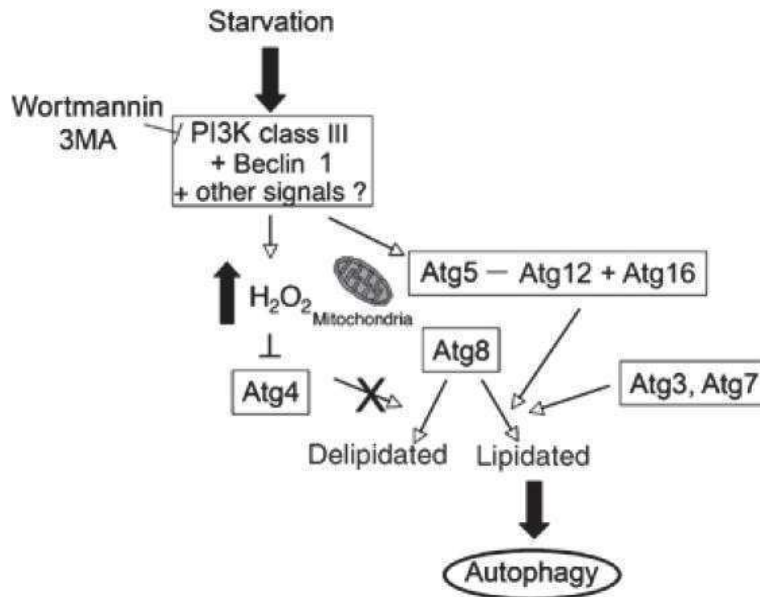


Figure 8 : Rôle des ROS dans le processus d'autophagie (Scherz-Shouval et al. 2007)

iii. Régulation de la différenciation cellulaire

Les mécanismes moléculaires qui guident la différenciation cellulaire ne sont pas totalement connus mais il semblerait que les ROS aient un rôle à jouer. En effet, le fait de piéger les ROS produits retarde la différenciation de cellules souches hématopoïétiques chez les drosophiles tandis que l'augmentation en quantité des ROS induit une différenciation de ces cellules (Sena, Chandel 2012).

III. Liens entre les ROS et la réponse immunitaire innée

1. ROS et agents pathogènes

a. ROS et défense antibactérienne dans le phagosome

Lorsqu'un agent pathogène est reconnu par une cellule phagocytaire et qu'il est phagocyté par cette dernière, un phénomène appelé poussée respiratoire se met en place durant lequel le phagocyte va augmenter sa consommation d'oxygène. NOX2 est essentielle pour ce phénomène et elle n'est assemblée sur la membrane du phagosome qu'après la phagocytose de l'agent pathogène. En effet, cet assemblage est permis par la protéine Rac : son activation entraîne le recrutement des composants cytosoliques de NOX2 dans la membrane. NOX2 va alors produire des ROS qui vont induire des dégâts oxydatifs et non oxydatifs non réparables (sur l'ADN, les protéines, les membranes, etc) de l'agent pathogène, du fait de leur forte réactivité et de leur fort pouvoir d'oxydation, qui vont permettre l'élimination de ce dernier (Fig.9A). Ces ROS

sont essentiels pour éliminer l'agent pathogène car des souris possédant une déficience au niveau de la production de ROS sont plus sensibles à beaucoup d'infections comme *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, etc. De plus, tout ceci serait aussi dépendant de la protéine CARD9 qui permettrait indirectement une activation plus rapide de la protéine Rac et donc une élimination plus rapide des microbes. En effet, les souris ne possédant pas la protéine CARD9 sont plus sensibles aux infections par *Listeria monocytogenes* et aux infections fongiques. De plus, l'élimination d'*E. coli* est plus rapide chez les souris de type sauvage. On sait aussi que la quantité de ROS produits et la vitesse à laquelle ils sont produits sont différentes selon l'agent pathogène reconnu par le phagocyte. Par exemple, lors de la reconnaissance avec *E. coli*, la quantité produite est moins importante et le relargage dans le phagosome est moins rapide qu'avec *L. monocytogenes* (Paiva, Bozza 2014).

De plus, les ROS, au sein du phagosome, vont permettre le relargage d'enzymes qui vont agir à leur tour sur les agents pathogènes. En effet, les superoxydes produits chargés négativement vont entraîner un afflux de K^+ au sein du phagosome pour compenser la charge négative de ces ROS. Cet afflux va avoir pour conséquence un relargage d'enzymes par des granules qui vont alors s'attaquer au microbe pour le détruire (Fig. 9B) (Paiva, Bozza 2014).

Les ROS mitochondriaux ont sûrement aussi leur rôle à jouer. En effet, suite à la stimulation des TLR par les bactéries, les ROS produits par NOX2 vont stimuler la production de ROS mitochondriaux qui pourraient agir sur les agents pathogènes cytoplasmiques mais ce mécanisme est encore très mal connu (Fig.9A). La stimulation des TLR induisent aussi une augmentation de la production de ROS mitochondriaux (West, Shadel, Ghosh 2011)

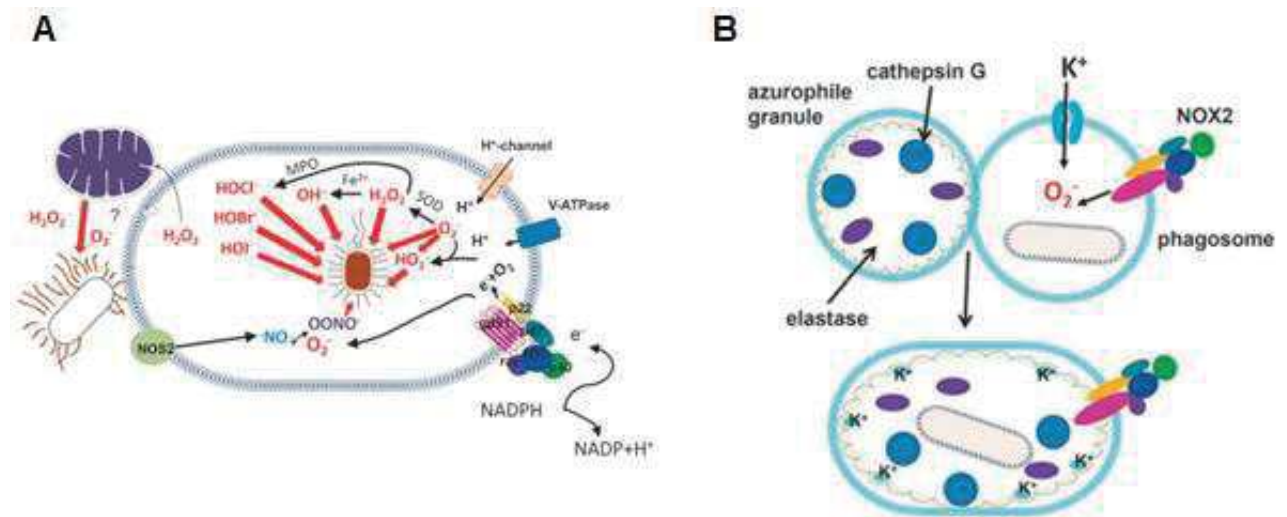


Figure 9 : Action directe des ROS sur les pathogènes par des dommages oxydatifs (A), par le relargage d'enzymes (B) (Paiva, Bozza 2014)

b. Autres mécanismes contribuant à l'élimination de l'agent pathogène (effet anti-pathogène)

i. Les ROS favorisent l'élimination des pathogènes par autophagie

En présence d'un agent pathogène, les ROS produits par NOX2 vont agir sur les protéines light chain 3 (LC3) associées aux microtubules ce qui va permettre la formation d'un autophagosome qui va ensuite fusionner avec un lysosome pour détruire le microbe par autophagie (Fig.10) (Paiva, Bozza 2014).

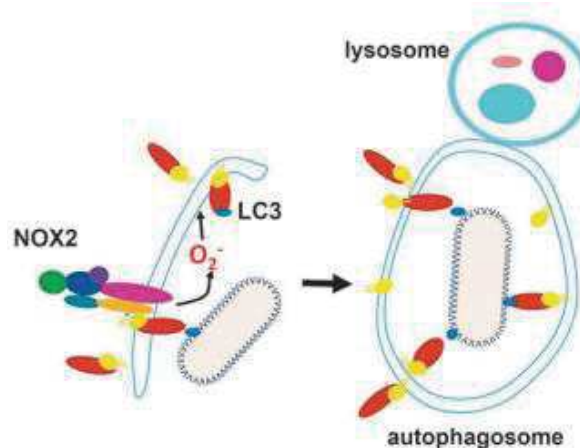


Figure 10 : Rôle des ROS dans l'autophagie (Paiva, Bozza 2014)

ii. Les ROS induisent une réponse antivirale en inhibant la voie des mTOR (mammalian target of rapamycin)

mTOR est une enzyme qui contrôle la croissance cellulaire et le métabolisme de la cellule en fonction du statut nutritif de cette dernière. Cette enzyme est inhibée par les AMPK, ces dernières étant activées quand le niveau d'ATP dans la cellule est bas et donc que le statut nutritif l'est aussi. Lorsque l'on a une forte concentration de ROS pendant longtemps au niveau cellulaire, on a une inhibition de la voie des mTOR par les AMPK ce qui induit la mort cellulaire et l'autophagie qui a pour effet de diminuer la charge virale de l'organisme lorsque celui-ci est infecté (Paiva, Bozza 2014).

iii. Les ROS favorisent les NETs (neutrophil extracellular traps)

Les NETs sont un réseau de fibres extracellulaires produites par les neutrophiles pour piéger les agents pathogènes pour ensuite les détruire grâce à la libération de protéines bactéricides et fongicides (défensines, lactoferrine, elastases, etc). Ces NETs sont composés principalement de chromatine et de protéines. Ce réseau de fibres se forme après activation des neutrophiles par des bactéries ou des

interleukines. Les ROS aident à la formation de ces NETs mais le mécanisme est encore mal connu (Fig.11) (Paiva, Bozza 2014).

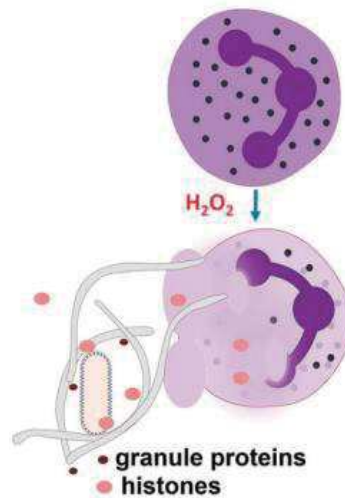


Figure 11 : Production de NETs par les ROS (Paiva, Bozza 2014)

iv. Les ROS : chémoattracteurs pour les phagocytes

Les cellules épithéliales se trouvant au sein d'un tissu blessé vont rapidement produire du peroxyde d'hydrogène qui va être un signal contribuant au recrutement initial des neutrophiles au niveau de la blessure tissulaire. Cela permet une réponse rapide à l'entrée du pathogène dans l'organisme (Paiva, Bozza 2014).

c. Mécanismes permettant la dissémination de l'agent pathogène (effet pro-pathogène)

Les ROS peuvent être bénéfiques pour l'immunité mais ils peuvent aussi l'être pour certains agents pathogènes en favorisant indirectement leur dissémination en intervenant dans certaines voies métaboliques.

i. Les ROS induisent une défense antioxydante qui est favorable aux microbes

Les ROS peuvent activer un facteur nucléaire NRF2 qui induit l'expression d'enzymes antioxydantes. De plus, ce facteur entraîne une surexpression du gène ATF3 (activating transcription factor 3) qui est un gène qui offre une protection contre un choc endotoxémique suite à une infection en inhibant la production d'IL-6. Cette diminution de production d'IL-6 peut favoriser à terme le développement de certains

agents pathogènes comme *E. coli* ou *Aspergillus fumigatus* (Fig.12) (Paiva, Bozza 2014).

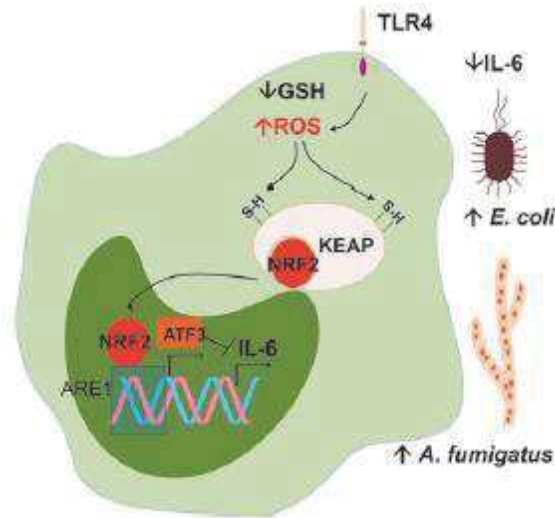


Figure 12 : Interaction entre les ROS et NRF2 (Paiva, Bozza 2014)

ii. Les ROS interfèrent avec le métabolisme lipidique

Les ROS avec l'aide des lipides peroxydés inhibent l'efflux de cholestérol de la cellule via les transporteurs ABC (ATP binding cassette) vers le milieu extérieur. Ces transporteurs ont pour rôle de faire sortir le cholestérol qui va être pris en charge par les lipoprotéines de haute densité (HDL). L'inhibition de ce transport contribue à la formation de cellules spumeuses dues à l'accumulation de cholestérol intracellulaire qui est un phénotype de macrophage qui est préféré par certains agents pathogènes comme le VIH, *Trypanosoma cruzi* et *Mycobacterium tuberculosis*. Ainsi, les ROS aident la propagation de ces différents agents (Paiva, Bozza 2014).

d. Mécanismes pouvant être pro ou anti-pathogène

Certaines voies de signalisation sur lesquelles interviennent les ROS peuvent jouer un double rôle selon le compartiment et les agents pathogènes impliqués.

i. Les ROS favorisent la mort cellulaire dans les réservoirs viraux

Les réservoirs viraux sont des sites dans l'organisme où le virus va s'accumuler et persister. Les ROS à forte concentration favorisant la mort cellulaire vont permettre, au niveau de ces réservoirs, de limiter la propagation de l'infection et de prévenir la réplication du virus dans ces cellules réservoirs. Mais dans certains cas particuliers, cela peut favoriser l'infection en facilitant la sortie du pathogène des cellules infectées

(si une cellule meurt sans que l'agent pathogène soit détruit) ou en tuant des cellules phagocytaires ce qui empêche donc l'élimination du virus. Nous voyons donc ici que les ROS peuvent contribuer à la lutte contre l'infection (effet anti-pathogène) mais peuvent aussi aider l'agent pathogène à se disséminer au sein de l'organisme (effet pro-pathogène) (Paiva, Bozza 2014).

ii. Les ROS interfèrent avec le stockage du fer et sa mobilisation

Le fer est un élément dont les bactéries ont besoin pour vivre. Une stratégie du système immunitaire innée est donc la séquestration du fer loin des pathogènes bactériens. Les ROS entraînent un relargage intracellulaire du fer par la ferritine (protéine cytosolique de stockage du fer) et inhibent la synthèse de cette protéine (le fer ne pouvant plus être stocké reste dans le cytoplasme) ce qui offre à certains agents pathogènes intracellulaires d'avoir cet élément à portée de main et donc leur développement au sein de la cellule (effet pro-pathogène). L'hepcidine va entraîner une diminution de l'absorption intestinale en fer (en détruisant la ferroportine) ce qui influe négativement sur la quantité circulant dans le plasma. La disponibilité du fer dans l'organisme est donc moindre pour les bactéries n'ayant pas un tropisme digestif (effet anti-pathogène) (Paiva, Bozza 2014).

Les ROS agissent également sur le facteur nucléaire NRF2 (nuclear factor-like 2) qui par une voie de signalisation faisant intervenir l'hème oxygénase 1 (HO-1) stimule l'expression de ferritine. Ainsi la disponibilité en fer pour les bactéries intracellulaires est diminuée (effet anti-pathogène) (Paiva, Bozza 2014).

En résumé, le devenir d'une infection dépend du besoin en fer, du tissu dans lequel se trouve le pathogène et de la disponibilité du fer dans ce tissu. Et tout ceci est influencé par la balance entre stress oxydatif et défense antioxydante.

iii. Les ROS interfèrent avec les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont responsables de la capture d'antigènes et de leur présentation aux lymphocytes T. Les ROS réduisent la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques, ce qui va amener les lymphocytes T à avoir plutôt une réponse immunitaire de type Th2 ou Th17. Ainsi, lors de stress oxydatif, le titre en virus Influenza est plus important car on a une réponse immunitaire de type Th2 qui est plutôt délétère au cours d'une infection primaire avec les virus Influenza (effet pro-pathogène) (Fig.13A) (Paiva, Bozza 2014).

