

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

MODULATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ PAR LE VIRUS DE LA GRIPPE

Par
Isabelle Meunier

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Pierre Talbot

Examineurs externes

Louis Flamand

Université Laval

Martin Richter

Université de Sherbrooke

Directrice de recherche

Veronika von Messling

Mai 2012

© Droits réservés, Isabelle Meunier, 2012

RÉSUMÉ

Le virus de la grippe cause une infection respiratoire aiguë qui est principalement contrôlée par le système immunitaire inné. Bien que ce dernier soit généralement efficace pour prévenir la réplication et la dissémination du virus, il arrive que certaines souches réussissent à vaincre ces effets, causant alors une maladie plus sévère comme ce fût le cas du virus de la grippe espagnole de 1918. Plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés chez le virus de la grippe servant soit à augmenter la vitesse de réplication, soit à inhiber certaines voies de l'immunité innée. Entre autres, les protéines virales NS1 et PB1-F2 peuvent influencer l'induction de la réponse immunitaire innée. Bien que les mécanismes d'action de ces protéines soient de plus en plus connus, leur contribution à la pathogenèse des souches humaines saisonnières dans un hôte naturellement susceptible demeure nébuleuse.

Dans un premier temps, nous avons évalué la contribution de la protéine NS1 à la virulence, c'est-à-dire sa capacité d'induire une maladie, en comparant trois souches de type H1N1 différent quant à leur virulence chez le furet : PR/8/34 (PR/8), qui est faiblement pathogène (causant une maladie peu sévère), USSR/90/77 (USSR), qui est une souche humaine saisonnière moyennement pathogène (causant une maladie moyennement sévère), et Brevig Mission/1/1918 (1918), qui est hautement pathogène (causant une maladie très sévère). Des virus recombinants sous le fond génétique d'USSR possédant le NS1 de 1918 ou de PR8 ont été générés. Nous avons observé que les protéines NS1 de souches plus pathogènes, soit USSR et 1918, étaient de meilleurs inhibiteurs de la signalisation des IFN I que celle de PR/8 *in vitro*. L'infection de furets avec les différents virus a démontré que le virus possédant la protéine NS1 de 1918 causait une maladie plus sévère et une fièvre plus forte. De plus, les virus recombinants possédant le NS1 de souches pathogènes se répliquaient de manière plus soutenue dans le tractus respiratoire supérieur et se disséminaient dans les poumons. Finalement, nous avons observé que la présence du NS1 de souches plus pathogènes était associée à significativement moins d'IFN I tôt suite à l'infection et à une réponse inflammatoire moins forte dans les lavages nasaux, indiquant que l'effet inhibiteur de NS1 sur l'induction d'une réponse innée contribue à la virulence.

Dans un deuxième temps, nous avons observé que la protéine PB1-F2 n'était pas un facteur clé dans la virulence des virus saisonniers humains H1N1 mais qu'elle avait un effet spécifique à certains types cellulaires. En effet, dans des systèmes de cultures *ex vivo* de poumons de furets et de macaque, la présence de la protéine n'avait aucun impact sur la réplication, l'induction de

l'apoptose et le profil de cytokines induit suite à l'infection, suggérant que PB1-F2 n'a aucun effet sur ce tissu. À l'opposé, le virus recombinant exprimant la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole provoquait un retard dans l'induction d'IL-6 et d'IL-8 dans les macrophages dérivés du sang de furet et causait légèrement plus d'apoptose à 8 h post-infection, sans toutefois influencer la réplication virale. Même si un retard dans l'induction d'IL-6 et d'IFN- α était aussi observé chez les furets infectés avec rUSSR-PB1F2 1918, la maladie était similaire entre les différents groupes et la charge virale, égale. Ces résultats démontrent donc que la contribution de PB1-F2 à la virulence des virus humains H1N1 est limitée.

Dans un troisième temps, nous avons comparé la virulence et la pathogenèse induite par deux isolats du virus pandémique de 2009, soit A/Mexico/InDRE4487/2009 (MX4487) et A/Canada-AB/RV1532/2009 (RV1532). Nous avons observé que ces deux virus, qui ne diffèrent que par quelques acides aminés dans six protéines différentes, diffèrent quant à la maladie qu'ils causent. En effet, bien que les deux virus étaient retrouvés à des titres similaires dans le tractus respiratoire supérieur et dans les poumons, l'isolat MX10 était associé à un taux de mortalité plus élevé, une pathologie aux poumons plus prononcée et soutenue dans le temps, comparativement à l'isolat A/Canada-AB/RV1532/2009. Finalement, dans les lavages nasaux, une plus grande production de plusieurs cytokines était retrouvée chez les animaux infectés avec MX10. Ces résultats suggèrent donc que la dérégulation de la réponse immunitaire peut contribuer à la pathologie.

En conclusion, ces études confirment les fonctions de NS1 et PB1-F2 identifiés *in vitro* ou chez les souris dans un hôte naturellement susceptible à l'infection. Elles ont démontré que la protéine NS1 contribuait à la virulence de virus saisonniers en influençant la réponse immunitaire et la dissémination du virus. De plus, ces études ont permis de démontrer que la protéine PB1-F2, bien qu'influencant également la réponse immunitaire dans certains types cellulaires, contribuait de façon limitée à la virulence des virus humains saisonniers H1N1. De plus, elles nous donnent une appréciation de la contribution de ces protéines à la pathogenèse d'une souche saisonnière et aident donc à l'interprétation de l'importance des mutations nouvellement identifiées dans le contexte de la surveillance continue de ce virus. Finalement, ces études démontrent aussi que la pathogenèse du virus de la grippe dépend de plusieurs facteurs et que la réponse immunitaire peut contribuer à la pathologie, ce qui suggère que des traitements immunomodulateurs administrés conjointement à des antiviraux pourraient avoir un effet bénéfique dans certains cas.

Isabelle Meunier

Veronika von Messling

REMERCIEMENTS

Tout comme pour ma maîtrise, mon doctorat a été une grande aventure qui n'aurait pas pu être réalisée sans l'aide inestimable de plusieurs personnes. Une énorme partie de ma gratitude va envers ma directrice de recherche, Veronika von Messling. Elle a été d'un support extraordinaire et m'a poussé à accomplir beaucoup de choses que je n'aurais peut être pas fait sans elle. J'ai énormément appris d'un point de vue scientifique mais aussi d'un point de vue personnel et je tiens à la remercier pour tout cela. Merci aussi de m'avoir permis de vivre plusieurs aventures pendant mon doctorat: les projets en collaboration avec Gary dont j'ai beaucoup bénéficié et appris, l'expérience avec l'équipe du contrôle anti-dopage pendant les Jeux Olympiques de Vancouver, les projets impliquant les singes dont j'ai aussi énormément appris, même si j'étais complètement épuisée à la fin des longues journées, et le stage à Singapour. Elle m'a aussi accordé beaucoup de confiance et de liberté pendant ces quatre années, ce qui a été énormément apprécié.

J'ai aussi eu la chance de travailler avec des collègues formidables. Un merci particulier à Bevan qui m'a beaucoup aidé en biologie moléculaire, qui a confirmé ce que pensais par rapport à certaines expériences (!) et qui m'a patiemment écouté et encouragé. Merci aussi à Ronan pour son écoute précieuse! Je veux aussi remercier Stéphane pour avoir pris le temps de relire ma thèse et pour ses commentaires. Merci à tous mes nombreux autres collègues avec qui j'ai beaucoup aimé travailler: Penny, Nick, Danielle, Sébastien (vive l'autophagie!), Christophe, Xiao, Alex, Louis et Éveline. Un gros merci à notre assistante de recherche, Chantal Thibault pour avoir allégé plusieurs tâches administratives!

J'ai aussi eu la chance de bénéficier du support et de l'aide de deux personnes formidables. Tout d'abord, merci à mon directeur de maîtrise Alain Lamarre qui a continué de me supporter, qui m'a donné beaucoup de conseils, autant scientifiques que par rapport à ma carrière et qui a patiemment continué à répondre à mes questions existentielles en immunologie! Je tiens aussi à remercier Esther Tarrab. Tout comme pendant ma maîtrise, elle a été d'un support moral incroyable et elle m'a vraiment aidé à passer au travers des moments difficiles et de doutes. Merci aussi à Patrick Labonté pour ses commentaires lors de mes comités d'encadrement et aussi pour son aide pour certains de mes projets.

Je tiens finalement à remercier mes parents et ma famille pour leur énorme soutien tout au long de ces quatre années. Merci de m'avoir encouragé à poursuivre mes études, merci pour le support moral et merci d'avoir compris mes horaires un peu fous, même s'ils n'étaient pas tout à

fait d'accord! Je voudrais aussi dire merci à mes collègues de l'institut pour leur aide et leur support moral : je pense que toute cette entraide entre les différents laboratoires fait en sorte que l'institut est un endroit formidable pour entreprendre des études graduées. Finalement, un merci spécial à mes amis proches Samuel et Marie-Noëlle pour le soutien, leurs conseils et les encouragements pendant ces dernières années.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
TABLE DES ILLUSTRATIONS	xii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1. Le virus de la grippe	2
1.1 Taxonomie, nomenclature et morphologie.....	2
1.2 Organisation génomique et réplication des virus du genre influenza A	3
1.2.1 Entrée du virus	4
1.2.2. Réplication.....	4
1.2.3. Assemblage et relargage des particules virales	5
1.3 Variation antigénique et écologie	6
1.3.1 Variation antigénique.....	6
1.3.2. Écologie du virus de la grippe	6
1.4 Pandémies du 20 ^{ème} et 21 ^{ème} siècle	7
1.4.1 Grippe espagnole (H1N1, 1918).....	7
1.4.2 Grippe asiatique (H2N2, 1957).....	9
1.4.3 Grippe de Hong Kong (H3N2, 1968)	9
1.4.4 Grippe russe (H1N1, 1977)	10
1.4.5 Grippe A H1N1 (H1N1, 2009).....	10
2. Étude de la pathogenèse	11
2.1 Pathogenèse humaine	11
2.2 Modèles animaux.....	12