D'autre part, les ROS favorisent la présentation d'antigènes par les cellules dendritiques aux lymphocytes CD8 en consommant les protons présents dans les phagosomes des cellules dendritiques. Cela va rendre le pH plus basique et donc ralentir la dégradation des antigènes présents ce qui augmente leur durée de vie et

donc favorise leurs présentations aux lymphocytes (effet anti-pathogène) (Fig.13B) (Paiva, Bozza 2014).

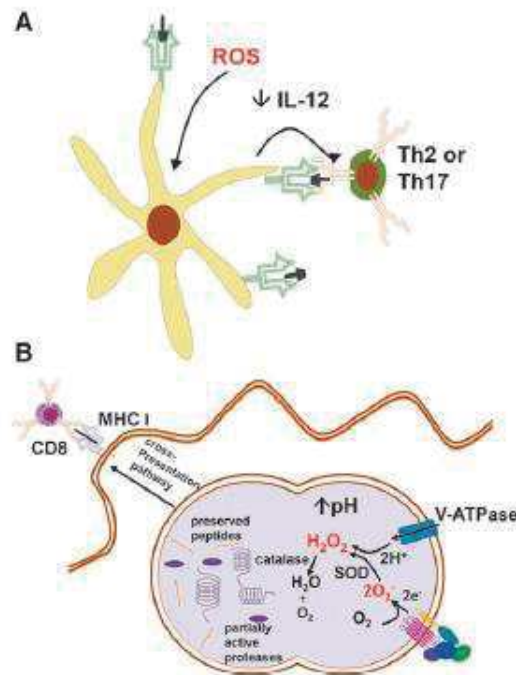


Figure 13 : Rôles des ROS dans les cellules dendritiques (Paiva, Bozza 2014)

2. Les ROS et la modulation de la signalisation lors de la réponse immunitaire innée

Les ROS mitochondriaux vont permettre de moduler la réponse immunitaire innée positivement ou négativement. En effet, le gène Atg5 qui régule l'autophagie peut inhiber la voie de signalisation des RLR (RIG-1-like receptors). Cette régulation vient de la production de ROS qui est dépendante aussi de l'expression de ce gène. En effet, les cellules déficientes en Atg5 accumulent des mitochondries dysfonctionnelles et donc une quantité de ROS plus importante. En infectant ces cellules avec un analogue d'ADN viral, une augmentation de la production d'interférons de type I est induite et, le traitement de ces cellules avec un antioxydant entraîne une production diminuée d'interférons de type I ce qui montre bien que les ROS modulent la synthèse d'interférons. De plus, le traitement par des molécules chimiques stimulant la production des ROS mitochondriaux potentialise les voies de signalisation des RLR. Ainsi, les ROS sont importants comme messagers secondaires dans la voie RLR-MAVS. De plus, il a été montré que l'expression de la protéine gC1qR, protéine qui inhibe la chaîne respiratoire, entraîne une inhibition de la signalisation par la protéine MAVS. gC1qR induit une inhibition des MAVS par la diminution de production de ROS qu'elle induit au niveau de la CRM. Tout ceci nous indique donc un rôle central des réactifs oxygénés sur la réponse immunitaire innée pendant une infection virale (Fig.14) (West, Shadel, Ghosh 2011).

Nous venons de voir aussi que les ROS ont un effet sur l'immunité innée durant une infection bactérienne au niveau du phagosome avec le phénomène de poussée respiratoire. On aura aussi production de cytokines grâce à une augmentation de la production de ROS lors ce type d'infection (Fig.14).

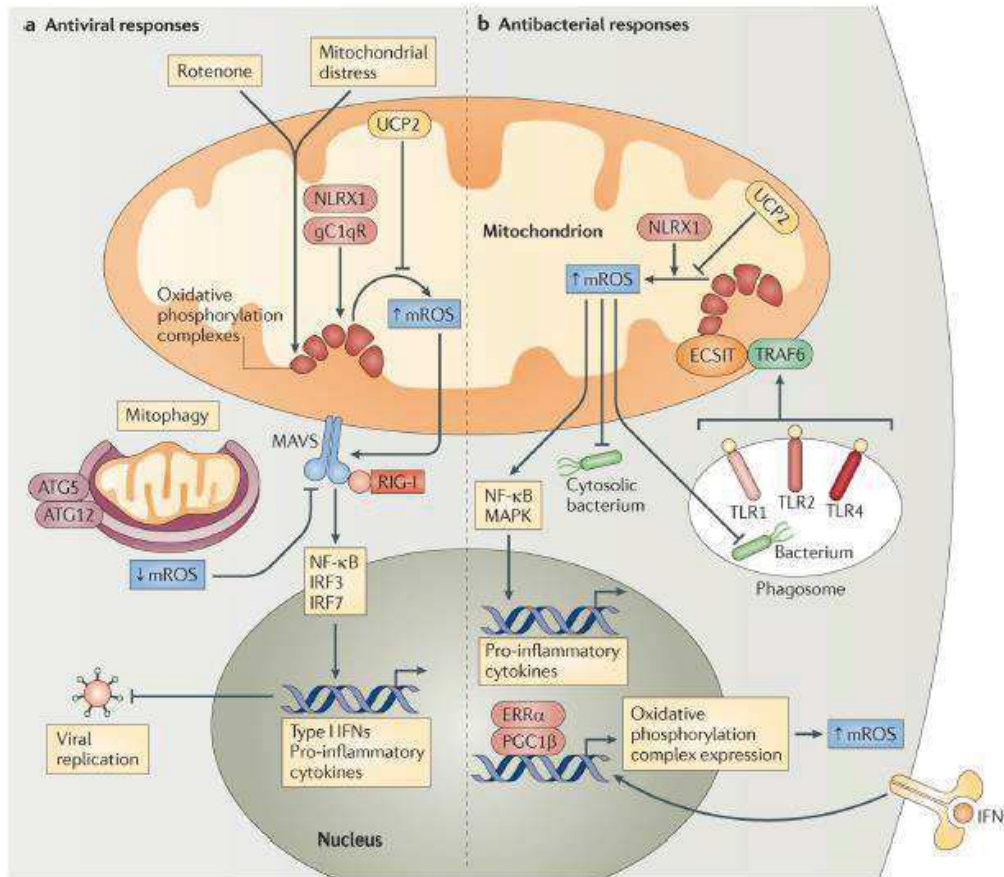


Figure 14 : Modulation de la réponse immunitaire innée par les ROS mitochondriaux (West, Shadel, Ghosh 2011)

En condition d'hypoxie, les ROS permettraient d'activer le facteur nucléaire NF-κB. En effet, des ROS vont être produits par les mitochondries qui à leur tour vont activer des protéines kinase qui activent le facteur nucléaire entraînant l'expression des ARNm (acides ribonucléiques messagers) de TNFα ce qui va à terme stimuler la synthèse d'autres cytokines (Chandel et al. 2000).

Les ROS pourraient aussi moduler la réponse immunitaire innée au niveau de l'épithélium nasal chez l'Homme lors d'infection par le virus Influenza. Ils permettraient la phosphorylation des facteurs de transcription STAT 1 et STAT 2 (signal transducer and activator of transcription 1 et 2) qui activent la synthèse d'interférons (Kim et al. 2015).

3. L'immunité innée entraîne la production de ROS mitochondriaux

Les récepteurs TLR sont capables d'induire la production de ROS mitochondriaux. En effet, la stimulation de macrophages avec des agonistes de TLR 1, 2 ou 4 (récepteurs au niveau de la membrane cellulaire) entraîne une production accrue de ROS mitochondriaux. Par contre, la stimulation avec des agonistes des autres TLR ne change rien. Ainsi, seuls les TLR à la surface des cellules et reconnaissant des motifs bactériens induiraient cette synthèse. Pour ce qui est du mécanisme, la reconnaissance de PAMP bactériens par les TLR phagosomaux entraîne la juxtaposition des mitochondries avec le phagosome et la translocation de TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6) vers la mitochondrie qui va agir sur la protéine ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway) se situant sur la membrane externe mitochondriale qui à son tour va induire la production de ROS mitochondriaux en agissant sur le complexe I de la CRM. Ces réactifs oxygénés ainsi produits vont soit entrer dans le phagosome pour agir directement sur l'agent pathogène phagocyté soit stimuler la production de ROS par le phagosome via NOX2 (Fig.15) (West et al. 2011).

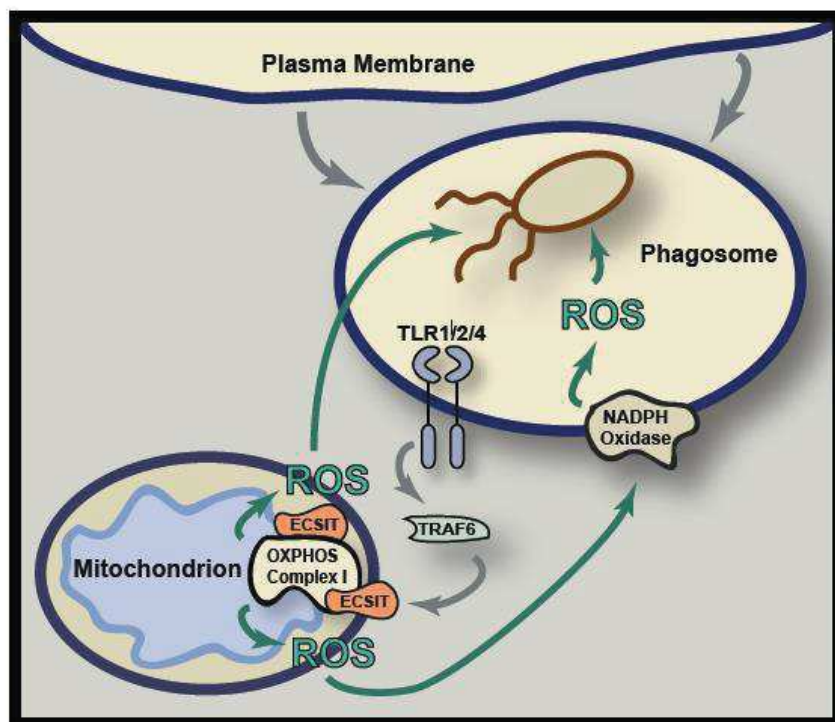


Figure 15 : Production de ROS mitochondriaux induite par les TLR (West et al. 2011)

4. ROS et pathogénicité

Les ROS peuvent avoir un effet bénéfique sur la réponse immunitaire antivirale mais aussi un effet néfaste lors d'infection virale. En effet, les peroxynitrites produits grâce à la réaction entre le monoxyde d'azote et les superoxydes sont des facteurs

pathogéniques très importants lors d'infection par le virus Influenza au niveau pulmonaire (Akaike et al. 1996). De plus, lorsque des souris infectées par le virus Influenza sont traitées avec un piègeur de ROS alors les dommages au niveau des poumons sont moindres et la survie des souris augmentée par rapport à des souris non traitées (Kash et al. 2014). Enfin, des souris déficientes en TLR4 ou traitées avec un antagoniste à TLR4 survivraient à des infections avec une dose létale de virus. Cela s'explique par le fait que la pathogénicité du virus est augmentée par les phospholipides oxydés qui sont produits par réaction avec les ROS. Ces phospholipides oxydés pourraient stimuler le TLR4 et contribueraient à l'immunopathologie associée à l'infection par les virus Influenza (Shirey et al. 2013, Bochkov et al. 2010). Ainsi, nous avons vu que les ROS jouent un double rôle : d'un côté, ils permettent une réponse immunitaire innée antivirale et de l'autre, ils augmentent les phénomènes pathologiques associés à l'infection.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Etude 1 : Influence d'UCP2 sur l'immunité antivirale

L'objectif de cette étude est d'augmenter la production de ROS dans les cellules infectées par le virus Influenza dans le but de potentialiser les effets stimulateurs des ROS mitochondriaux sur la signalisation intracellulaire activant la réponse immunitaire antivirale. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons choisi d'inhiber l'expression de la protéine UCP2 qui régule la production de ROS mitochondriaux par les mécanismes que nous allons décrire ci-dessous.

Dans un premier temps, nous allons présenter la protéine mitochondriale UCP2, ses différents rôles au sein de l'organisme et en particulier son implication au niveau immunitaire. Puis, nous détaillerons le protocole et les résultats de cette étude expérimentale.

1. UCP2 : une protéine qui influe sur la production de ROS

a. Présentation de la protéine UCP2 et rôles non immunitaires

UCP2 est une protéine découplante de la membrane interne mitochondriale possédant un temps de demi-vie court (environ 30 minutes) (Rousset et al. 2007). Cette protéine est exprimée dans beaucoup de tissus et de cellules : rate, thymus, cellules β du pancréas, cœur, poumons, tissu adipeux, estomac, testicules, macrophages, muscles, etc. (Echtay 2007). Comme toutes les protéines découplantes, elle permet le passage de protons de l'EIM vers la matrice (Echtay, Winkler, et al. 2001). Ainsi, elles vont diminuer la force proton motrice créée par la CRM.

On sait tout d'abord que contrairement aux autres protéines découplantes, UCP2 ne permet pas la thermogénèse. Le premier rôle que l'on peut lui attribuer est de réguler la sécrétion d'insuline. En effet, les cellules β du pancréas détectent le glucose via le catabolisme de ce dernier. Ainsi, lorsque l'on a une augmentation du ratio ATP/ADP, il va y avoir fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants ce qui crée une dépolarisation de la membrane qui va permettre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'influx d'ions calcium ainsi créé dans la cellule va induire la sécrétion d'insuline. Or, UCP2 par son activité de transport de protons va diminuer la production d'ATP ce qui diminue le ratio ATP/ADP et donc la sécrétion d'insuline *in fine* (Fig.16) (Echtay 2007).

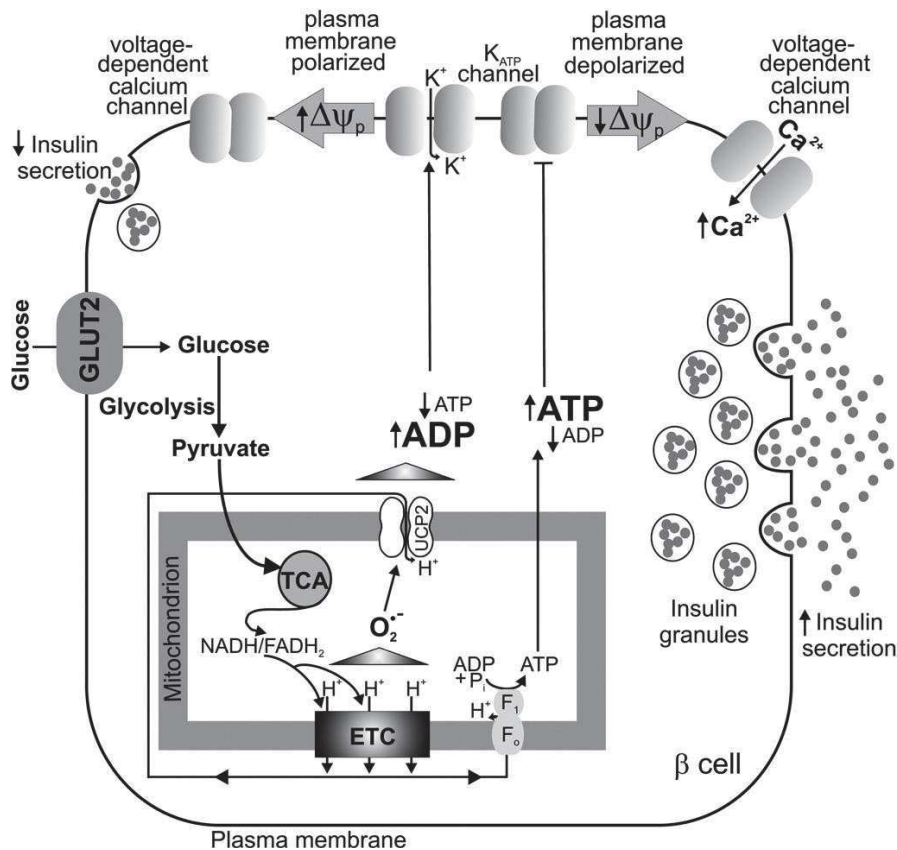


Figure 16 : Régulation de la sécrétion d'insuline par UCP2 (Echtay 2007)

Le deuxième rôle que l'on peut lui attribuer est l'exportation des acides gras peroxydés. Ces derniers peuvent créer des dommages au niveau des protéines et de l'ADN mitochondrial. UCP2 exporte ces acides gras dans l'EIM permettant d'éviter ces dommages (Brand, Esteves 2005).

b. UCP2 régule la production de ROS

La production mitochondriale de ROS est très dépendante de la force proton motrice générée par la CRM. UCP2 diminue cette force proton motrice et entraîne donc une diminution de la production de ROS. Ce phénomène va permettre de limiter les dommages causés par les ROS lorsqu'ils sont produits en grande quantité (Brand, Esteves 2005). Une étude (Arsenijevic et al. 2000) a montré que des souris déficientes en protéine UCP2 produisaient plus de ROS que les souris sauvages. UCP2 serait activée directement par les superoxydes (Echtay, Roussel, et al. 2001) et par les phospholipides oxydés (Brand, Esteves 2005). De plus, la surproduction de ROS lors de stress oxydatif entraînerait une production plus importante d'UCP2, ceci montre que cette protéine est un système préventif de la surproduction de ROS (Casteilla, Rigoulet, Pénicaud 2001).

c. UCP2 influe sur la réponse immunitaire

L'étude de Rousset et al. (2006) a démontré que des souris déficientes en UCP2 ont une réponse immunitaire innée plus efficace que les souris sauvages et sont plus résistantes aux infections par *Listeria monocytogenes*. En effet, l'absence d'UCP2 lors d'infection par cette bactérie permettrait un meilleur recrutement de cellules effectrices de l'immunité innée par une augmentation de synthèse de CCL2. Une autre étude (Blanc 2003) montre que les lésions d'athérosclérose (lésions dues à l'accumulation de macrophages) sont plus importantes chez des souris homozygotes UCP2(-/-) car les lésions contiennent un nombre plus important de macrophages du fait du meilleur recrutement de ces cellules. UCP2 peut aussi moduler directement l'activité des cellules immunitaires et notamment des macrophages : les macrophages n'exprimant pas UCP2 éliminent plus facilement *Toxoplasma gondii* et *Salmonella typhimurium* que les macrophages des souris sauvages (Emre, Nübel 2010). Ces mêmes auteurs ont montré que la reconnaissance des LPS par TLR4 au niveau du macrophage active les voies de signalisation de ERK (extracellular signal-regulated kinases), JNK et p38. Ces deux dernières voies vont aboutir à une réponse inflammatoire mais aussi à une diminution de l'expression d'UCP2 qui va augmenter la production de ROS qui à leur tour vont activer les voies d'ERK et p38 pour une réponse inflammatoire augmentée. Ainsi, UCP2 contribue à la régulation de la réponse inflammatoire macrophagique (Fig.17) (Emre et al. 2007).

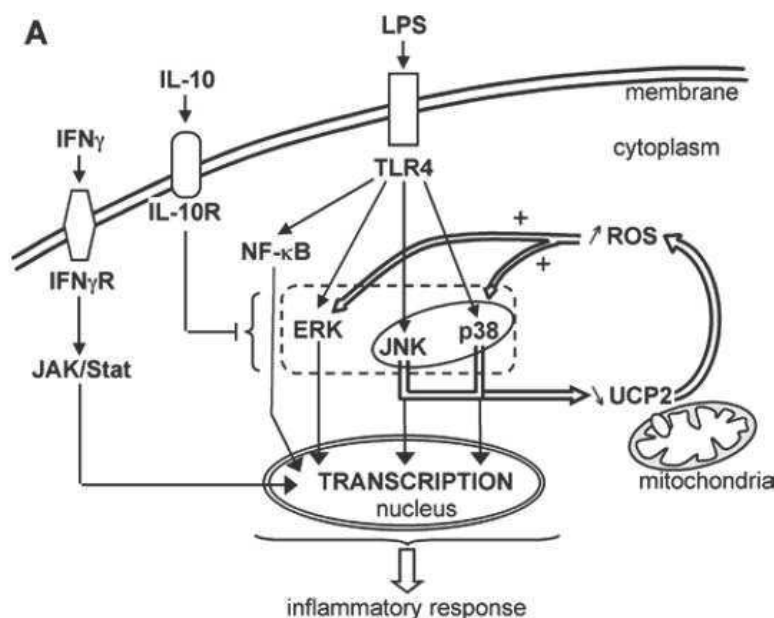


Figure 17 : Implication d'UCP2 dans la réponse inflammatoire macrophagique (Emre et al. 2007)

UCP2 agit aussi sur la production de cytokines. Plusieurs études ont montré que des souris déficientes en UCP2 présente une meilleure production d'interleukines et

d'interférons que des souris sauvages. Inversement, la surexpression d'UCP2 diminue la production de cytokines (Emre, Nübel 2010).

2. Protocole expérimental

a. Obtention de cellules A549 mutantes par la technique CRISPR/Cas9

Nous avons choisi de réaliser nos expériences dans les cellules A549, une lignée cellulaire issue d'adénocarcinome humain. Ces cellules sont utilisées pour les infections sur les virus Influenza humains car elles permettent une bonne réplication des virus et possèdent un système immunitaire inné antiviral considéré comme complet. Afin d'obtenir des cellules A549 dépourvue de la protéine UCP2, nous avons utilisé la technique CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) pour introduire des mutations dans la séquence codante du gène UCP2. Brièvement, les séquences permettant de cibler le premier exon du gène UCP2 dans le génome sont introduites dans le plasmide pSpCas9n(BB)-2A-Puro (don du Dr Feng Zhang, MIT, Boston, USA). Ce plasmide contient les éléments permettant de cibler l'ADN génomique et l'enzyme permettant de couper cet ADN. Il est de plus équipé d'un gène de résistance à la puromycine qui permet de sélectionner les cellules transfectées (car elles deviennent résistantes à cet antibiotique toxique pour les cellules eucaryotes). Trois séquences ciblant l'ADN cellulaire ont été choisies et nous avons donc utilisé trois plasmides pSpCas9n(BB)-2A-Puro ciblant le premier exon du gène UCP2. La sélection à la puromycine permet d'obtenir des clones cellulaires qui sont amplifiés pour obtenir assez de cellules pour réaliser les tests fonctionnels permettant d'évaluer si ces clones sont dépourvus du gène UCP2 fonctionnel.

Les étapes de sélection des séquences génétiques, de clonage et de transfection ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire. J'ai pris en charge l'obtention des cellules mutantes à l'étape d'amplification des clones. J'ai donc étudié le caractère mutant des clones cellulaires sélectionnés par Western Blot et par séquençage de l'ADN (cf protocole en Annexe 1 p.71).

b. Analyse de la réplication virale et de la réponse immunitaire innée

Les cellules ont été infectées avec le virus Influenza PR8 (multiplicité d'infection = 1), ou traitées avec du poly (I:C) complexé à un agent de transfection (analogue d'ARN viral qui va imiter une infection) à des concentrations de 0,1 µg/ml ou 0,5 µg/ml (cf protocole en Annexe 2 p.72). Puis après un temps d'inoculation précis, nous avons lysé les cellules pour en extraire l'ARN. Nous avons fait une RT-qPCR pour savoir s'il y avait une différence de synthèse d'ARNm d'interférons β entre les cellules sauvages

et UCP2 KO. Nous avons normalisé cette quantification avec celle de l'ARNm de l'actine β pour éliminer les effets de fluctuation. Nous avons choisi ce gène de référence car sa quantité ne varie pas en fonction de l'inoculation. L'ARN a été collecté grâce au kit RNeasy mini kit (Qiagen®) et les ARNm interféron β (IFN β) et actine β ont été analysés avec les amorces et sondes préfabriquées du kit Taqman® Gene Expression Assay (AppliedBiosystems®) et le kit RNA-to-Ct 1-step (AppliedBiosystems®) (cf protocole Annexe 3 p.73). Pour chaque échantillon et pour une inoculation donnée, nous avons des duplicats ce qui fait un total de 96 puits. Les analyses statistiques ont été faites grâce au logiciel Prism qui calcule les p-value avec le test de Mann-Whitney.

Enfin, nous avons fait une RT-PCR pour évaluer la réplication virale en quantifiant les ARN viraux intracellulaires pour chaque lignée cellulaire pour voir s'il n'existait pas de différences entre les lignées. Pour ce faire, nous avons réalisé une RT-PCR quantitative avec les amorces M52F et M52R (Fig.18) ciblant le segment M de l'ARN viral en utilisant le kit QuantiTect SYBR probe RT-PCR kit (Qiagen®). Nous avons aussi fait au cours de cette expérience une quantification relative avec le gène actine β (données que nous avons reprise de l'expérience précédente). Nous avons ici aussi des duplicats pour chaque échantillon. De plus, nous avons fait un puits contrôle avec de l'eau. Les statistiques ont été effectuées de la même manière que pour l'expérience précédente.

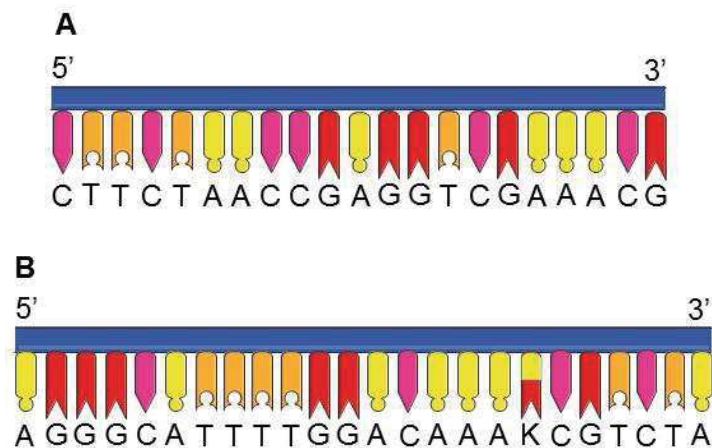


Figure 18 : Amorces M52F (A) et M52R (B)

3. Résultats et interprétation

a. Analyse de l'expression d'UCP2 par Western Blot

Les Western Blots que nous avons faits ne nous ont pas permis d'analyser l'expression d'UCP2. En effet, malgré les nombreuses tentatives et les nombreuses mises au point, les deux anticorps vendus comme capable de détecter UCP2 dans les cellules humaines ne nous ont pas permis d'obtenir un signal spécifique satisfaisant. Nous pensions que le premier anticorps primaire anti-UCP2 que nous avons utilisé n'était pas de bonne qualité car le marquage de la protéine n'était pas présent même sur des cellules contrôles UCP2(+). Ainsi, nous avons acheté un autre anticorps qui n'a pas permis d'avoir de meilleurs résultats. L'utilisation avec succès d'anticorps dirigés contre la tubuline, une protéine cellulaire abondante, nous a permis de vérifier que le problème de détection était bien dû à la mauvaise qualité des anticorps UCP2 ou au niveau d'expression trop faible de la protéine UCP2 dans les cellules A549.

b. Séquençage du gène UCP2 dans l'ADN des clones de cellules transfectées

Puisque les Western Blots n'ont pas permis de sélectionner les clones de cellules dépourvues d'UCP2, nous avons opté pour un séquençage de l'ADN cellulaire ciblé par le plasmide technique de CRISPR/Cas9. La technique de CRISPR/Cas9 permet d'introduire des coupures d'ADN à proximité de la zone ciblée par les séquences introduites dans le plasmide pSpCas9n(BB)-2A-Puro. Il faut néanmoins préciser que les coupures ont un caractère aléatoire et plusieurs cas de figure peuvent se présenter :

- situation 1 : clone cellulaire résistant à la puromycine ne présentant aucune coupure ADN
- situation 2 : clone cellulaire résistant à la puromycine présentant une coupure ADN sur un seul allèle
- situation 3 : clone cellulaire résistant à la puromycine présentant une coupure ADN sur chaque allèle, mais à des endroits différents
- situation 4 : clone cellulaire résistant à la puromycine présentant une coupure ADN au même site sur chaque allèle

Le séquençage ADN par la technique Sanger est réalisé à partir d'amorces encadrant la zone ciblée par les plasmides pSpCas9n(BB)-2A-Puro en utilisant comme matrice l'ADN cellulaire. L'analyse des chromatogrammes est difficile dans les situations 2 et 3 car les coupures à des sites différents sur les deux allèles introduisent des décalages dans les chromatogrammes. La situation 1 et la situation 4 sont faciles à analyser.

Nous avons analysé 20 clones cellulaires et obtenu les différentes situations décrites ci-dessus. Nous avons sélectionné des clones non mutés (situation 1) comme

contrôles et obtenus trois clones dans la situation 4 (cellules UCP2 (-/-)). La séquence d'un clone UCP2 (-/-) est fournie en figure 19. Cette séquence montre la présence d'une délétion au même endroit sur les deux allèles qui va entraîner un décalage de la zone de lecture de l'ADN lors de la transcription et donc une non-expression de la protéine UCP2.

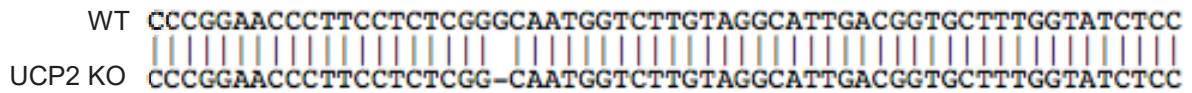


Figure 19 : Comparaison entre la séquence d'ADN codant pour la protéine UCP2 chez les cellules sauvages (WT) et homozygotes UCP2 (-/-) (UCP2 KO)

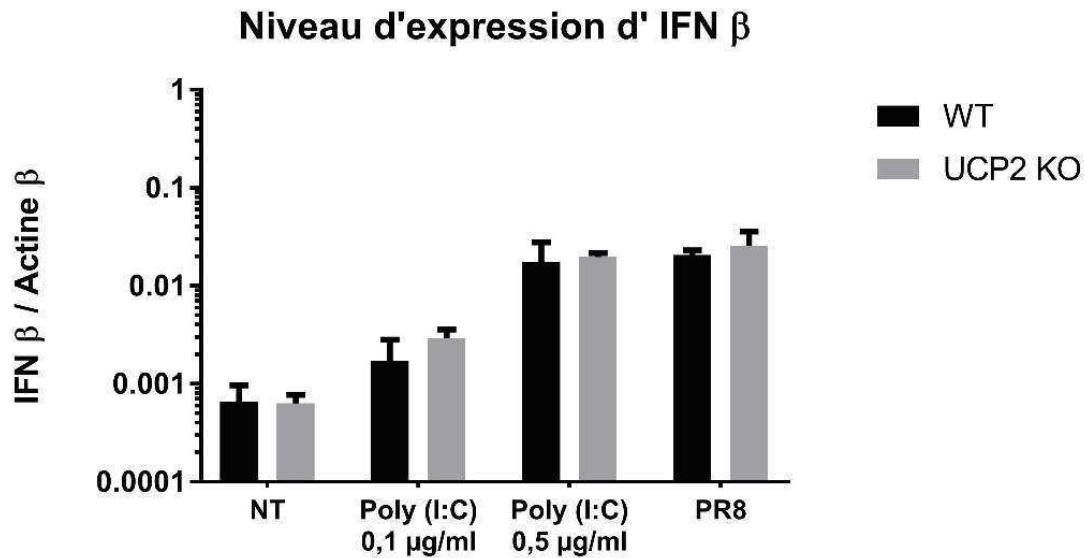
c. RT-qPCR et niveau d'expression d'IFN β

Tableau 2 : Schéma de la plaque pour l'analyse par RT-qPCR. Pas d'inoculation : fond blanc, Poly (I:C) à 0,1 $\mu\text{g/ml}$: fond bleu clair, Poly (I:C) à 0,5 $\mu\text{g/ml}$: fond bleu foncé, PR8 : fond jaune

IFN β	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-08	1420-08	1420-08	1420-08
	1420-08	1420-08	1420-08	1420-08	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18
	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-08	1430-08	1430-08	1430-08
	1430-08	1430-08	1430-08	1430-08	A549	A549	A549	A549	A549	A549	A549	A549
Actine β	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-04	1420-08	1420-08	1420-08	1420-08
	1420-08	1420-08	1420-08	1420-08	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18	1428-18
	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-05	1430-08	1430-08	1430-08	1430-08
	1430-08	1430-08	1430-08	1430-08	A549	A549	A549	A549	A549	A549	A549	A549

Dans le tableau 2, les lignées cellulaires sauvages (situation 1 du séquençage p.40) sont A549, 1420-04 et 1420-08 et les lignées cellulaires UCP2 KO (situation 4 du séquençage p.40) sont 1428-18, 1430-05 et 1430-08.