2.2.1 Souris	12
2.2.2 Furets	13
2.2.3 Primates non-humains.....	14
2.2.4 Cochon d'Inde	15
2.2.5 Porcs	15
2.2.6 Autres	15
3. Réponse immunitaire induite contre le virus de la grippe.....	17
3.1 Réponse immunitaire innée	17
3.1.1 Réponse des cellules épithéliales à l'infection	17
3.1.1.1 Reconnaissance intracellulaire du virus.....	17
3.1.1.2 Production des interférons de type I	18
3.1.1.3 Production de cytokines et chimiokines	20
3.1.2 Rôle des macrophages alvéolaires	20
3.1.3 Rôle des cellules dendritiques.....	21
3.1.4 Rôle des cellules NK	22
3.2 Réponse immunitaire adaptative.....	22
3.2.1 Réponse humorale	22
3.2.2 Réponse cellulaire	23
4. Facteurs de virulence.....	24
4.1 NS1	24
4.1.1 Expression et localisation cellulaire	24
4.1.2 Fonctions dans la réplication virale	26
4.1.3 Interaction entre NS1 et la survie cellulaire	27
4.1.4 Interaction entre NS1 et le système immunitaire.....	27
4.1.4.1 Inhibition de la réponse aux IFN I	27
4.1.4.2 Autres interactions avec le système immunitaire	29
4.1.5 Contribution de NS1 à la virulence	29

4.2 PB1-F2	31
4.2.1 Expression et localisation cellulaire	31
4.2.2 Mécanismes d'action	32
4.2.2.1 Induction de l'apoptose	32
4.2.2.2 Interaction avec la réponse aux IFN I	33
4.2.2.3 Modulation de l'activité du complexe de polymérase.....	33
4.2.2.4 Exacerbation de la réponse inflammatoire et des infections secondaires	33
4.2.3 Contribution à la virulence	34
4.3 Autres facteurs de virulence.....	35
4.3.1 Hémagglutinine.....	35
4.3.2 Neuraminidase	36
4.3.3 Complexe de polymérase.....	36
5. Hypothèses et objectifs de travail	37
CHAPITRE 2: PUBLICATIONS	39
Publication no. 1	40
Résumé.....	41
Abstract	42
Introduction	43
Results	45
Discussion.....	52
Materials and methods.....	54
Acknowledgements	57
Publication no. 2	64
Résumé.....	65
Abstract	66
Introduction	67

Materials and Methods.....	69
Results.....	73
Discussion.....	82
Acknowledgments.....	84
References.....	85
Publication no. 3.....	89
Résumé.....	90
Abstract.....	91
Introduction.....	92
Results.....	94
Discussion.....	102
Materials and methods.....	104
Acknowledgments.....	106
References.....	107
CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	112
3.1 Les souches plus virulentes utilisent souvent plusieurs mécanismes différents pour interférer avec la réponse aux IFN I.....	114
3.2 L'importance de la réponse aux IFN I dans le contrôle du virus de la grippe et de sa dissémination.....	116
3.3 Pourquoi l'impact de PB1-F2 sur la modulation de la réponse inflammatoire est si subtil <i>in vivo</i>?.....	118
3.4 Est-ce que la fonction de PB1-F2 serait spécifique à l'hôte?.....	119
3.5 L'utilisation des cultures <i>ex vivo</i> de poumons : potentiel et pistes de recherche..	120
3.6 Réponse aux IFN et virus de la grippe : nouveaux traitements et vaccins potentiels.	121
3.7 Qu'est-ce qui contribue à la pathogénèse du virus de la grippe?.....	124

CONCLUSION	131
Références bibliographiques	132
ANNEXE I: CONTRIBUTIONS SUPPLÉMENTAIRES	184
Les IFN I stimulent l'activation de l'inflammasome dépendant de RIG-I/TLR3/NLRP3 dans les cellules infectées par le virus de la grippe	185
Une réponse cellulaire en présence d'un niveau protecteur d'anticorps confère une protection contre le virus de la grippe de 1918 chez les furets	246
Évaluation des vaccins commercialement disponibles et à l'étude contre le virus de la grippe pandémique de 2009	256
Pathogenèse du virus de la grippe : leçons apprises des études animales avec les virus H5N1, le virus de la grippe espagnole et le virus pandémique de 2009.....	264

TABLE DES ILLUSTRATIONS

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Figure 1: Représentation schématique du virus influenza et organisation génomique	3
Figure 2 : Pathogenèse de l'infection par le virus de la grippe.	11
Figure 3 : Induction et signalisation de la réponse aux IFN I suite à une infection virale.	20
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine NS1.	26

CHAPITRE 2: PUBLICATIONS

Publication no.1

Figure 1: Characterization of the different NS1 proteins	46
Figure 2: <i>In vitro</i> characterization of the recombinant viruses.	47
Figure 3: Clinical assessment of the infection.	48
Figure 4: Viral replication in the upper and lower respiratory tract.	49
Figure 5: Histopathological changes in the lungs.	50
Figure 6: Comparison of the cytokine mRNA profiles in nasal wash cells.....	51

Publication no.2

Figure 1: Generation of recombinant viruses.	74
Figure 2: Infection and cellular responses in ferret <i>ex vivo</i> lung cultures.	75
Figure 3: Infection and cytokine profiles in macaque lung <i>ex vivo</i> cultures.	76
Figure 4: Cytokine responses in ferret blood-derived macrophages.	78
Figure 5: Pathogenesis and virulence of the recombinant viruses in ferrets.	79
Figure 6: Comparison of cytokine mRNA expression in ferret nasal washes.....	81

Publication no.3

Figure 1: Pathogenesis and virulence of the different isolates.	96
Figure 2: Viral load in nasal wash fluid and different tissues.	97
Figure 3: Histopathological examination of lung tissue.	99
Figure 4: Immunohistochemical detection of infected cells.	100
Figure 5: Comparison of the cytokine response induced by the different isolates.	101

CHAPITRE 3: DISCUSSION

Figure 5: Plusieurs stratégies différentes peuvent être utilisées par le virus de la grippe pour inhiber la réponse aux IFN I.	116
Figure 6: Mécanismes pouvant possiblement contribuer à la pathogenèse causée par le virus de la grippe.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Table 1: Amino acid differences between MX10 and RV1532.....	94
---	-----------

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C: degré Celcius

µg: microgramme

µl: microlitre

a.a.: acide aminé

aMφ: *alveolar macrophage*

ANT3: *adenine nucleotide translocator 3*

ARN: acide ribonucléique

ARNc: acide ribonucléique complémentaire

ARNdb: acide ribonucléique double brin

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNv: acide ribonucléique viral

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPSF30: *30 kDa subunit of cleavage and polyadenylation specificity factor*

DC: *dendritic cell*

deINS1: virus qui n'expriment pas NS1

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

h: heure

HA: hémagglutinine

IFN: interféron

IFN I: interférons de type I

IFNAR: *IFN-α/β receptor*

IL: interleukine

IP-10: *interferon gamma inducible protein 10*

ISG: *interferon stimulated gene*

ISGF3: *interferon-stimulated gene factor 3*

ISRE: *IFN-stimulated response elements*

kg : kilogramme

MAVS: *mitochondrial antiviral signaling protein*

MCP: *monocyte chemoattractant proteins*

M-CSF: *monocyte colony-stimulating factor*

MIP: *macrophage inflammatory proteins*

m.o.i.: *multiplicity of infection*

Mx: *myxovirus resistance protein*

NA: neuraminidase

NEP: *nuclear export protein*

NES: *nuclear export signal*

ng: nanogramme

NLS: *nuclear localization signal*

NoLS: *nucleolar localization signal*

NLR: *nod-like receptors*

NP: nucléoprotéine

NS1/NS2: protéine non-structurale 1/2

NS1-BP: *NS1-binding protein* (protéine se liant à NS1)

nm: nanomètre

OAS: *2',5'-oligoadenylate synthetase*

PA : polymérase acide

PABP I/II: *poly(A)-binding protein I/II*

pb: paires de bases

PB1/PB2: polymérase basique 1/2

PKR: protein kinase R

PL: *PDZ ligand*

PRR: *pattern recognition receptors*

RIG-I: *retinoic-acid-inducible gene I*

RLR: *retinoic acid-inducible gene 1 protein (RIG-I)-like helicase*

ROS: *reactive oxygen species*

RNP: ribonucléoprotéines

RT-PCR: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

S66: sérine à la position 66

smRNA: *small nuclear RNA* (petit ARN nucléaire)

SRAS: virus du syndrome respiratoire aigu sévère

Th: *T helper cell*

TLR: *toll-like receptor*

TOM20: *translocase of the outer mitochondrial membrane 20*

Treg: lymphocyte T régulateur

TRAIL: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

TRIM25: *tripartite motif-containing protein 25*

U: unite internationale

UTR: *untranslated region*

VDAC1: *voltage-dependant ion channel 1*

VSV: *vesicular stomatitis virus*

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Le virus de la grippe

1.1 Taxonomie, nomenclature et morphologie

Le virus de la grippe fait partie de la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend cinq genres différents, soit influenza A, B, C, Thogotovirus et Isavirus. Il s'agit de virus enveloppés avec un génome segmenté d'ARN à polarité négative.

Les virus de la grippe sont classifiés selon le genre auquel ils appartiennent (A, B ou C), l'espèce (sauf si cela provient de l'humain) et le lieu duquel ils ont été isolés et, dans le cas des virus influenza A, selon l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) qu'ils expriment à leur surface. Jusqu'à maintenant, 16 hémagglutinines et 9 neuraminidases différentes ont été identifiées (Webster et al., 2006).

Les virus du genre influenza A possèdent une enveloppe lipidique provenant de la membrane de l'hôte et exhibent à leur surface les protéines HA, NA et la protéine M2 (**Figure 1A**). Associé à l'intérieur de la bicouche lipidique se retrouvent la protéine de la matrice (M1) ainsi que le complexe de ribonucléase composé des 8 segments d'ARN, des polymérases basiques (PB1 et PB2), d'une polymérase acide (PA) et de la nucléoprotéine (NP) (Nayak et al., 2004). Finalement, la protéine NS2 (ou *nuclear export protein*, NEP) fait un pont entre les protéines de la matrice et les complexes ribonucléoprotéiques (Richardson and Akkina, 1991; Whittaker et al., 1996; Yasuda et al., 1993). Les virus influenza ont généralement une forme pléiomorphe: ils peuvent être soit d'une forme sphérique d'environ 100 nm de diamètre avec les projections des protéines HA et NA ou de forme plutôt filamenteuse de plus de 300 nm (Chu et al., 1949; Harris et al., 2006; Nayak et al., 2004).