Les résultats des niveaux d'expression d'IFN β selon la lignée cellulaire et l'inoculation faite sont présentés dans l'histogramme suivant (Graph.1) :

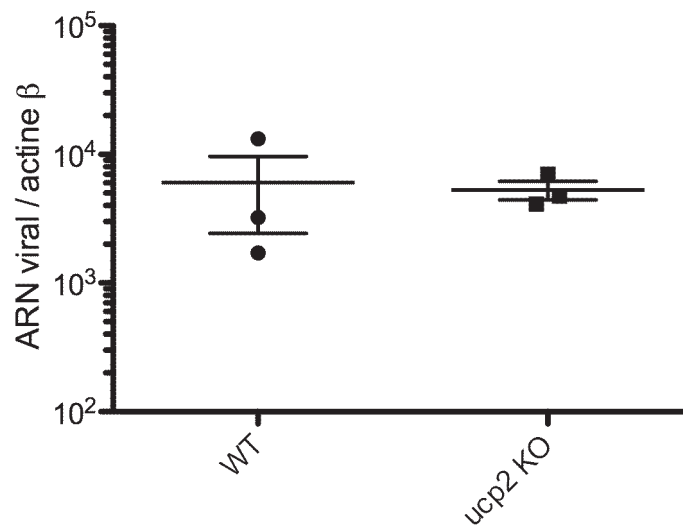


Graphique 1 : Différence de niveau d'expression d'interférons β entre les cellules sauvages (WT) et UCP2 KO en fonction de l'inoculation

On s'aperçoit que, quel que soit le traitement, il n'existe pas de différence significative entre les cellules sauvages ou déficientes en UCP2 ($p=0,88$). Nous pouvons donc conclure que l'expression d'IFN β est la même pour les cellules sauvages et les cellules dépourvues d'UCP2 traitées avec du poly (I:C). Pour l'infection avec le virus PR8, il subsiste tout de même un doute car il faut d'abord vérifier que la réplication virale soit la même pour tous les types de cellules car une réplication différente montrerait que certaines cellules sont plus sensibles à l'infection que d'autres et donc que la production d'interférons ne peut pas être comparable.

d. RT-PCR et réplication virale

La réplication virale dans les deux types de cellules est présentée dans le graphique suivant (Graph.2) :



Graphique 2 : Différence de titre viral entre les cellules sauvages (WT) et UCP2 KO

Ces résultats nous montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre les cellules sauvages et UCP2 KO ($p > 0,99$). La première conclusion est que la réplication virale entre ces deux types de cellules est la même. Cela permet de confirmer notre précédent résultat montrant qu'il n'existe pas de différence de production d'interférons β entre les cellules sauvages et les cellules homozygotes UCP2(-/-). Ainsi, l'absence d'UCP2 ne permet pas une meilleure synthèse de cytokines et ne semble donc pas intervenir sur ce paramètre lors d'infections virales.

4. Discussion

Nous pouvons commencer par critiquer le fait que nous n'avons pas réussi à démontrer par Western Blot que les cellules étaient homozygotes UCP2(-/-). En effet, malgré toutes les tentatives et les modifications du protocole faites, le résultat n'était soit pas interprétable, car le gel n'était pas de bonne qualité, soit pas répétable. L'obligation de résultat n'était pas primordiale pour la suite de cette étude car en effet, nous avons en notre possession le séquençage de l'ADN qui montrait une délétion au niveau de la séquence du gène codant pour UCP2 et donc une absence de synthèse de cette dernière mais les Western Blots auraient pu confirmer tout cela.

Pour ce qui est du reste des expériences, nous pouvons avoir confiance aux résultats obtenus. En effet, dans le protocole permettant d'évaluer le niveau d'expression d'IFN β nous avons trois clones cellulaires différents dans chaque condition, traités en duplicats pour chaque échantillon. En comparant les résultats d'un puits avec son duplicat, nous avons des résultats homogènes pour chaque couple ce qui nous montre alors que la manipulation a été bien réalisée et le protocole bien respecté. Ainsi, l'absence de différence d'expression d'IFN β observée n'est pas due à un biais induit

par le manipulateur. De plus, que ce soit pour les cellules sauvages ou UCP2 KO, nous avons 3 lignées cellulaires différentes ce qui nous confère un grand nombre d'échantillons et donc un pouvoir statistique important. Ce qui est éventuellement critiquable ici, est le fait que pour évaluer la réplication virale, nous avons repris les résultats de l'expression de l'actine β de l'expérience précédente. Ceci a été un choix de notre part car nous utilisons les mêmes échantillons d'ARN pour les deux expériences, il nous a donc paru inutile de refaire la manipulation.

Il aurait été intéressant de mesurer la production de ROS mitochondriaux pour vérifier si la déficience en protéine UCP2 entraîne effectivement une plus grande production de ROS mitochondriaux. Nous avons fait le choix de ne pas faire cette manipulation au vu des résultats que nous avons obtenus sur la production d'IFN β qui est la même dans les 2 types cellulaires. Ainsi, cette absence de résultat rend cette analyse moins importante. Donc au final, même si nous ne pouvons pas formellement conclure sur le rôle des ROS dans l'infection virale, nous pouvons conclure que la protéine UCP2 ne régule pas la réponse immunitaire innée antivirale, ni la réplication du virus Influenza dans les cellules A549. Nous pouvons confronter ce résultat avec les précédentes études qui montrent une meilleure réponse immunitaire contre certaines bactéries (*L. monocytogenes*, *S. typhimurium*) ou certains parasites (*T. gondii*) chez des souris dépourvues d'UCP2. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'UCP2 serait simplement importante lors de l'immunité innée antibactérienne ou antiparasitaire. En effet, il a été montré que chez des souris dépourvues d'UCP2 alors le taux de survie était le même que chez des souris sauvages lorsque ces souris sont infectées avec un herpesvirus (HSV-1) (Rouger et al. 2011). UCP2 augmenterait donc la production de ROS et ces derniers seraient parasitocides et bactéricides à forte dose et n'auraient pas d'effets bénéfiques contre les virus.

II. Etude 2 : évaluation des conséquences du traitement à la metformine chez des souris infectées par le virus Influenza

1. Utilisation thérapeutique de la metformine

a. Une molécule très utilisée en médecine humaine

La metformine fait partie de la famille des biguanides, elle est utilisée en médecine humaine dans la prise en charge du diabète de type II. Cette molécule ne stimule pas la sécrétion d'insuline donc ne provoque pas d'hypoglycémie. Elle agit en réduisant la production de glucose dans le foie, en augmentant la sensibilité de l'insuline au niveau musculaire et en retardant l'absorption intestinale du glucose (VIDAL France). Tous ces effets sont dus à l'activation de l'AMPK par la metformine (Fig.20) (Zhou et al. 2001).

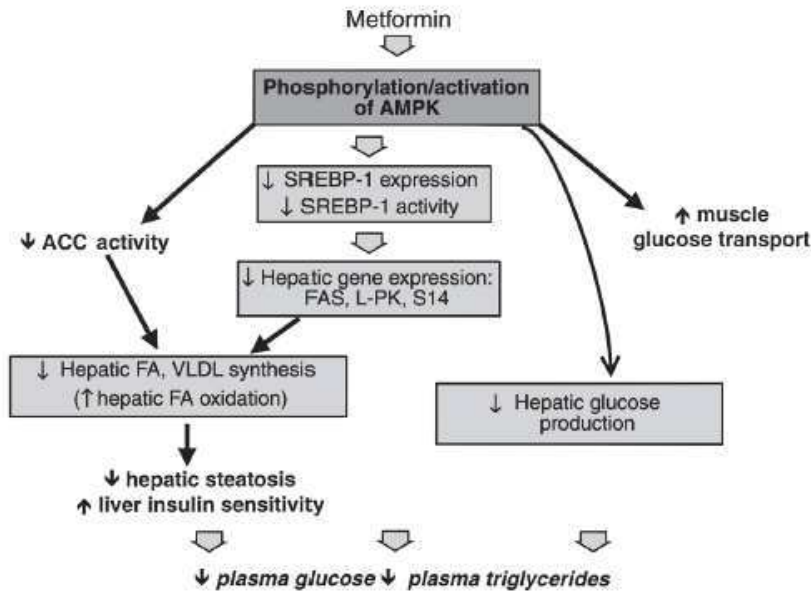


Figure 20 : Modèle du mécanisme de la metformine sur le métabolisme du glucose et des lipides (Zhou et al. 2001)

Cette molécule est utilisée en première intention en médecine humaine lorsque le patient est atteint d'un diabète de type II. Cela signifie donc que cette molécule est utilisée très fréquemment et elle peut donc passer des tests cliniques facilement si elle se révélait utile dans d'autres situations.

b. Activité anti-inflammatoire de la metformine

La metformine diminue la production de ROS mitochondriaux (Ouslimani et al. 2005). Cette diminution est due au fait que la metformine va agir au niveau du complexe I de la CRM en inhibant le flux inverse d'électrons (RET) (Batandier et al. 2006). Cette inhibition n'est pas directe mais il existerait une voie de signalisation qui serait rapide et qui empêcherait donc la production de ROS par le complexe I (El-Mir et al. 2000, Doran et al. 2000). De plus, la metformine chélaterait directement les molécules possédant des groupes hydroxyles donc certains ROS (Bonfont-Rousselot et al. 2003).

Lorsque les macrophages sont stimulés par des LPS, la metformine entraîne une diminution de la production de ROS et d'un précurseur de l'interleukine 1 β (IL-1 β), et une augmentation de la production d'IL-10 ce qui confère donc une autre activité anti-inflammatoire à cette molécule (Kelly et al. 2015). De plus, la metformine va aussi inhiber l'activation du facteur nucléaire NF- κ B qui est essentiel pour la production de certaines cytokines. Celles-ci étant moins produites, l'inflammation s'en trouve diminuée (Isoda 2005). Enfin, cette même molécule inhibe l'expression de l'ARN_m codant pour TNF α et de la protéine COX2 lors d'otites moyennes chez l'Homme (Cho et al. 2016).

c. Une molécule miracle contre le virus Influenza ?

En 1950, une étude a été réalisée aux Philippines sur 30 patients humains atteints de grippe (Garcia 1950). Sur les 30 sujets, 10 présentaient seulement une forme fébrile de la maladie avec des maux de tête modérés, 10 étaient atteints d'une forme décrite comme cérébrale par l'auteur et 10 d'une forme décrite comme chronique. Ces 20 derniers sujets avaient des maux de tête plus importants que les 10 premiers. 20 de ces patients étaient suspectés d'avoir la Malaria ou la fièvre typhoïde et non une grippe, donc des analyses ont été faites et sont revenues en faveur d'une infection par le virus Influenza, possiblement associée à une autre pathologie. Les 30 patients ont reçu par injection intramusculaire de la metformine et les auteurs suivaient l'évolution des symptômes et en particulier des maux de tête (Garcia 1950). Les résultats qu'ils ont obtenus sont présentés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Résultats obtenus par Garcia en 1950

Forme de la maladie	Disparition des maux de tête	Guérison complète
Forme fébrile	12 minutes en moyenne après 1 injection	15 à 20 heures après 1 injection
Formes chronique et cérébrale	15 minutes en moyenne après 1 injection	36 à 40 heures après 2 injections à 18h d'intervalle

Les résultats présentés ci-dessus montrent que la metformine serait un remède particulièrement efficace contre le virus Influenza.

Le Dr Garcia avait noté que les patients traités à la metformine présentaient une légère baisse de la glycémie. Cette observation n'est pas passée inaperçue aux yeux du Professeur Jean Sterne, diabétologue à Paris, qui suite à cette lecture a été le premier à émettre l'idée d'utiliser la metformine dans le traitement du diabète de type II et a lancé les essais cliniques.

2. Etude de l'effet de la metformine sur l'infection de souris par le virus Influenza

Lors d'infections sévères par le virus Influenza, la mortalité est en très grande partie due aux dégâts causés au niveau pulmonaire par l'inflammation et ses acteurs (Imai et al. 2008) et notamment ceux causés par les phospholipides oxydés (Fruhirth, Loidl, Hermetter 2007). La grande majorité des effets immunopathologiques observés lors d'infection sévère par les virus Influenza est due au recrutement des cellules inflammatoires (macrophages principalement) qui vont produire une grande quantité de ROS et de cytokines pro-inflammatoires. Ces observations fournissent des

arguments solides pour évaluer expérimentalement le bénéfice de traitements immunomodulateurs lors d'infections par les virus Influenza (Ramos, Fernandez-Sesma 2015; Short et al. 2014; Opal, Fedson 2014).

Dans la première étude sur UCP2, nous voulions augmenter la production de ROS mitochondriaux dans les cellules épithéliales qui sont les cibles principales du virus Influenza *in vivo* afin d'augmenter la signalisation antivirale dans les cellules cibles du virus. L'objectif de cette deuxième étude était de diminuer l'immunopathologie associée à l'infection par le virus Influenza en utilisant la metformine. Nous avons émis l'hypothèse que les effets protecteurs de la metformine impliqueraient majoritairement les cellules immunitaires recrutées au site de l'infection et non pas les cellules épithéliales infectées. Notre hypothèse était que la metformine permettrait de diminuer la production de ROS dans les cellules immunitaires recrutées au site d'infection et donc de diminuer l'immunopathologie et les symptômes de cette infection.

Sur la base des propriétés anti-inflammatoires de la metformine, et encouragés par les résultats publiés en 1950 par le Dr Garcia, nous avons élaboré un protocole expérimental permettant d'évaluer les conséquences d'un traitement à la metformine sur l'évolution de la maladie due au virus Influenza. Il est nécessaire d'évaluer les effets de la metformine *in vivo*, dans un modèle animal permettant de faire interagir les cellules épithéliales cibles de l'infection et les cellules immunitaires recrutées au site d'infection.

a. Protocole expérimental

i. Infection des souris

Pour étudier l'effet de la metformine lors d'infection par le virus Influenza, nous avons infecté des souris avec le virus Influenza PR8. Ces dernières sont des souris exemptes d'agents pathogènes spécifiques de la lignée C57BL/6JRj. Nous avons choisi ces souris et ce virus car ce sont les plus fréquemment utilisés dans l'étude de molécules antivirales et d'analyses immunologiques. De plus, nous connaissions préalablement la DL_{50} de ce virus sur cette lignée de souris qui est de 4200 pfu. Nous avons ensuite infecté les souris avec une dose de virus égale à deux fois la DL_{50} soit 8400 pfu. Nous considérons dans cette expérience que J0 est le jour de l'infection. Avant d'infecter les souris, nous les avons anesthésiées avec un mélange de PBS, xylazine et kétamine (injection en IM au niveau de la cuisse). Puis, une fois qu'elles étaient bien endormies, nous les avons infectées en intra-nasal avec une solution contenant 8400 pfu de virus (30 μ L par souris). Il fallait une bonne anesthésie car les souris peuvent rejeter la solution d'infection en éternuant.

ii. Echantillonnage des souris

Les souris ont ensuite été séparées en 3 groupes de 10 : un groupe non traité, un traité à partir de J0 et le dernier traité à partir de J2. Puis chaque groupe était séparé en 2 groupes de 5 souris car les souris vivaient dans des cages ne pouvant pas accueillir 10 souris. Ainsi, nous avons 6 cages de 5 souris et l'on a identifié les souris en colorant leur queue avec des marqueurs : blanc (souris sans marquage), bleu, noir, vert et rouge. Les cages des souris étaient nettoyées une fois par semaine par un animalier et la nourriture changée à la même fréquence. Les cages étaient numérotées de 1 à 6 selon le schéma suivant :

- Cage 1 et 2 : Non traité (NT)
- Cage 3 et 4 : Traité à partir de J0 (T J0)
- Cage 5 et 6 : Traité à partir de J2 (T J2)

iii. Traitement mis en place

Nous avons fait le choix de traiter les souris via l'eau de boisson car la metformine est stable et administrée actuellement chez l'homme par voie orale. Nous possédions de la metformine à 95% pure sous forme de poudre qu'il fallait seulement dissoudre dans l'eau pour la remettre en solution. Cette dernière était mise dans un biberon et changée tous les 2 jours. Cette solution était à une concentration de 5 mg/ml de metformine. Cette concentration a été calculée à partir de la quantité d'eau moyenne bue par souris (6 ml par jour) et aussi par le fait que nous avons voulu avoir une dose importante de metformine par souris pour être sûr qu'elles soient bien traitées. Les souris pesant en moyenne au jour de l'infection 17,6 grammes, nous avons donc une dose moyenne par souris de 395 mg/kg sachant que la dose maximale utilisée en humaine pour le traitement du diabète de type II est de 3000 mg par jour (soit pour un homme de 60 kg, 50 mg/kg de metformine), cette dose pouvant varier de 500 à 3000 mg (VIDAL France). Pour vérifier qu'il n'existait pas de différence de prise de boisson entre les différentes cages, nous pesions les biberons d'eau à chaque changement de solution à boire, soit tous les 2 jours. Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé le test de Student bilatéral pour chaque jour de l'expérience.

iv. Suivi clinique

Enfin, nous avons suivi le poids des souris quotidiennement car la perte de poids est un indicateur quantitatif de l'intensité des signes cliniques chez la souris. Pour des raisons éthiques, les souris étaient euthanasiées lorsqu'elles perdaient 30% de leur poids initial et nous prélevions du sang sur certaines d'entre elles. Ceci nous a donc permis de faire des courbes de survie.

De plus, nous avons aussi établi un score clinique sur une échelle de 0 à 3 avec :

- 0 : souris non malade
- 1 : souris légèrement malade
- 2 : souris sévèrement malade
- 3 : souris morte

Nous faisons la différence entre ces 4 paliers selon la vitalité de la souris et l'apparition de symptômes tels que le dos voussé, le poil piqué et la présence de difficultés respiratoires.

Les analyses statistiques ont été faites grâce au logiciel Prism. Pour les courbes de survie, nous avons utilisé le test du logrank et pour les scores cliniques, le test de Student bilatéral en comparant les valeurs jour par jour.

A la fin de l'expérience qui a duré 17 jours, nous avons euthanasié les souris et nous avons prélevé du sang sur certaines d'entre elles.

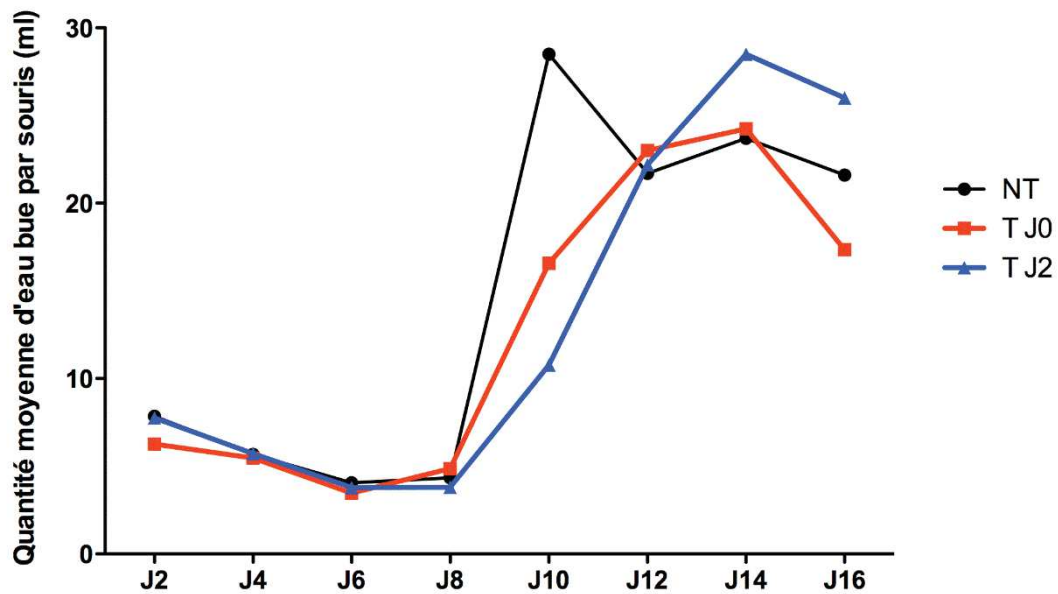
v. Test d'inhibition d'hémagglutination

Avec les différents prélèvements de sang que nous avons faits, nous avons réalisé un test d'inhibition d'hémagglutination pour vérifier que les souris avaient développé une réponse sérologique et étaient donc bien infectées (cf protocole annexe 4 p.74). Nous avons tout d'abord déterminé le titre d'hémagglutination du virus PR8 utilisé au cours de cette étude. Pour ce faire, dans une plaque 92 puits, nous avons mis dans les 4 premières lignes 50 μ L de PBS + 50 μ L de virus dilué par 2 et dans les 4 dernières lignes 100 μ L de PBS pour un contrôle négatif.

b. Résultats

i. Quantité moyenne d'eau bue par souris

Le graphique 3 montre la quantité moyenne d'eau bue par souris en fonction du traitement :



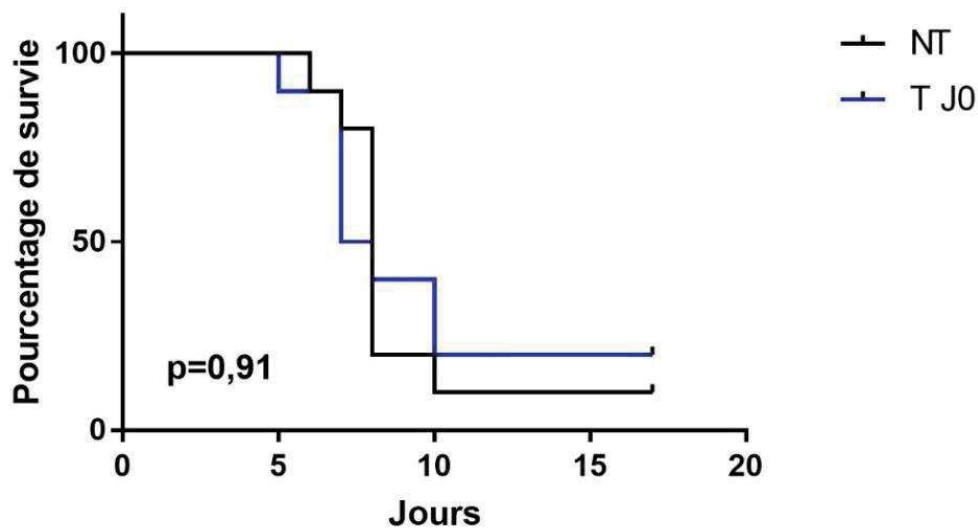
Graphique 3 : Quantité moyenne d'eau bue par souris en fonction du temps et du traitement

On observe une augmentation de la quantité d'eau bue à partir de J8. Cela est dû à un effet perte au niveau du goulot lorsque l'on enlevait le biberon de la cage. Cet effet perte est donc minimisé dans les premiers jours car il est réparti sur un plus grand nombre de souris (le taux de mortalité étant de 0% au départ) et lorsque ce taux de mortalité est très important alors l'effet perte n'est plus négligeable et permettrait d'expliquer cette divergence des courbes car l'axe des ordonnées reflète l'effet perte ajoutée à la quantité d'eau réellement bue. L'analyse de la quantité d'eau bue est donc difficilement interprétable après J8.

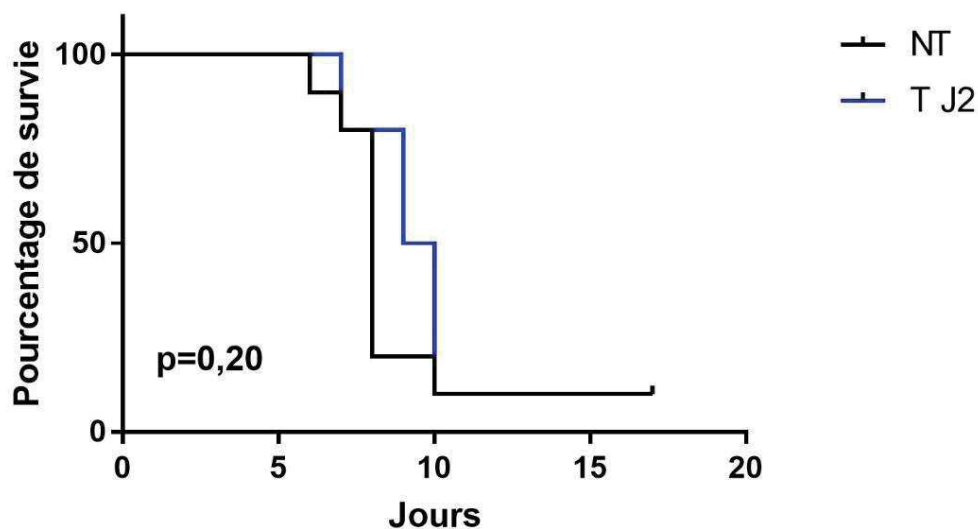
L'analyse statistique du test de Student nous a montré qu'il n'existe pas de différences significatives entre ces 3 courbes tout au long de l'expérience et donc que l'observance du traitement est bonne pour les souris traitées.

ii. Survie des souris

Le suivi quotidien du poids des souris (cf annexe 5 p.75) nous a permis d'obtenir des courbes de survie entre les différents groupes (Graph.4 et 5) :



Graphique 4 : Courbes de survie des groupes non traité (NT) et traité à partir de J0 (T J0)

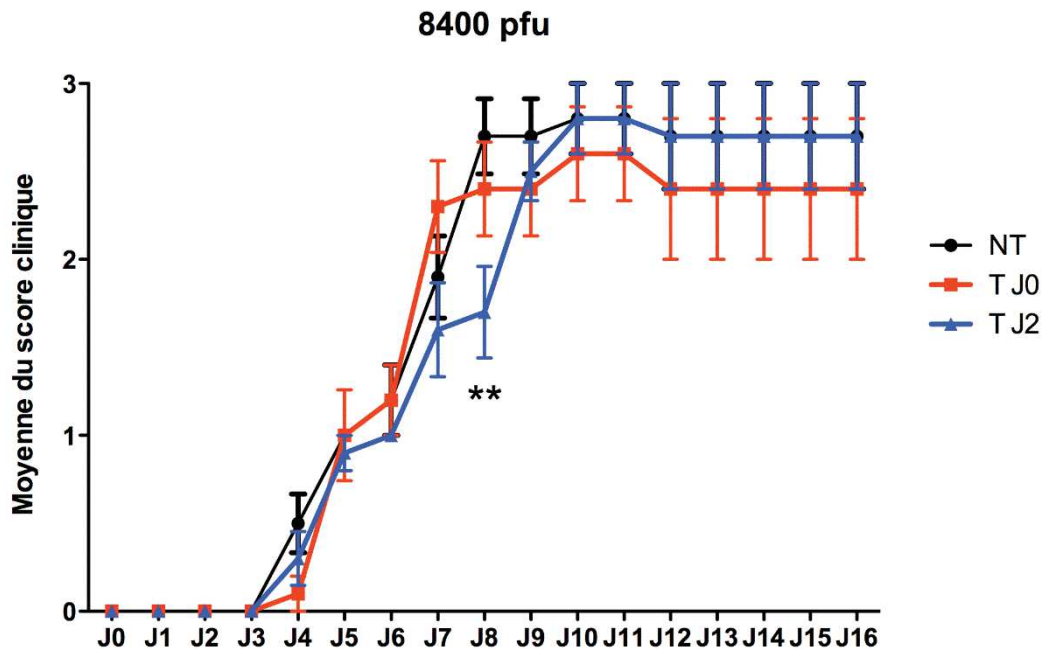


Graphique 5 : Courbes de survie des groupes non traité (NT) et traité à partir de J2 (T J2)

Ces deux résultats nous montrent qu'il n'existe pas de différences significatives de survie entre les souris non traitées et les souris traitées à partir de J0 ou à partir de J2 (cf p-value sur les graphiques 4 et 5 respectivement). Malgré cela, on peut voir une tendance pour les souris traitées à J2. En effet, on s'aperçoit qu'elles meurent légèrement plus tard que les souris non traitées tout en ayant au final un taux de survie similaire.

iii. Score clinique

Les résultats des scores cliniques moyens sont présentés dans le graphique 6, les barres d'erreur représentant l'écart-type à la moyenne :



Graphique 6 : Score clinique moyen des souris en fonction du temps et du traitement

Le test de Student montre qu'il existe une différence significative au huitième jour de l'expérience entre les souris non traitées et traitées à partir de J2 ($p=0,008$). Les autres jours, nous n'observons pas une telle différence. Nous ne pouvons donc rien conclure malgré cette analyse statistique car il aurait fallu que cette tendance continue à s'observer tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience ce qui n'est pas le cas.

iv. Test d'inhibition d'hémagglutination

Pour le premier test permettant de déterminer le titre d'hémagglutination du virus PR8, nous avons trouvé un titre de 256 pour ce virus.

Les résultats pour les échantillons de sérum des souris que nous avons prélevées sont dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Résultats du test d'inhibition d'hémagglutination

	Echantillon	Lignes	Colonne d'inhibition	Titre d'hémagglutination
Plaque 1	Cage 1 Rouge	A	5	90
		B	6	
	Cage 1 Blanc	C	6	256
		D	6	
	Cage 2 Blanc	E	6	362
		F	7	
	Cage 3 Blanc	G	8	512
		H	8	
Plaque 2	Cage 4 Vert	A	9	724
		B	8	
	Cage 5 Bleu	C	9	1448
		D	10	
	Cage 5 Blanc	E	9	1024
		F	9	
	Cheval	G	3	16
		H	3	
Plaque 3	PBS	A	0	0
	Virus PR8	B	8	256
		C	8	

On remarque que pour la souris rouge de la cage 1, nous avons un titre faible en anticorps dirigés contre le virus. Les autres souris quant à elles, ont un titre en anticorps convenable. L'infection a donc induit une réponse sérologique détectable chez toutes les souris testées.

c. Discussion

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la dose de virus utilisée lors de l'infection est très importante (2 fois la DL_{50} pour rappel). Nous avons fait ce choix car nous voulions que l'inflammation causée par l'infection soit importante. En effet, la metformine agissant au niveau du processus inflammatoire en limitant ce dernier, nous avons voulu que ce processus soit très important pour voir d'éventuels effets de cette molécule. Notre hypothèse était que plus l'inflammation serait importante, plus on augmenterait le potentiel thérapeutique de la metformine

Ensuite, nous avons fait le choix de commencer les traitements à J0 et J2 car nous ne savions pas s'il fallait directement débiter le traitement à J0 pour contre-attaquer l'inflammation dès le début ou s'il fallait attendre un peu pour que l'inflammation se mette en place et que la metformine puisse agir sur celle-ci lorsqu'elle devenait

pathologique. Nous avons donc mis en place ce protocole pour étudier ces deux possibilités et pour optimiser le traitement pour d'éventuelles études ultérieures.

La quantité d'eau bue par souris n'est qu'une quantité moyenne et on ne peut donc pas réellement savoir si toutes les souris buvaient le même volume. De plus, les résultats obtenus ne reflètent pas réellement la quantité bue par les souris du fait de l'effet perte. Il aurait été bien de quantifier ces pertes mais cela est très compliqué car ces dernières dépendent de beaucoup de paramètres. Nous avons donc fait l'hypothèse que ces pertes étaient identiques à toutes les cages ce qui nous a permis malgré tout d'interpréter les résultats obtenus.

On peut remarquer dans l'annexe 5 (p.75) que certaines souris n'ont pas perdu beaucoup de poids en particulier la souris rouge de la cage 1. C'est pour cette raison que nous avons fait le test d'inhibition d'hémagglutination pour vérifier la bonne infection des souris sur lesquelles nous avons un doute et les écarter de nos analyses si ces dernières n'étaient pas infectées. Les résultats de l'hémagglutination ont montré un titre anticorps faible mais considéré comme positif pour la souris 1 rouge (cf Tableau 4 p.53). Nous en avons conclu que nous ne pouvions pas écarter cette souris de nos analyses car elle a été bien infectée (cf annexe 5 p.75).

Sur les courbes de survie (Graph.4 et 5 p.51) une légère tendance suggérant un effet bénéfique de la metformine est à noter pour les souris traitées à partir de J2. Nous nous sommes donc demandé si notre échantillonnage n'était pas trop petit ce qui diminuerait notre pouvoir statistique. De plus, vu le taux de survie final que nous obtenions (10% pour les NT et les T J2 et 20% pour les T J0), nous nous sommes interrogé sur la dose de virus que nous avons utilisé lors de l'infection, celle-ci étant peut-être trop importante pour observer des effets du traitement car elle entraînerait la mort rapide et inévitable des souris.

d. Conclusion

Nous avons décidé, suite à cette expérience, d'en réaliser une nouvelle avec 3 doses différentes de virus pour vérifier si notre première dose était effectivement trop importante et pour augmenter notre pouvoir statistique en augmentant le nombre de souris infectées avec la dose utilisée précédemment.

3. Etude de l'effet de la metformine pour des doses différentes en virus

a. Protocole expérimental

Nous avons repris le même protocole expérimental qu'à l'expérience précédente et les statistiques ont été calculées de la même manière. Nous allons détailler dans les parties suivantes seulement les changements apportés.

i. Infection des souris

Nous avons utilisé ici 3 doses de virus pour infecter les souris :

- 10 souris infectées avec une dose de 8400 pfu (soit 2 fois la DL₅₀)
- 30 souris infectées avec une dose de 4200 pfu (soit la DL₅₀)
- 20 souris infectées avec une dose de 2100 pfu (soit la DL₅₀/2)

ii. Echantillonnage des souris

Nous avons en termes de répartition des souris :

- 8400 pfu :
 - o Non traitées : cage 1
 - o Traitées : cage 2
- 4200 pfu :
 - o Non traitées : cages 3, 5 et 7
 - o Traitées : cages 4, 6 et 8
- 2100 pfu :
 - o Non traitées : cages 9 et 11
 - o Traitées : cages 10 et 12

Nous avons choisi seulement 10 souris avec la dose de 8400 pfu car nous allons intégrer ces nouveaux résultats avec ceux de l'expérience précédente réalisée avec la même quantité de virus.

iii. Traitement

Au vu de la tendance que nous avons remarquée à l'expérience précédente, nous avons mis en place le traitement à partir de J2.