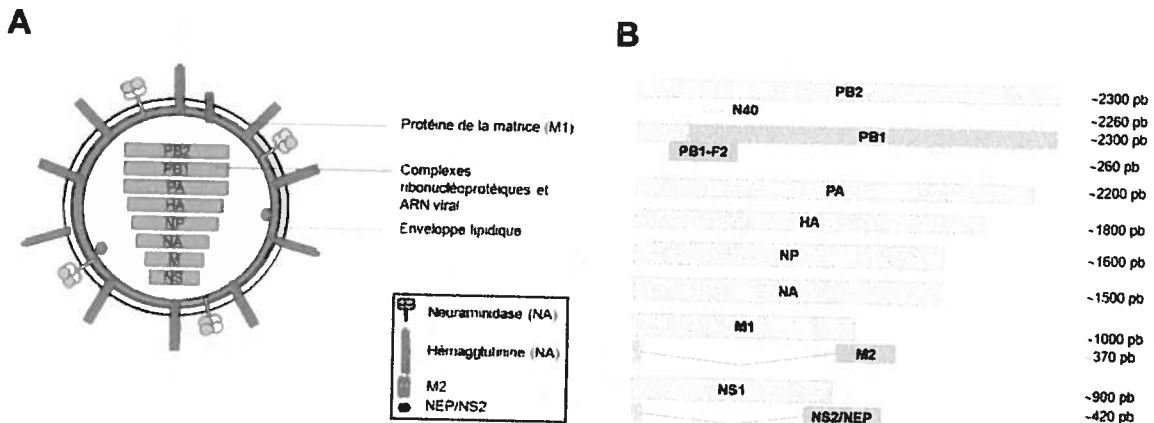


Figure 1: Représentation schématique du virus influenza et organisation génomique. (A) Les protéines de l'hémagglutinine (HA), de la neuraminidase (NA) et M2 (en bleu foncé) sont insérées dans la bicouche lipidique (blanc). La protéine de la matrice M1 (aqua) réside sous la membrane lipidique. Les complexes ribonucléoprotéiques (RNP, bleu pâle) sont composés des segments d'ARN viral et du complexe de polymérase (PB1, PB2, PA et NP). La protéine NS2/NEP (rouge) est aussi associée au virion. (B) Représentation schématique des 8 segments viraux avec les protéines qu'ils encodent. La taille approximative des segments en paire de bases (pb) est notée à l'extrême droite. Le segment PB1 contient un cadre de lecture alternatif représenté en vert. La traduction de la protéine N40 est initiée dans le même cadre de lecture que PB1 par scan ribosomal (représenté par un mélange rose et bleu). Les protéines M2 et NS2/NEP sont produites par épissage alternatif. Inspiré de (Knipe, 2005).

1.2 Organisation génomique et répllication des virus du genre influenza A

Les virus du genre influenza A possèdent 8 segments génomiques. Les trois plus longs segments codent pour les polymérases virales, soit PB2 (segment 1), PB1 (segment 2) et PA (segment 3) (Figure 1B). Le segment 2 mène en plus à la synthèse de deux protéines accessoires, soit PB1-F2, grâce à un cadre de lecture alternatif, et N40, dont la traduction est initiée à un deuxième codon de départ dans le cadre de lecture de PB1 (Wise et al., 2009). Les segments 4, 5 et 6 codent respectivement pour les protéines HA, NP et NA. Les segments M et NS (segments 7 et 8, respectivement) produisent les protéines M1 et NS1 et, par épissage alternatif, M2 et NS2/NEP (Nayak et al., 2004). Chaque segment comprend des régions non-traduites aux extrémités 5' et 3' qui contiennent les signaux essentiels pour la répllication, la transcription et l'empaquetage des segments dans la particule virale (Fujii et al., 2005; Gog et al., 2007; Hutchinson et al., 2010; Hutchinson et al., 2009; Parvin et al., 1989). Ces régions non-codantes sont composées d'une séquence commune aux 8 segments longues de 13 nucléotides à l'extrémité 5' et de 12 nucléotides à l'extrémité 3' et d'une séquence spécifique à

chaque segment vers l'intérieur du gène. Enfin, ces régions non-traduites sont très conservées au cours de l'évolution et sont sous pression négative de sélection (Furuse and Oshitani, 2011).

1.2.1 Entrée du virus

Afin d'initier l'infection, le virus de la grippe doit se lier à son récepteur cellulaire qui est un acide sialique relié à une molécule de galactose, soit par un lien α -2,6, dans le cas des virus humains, ou par un lien α -2,3, dans le cas des virus aviaires (Connor et al., 1994; Matrosovich et al., 2000; Rogers and Paulson, 1983; Rogers et al., 1983). L'entrée du virus dans la cellule se fait principalement par endocytose dépendante de la clathrine (Matlin et al., 1981; Patterson et al., 1979), bien que d'autres mécanismes d'entrée, soit par endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles ou par macropinocytose aient aussi été décrits (de Vries et al., 2011; Sieczkarski and Whittaker, 2002).

Le pH acide de l'endosome active le processus de fusion. À cette, la protéine HA, initialement produite sous forme d'un précurseur nommé HA0, doit être clivée en deux sous-unités, soit HA1 et HA2. Une fois présente dans le pH acide de l'endosome, HA, présente à la surface de la particule virale, subit un changement de conformation. Ceci expose le peptide de fusion localisé à la partie N-terminale de la protéine afin de permettre son interaction avec la membrane de l'endosome. L'action concomitante de plusieurs protéines HA crée un pore dans la membrane endosomale, permettant le relargage des complexes de ribonucléoprotéiques (RNP). Ces RNP, composés d'un segment d'ARN, de NP et des polymérases sont ensuite relâchés dans le cytoplasme (Stegmann et al., 1987). Le relargage efficace des RNP est aussi dépendante de la protéine M2. Cette dernière a une activité de canal ionique et permet l'influx de protons de l'endosome vers la particule virale, détruisant les interactions protéines-protéines entre les RNP et la protéine M1 (Matlin et al., 1981; Rossman and Lamb, 2011; Wang et al., 2011).

1.2.2. Réplication

La réplication du virus de la grippe s'effectue dans le noyau. À cette fin, l'importation des RNP du cytoplasme vers le noyau est permise grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire dans la protéine NP qui lui permet d'interagir avec la karyophérine α (O'Neill et al., 1995; Wang et al., 1997). À cet endroit, les ARN viraux (ARNv) permettent de générer deux types d'ARN à polarité positive : un ARN complémentaire (ARNc) qui servira de gabarit pour la production subséquente d'ARN viral et un ARN messenger (ARNm) qui sera traduit afin de permettre la production des protéines virales (Neumann et al., 2004).

La génération des ARNm viraux est indirectement dépendante de l'ARN polymérase II car le virus se sert des coiffes des ARNm de l'hôte afin de pouvoir initier sa propre transcription par un processus nommé « *cap snatching* ». Lorsque la polymérase PB1 se lie à l'extrémité 5' des ARNv, cela provoque un changement de conformation dans la polymérase PB2 qui lui permet de se lier à la coiffe d'un ARNm de l'hôte. Par la suite, la polymérase PA clive l'ARNm de l'hôte de 10 à 13 nucléotides en aval de la coiffe et la transcription de l'ARNm viral est initiée. Finalement, l'addition d'une queue polyA est effectuée par le même complexe de polymérase (Cianci et al., 1995; Dias et al., 2009; Fechter and Brownlee, 2005).

Pour permettre l'épissage des segments M et NS, le virus utilise la machinerie de l'hôte. Il s'agit d'un mécanisme relativement peu efficace menant à un ratio de transcrits non-épissés/épissés d'environ 90:10. Plusieurs facteurs peuvent contrôler l'épissage dont certaines protéines virales (NS1 et les polymérases), certaines protéines cellulaires (SF2/ASF) ainsi que le taux d'export nucléaire (Alonso-Caplen et al., 1992; Nemeroff et al., 1992; Shih and Krug, 1996; Shih et al., 1995). Finalement, la synthèse des ARNv se fait à partir des ARNc et, contrairement à la production d'ARNm, ne requiert pas la présence des ARNm de l'hôte (Deng et al., 2006).

1.2.3. Assemblage et relargage des particules virales

Les nouveaux complexes RNP sont formés à l'intérieur du noyau et s'associent aux protéines M1 et NS2. La protéine M1 se lie aux nucléosomes et fait un pont entre NS2 et les RNP (Huang et al., 2001). La protéine NS2, quant à elle, s'associe à des protéines d'export nucléaire, dont Crm1, et permet la sortie des complexes du noyau (Neumann et al., 2000; O'Neill et al., 1998). La protéine NP interagit également avec Crm1 et pourrait contribuer à l'export nucléaire (Elton et al., 2001). Une fois dans le cytoplasme, le complexe RNP-NS2-M1 se dirige vers la membrane cytoplasmique pour l'assemblage. Les protéines HA, NA, associées aux radeaux lipidiques, et M2, liée au cholestérol, sont aussi dirigées vers la membrane cellulaire (Carrasco et al., 2004). Le bourgeonnement s'effectue toujours du côté apical de la cellule et la protéine M1 est importante pour permettre l'élongation de la membrane plasmique (Gomez-Puertas et al., 2000; Mora et al., 2002; Nayak et al., 2004; Rossman and Lamb, 2011). Une fois les particules virales relarguées, les protéines NA présentes à la surface du virion clivent les acides sialiques afin de libérer le virus de la cellule (Gong et al., 2007).

1.3 Variation antigénique et écologie

Afin de se maintenir dans la population et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, le virus de la grippe a développé différentes stratégies. Une première, la dérive antigénique, lui permet d'accumuler des changements mineurs afin de mieux s'adapter à son hôte et de diminuer la reconnaissance par le système immunitaire. La seconde implique des changements plus importants et permet un passage d'une espèce à l'autre et est associée à la génération de virus pandémiques.