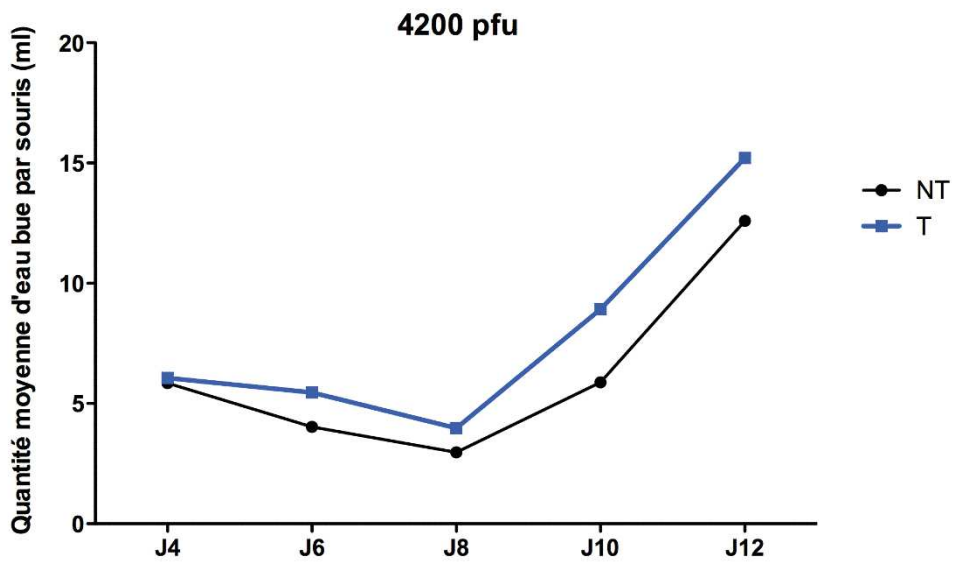
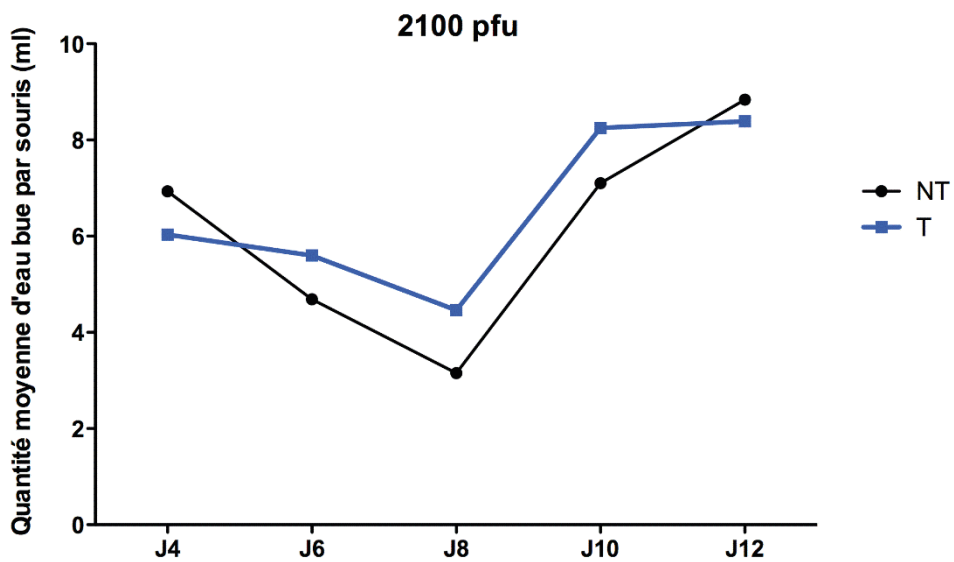
iv. Suivi clinique

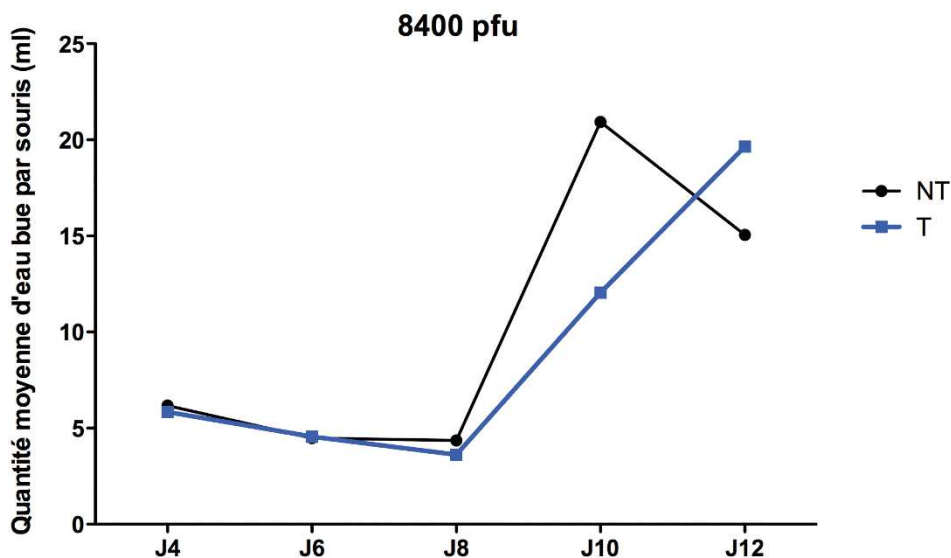
Le suivi clinique n'a duré ici que 14 jours au lieu de 17 jours précédemment. L'analyse statistique du suivi de poids a été effectuée avec le test de Student bilatéral en comparant jour par jour.

b. Résultats

i. Quantité moyenne d'eau bue par souris

Les graphiques suivants présentent la quantité moyenne d'eau bue par souris :



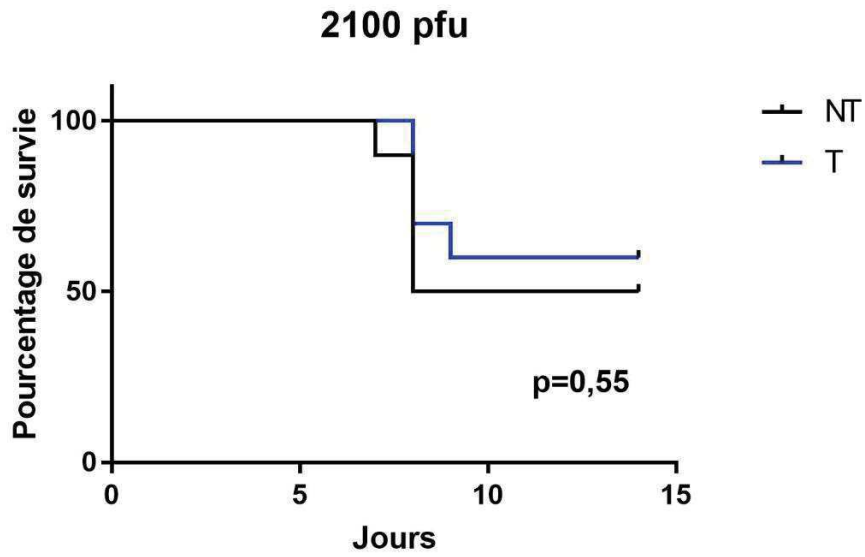


Graphique 7 : Quantité moyenne d'eau bue par souris en fonction du temps pour les souris infectées avec une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu

L'analyse statistique nous montre qu'il n'existe pas de différence significative de prise de boisson entre les souris traitées et non traitées quelle que soit la dose de virus utilisée.

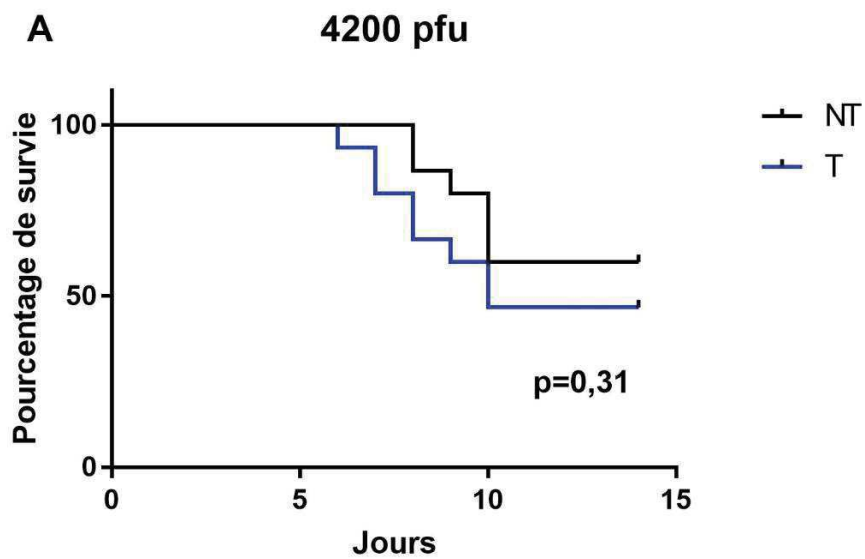
ii. Survie des souris

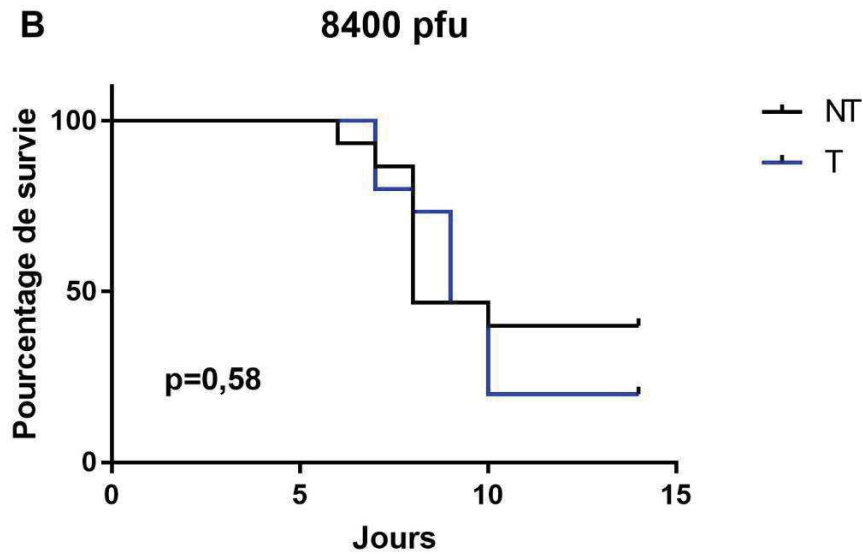
Pour les souris infectées avec une dose de 2100 pfu, aucune des souris n'a atteint 70% de son poids initial donc nous avons, que ce soit pour les souris traitées ou non traitées, une survie de 100%. Pour voir s'il pouvait exister un effet de traitement avec cette dose, nous avons donc tracé la courbe de survie pour un seuil de 75% du poids initial que certaines souris ont dépassé (souris donc considérées comme mortes si elles dépassent ce seuil). Ce résultat est présenté dans le graphique 8 :



Graphique 8 : Courbes de survie des souris non traitées et traitées, infectées avec une dose de virus de 2100 pfu

Pour les autres doses, nous avons pu tracer les courbes de survie pour un seuil de 70% du poids initial comme le montre la série de graphiques suivante :





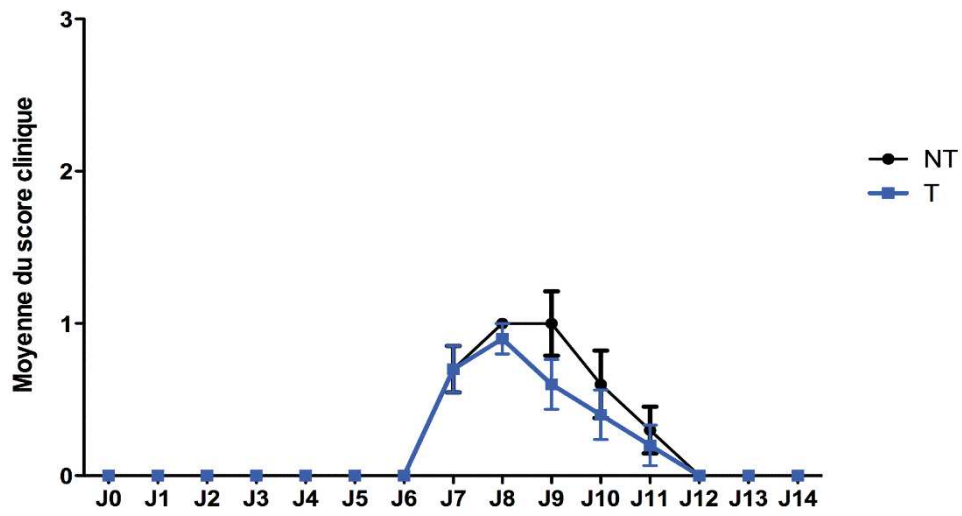
Graphique 9 : Courbes de survie des souris non traitées et traitées, infectées avec une dose de virus de 4200 pfu (A) et 8400 pfu (B)

On peut noter ici qu'il n'existe pas de différences significatives (cf p-value sur les graphiques 8 et 9) quelle que soit la dose utilisée pour l'infection des souris. Nous pouvons remarquer certaines tendances. En effet, le taux de survie final des souris traitées est plus bas pour les doses de 8400 et 4200 pfu. De plus, pour cette dernière dose, les souris traitées sont euthanasiées généralement plus tôt que les non traitées.

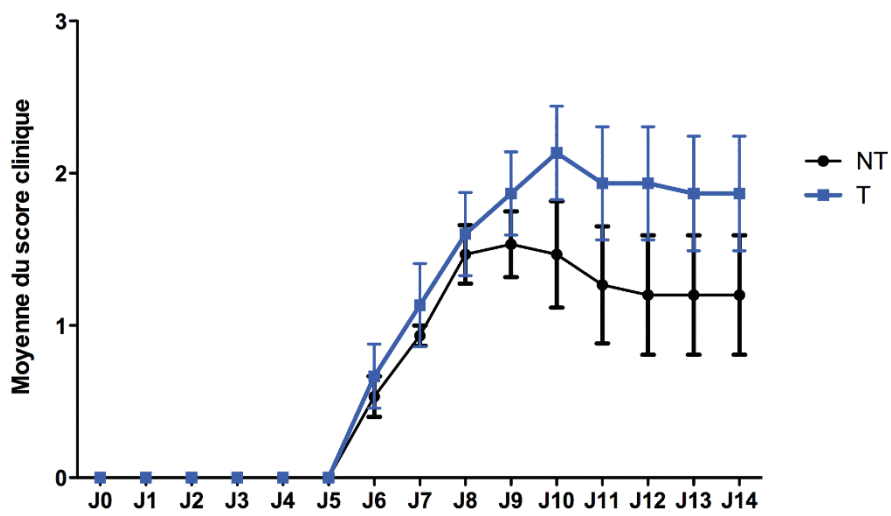
iii. Score clinique

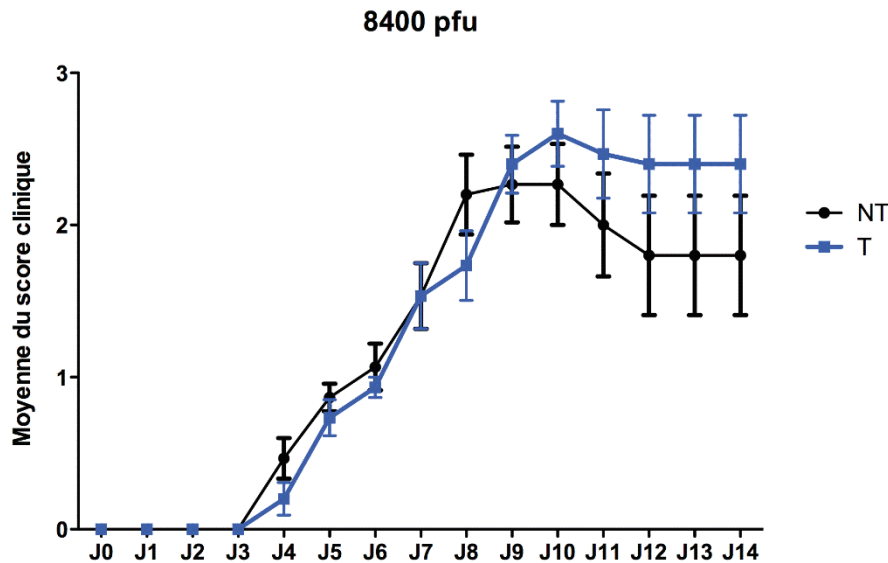
Le graphique 10 montre les scores cliniques moyens des souris en fonction du temps, les barres d'erreur représentant l'écart-type à la moyenne :

2100 pfu



4200 pfu





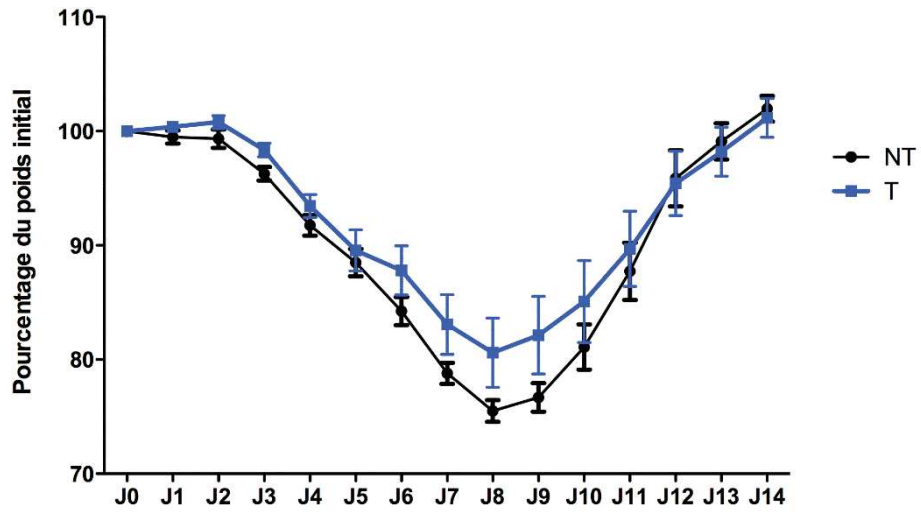
Graphique 10 : Moyenne du score clinique des souris en fonction du temps pour une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu

L'analyse statistique ne montre pas de différences significatives pour les 3 doses. On remarque par contre un score clinique moyen faible pour les souris infectées avec une dose de 2100 pfu par rapport aux deux autres doses. Pour les deux autres doses, nous avons la même tendance que pour les courbes de survie : les souris traitées ont un score clinique légèrement plus élevé que les non traitées.