1.3.1 Variation antigénique

La dérive antigénique est caractérisée par l'accumulation de mutations ponctuelles dans les deux protéines de surface, soit HA et NA, causant des changements mineurs et graduels. Ceci est possible car l'ARN polymérase virale n'a pas d'activité de correction ce qui mène à l'accumulation de mutations suite à chaque ronde de réplication. À titre d'exemple, il est estimé que le taux de mutations dans le gène de HA est de $2,6-4 \times 10^{-3}$ mutations par année et dans le gène de NS, de $2,2 \times 10^{-3}$ mutations par année (Nobusawa and Sato, 2006; Webster et al., 1992). La réponse immunitaire de l'hôte, principalement la réponse humorale, joue un rôle important en exerçant une pression pour la sélection de variants qui ont accumulé des mutations dans les sites antigéniques. Ces derniers sont généralement localisés dans la partie globulaire des protéines. Ainsi, quatre sites antigéniques ont pu être identifiés dans HA et deux dans NA (Air and Laver, 1989; Chen and Deng, 2009; Gerhard et al., 1981). L'accumulation de mutations dans d'autres segments est aussi observée mais à une moins grande fréquence que dans les protéines de surface, probablement car la pression de sélection y est moins forte.

Le réassortiment implique un changement plus important et survient lorsqu'une cellule est infectée par deux virus différents et qu'il y a échange de segments homologues. Ceci est possible en raison de la nature segmentée du génome viral, pouvant résulter en 256 (2^8) combinaisons théoriquement possibles pouvant mener à la génération d'un nouveau virus. Cette grande flexibilité génétique a facilité la colonisation d'un grand nombre d'espèces de mammifères et d'oiseaux et est aussi responsable des pandémies occasionnelles chez l'humain.

1.3.2. Écologie du virus de la grippe

Le virus de la grippe peut infecter une large gamme d'hôtes incluant les humains, les porcs, les mammifères marins et les oiseaux. Les oiseaux aquatiques de l'ordre des Charadriiformes (goéland, sterne) et Anseriformes (canards, oies, cygnes) ont été identifiés comme le réservoir

naturel du virus et sont à l'origine de tous les virus transmis aux autres espèces (Gorman et al., 1990; Taubenberger and Kash, 2010; Webster et al., 1992). Chez les oiseaux aquatiques, l'infection est généralement asymptomatique et le virus se réplique principalement dans le tractus gastro-intestinal (Taubenberger and Kash, 2010; Webster et al., 1977). Les oiseaux aquatiques peuvent transmettre le virus à d'autres espèces, menant à l'établissement d'une nouvelle lignée virale. Dans le cas des humains, le virus provient rarement directement des oiseaux aquatiques mais passe plus souvent par des intermédiaires. Plusieurs cas de transmission de la volaille vers l'humain ont été recensés mais en général, le virus ne s'établit pas dans la population car il ne se transmet pas d'une personne à l'autre (Naffakh et al., 2008). Par ailleurs, une transmission du porc à l'humain occasionne souvent l'établissement du virus dans la population humaine (Castrucci et al., 1993; Ma et al., 2009). Cet animal a la particularité d'avoir dans son tractus respiratoire des cellules exprimant des acides sialiques α -2,6, reconnus par les virus humains, mais aussi des acides sialiques α -2,3, qui sont reconnus par les virus aviaires (Ito et al., 1998; Rogers and D'Souza, 1989; Rogers and Paulson, 1983). Conséquemment, le porc peut être infecté à la fois par des virus humains, porcins et aviaires. En raison du phénomène de réassortiment, lorsqu'un animal est infecté par plusieurs virus à la fois, il peut y avoir échange de segments ce qui crée des réassortants doubles ou multiples. Les réassortants doubles sont généralement un mélange de virus aviaires et humains tandis que les réassortants triples sont un mélange des trois virus (Ma et al., 2009). Le porc est donc considéré comme un « mixing vessel » permettant le réassortiment entre des virus humains, aviaires et porcins pouvant mener à la génération de virus pandémiques (Ma et al., 2007; Normile, 2005; van Riel et al., 2006; Webster et al., 1992).

1.4 Pandémies du 20^{ème} et 21^{ème} siècle

Quatre pandémies d'ampleurs différentes sont survenues au cours du 20^{ème} siècle et une, jusqu'à présent, au cours du 21^{ème} siècle. Les trois premières ont été associées à un réassortiment entre un virus humain et aviaire, tandis que le virus ayant causé celle du 21^{ème} siècle possédait des segments humains, aviaires et porcins.

1.4.1 Grippe espagnole (H1N1, 1918)

La pandémie de la grippe espagnole est de loin celle qui a été la plus dévastatrice. Il est estimé que 28% de la population mondiale (500 millions d'individus à l'époque) a été infecté par le virus. La maladie a aussi été particulièrement virulente avec des taux de mortalité de plus de

2,5%, comparativement au taux de mortalité d'une grippe saisonnière qui est d'environ 0,1%. Le nombre de décès ayant été associé à la pandémie de 1918 est situé entre 20 à 40 millions (Patterson and Pyle, 1991; Watanabe and Kawaoka, 2011). La pandémie est survenue en trois vagues successives. Les premiers cas auraient été détectés aux États-Unis au printemps 1918 mais l'origine reste encore contestée car plusieurs cas ont aussi été signalés dans la même période en Europe et en Asie (Olson et al., 2005; Oxford et al., 2005). Cette première vague a été très contagieuse mais peu mortelle. Il est soupçonné que le virus a acquis des mutations pendant l'été 1918 qui auraient augmenté sa virulence. La deuxième vague, à l'automne 1918, a été particulièrement meurtrière, particulièrement auprès des jeunes de moins de 15 ans, des 65 ans et plus mais aussi, plus étonnement, chez les individus de 15 à 34 ans (Simonsen et al., 1998). Plusieurs de ces mortalités ont été associées au développement d'infections secondaires, probablement car les antibiotiques n'étaient pas disponibles à cette époque. Par contre, une autre fraction des patients décédés démontrait une hémorragie et/ou de l'œdème aux poumons et une consolidation du tractus respiratoire. Chez ces patients, le décès a été attribué à une déficience respiratoire (Taubenberger et al., 2001). Finalement, la troisième vague survenue à l'hiver 1919 a été aussi ravageuse que la deuxième. Plusieurs études semblent maintenant démontrer que le virus se serait établi chez les porcs après la première vague et ses descendants continuent à circuler en Amérique du Nord, Europe et Asie (Kupradinun et al., 1991; Nerome et al., 1982).

Ce n'est que beaucoup plus tard, vers la fin des années 1990, que l'agent causateur de la grippe espagnole a été caractérisé. De l'ARN viral a pu être isolé de poumons fixés à la formaline et emparrafinés de soldats américains ayant succombés à la maladie ainsi que d'une femme Inuit enterrée en Alaska dans le pergélisol. Ceci a permis de reconstruire les gènes viraux et des analyses génétiques ont démontré qu'il s'agissait d'un virus de sous-type H1N1 ayant plusieurs gènes aviaires (Basler et al., 2001; Reid et al., 1999; Reid et al., 2004; Reid et al., 2002; Reid et al., 2000; Taubenberger et al., 1997; Taubenberger et al., 2005). Par contre, la présence de plusieurs mutations non-silencieuses dans divers segments comparativement à une séquence consensus aviaire suggère que le virus n'est pas passé directement des oiseaux aux humains mais a subi une période d'adaptation. Cependant, cette hypothèse reste controversée (Taubenberger et al., 2005; Watanabe and Kawaoka, 2011).

Beaucoup d'études ont été effectuées afin de comprendre pourquoi le virus de la grippe espagnole était si virulent. Chez la souris et les macaques, le virus se réplique à de hauts titres

et se dissémine rapidement dans tout le tractus respiratoire. Tout comme il l'a été observé chez les patients infectés, les poumons des animaux ont de l'œdème ainsi que des zones hémorragiques. Une analyse de la réponse immunitaire chez les macaques a démontré une forte induction de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines mais une faible induction des interférons de type I (IFN I) (Kash et al., 2006; Kobasa et al., 2007). Finalement, grâce à la génétique inverse, des études ont été effectuées afin de déterminer quels segments contribuaient à la virulence. Les protéines NS1, PB1-F2, NA, mais particulièrement le complexe de polymérase et HA contribuent à la pathogenèse (Conenello et al., 2007; Glaser et al., 2005; Kobasa et al., 2004; McAuley et al., 2007; Pappas et al., 2008; Perrone et al., 2008; Qi et al., 2009; Tumpey et al., 2005b; Tumpey et al., 2007a; Van Hoeven et al., 2009b; Watanabe et al., 2009).

1.4.2 Grippe asiatique (H2N2, 1957)

La pandémie de la grippe asiatique a débuté en Chine à l'hiver 1957 et s'est propagée vers l'Amérique du Nord à l'automne. Les Amériques ont ensuite été frappées par une seconde vague à l'hiver 1958. L'agent causateur, un virus du sous-type H2N2, a davantage atteint les individus âgés de 5-19 ans et a causé environ 1 million de décès mondialement. Des analyses génétiques ont démontré que le virus provenait d'un réassortiment entre des virus humains et aviaires dont les gènes HA, NA et PB1 étaient issus (Kawaoka et al., 1989; Schafer et al., 1993). Puisque des études animales subséquentes ont démontré que le virus n'était pas particulièrement virulent, la mortalité accrue a été attribuée au fait que la population plus jeune ne possédait pas d'immunité pré-existante contre les virus H2N2. Il est soupçonné qu'une épidémie causée par un virus H2N2 aurait eu lieu dans les années 1889-1890, ce qui expliquerait l'immunité pré-existante des individus plus âgés (Mulder and Masurel, 1958). Finalement, depuis l'apparition de la grippe de Hong Kong en 1968, les virus H2N2 ne circulent plus dans la population humaine (Ma et al., 2007).

1.4.3 Grippe de Hong Kong (H3N2, 1968)

Le nouveau virus a été détecté pour la première fois en Chine à l'été 1968 et il s'est rapidement propagé dans le monde par la suite. Les personnes les plus atteintes étaient les jeunes de moins de 14 ans et les personnes âgées. Une faible mortalité a été associée à cette pandémie, probablement à cause de la présence d'anticorps anti-N2 dans la population. Le virus de la grippe de Hong Kong provient d'un réassortiment entre un virus humain et aviaire, dont les segments HA et PB1 proviennent (Kawaoka et al., 1989; Scholtissek et al., 1978; Webster and Laver, 1972).

1.4.4 Grippe russe (H1N1, 1977)

Les premiers cas de grippe russe sont survenus en Chine à l'été 1977 et le virus s'est disséminé vers l'Union des Républiques Soviétiques Socialistes quelques mois plus tard. Vers la mi-janvier 1978, les États-Unis ont eu leur première éclosion. La mortalité associée à ce virus a été relativement faible et surtout chez les personnes de moins de 25 ans, suggérant que les individus plus âgés avaient une immunité pré-existante. L'agent causateur de la pandémie, A/USSR/77 a en effet plusieurs similarités avec les souches ayant circulé dans la population dans les années 50 et serait en fait un descendant de la grippe espagnole de 1918 (Zakstelskaja et al., 1978; Zhdanov et al., 1978). Finalement, depuis ce temps, les virus H1N1 et H3N2 co-circulent dans la population.