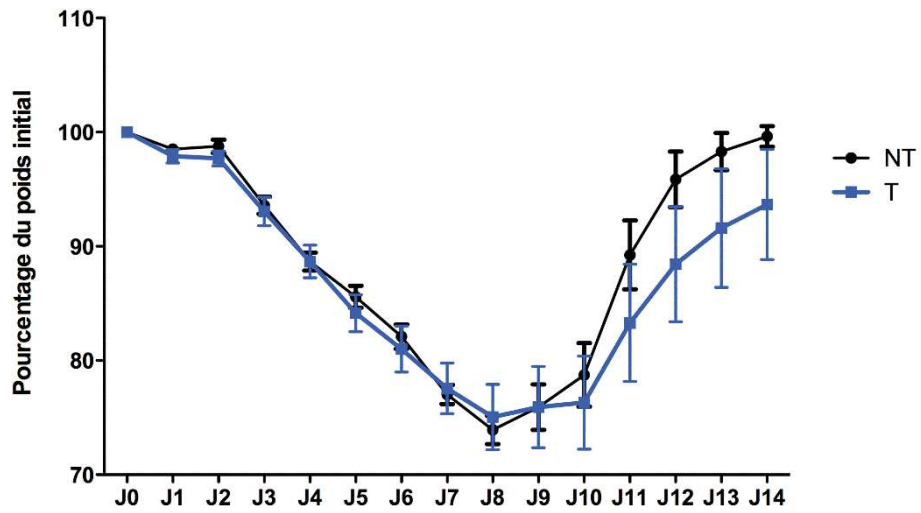
iv. Poids des souris

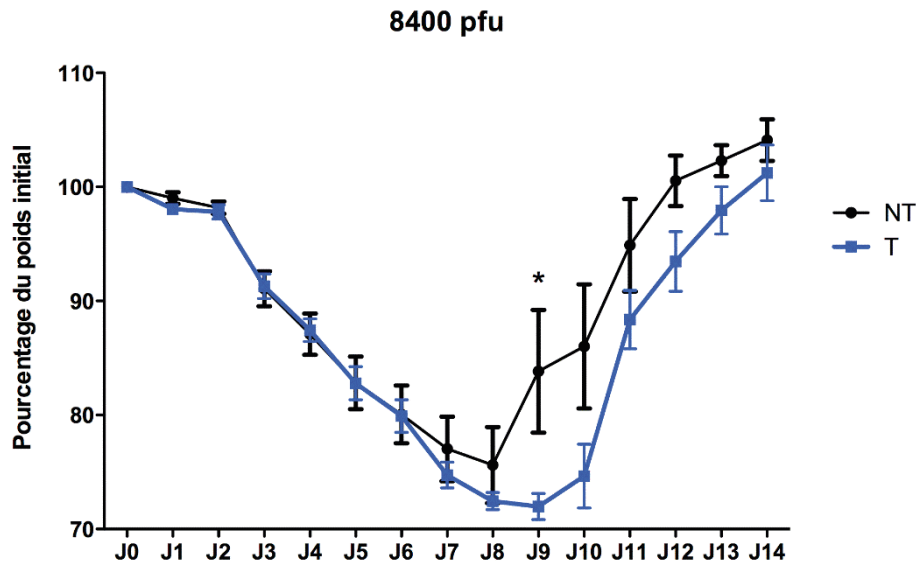
Le graphique 11 montre le poids moyen des souris aux différents jours post-infection, les barres d'erreur représentant l'écart-type à la moyenne :

2100 pfu



4200 pfu





Graphique 11 : Moyenne du pourcentage du poids initial des souris en fonction du temps pour une dose de virus de 2100 pfu, 4200 pfu et 8400 pfu

L'analyse statistique ne montre pas de différences significatives pour les doses de 2100 et 4200 pfu. Par contre, pour la dose de 8400 pfu, au neuvième jour post-infection, une différence significative est observée ($p=0,02$) qui montre qu'à ce jour précis, les souris traitées ont un poids plus faible que les souris non traitées. La metformine entraînerait donc une perte de poids plus importante et donc une moins bonne évolution clinique.

c. Discussion

La tendance que nous avons observée lors de notre première étude n'est pas répétable. Au contraire, nous avons observé que les souris traitées meurent légèrement plus tôt, possèdent un score clinique plus élevé et sont plus légères (différences non statistiquement significatives) pour les doses de 4200 et 8400 pfu. On peut donc se demander si la metformine n'est pas plutôt néfaste lors d'infection par le virus Influenza. La metformine engendre une production de ROS moindre, donc potentiellement moins d'immunopathologie lors de l'infection. Mais les ROS permettent aussi de lutter contre les agents pathogènes directement et en tant que messagers secondaires en favorisant la synthèse de cytokines. Dans le cas de l'infection par le virus Influenza, le rôle bénéfique des ROS est peut-être plus important que les dommages qu'ils peuvent créer.

Après cette deuxième expérience, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'étude. Le bilan de ces expériences montre que la metformine n'a pas d'effet lors d'infection par le virus Influenza chez la souris. Il subsiste une interrogation sur un éventuel effet délétère de la metformine suggéré par nos résultats, possiblement à cause de ses

effets limitant la réponse immunitaire innée. Il pourrait être intéressant de poursuivre ces études pour comprendre dans quelle mesure le traitement à la metformine pourrait contribuer à augmenter la gravité des infections aux virus Influenza observée chez les patients diabétiques. Dans tous les cas, nos résultats démontrent que la metformine n'est pas une molécule au potentiel thérapeutique contre les infections à virus Influenza A, comme le montrait l'étude de Garcia de 1950. Il convient de s'interroger sur la robustesse de cette étude basée seulement sur des observations cliniques très subjectives. En effet, les patients notaient seulement la disparition des maux de tête mais nous n'avons ni suivi clinique ni éléments objectifs pour vérifier cette disparition. Pour ce qui est de la guérison, cela est basé simplement sur l'état clinique des patients et non sur l'élimination totale du virus dans l'organisme. Toutefois, on ne peut pas exclure que les effets de la metformine ne soient observables que chez l'homme. Cette réponse ne sera disponible que si des études épidémiologiques comparant la sévérité de l'infection par les virus Influenza dans des cohortes de patients traitées ou non à la metformine sont réalisées. A ce jour, nous n'avons trouvé aucune étude répondant à cette question.

Conclusion

Les ROS jouent un double rôle dans l'organisme. D'un côté, ils peuvent être néfastes en causant des dommages aux cellules pouvant entraîner leur mort lorsqu'ils sont produits en grande quantité et en favorisant le développement de certains agents pathogènes. De l'autre, les ROS contribuent à la destruction des agents pathogènes notamment dans le phagosome et ils stimulent la synthèse de cytokines. Des études récentes ont en effet révélé que les ROS peuvent agir comme messagers secondaires au cours de la réponse immunitaire innée. Les voies de signalisation et les mécanismes par lesquels les ROS modulent la réponse immunitaire innée restent encore très mal connus. Beaucoup d'études sont encore à mener dans ce domaine pour résoudre toutes ces zones d'ombre.

Dans notre première étude, nous avons voulu montrer le rôle que peuvent avoir ces ROS dans l'immunité antivirale, rôle qui est encore peu connu. Nous avons donc créé des cellules homozygotes déficientes en UCP2, car UCP2 est connue pour minimiser la production de ROS mitochondriaux. Suite à l'infection avec un virus Influenza, nous n'avons pas observé de production augmentée d'interférons β dans les cellules dépourvues d'UCP2 et nous n'avons observé aucune différence au niveau de la réplication virale. Nos résultats montrent que UCP2 ne module pas la réponse immunitaire innée antivirale contre le virus Influenza. Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de la production de ROS mitochondriaux n'est pas un régulateur clé de la réponse immunitaire innée dans les cellules cibles du virus Influenza.

Dans notre seconde étude, nous avons voulu contrecarrer les effets néfastes que peuvent créer les ROS lors du phénomène inflammatoire après une infection par le virus Influenza en utilisant la metformine, médicament utilisé couramment chez l'Homme dans le traitement contre le diabète de type II et qui a récemment été montré comme capable de diminuer la production de ROS dans les macrophages. Dans cette étude aussi, nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés et au contraire, nous aurions une tendance qui montrerait que la metformine rend les souris plus malades et donc exacerberait les effets inflammatoires dus à l'infection.

Bibliographie

AKAIKE T, NOGUCHI Y, IJIRI S, SETOGUCHI K, SUGA M, ZHENG Y, DIETZSCHOLD B et MAEDA H (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia : involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, n° 6, 2448–2453.

ALLEN I, SCULL M, MOORE C, HOLL E, MCELVANIA-TEKIPPE E, TAXMAN D, GUTHRIE E, PICKLES R et TING J (2009). The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*, **30**, n° 4, 556-565.

ARNOULT D, SOARES F, TATTOLI I et GIRARDIN S (2011). Mitochondria in innate immunity. *EMBO reports*, **12**, n° 9, 901-910.

ARSENIJEVIC D, ONUMA H, PECQUEUR C, RAIMBAULT S, MANNING B.S, MIROUX B, COUPLAN E, ALVES-GUERRA M.C, GOUBERN M, SURWIT R, BOUILLAUD F, RICHARD D, COLLINS S et RICQUIER D (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics*, **26**, n° 4, 435-439.

BATANDIER C, GUIGAS B, DETAILLE D, EL-MIR M, FONTAINE E, RIGOULET M et LEVERVE X.M (2006). The ROS Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 is Hampered by Metformin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **38**, n° 1, 33-42.

BLANC J (2003). Protective Role of Uncoupling Protein 2 in Atherosclerosis. *Circulation*, **107**, n° 3, 388-390.

BLEIER L et DRÖSE S (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **1827**, n° 11-12, 1320-1331.

BOCHKOV V.N, OSKOLKOVA O.V, BIRUKOV K.G, LEVONEN A.L, BINDER, C.J et STÖCKL J (2010). Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, n° 8, 1009–1059.

BONNEFONT-ROUSSELOT D, RAJI B, WALRAND S, GARDÈS-ALBERT M, JORE D, LEGRAND A, PEYNET J et VASSON M.P (2003). An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, **52**, n° 5, 586-589.

BRAND M.D, AFFOURTIT C, ESTEVES T.C, GREEN K, LAMBERT A.J, MIWA S, PAKAY J.L et PARKER N (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, n° 6, 755-767.

BRAND, M.D et ESTEVES T.C (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, **2**, n° 2, 85-93.

- CASTEILLA L, RIGOULET M et PÉNICAUD L (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB life*, **52**, n° 3-5, 181–188.
- CHANDEL N.S, TRZYNA W.C, MCCLINTOCK D.S et SCHUMACKER P.T (2000). Role of Oxidants in NF- B Activation and TNF- Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin. *The Journal of Immunology*, **165**, n° 2, 1013-1021.
- DORAN E, HALESTRAP A.P et OWEN M.R (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal*, **348**, n° 3, 607–614.
- ECHTAY K.S, ROUSSEL D, ST-PIERRE J, JEKABSONS M.B, CADENAS S., STUART J.A, HARPER J.A, ROEBUCK S.J, MORRISON A, PICKERING S (2001). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *J. Clin. Invest*, **107**, 585–593.
- ECHTAY K.S, WINKLER E, FRISCHMUTH K et KLINGENBERG M (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, n° 4, 1416–1421.
- ECHTAY K (2007). Mitochondrial uncoupling proteins - What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, **43**, n° 10, 1351-1371.
- EL-MIR M.Y., NOGUEIRA V, FONTAINE E, AVÉRET N, RIGOULET M et LEVERVE X, (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, n° 1, 223–228.
- EMRE Y, HURTAUD C, NÜBEL T, CRISCUOLO F, RICQUIER D et CASSARD-DOULCIER A.M (2007). Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochemical Journal*, **402**, n° 2, 271-278.
- EMRE Y et NÜBEL T (2010). Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Letters*, **584**, n° 8, 1437-1442.
- ESPINOSA E et CHILLET P (2010). *Immunologie*. Paris : Ellipses Edition. 511p. ISBN 978-2-7298-6076-9.
- ESTEVEZ T.C et BRAND M.D (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **1709**, n° 1, 35-44.
- FINKEL T (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, **194**, n° 1, 7-15.
- FRUHWIRTH G.O, LOIDL A et HERMETTER A (2007). Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1772**, n° 7, 718-736.
- GARCIA E.Y (1950). Flumamine, a new synthetic analgesic and anti-flu drug. *Journal of the Philippine Medical Association*, **26**, n° 7, 287-293.

HAMANAKA, R.B et CHANDEL N.S (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, **35**, n° 9, 505-513.

IMAI Y, KUBA K, NEELY G.G, YAGHUBIAN-MALHAMI R, PERKMANN T, VAN LOO G, ERMOLAEVA M, VELDHUIZEN R, LEUNG Y.H.C, WANG H, LIU H, SUN Y, PASPARAKIS M, KOPF M, MECH C, BAVARI S, PEIRIS J.S.M, SLUTSKY A.S, AKIRA S, HULTQVIST M, HOLMDAHL R, NICHOLLS J, JIANG C, BINDER C.J et PENNINGER J.M (2008). Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, **133**, n° 2, 235-249.

ISODA K (2005). Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26**, n° 3, 611-617.

IWASAKI A et PILLAI P.S (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews Immunology*, **14**, n° 5, 315-328.

KASH J.C, XIAO Y, DAVIS A.S, WALTERS K.A, CHERTOW D.S, EASTERBROOK J.D, DUNFEE R.L, SANDOUK A, JAGGER B.W, SCHWARTZMAN L.M, KUESTNER R.E, WEHR N.B, HUFFMAN K, ROSENTHAL R.A, OZINSKY A, LEVINE R.L, DOCTROW S.R et TAUBENBERGER J.K (2014). Treatment with the reactive oxygen species scavenger EUK-207 reduces lung damage and increases survival during 1918 influenza virus infection in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, **67**, 235-247.

KELLY B, TANNAHILL G.M, MURPHY M.P et O'NEILL L.A.J (2015). Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, n° 33, 20348-20359.

KIM S, KIM M.J, PARK D.Y, CHUNG H.J, KIM C.H, YOON J.H et KIM H.J (2015). Mitochondrial reactive oxygen species modulate innate immune response to influenza A virus in human nasal epithelium. *Antiviral Research*, **119**, 78-83.

LAMBERT A.J et BRAND M.D (2009). Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. In *Mitochondrial DNA*. Totowa : Humana Press, p. 165-181. ISBN 978-1-934115-60-2.

LEEPER-WOODFORD S.K et DETMER K (1999). Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF- κ B expression. *The American Journal of Physiology*, **276**, n° 6 Pt 1, 909-916.

MITTLER R, (2016). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*.

MOORE C.B et TING J.P.Y (2008). Regulation of Mitochondrial Antiviral Signaling Pathways. *Immunity*, **28**, n° 6, 735-739.