1.4.5 Grippe A H1N1 (H1N1, 2009)

En avril 2009, un nouveau virus de type H1N1 a été identifié au Mexique et s'est rapidement propagé en Amérique du Nord et vers les autres continents. À ce jour, il est estimé qu'environ 214 pays ont été touchés par la pandémie et environ 18 000 décès lui ont été attribués (Fraser et al., 2009; Liu et al., 2011; Shinde et al., 2009). Des études phylogénétiques ont démontré que le virus était issu d'un réassortiment entre des virus porcins, aviaires et humains (Garten et al., 2009; Smith et al., 2009). Le virus de la grippe A H1N1 a causé en général une maladie moyennement sévère mais une forme plus grave, avec des symptômes atypiques pour une grippe saisonnière, a aussi été observée, particulièrement chez les jeunes (Chowell et al., 2009; Gill et al., 2010; Perez-Padilla et al., 2009). Des études animales chez les macaques, furets et souris ont démontré que certains isolats étaient effectivement plus virulents que d'autres, ce qui explique la variabilité dans la présentation de la maladie (Itoh et al., 2009; Maines et al., 2009; Safronetz et al., 2011). Finalement, le virus A H1N1 circule encore présentement dans la population mais sa prévalence est plus faible que les autres virus H1N1 et H3N2 circulants.

2. Étude de la pathogénèse

2.1 Pathogénèse humaine

L'infection par le virus de la grippe cause en général une maladie peu ou moyennement sévère qui peut aussi dégénérer dans des cas graves ou même mortels. La période d'incubation est courte, soit de un à deux jours suivant l'infection et le début de la maladie est généralement abrupt, caractérisé par l'apparition de céphalées, de myalgies, de frissonnements et d'une perte de poids. Un signe important de l'infection est le développement d'une fièvre atteignant 38 °C à 41 °C dans les premières 24 h et qui diminue dans les jours suivants. Dans les cas sans complication, l'infection est confinée au tractus respiratoire supérieur et se manifeste par de la congestion nasale, des éternuements et le développement de pharyngite. La toux et les maux de gorge peuvent persister pour plusieurs jours suivants l'apparition des premiers symptômes (Cate, 1987; Eccles, 2005; Wright et al., 1980). La réplication virale atteint un sommet de 1-2 jours suivant l'infection et le virus n'est généralement plus détectable dans les sécrétions nasales à partir des jours 6-8. La diminution du titre viral semble coïncider avec l'induction d'une réponse des IFN I, bien que d'autres facteurs contribuent aussi à la réduction de la charge virale (Figure 2) (Richman et al., 1976).

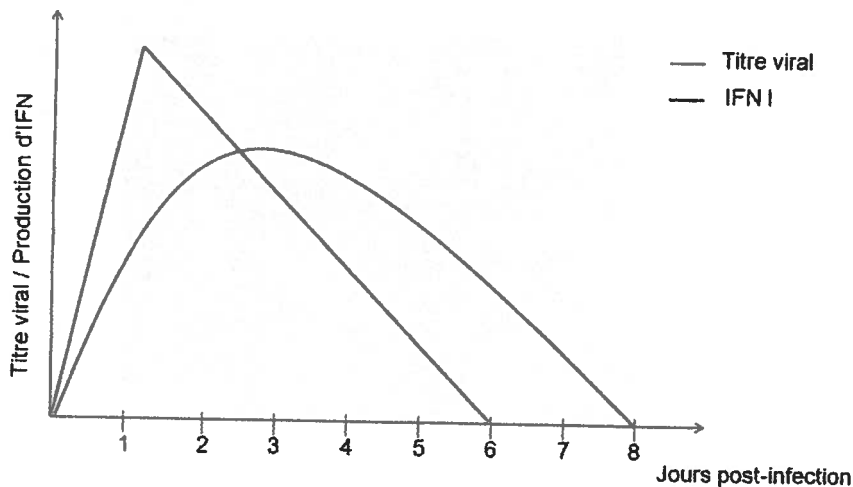


Figure 2 : Pathogénèse de l'infection par le virus de la grippe. Le virus atteint son titre maximal de 24 à 48 h suivant l'infection (rouge). La diminution du titre viral corrèle avec l'induction de la réponse aux IFN I (vert). La phase symptomatique, représenté par la zone en bleue, débute généralement 24 h post-infection et peut persister pour au moins une semaine. Inspiré de (Knipe, 2005).

Les complications suite à l'infection sont souvent retrouvées chez les très jeunes enfants ou les personnes âgées et inclus les pneumonies virales ou le développement d'infections bactériennes secondaires (Treanor, 2007). La pneumonie causée par le virus de la grippe commence typiquement par une infection du tractus respiratoire supérieur mais la maladie dégénère rapidement lorsque le virus se dissémine dans les poumons. Des symptômes plus graves comme la dyspnée et une baisse de la saturation en oxygène sont observables. Les infections secondaires bactériennes peuvent soit suivre l'infection primaire ou survenir en même temps et causent une consolidation des poumons (présence de liquide dans les alvéoles pulmonaires) (Martin et al., 1959; Rello and Pop-Vicas, 2009; Schwarzmann et al., 1971; van der Sluijs et al., 2010). Finalement, dans de rares cas, le virus peut se disséminer à l'extérieur du tractus respiratoire et être retrouvé dans différents organes tels que le cœur, le foie, la rate, les reins, les glandes surrénales et les méninges. Le virus a aussi pu être détecté dans le système nerveux central, dans les ganglions lymphatiques drainants le tractus respiratoire et dans les cytotrophoblastes et cellules de Hofbauer du placenta. Cependant, il est à noter que la dissémination à l'extérieur du tractus respiratoire a surtout été observée suite aux infections avec les virus H5N1 (Beigel et al., 2005; Dietzman et al., 1976; Gu et al., 2007; Lehmann and Gust, 1971).

2.2 Modèles animaux

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier la pathogenèse du virus de la grippe, sa transmission ainsi que pour le développement de vaccins et de drogues antivirales. Certains nécessitent l'adaptation préalable du virus, d'autres développent une maladie qui diffère de celle de l'humain et donc, selon le but de l'étude, un modèle animal sera plus avantageux qu'un autre.

2.2.1 Souris

La souris est le modèle animal le plus utilisé pour étudier le virus influenza en raison de son prix, la disponibilité de souches transgéniques et de réactifs. La susceptibilité des souris au virus dépend à la fois du fond génétique de la souris et de la souche virale (Itoh et al., 2009; Srivastava et al., 2009). La majorité des études sont réalisées avec les souris C57BL/6 et BALB/c avec les souches virales adaptées à la souris H1N1 A/PR/8/34 (PR/8) et A/WSN/33 (WSN33). Néanmoins, certaines souches virales peuvent directement infecter les souris sans adaptation préalable, dont le virus de la grippe espagnole de 1918, le virus pandémique de

2009, plusieurs virus H5N1 et certain sous-types H7 (Belser et al., 2010; Driskell et al., 2010; Itoh et al., 2009; Joseph et al., 2007; Lu et al., 1999; Maines et al., 2009; Tumpey et al., 2005a). En raison de la prédominance des acides sialiques α -2,3 dans leur tractus respiratoire, les souris sont peu susceptibles aux virus humains qui reconnaissent préférentiellement les acides sialiques α -2,6 (Glaser et al., 2007; Ibricevic et al., 2006). Contrairement aux humains, les souris ne développent pas de fièvre, ne toussent pas, n'éternuent pas et la réplication virale se produit principalement dans le tractus respiratoire inférieur, ce qui fait en sorte que la maladie est souvent plus sévère que celle observée chez l'humain (Belser et al., 2007; Belser et al., 2010; Dybing et al., 2000; Hatta et al., 2001). De plus, dans le cas des virus hautement pathogènes, la dissémination à l'extérieur du tractus respiratoire est plus prononcée que chez l'humain (de Jong et al., 2005). De plus, certains virus de sous-type H7 sont très virulents chez la souris mais peu pathogènes chez l'humain. Donc, la sévérité de la maladie observée chez la souris ne corrèle pas nécessairement avec celle observée chez l'humain (Joseph et al., 2007). Finalement, la transmission du virus entre souris est encore controversée (Schulman, 1968).

2.2.2 Furets

Les furets, tout comme les souris, ont été utilisés depuis les premières isolations du virus de la grippe pour des études de pathogénèse (Francis and Magill, 1935; Francis and Stuart-Harris, 1938a, b). Ces animaux sont naturellement susceptibles aux virus humains et peuvent également être infectés par des virus porcins ou aviaires sans qu'aucune étape d'adaptation virale ne soit nécessaire (Jackson et al., 2009; Kim et al., 2009; Munster et al., 2009; Shope, 1934; Sweet et al., 1985; Wan et al., 2008). Tout comme pour l'humain, l'infection chez les furets est principalement localisée dans le tractus respiratoire supérieur et seulement les souches les plus pathogènes peuvent se disséminer dans les poumons. De plus, ils possèdent une prédominance des acides sialiques α -2,6, aussi une caractéristique partagée avec les humains (Maher and DeStefano, 2004; Smith and Sweet, 1988; van Riel et al., 2007). Les animaux infectés développent les mêmes symptômes que l'humain dont la fièvre, éternuements, congestion, pertes nasales et perte de poids (Smith and Sweet, 1988; Svitek et al., 2008). Les furets sont aussi capable de transmettre efficacement le virus à d'autres animaux, autant par contact direct que par aérosols (Francis and Magill, 1935; Herlocher et al., 2001; Maines et al., 2009; Munster et al., 2009). Puisqu'ils reproduisent bien la maladie et la réponse immunitaire retrouvées chez l'humain, les furets sont beaucoup utilisés pour des études de pathogénèse, de virulence et afin de caractériser les facteurs pouvant influencer la transmission virale. Ils sont

aussi utilisés pour des études de développement de drogues antivirales et de vaccins (Hoffmann et al., 2005; Mishin et al., 2005; Sweet et al., 2002).

Néanmoins, l'utilisation du furet pour l'étude du virus de la grippe comporte aussi certains inconvénients. Tout d'abord, contrairement aux souris, les furets ne sont pas syngéniques, c'est-à-dire qu'ils diffèrent au niveau de l'expression de différents locus génétiques. Bien que plus représentatif de la réalité, cela emmène une plus grande variabilité dans les groupes. En conséquence, un plus grand nombre d'animaux est souvent nécessaire afin de voir des différences significatives. De plus, des études avec des animaux déficients dans l'expression d'un gène ne peuvent être effectuées avec ce modèle animal. Un autre désavantage de l'utilisation des furets est qu'ils sont plus dispendieux et nécessitent un plus grand espace d'hébergement, ce qui augmente les coûts de la recherche (Bouvier and Lowen, 2010). Finalement, peu de réactifs immunologiques sont commercialement disponibles à ce jour. Néanmoins, plusieurs cytokines de furets ont été séquencées et peuvent donc être analysées par PCR quantitatif. De plus, les cytokines de furets et de chien présentent une grande homologie de séquences, ce qui fait en sorte que les puces à ADN conçues pour le chien ont été utilisées avec succès pour analyser certaines réponses immunitaires chez le furet (Cameron et al., 2008; Svitek et al., 2008; Svitek and von Messling, 2007). Finalement, plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la souris peuvent reconnaître des protéines exprimées par les lymphocytes de furets (Fang et al., 2010; Rutigliano et al., 2008).

2.2.3 Primates non-humains

Les primates non-humains peuvent être infectés par des virus humains, sans adaptation préalable (Itoh et al., 2009; Rimmelzwaan et al., 2001; Rimmelzwaan et al., 2006). L'infection par voie intra-nasale est associée à peu de symptômes tandis que l'infection intra-trachéale permet de reproduire davantage la maladie observée chez l'humain (Saslaw et al., 1946). En raison des similarités génétiques et physiologiques entre les humains et les macaques, ces derniers ont été utilisés pour étudier les gènes induits suite à l'infection (Baas et al., 2006; Cilloniz et al., 2009; Kobasa et al., 2007), l'immunogénicité et l'efficacité de vaccins et de drogues antivirales (Baskin et al., 2007; Fan et al., 2004; Fan et al., 2009; Laddy et al., 2009). Par contre, les macaques diffèrent des humains quant au patron d'attachement viral. En effet, les virus humains infectent avec une très faible efficacité la trachée et les alvéoles des macaques. De plus, les virus H5N1 infectent davantage les pneumocytes de type I tandis que chez l'humain, les pneumocytes de type II sont davantage ciblés (van Riel et al., 2007).

2.2.4 Cochon d'Inde

Les cochons d'Inde sont naturellement susceptibles aux virus saisonniers humains, aux virus pandémiques de 2009 et de 1918 ainsi qu'aux virus H5N1 (Gao et al., 2009; Lowen et al., 2006; Lowen et al., 2009; Phair et al., 1979; Steel et al., 2009; Tang and Chong, 2009; Van Hoeven et al., 2009a). Ils peuvent aussi être infectés par des isolats aviaires et porcins mais de façon beaucoup moins efficace (Steel et al., 2009; Van Hoeven et al., 2009a). Le virus se réplique principalement dans le tractus respiratoire supérieur à des titres élevés mais les animaux ne développent aucun symptôme. Par ailleurs, il est possible d'observer de la pathologie au niveau des fosses nasales mais aussi dans les poumons (Azoulay-Dupuis et al., 1984; Kwon et al., 2009; Tang and Chong, 2009; Van Hoeven et al., 2009a). Les cochons d'Inde sont principalement utilisés pour les études de transmission et très peu pour des études vaccinales ou pour l'évaluation de drogues antivirales puisqu'ils ne développent pas de symptôme visible (Bouvier and Lowen, 2010; Lowen et al., 2006).

2.2.5 Porcs

Les porcs ont suscité de l'intérêt comme modèle animal en raison du rôle important qu'ils peuvent jouer dans l'adaptation et la transmission de virus à l'humain. Lorsqu'ils sont infectés, les porcs développent de la fièvre, une difficulté à respirer et de la toux (Barnard, 2009). Ils sont peu susceptibles aux virus H5N1 et le virus de la grippe espagnole y cause une maladie beaucoup moins importante que chez d'autres mammifères (Isoda et al., 2006; Lipatov et al., 2008; Weingartl et al., 2009). Les porcs ont surtout été utilisés dans des études pour le développement de vaccins porcins (van der Laan et al., 2008).

2.2.6 Autres

Les chats et les chiens peuvent être infectés par les virus H5N1 (Cleaveland et al., 2006; Giese et al., 2008). Suite à une l'infection des chats, le virus est retrouvé dans les tractus digestif et respiratoire, les reins, le foie, les ganglions et le cerveau. La pathologie aux poumons est comparable à celle retrouvée dans d'autres modèles animaux (Rimmelzwaan et al., 2006). Des études avec ces derniers ont été effectuées afin de tester l'efficacité de drogues antivirales ainsi que des vaccins (Karaca et al., 2005; Vahlenkamp et al., 2008).

Les rats cotonniers sont naturellement susceptibles aux virus humains et démontrent des signes cliniques et une cinétique de répllication virale similaires à l'humain (Eichelberger, 2007; Ottolini et al., 2005). Le virus peut infecter le tractus respiratoire supérieur et aussi se rendre dans les poumons. Les rats ont été utilisés pour étudier les facteurs de l'hôte pouvant contribuer à la

susceptibilité à l'infection (Daniels et al., 2003), pour des études vaccinales (Alarcon et al., 2007; Straight et al., 2008) ainsi que pour le développement de drogues antivirales (Eichelberger et al., 2004; Stertz et al., 2007).

Finalement, les hamsters sont naturellement susceptibles aux virus humains (Abou-Donia et al., 1980; Jennings et al., 1974; Reeve, 1978). Tout comme pour l'humain, le virus infecte principalement le tractus respiratoire supérieur, où il peut être retrouvé à des titres élevés et il peut aussi être détecté dans les poumons. Par contre, les animaux ne développent aucun symptôme ni de pathologie aux poumons (Potter and Jennings, 1976; Reeve et al., 1981). De plus, ils semblent pouvoir transmettre le virus par contact direct mais pas par aérosols (Ali et al., 1982). Les hamsters ont surtout été utilisés dans des études vaccinales (Mills et al., 1971).

3. Réponse immunitaire induite contre le virus de la grippe

3.1 Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense contre une infection par le virus de la grippe. Le tractus respiratoire possède plusieurs mécanismes de défense non-spécifiques comme la couche de mucine, les collectines, les protéines du surfactant, les cils présents sur certaines cellules ainsi que certains inhibiteurs de protéases. L'action concertée de ces composants peut contribuer à prévenir l'infection. Finalement, les cellules épithéliales infectées ainsi que les cellules du système immunitaire inné vont générer une réponse immunitaire qui permettra le contrôle de l'infection et l'induction de la réponse immunitaire adaptative.

3.1.1 Réponse des cellules épithéliales à l'infection

Les cellules épithéliales du tractus respiratoire sont les premières cellules ciblées par le virus de la grippe. Elles sont responsables de la vague initiale de production de cytokines et déclenchent les réponses inflammatoires initiale et systémique (Van Reeth, 2000).

3.1.1.1 Reconnaissance intracellulaire du virus

Le virus peut être reconnu par différents types de récepteurs intracellulaires dans les cellules épithéliales infectées. Ces récepteurs, nommés *pattern recognition receptors* (PRR) reconnaissent des motifs communs à plusieurs pathogènes comme les sucres, peptidoglycans, acides nucléiques, peptides bactériens et les acides lipothéichoïques. Les PRR sont divisés en trois familles distinctes soit les *toll-like receptors* (TLR), *nod-like receptors* (NLR) et les *retinoic acid-inducible gene 1 protein (RIG-I)-like helicases* (RLR). Le TLR3 est exprimé par plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales, et reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) qui pourrait être présent sous forme de produit intermédiaire lors de la réplication virale (Botos et al., 2009; Ciencewicky et al., 2009; Matsumoto et al., 2011; Miettinen et al., 2001). L'activation du TLR3 mène à la synthèse d'IFN- β et des cytokines interleukine-6 (IL-6), -8 et RANTES par la voie de signalisation de *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) et de *interferon regulatory factor 3* (IRF3) (Guillot et al., 2005). Conséquemment, des souris déficientes en TLR3 produisent moins de ces cytokines et d'IFN- β suite à l'infection par le virus de grippe. Par ailleurs, elles ont un taux de survie plus élevé que les souris de type sauvage, malgré une charge virale plus élevée (Le Goffic et al., 2006).

RIG-I est un membre de la famille des RLR qui s'associe et reconnaît les ARN avec une extrémité 5' tri-phosphatée (Cui et al., 2008; Hornung et al., 2006; Nallagatla et al., 2007). Lorsqu'il est activé, RIG-I se lie à la protéine adaptatrice *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS, ou aussi connu sous les noms de CARDIF, IPS-1 et VISA) et active des voies de signalisation menant à la translocation nucléaire de NF- κ B et/ou à l'activation de IRF3/7 menant à l'induction de la réponse aux IFN I (Dev et al., 2011; Paz et al., 2006; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005; Yoneyama et al., 2004).

Finalement, le virus de la grippe est reconnu par deux membres de la famille des NLR, soit NLRP3 et NOD2. NLRP3 est une des protéines qui composent l'inflammasome. Suite à un stimulus approprié, les protéines de l'inflammasome vont s'assembler et permettre l'activation de la caspase-1 qui clive les précurseurs de l'IL-1 β , -18, -33 et l'IL-1 γ en leur forme biologiquement active (Martinon and Tschopp, 2004). L'infection par le virus de la grippe provoque une augmentation de la production d'IL-1 β et d'IL-18, ce qui favorise le recrutement des monocytes et neutrophiles au site d'infection. Il a récemment été démontré que la protéine M2 du virus était responsable de l'activation de l'inflammasome (Ichinohe et al., 2010). Des souris déficientes en NLRP3 ont moins d'inflammation aux poumons mais ont une charge virale plus élevée et un plus haut taux de mortalité (Allen et al., 2009; Thomas et al., 2009). Quant à NOD2, il est induit par l'ARN simple brin et faciliterait l'activation d'IRF3 et la production d'IFN- β (Lecat et al., 2010; Sabbah et al., 2009). Conséquemment, des souris déficientes pour NOD2 produisent moins d'IFN suite à une infection par le virus de la grippe (Sabbah et al., 2009).