MURPHY M.P, HOLMGREN A, LARSSON N.G, HALLIWELL B., CHANG C.J, KALYANARAMAN B, RHEE S.G, THORNALLEY P.J, PARTRIDGE L, GEMS D, NYSTRÖM T, BELOUSOV V, SCHUMACKER P.T et WINTERBOURN C.C (2011). Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metabolism*, **13**, n° 4, 361-366.

NAUSEEF W.M (2008). Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, n° 25, 16961-16965.

OPAL S.M et FEDSON D.S (2014). The dysfunctional host response to influenza A H7N9: a potential treatment option? *Critical Care*, **18**, n° 2, 135.

ORRENIUS S, GOGVADZE V et ZHIVOTOVSKY B (2007). Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **47**, n° 1, 143-183.

OUSLIMANI N, PEYNET J, BONNEFONT-ROUSSELOT D, THÉRON P, LEGRAND A et BEAUDEUX J.L (2005). Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*, **54**, n° 6, 829-834.

PAIVA C.N et BOZZA M.T (2014). Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens?. *Antioxidants & Redox Signaling*, **20**, n° 6, 1000-1037.

PELLETIER M, LEPOW T.S, BILLINGHAM L.K, MURPHY M.P et SIEGEL R.M (2012). New tricks from an old dog: Mitochondrial redox signaling in cellular inflammation. *Seminars in Immunology*, **24**, n° 6, 384-392.

RAMOS I et FERNANDEZ-SESMA A (2015). Modulating the Innate Immune Response to Influenza A Virus: Potential Therapeutic Use of Anti-Inflammatory Drugs. *Frontiers in Immunology*, **6**.

ROUGER L, SERGERIE Y, ARSENIJEVIC D, PARADIS E, BOIVIN G et RICHARD D (2011). Implication of Uncoupling Protein 2 in Immunity to Herpes Simplex Virus Type I in Resistant and Susceptible Mouse Strains. *Journal of Neuroparasitology*, **2**, 1-10.

ROUSSET S, EMRE Y, JOINLAMBERT O, HURTAUD C, RICQUIER D et CASSARDDOULCIER A (2006). The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity. *Cytokine*, **35**, n° 3-4, 135-142.

ROUSSET S, MOZO J, DUJARDIN G, EMRE Y, MASSCHELEYN S, RICQUIER D et CASSARD-DOULCIER A.M (2007). UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Letters*, **581**, n° 3, 479-482.

SCHERZ-SHOVAL R, SHVETS E, FASS E, SHORER H, GIL L et ELAZAR Z (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, **26**, n° 7, 1749–1760.

SENA L.A et CHANDEL N.S (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, **48**, n° 2, 158-167.

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.G et VOGEL S.N (2013). The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*, **497**, n° 7450, 498-502.

SHORT K.R, KROEZE E.JB.V, FOUCHIER R.AM et KUIKEN T (2014). Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet infectious diseases*. **14**, n° 1, 57–69.

TANG X, LUO Y.X, CHEN H.Z et LIU D.P (2014). Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in Physiology*, **5**, n° 175, 1-17.

TODA C et DIANO S (2014). Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **28**, n° 5, 757-764.

VAN DE SANDT C.E, KREIJTZ J.H.C.M et RIMMELZWAAN G.F (2012). Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses*, **4**, n° 12, 1438-1476.

VIDAL FRANCE. VIDAL [en ligne]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/substances/2339/metformine/> (consulté le 02/01/2017).

WEST A.P, BRODSKY I.E, RAHNER C, WOO D.K, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, WALSH M.C, CHOI Y, SHADEL G.S et GHOSH S (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, **472**, n° 7344, 476-480.

WEST A.P, SHADEL G.S et GHOSH S (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, **11**, n° 6, 389-402.

ZHOU G, MYERS R, LI Y, CHEN Y, SHEN X, FENYK-MELODY J, WU M, VENTRE J, DOEBBER T, FUJII N, MUSI N, HIRSHMAN M.F, GOODYEAR L.J et MOLLER D.E (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, **108**, n° 8, 1167-1174.

Annexe 1 : Protocole de Western Blot

❖ Pour le marquage de la protéine UCP2 :

1/ Dosage protéines au Qbit avec dilution directe de l'échantillon : 1 μ L d'échantillons pour 199 μ L de solution Qbit

2/ Préparation du mélange que l'on va faire migrer de 20 μ L (échantillon + tampon de lyse (10 μ L les deux réunis) + marqueur 10 μ L)

3/ Préparation du gel de migration à 15%

4/ Remplissage des puits avec 15 μ L du mélange

5/ Migration à 130 V le temps nécessaire pour que le mélange disparaisse du gel

6/ Transfert du gel

7/ Blocage avec TBST-lait 5% pendant une heure à température ambiante

8/ Trois lavages de 5 minutes avec du TBST

9/ Incubation avec anticorps primaire anti-UCP2 de lapin (dilué au 1/1000^{ème} dans une solution de TBST-BSA 1%) la nuit à 4°C

10/ Trois lavages de 5 minutes avec du TBST

11/ Incubation 1 heure avec anticorps secondaire (Goat α -rabbit peroxydase dilué au 1/4000^{ème} avec du TBST-BSA 1%) à température ambiante

12/ Trois lavages de 5 minutes avec du TBST

13/ Révélation du gel

❖ Pour le marquage de la tubuline :

Même protocole avec anticorps primaire anti-tubuline dilué au 1/2000^{ème} et anticorps secondaire dilué au 1/4000^{ème}.

Annexe 2 : Protocole d'inoculation de cellules pour la RT-qPCR

- ❖ Préparation de l'inoculum avec le virus Influenza PR8 (pour 1 puit) :
 - 23 μL de solution contenant le virus
 - 227 μL de solution DMEM + BSA 0,2%

- ❖ Préparation du poly (I:C) : préparation extemporanée dans laquelle il suffit de rajouter 500 μL d'eau stérile puis laisser 15 minutes à température ambiante avant de pouvoir l'utiliser

- ❖ Inoculation des cellules en P6 (4 puits par lignée) :
 - Mettre 4 ml de milieu contenant les cellules dans chaque puit :
 - Puit 1 : rien
 - Puit 2 : poly(I:C) à 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 4 μL de par puit
 - Puit 3 : poly(I:C) à 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soit 20 μL de par puit
 - Puit 4 : inoculum avec virus (pour 1 puit) :
 - Enlever le milieu de culture
 - Inoculer avec 250 μL d'inoculum
 - Incubation 1h à 37°C en remuant toutes les 10 minutes
 - Rincer avec 2 mL de PBS
 - Mettre 2 mL de milieu FC2
 - Incuber 16h

Annexe 3 : Protocole de purification d'ARN et du mix pour la RT-qPCR

- ❖ Lyse des cellules avec de la solution tampon RLT 700 µL par puit pour extraire l'ARN puis centrifuger

- ❖ Purification de l'ARN avec le kit Qiagen® RNeasy Mini Kit :
 - Homogénéiser le lysat obtenu
 - Ajouter le volume équivalent au volume du lysat obtenu d'éthanol 70%
 - Transférer 700 µL d'échantillons dans une colonne à centrifuger du kit
 - Centrifuger pendant 15 secondes à 12000 T/min
 - Ajouter 700 µL de tampon RWI
 - Centrifuger pendant 15 secondes à 12000 T/min
 - Ajouter 500 µL de tampon RPE
 - Centrifuger pendant 15 secondes à 12000 T/min
 - Ajouter 500 µL de tampon RPE
 - Centrifuger pendant 15 secondes à 12000 T/min
 - Centrifuger pendant 1 minute à vitesse maximale
 - Ajouter 40-50 µL d'eau stérile
 - Centrifuger pendant 1 minute à 12000 T/min

- ❖ Préparation du mix pour la RT-qPCR (pour 1 échantillon) :
 - 10 µL de Taq mix PCR
 - 1 µL d'amorces IFN β ou Actine β
 - 0,5 µL de RT enzyme

- ❖ Préparation de la plaque pour la RT-qPCR : dans chaque puit, mettre 11,5 µL de mix et 8,5 µL d'échantillon

Annexe 4 : protocole du test d'inhibition d'héماغglutination

- ❖ Mélanger 50 µL de sérum de chaque échantillon avec 150 µL de RDE (enzyme qui dégrade certains récepteurs dans le sérum)
- ❖ Incuber une nuit à 37°C
- ❖ Incuber 30 minutes à 56°C pour inactiver l'enzyme RDE
- ❖ Préparation des plaques :
 - Mettre 25 µL de PBS dans chaque puits à partir de la colonne 2
 - Mettre 50 µL de chaque échantillon (2 lignes pour un échantillon) dans la première colonne :
 - Plaque 1 :
 - Cage 1 rouge : lignes A et B
 - Cage 1 blanc (sérum dilué par deux) : ligne C et D
 - Cage 2 blanc (sérum dilué par deux) : ligne E et F
 - Cage 3 blanc : ligne G et H
 - Plaque 2 :
 - Cage 4 vert : lignes A et B
 - Cage 5 bleu : ligne C et D
 - Cage 5 blanc : ligne E et F
 - Cheval : ligne G et H (contrôle positif)
 - Plaque 3 :
 - PBS seul : ligne A (contrôle négatif)
 - Virus dilué au 1/2 : lignes B et C (vérification du titre d'héماغglutination du virus)
 - Prélever 25 µL dans chaque puits de la colonne 1 et mettre dans les puits la colonne 2. Bien mélanger avec la pipette
 - Refaire la même manipulation jusqu'à la dernière colonne pour obtenir des dilutions de 2 en 2
 - Ajouter 25 µL de virus PR8 dans chaque puits
- ❖ Incuber les plaques 30 minutes à température ambiante
- ❖ Ajouter 50 µL d'hématies de dinde diluée au 1/10^{ème} dans chaque puits

Annexe 5 : suivi quotidien du poids des souris en % du poids initial

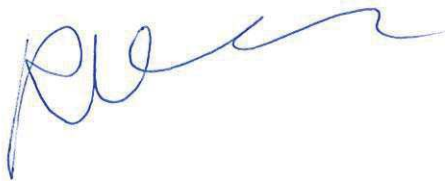
		J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17		
NT	Cage 1	blanc	100,00	98,86	97,71	85,71	80,57	76,57	72,57	70,29	67,43										
		bleu	100,00	100,57	98,30	90,34	85,23	77,84	74,43	71,02	68,18										
		rouge	100,00	100,56	100,00	100,56	96,65	93,85	97,21	96,65	97,77	100,56	100,00	105,03	107,26	105,03	104,47	108,38	107,82	111,17	
		noir	100,00	99,40	98,80	88,55	84,34	78,31	74,70	70,48	68,07										
		vert	100,00	97,02	94,05	85,12	79,76	73,21	70,83	68,45											
	Cage 2	blanc	100,00	94,51	96,70	85,16	81,32	77,47	75,27	70,33	67,58										
		bleu	100,00	97,59	95,18	84,94	78,31	70,48	68,67												
		rouge	100,00	100,00	97,66	85,96	83,04	76,02	74,27	70,76	67,84										
		noir	100,00	97,83	98,37	92,39	89,13	82,61	79,35	74,46	72,28	70,65	67,39								
		vert	100,00	96,61	96,61	88,14	85,88	80,79	77,97	72,32	68,93										
T J0	Cage 3	blanc	100,00	96,70	97,80	96,70	92,86	89,56	87,91	84,62	86,26	93,41	95,05	99,45	103,30	103,85	102,75	103,85	102,75	107,69	
		bleu	100,00	99,39	96,32	86,50	84,66	74,85	72,39	68,10											
		rouge	100,00	94,64	93,45	87,50	76,19	69,64													
		noir	100,00	95,00	96,11	87,22	83,33	76,67	73,89	69,44											
		vert	100,00	98,90	97,79	92,27	88,95	84,53	80,11	75,14	72,93	70,17	66,85								
	Cage 4	blanc	100,00	96,45	96,45	88,17	82,84	76,92	73,37	69,23											
		bleu	100,00	97,89	97,37	84,74	79,47	74,74	72,11	69,47											
		rouge	100,00	96,11	97,78	90,00	89,44	85,00	80,56	76,11	73,33	70,56	67,78								
		noir	100,00	100,00	98,91	91,85	88,59	82,07	79,35	73,37	69,57										
		vert	100,00	93,22	95,48	92,66	96,61	89,83	85,88	77,40	77,40	81,36	87,57	96,61	100,56	100,00	101,13	101,13	99,44	102,82	
T J2	Cage 5	blanc	100,00	100,55	99,45	92,86	89,56	85,71	82,42	78,02	73,63	70,88	69,23								
		bleu	100,00	96,79	93,58	90,37	87,17	80,75	78,07	73,80	70,59	67,91									
		rouge	100,00	100,00	98,73	87,34	81,65	72,78	70,25	65,82											
		noir	100,00	98,26	98,84	90,70	87,79	83,14	79,65	75,58	72,09	71,51	68,60								
		vert	100,00	98,28	101,15	94,83	90,80	85,63	82,18	77,59	74,14	71,84	68,97								
	Cage 6	blanc	100,00	97,13	95,98	92,53	84,48	75,86	73,56	69,54											
		bleu	100,00	97,70	98,28	91,38	84,48	81,61	78,74	72,99	70,69	69,54									
		rouge	100,00	96,47	98,24	81,76	87,65	81,76	80,00	74,12	71,18	69,41									
		noir	100,00	99,40	101,19	96,43	89,29	83,93	81,55	78,57	73,81	72,62	69,64								
		vert	100,00	96,41	98,46	95,90	92,82	89,23	88,21	78,46	72,82	71,79	77,44	84,10	89,23	93,85	96,41	101,03	101,03	102,56	

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Romain VOLMER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Dimitri SOULIE** intitulée « **Contribution des réactifs oxygénés à la réponse immunitaire innée antivirale contre le virus Influenza.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

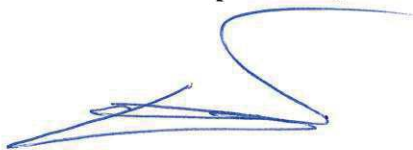
Fait à Toulouse, le 22 mai 2017
Docteur romain VOLMER
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIA



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Toulouse 2017

NOM : SOULIE

PRENOM : Dimitri

TITRE : Contribution des réactifs oxygénés à la réponse immunitaire innée contre le virus Influenza

RESUME : Les réactifs oxygénés (ROS) font partie intégrante de l'immunité innée en permettant l'élimination d'agents pathogènes grâce à leur pouvoir oxydatif et en modulant cette réponse immunitaire via différentes voies de signalisation. L'objectif ici, dans un premier temps, est de rappeler les différents rôles des ROS dans l'immunité innée antivirale et dans un second temps, d'étudier leurs rôles lors d'infection par le virus Influenza à travers deux études expérimentales. La première étude avait pour objectif de potentialiser les effets stimulateurs des ROS mitochondriaux sur la signalisation intracellulaire qui active la réponse immunitaire antivirale en inhibant la protéine mitochondriale UCP2 qui régule la production de ROS. La seconde étude avait pour objectif d'évaluer les conséquences du traitement à la metformine chez des souris infectées par le virus Influenza. La metformine a été décrite comme étant capable de diminuer la production de ROS dans les cellules immunitaires. Notre hypothèse était que la metformine permettrait donc de diminuer l'immunopathologie provoquée par les cellules immunitaires recrutées au site d'infection et les symptômes de cette infection. Les résultats obtenus montrent que l'absence de la protéine UCP2 ne permettait pas une meilleure réponse immunitaire innée antivirale et que la metformine était dépourvue d'effet thérapeutique. Au contraire nos résultats suggèrent que la metformine pourrait aggraver l'immunopathologie induite par le virus Influenza A.

MOTS-CLES : Réactifs oxygénés, mitochondrie, virus, immunité innée, immunopathologie

TITLE : Contribution of reactive oxygen species to the innate immune response against Influenza virus

ABSTRACT : Reactive oxygen species (ROS) are an integral part of the innate immunity by allowing the elimination of pathogens thanks to oxidative power and by modulating the innate immune response through different cellular signalling pathways. The aim of this work was, firstly, to remind the different roles of ROS in the antiviral innate immunity and, secondly, to study their roles during Influenza A virus infection via two experimental studies. The aim of the first study was to potentiate the stimulating effects of mitochondrial ROS on cellular signalling pathways that activate antiviral immunity by inhibiting UCP2, a mitochondrial protein that regulates ROS production. The second study aimed at evaluating the consequences of metformin treatment in mice infected with Influenza virus. Metformin was shown to reduce ROS production in immune cells. Our hypothesis was that metformin would reduce the immunopathology associated with inflammatory cells recruited at the site of infection and thus the symptoms due to Influenza virus infection. Our results show that the lack of UCP2 protein does not potentiate the antiviral innate immunity response and that metformin lacks any therapeutic effect. On the contrary, our results would rather suggest that metformin would promote Influenza A virus immunopathology.

KEYWORDS : Reactive oxygen species, mitochondria, virus, innate immunity, immunopathology