3.1.1.2 Production des interférons de type I

Une des premières réponses antivirales des cellules épithéliales est la production d'IFN I. Les IFN I chez l'humain comprennent l'IFN- α (12 sous-types différents), - β , - ω , - κ , - ϵ , - ξ (limitine), - τ , - δ et - ν . Comme il l'a été mentionné précédemment, la production des IFN I est déclenchée suite à la reconnaissance de PAMPs soit par les TLR-3, -7, -9, NOD2, PKR ou les RLR. La signalisation par RIG-I/MDA-5 requiert la présence de la molécule MAVS qui mène à l'activation d'IRF3, qui transloquera par la suite au noyau et se liera au promoteur de l'IFN.

Les régions 5' des gènes de l'IFN- α/β possèdent plusieurs éléments régulateurs permettant leur activation suite à une infection virale. En effet, dans une cellule infectée le *virus responsive element* (VRE) devient accessible à plusieurs facteurs de transcription afin de permettre la synthèse des IFN I. Entre autres, le VRE contient des séquences GAAANN qui permettent la

liaison aux IRF et, dans le cas du promoteur de l'IFN- β , il y a une séquence de liaison à NF- κ B et Rel (Weidle and Weissmann, 1983). La synthèse de l'IFN- β débute suite au recrutement au site VRE de NF- κ B, des IRF-3/7 et de l'*activated protein 1* (AP-1) (Ali et al., 1982; Parekh and Maniatis, 1999; Thanos and Maniatis, 1995a, b). Le promoteur de l'IFN- α , quant à lui, ne possède pas de séquence de liaison à NF- κ B et contient plusieurs séquences répétées AANNGAA qui permettent la liaison des IRFs activés suite à l'infection. Dans ce cas, l'IRF-7 semble le médiateur le plus important dans l'activation de la transcription de l'IFN- α (Civas et al., 2002; Genin et al., 2009; Honda et al., 2005; Kawai et al., 2004).

Une fois relâchés dans le milieu, les IFN I pourront avoir plusieurs effets antiviraux. L'IFN- α et - β partagent un récepteur commun nommé *IFN- α/β receptor* (IFNAR), composé de deux sous-unités, IFNAR-1 et IFNAR-2. Suite à la liaison au récepteur, les protéines Jak1 et Tyk2 sont activées et phosphorylent les molécules Stat 1 et Stat 2. Ces dernières s'associent alors avec IRF-9 (p48, ISGF3 γ) formant le complexe *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3) qui transloque au noyau afin d'induire la transcription des gènes induits par les IFN (*interferon stimulated genes*, ISG). Ces derniers possèdent tous dans leur promoteur une séquence *IFN-stimulated response elements* (ISRE) (**Figure 3**). La transcription de ces gènes mène à la production de protéines avec un potentiel anti-viral dont PKR, *2',5'-oligoadenylate synthetase* (OAS)/RNaseL et la *myxovirus resistance protein* (Mx). Cette dernière est particulièrement importante pour contrôler les infections aux orthomyxovirus puisque les souris de laboratoire déficientes pour la protéine sont hautement susceptibles au virus (Pavlovic et al., 1992; Staeheli et al., 1988).

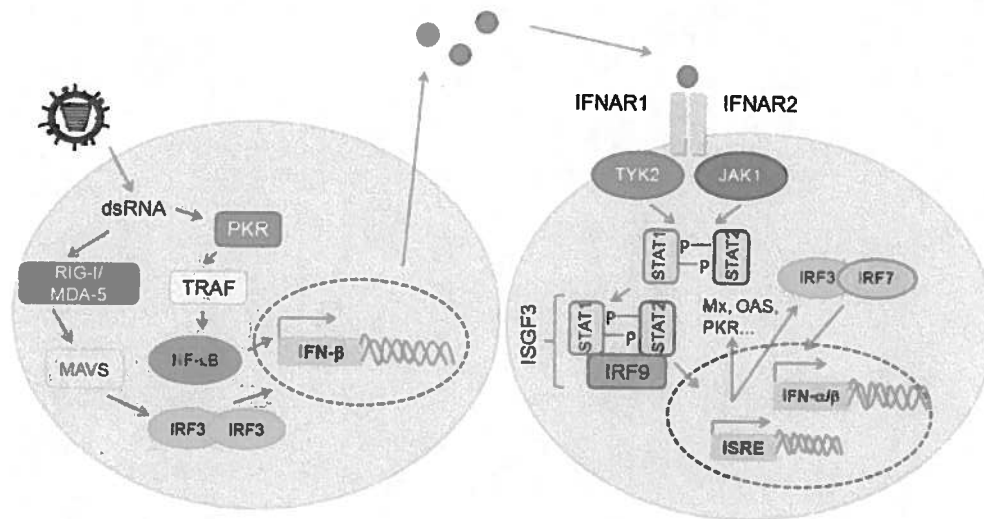


Figure 3 : Induction et signalisation de la réponse aux IFN I suite à une infection virale. Des sous-produits de la réplication virale comme l'ARN double brin (dsRNA) sont détectés par des récepteurs intracellulaires menant à l'activation de facteurs de transcriptions comme NF- κ B et IRF-3. L'action concertée de ces facteurs mène à l'activation du promoteur de l'IFN- β . Une fois synthétisé, l'IFN- β peut se lier à son récepteur composé de deux sous-unités, soit IFNAR1 et 2. Ceci mène à la phosphorylation de STAT1/2 et l'activation de plusieurs gènes induits par les IFN. L'IRF-7 amplifie la réponse aux IFN en induisant la production d'IFN- β et de divers sous-types d'IFN- α . Inspiré de (Haller et al., 2006).

3.1.1.3 Production de cytokines et chimiokines

Outre les IFN I, les autres cytokines produites par les cellules épithéliales sont le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), l'IL-1 α/β , l'IL-6, -8, l'*interferon gamma inducible protein 10* (IP-10), RANTES, les *monocyte chemoattractant proteins* (MCP) et les *macrophage inflammatory proteins* (MIP). Typiquement, chez les humains, ces cytokines atteignent un sommet de 1 à 2 jours suivant l'infection (Sanders et al., 2011; Van Reeth, 2000). Le TNF- α , IL-6 et l'IL-1 sont les principales cytokines responsables des effets systémiques comme la fièvre, l'anorexie et la sensation de fatigue. Les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales agissent en permettant le recrutement rapide des cellules immunitaires au site d'infection et en favorisant leur activation. Néanmoins, une trop forte induction peut aussi contribuer à la pathologie comme il l'a été observé pour plusieurs virus de la grippe plus virulents (Baskin et al., 2009; Chan et al., 2010; Oslund and Baumgarth, 2011).

3.1.2 Rôle des macrophages alvéolaires

À l'état basal, les poumons possèdent deux types de cellules phagocytaires : les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC) et les macrophages alvéolaires (*alveolar macrophages*, aM ϕ)

qui prédominent par leur nombre. En absence d'infection, les aM ϕ ont un rôle plutôt régulateur et inhibent les réponses immunitaires innée et adaptative (Holt, 1978; Strickland et al., 1993). Par contre, suite à une infection par le virus de la grippe, les aM ϕ deviennent des cellules avec un fort potentiel phagocytaire et peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6 et le TNF- α (Becker et al., 1991). Le rôle des aM ϕ dans la protection contre le virus de la grippe n'est pas très clair à l'heure actuelle. La déplétion des aM ϕ avant l'infection est associée à une mortalité plus élevée chez les souris, et, chez les porcs, à une plus grande morbidité, des titres d'anticorps plus faibles et à un nombre réduit de lymphocytes TCD8⁺ spécifiques au virus. Une autre des fonctions des aM ϕ est de phagocyter les cellules apoptotiques afin de limiter la propagation du virus et, conséquemment, la diminution du nombre de aM ϕ est associé à un titre viral plus élevé (Hashimoto et al., 2007; Kim et al., 2008a; Tumpey et al., 2005b). À l'opposé, les aM ϕ peuvent avoir un effet négatif sur l'hôte. La production de TNF- α et de monoxyde d'azote par les aM ϕ et de façon moins importante par les DC, peut contribuer à l'immunopathologie (Dawson et al., 2000; Herold et al., 2006; Perrone et al., 2008). De plus, les aM ϕ recrutés au site d'infection expriment à leur surface le *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), ce qui favorise l'induction d'apoptose chez les cellules épithéliales et contribue aussi à la pathologie (Herold et al., 2008).

3.1.3 Rôle des cellules dendritiques

Les DC jouent un rôle crucial dans la réponse contre le virus de la grippe en permettant de faire le pont entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules sont localisées un peu partout dans le tractus respiratoire, incluant le parenchyme pulmonaire, les espaces alvéolaires et l'épithélium respiratoire (Lambrecht and Hammad, 2003; Pollard and Lipscomb, 1990; Stumbles et al., 2003; von Garnier et al., 2005). Suite à la reconnaissance du virus, elles produisent diverses cytokines dont l'IL-6, -8, -12, TNF- α , IP-10, RANTES, MIP-1 β et, de façon plus importante, les IFN I (Guermonprez et al., 2002). Les IFN I sont très importants dans le contrôle des infections par le virus de la grippe mais peuvent aussi favoriser l'immunité adaptative en augmentant la maturation des DC et en favorisant la survie et le développement des fonctions effectrices des lymphocytes TCD8⁺ (Durbin et al., 2000; Kolumam et al., 2005; Marrack et al., 1999; Price et al., 2000). La présentation antigénique se fait dans les ganglions lymphatiques drainant la région pulmonaire dans les deux premiers jours suivant l'infection, atteint son sommet à environ 3 jours post-infection et pourrait être maintenue jusqu'au jour 9 (Belz et al., 2004). Finalement, l'infection par le virus de la grippe provoque aussi un recrutement massif de DC et de DC

plasmacytoïdes aux poumons pour au moins 6 jours post-infection (Belz et al., 2004; Legge and Braciale, 2003).

3.1.4 Rôle des cellules NK

Les *natural killer cells* (cellules NK) ont une activité cytotoxique envers les cellules infectées et peuvent produire plusieurs cytokines dont l'IFN- γ , le TNF- α et MIP-1 α (Long et al., 2008; Robertson and Ritz, 1990; Tay et al., 1998; Trinchieri, 1989). Dans le cas du virus de la grippe, il a été observé que les récepteurs NKp44 et NKp46 permettaient de reconnaître la protéine HA (Arnon et al., 2001; Draghi et al., 2007; Mandelboim et al., 2001; Mendelson et al., 2010). La diminution de la population de cellules NK avant l'infection est associée à une augmentation de la mortalité chez les souris et les hamsters, suggérant un rôle important de ces cellules pour le contrôle du virus (Stein-Streilein and Guffee, 1986).

3.2 Réponse immunitaire adaptative

3.2.1 Réponse humorale

L'infection par le virus de la grippe induit la production d'anticorps qui commencent à être détectables dans le sérum et les lavages nasaux à environ 8 jours post-infection (Richman et al., 1976). Les anticorps produits sont majoritairement d'isotypes IgG, IgA et IgM et reconnaissent principalement les protéines virales de surface HA et NA (Gerhard, 2001). Les anticorps anti-HA qui se lient à la tête globulaire de la protéine empêchent l'entrée du virus dans la cellule-cible. Ils favorisent aussi la cytotoxicité dépendante des anticorps médiée par les cellules NK et les neutrophiles (Kreijtz et al., 2011). La tige de la protéine HA présente généralement moins de variabilité antigénique et moins de variation entre différents sous-types. Des anticorps dirigés contre cette région sont aussi retrouvés en plus faible quantité et présentent l'avantage de pouvoir neutraliser plusieurs sous-types différents du virus (Ekiert et al., 2009; Ekiert et al., 2011; Sui et al., 2009). Les anticorps contre NA ont également un potentiel protecteur en limitant l'activité enzymatique de NA et permettent donc de diminuer la propagation du virus (Mozdzanowska et al., 1999). Finalement, une réponse humorale est aussi induite contre les protéines M2 et NP et peut également contribuer à protéger l'hôte en favorisant l'élimination du virus (Carragher et al., 2008; Treanor et al., 1990; Zebedee and Lamb, 1988).

3.2.2 Réponse cellulaire

L'infection par le virus de la grippe induit l'activation des lymphocytes TCD8⁺ (lymphocytes T cytotoxiques), TCD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires ou *T helper cells* (Th)) ainsi que des lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Kreijtz et al., 2011). Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires et sont recrutés au site d'infection vers les jours 5 à 7 suivants l'infection où ils reconnaissent et éliminent les cellules infectées grâce à la libération de perforine et granzyme (Lawrence et al., 2005). Ils peuvent aussi induire l'apoptose des cellules infectées grâce à l'interaction Fas-Fas Ligand. Finalement, les lymphocytes T cytotoxiques produisent plusieurs cytokines qui favorisent l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH I) et qui ont des fonctions antivirales (Doherty et al., 1997; Harty et al., 2000; Kagi et al., 1996; Smyth et al., 2001). Les protéines virales principalement reconnues par les lymphocytes TCD8⁺ sont HA, PB2, M1, NP et PA. Puisque M1, NP et PA sont assez bien conservées, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à ces protéines peuvent permettre une protection croisée entre différents sous-types (Boon et al., 2002; Fleischer, 1985; Gotch et al., 1987; Jameson et al., 1998; McMichael et al., 1983; Wang et al., 2007; Yewdell et al., 1985). Les lymphocytes TCD4⁺, quant à eux, reconnaissent principalement des épitopes localisés dans les protéines HA, M et NP (Fischer et al., 1982; Gao et al., 1989, 1990; Gerhard et al., 1983). Deux sous-types différents de lymphocytes T auxiliaires sont activés suite à l'infection et auront des fonctions différentes. Les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2 afin de soutenir la réponse cytotoxique tandis que les lymphocytes Th2 sécrètent davantage de l'IL-4 et l'IL-13 afin de promouvoir la production d'anticorps par les lymphocytes B (Abbas et al., 1996; Brown et al., 2004; Lamb et al., 1982). Une autre sous-population de lymphocytes Th, les lymphocytes Th17 favoriseraient la réponse des lymphocytes Th et pourraient avoir un rôle protecteur dans les cas sévères d'infection par le virus de la grippe (Almansa et al., 2011; Iwakura et al., 2008; Lee et al., 2011). Finalement, le rôle des Tregs dans le cadre d'une infection par le virus de la grippe n'est pas encore bien compris. Certaines études ont démontré qu'ils pourraient permettre un contrôle de l'expansion des lymphocytes Th, des réponses humorale et inflammatoire mais leur déplétion avant l'infection n'a aucun effet sur la pathogenèse (Antunes and Kassiotis, 2010; Betts et al., 2011; Surls et al., 2010).

4. Facteurs de virulence

Le virus de la grippe cause une infection aiguë du tractus respiratoire qui est contrôlée en grande partie par le système immunitaire inné. En raison des effets délétères de cette réponse immunitaire, le virus a développé plusieurs stratégies, soit pour augmenter sa vitesse de réplication, soit pour directement en contrecarrer les effets. De ce fait, plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés jusqu'à maintenant.

4.1 NS1

4.1.1 Expression et localisation cellulaire

NS1 est une protéine non-structurale et est donc strictement exprimée dans les cellules infectées. Des études phylogénétiques basées sur les séquences en acides aminés ont permis de séparer les protéines NS1 en deux groupes nommés allèle A et allèle B (Ludwig et al., 1991; Treanor et al., 1989). Les NS1 de l'allèle A proviennent de virus aviaires, humains, porcins et équins, tandis que ceux de l'allèle B proviennent exclusivement de virus aviaires. Les membres des deux allèles démontrent une homologie de séquence de 62% tandis qu'à l'intérieur d'une même allèle, le degré d'homologie peut varier de 93-100% (Treanor et al., 1989). Il semblerait que les protéines NS1 de l'allèle A permettent une meilleure réplication chez les mammifères et sont sous une plus forte pression de sélection que celles de l'allèle B (Ludwig et al., 1991; Treanor et al., 1989). Finalement, les virus hautement pathogènes expriment toujours le NS1 de l'allèle A (Zohari et al., 2008).

La protéine NS1 est codée par le segment 8 du virus, soit le gène NS, qui mène à la production de NS1 et de NS2/NEP suite à l'épissage alternatif (Inglis et al., 1979; Lamb and Choppin, 1979). Les deux protéines partagent 56 nucléotides à la région 5' ou 10 acides aminés dans la région N-terminale (Lamb and Lai, 1980). NS1 a une longueur de 230-237 acides aminés qui varie selon les souches. Dans les années 1940, les virus H1N1 ont gagné une extension de 7 résidus à la partie C-terminale qui a par la suite été conservée par les virus H1N1, H2N2 et H3N2 jusqu'aux années 1980.

La localisation cellulaire de NS1 peut varier selon les souches, le type cellulaire, l'abondance de la protéine, la polarisation des cellules et le temps post-infection, mais elle est généralement retrouvée dans le noyau et dans le cytoplasme, particulièrement vers la fin du cycle de réplication (Greenspan et al., 1988; Li et al., 1998; Newby et al., 2007). En fonction de la souche de laquelle elle provient, NS1 peut avoir un ou deux signaux de localisation nucléaire lui

permettant d'interagir avec l'importine α pour le transport actif du cytoplasme vers le noyau (Melen et al., 2007; Privalsky and Penhoet, 1981). De plus, un signal de localisation au nucléole (*nucleolar localization signal* (NoLS)) est présent chez certaines souches virales mais la présence de la protéine au nucléole ne semble pas importante pour la réplication (Melen et al., 2007; Murayama et al., 2007).

La protéine NS1 est divisée en deux domaines fonctionnels. La partie N-terminale, composée des acides aminés 1 à 73, permet la liaison à l'ARN, avec RIG-I et certaines protéines cellulaires et contient le premier signal de localisation au noyau (*nuclear localisation signal*, NLS) (**Figure 4**). La liaison à l'ARN est dépendante de l'homodimérisation du domaine N-terminal, chaque monomère étant composé de trois hélices α (Chien et al., 1997; Liu et al., 1997). De plus, une arginine à la position 38 ainsi qu'une lysine à la position 41 sont essentielles pour la liaison à l'ARN puisque le remplacement de ces acides aminés par des alanines bloque cette activité (Donelan et al., 2003; Wang et al., 1999; Yin et al., 2007). Le domaine C-terminal comprend les acides aminés 73 à 207 et peut s'homodimériser, chaque monomère étant composé de sept feuillets β et 3 hélices α . Ce domaine est responsable de la majorité des interactions avec les protéines de l'hôte mais contribue aussi à stabiliser le domaine N-terminal de la protéine (Bornholdt and Prasad, 2006; Hale et al., 2008a; Wang et al., 2002). Finalement, la structure associée aux derniers 25 acides aminés n'est pas encore connue, mais cette région contient le deuxième NLS et le NoLS présents chez certaines souches. Il a été émis comme hypothèse qu'elle pourrait adopter une conformation plus définie suite à la liaison avec un ligand particulier (Hale et al., 2008b).

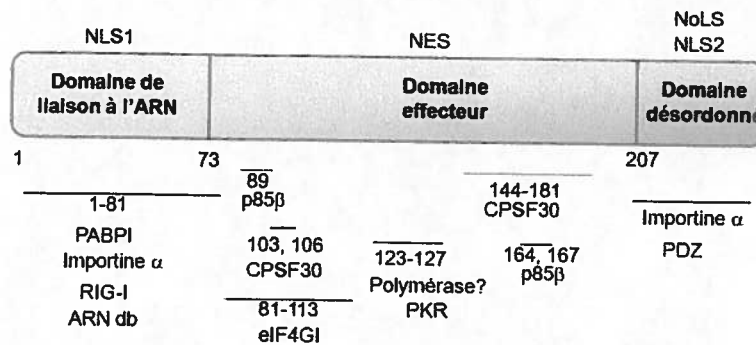


Figure 4 : Représentation schématique de la protéine NS1. La protéine NS1 a une longueur de 230-237 a.a. selon les souches. Elle est séparée en deux domaines fonctionnels, soit un domaine N-terminal, ou domaine de liaison à l'ARN, des a.a. 1 à 73 et d'un domaine C-terminal, ou domaine effecteur, des a.a. 73 à 207. La structure à l'extrémité C-terminale n'est pas encore connue et serait désordonnée. Les protéines avec lesquelles NS1 peut interagir, ainsi que les a.a. importants pour cette liaison sont énumérés. Les signaux de localisation au noyau et au nucléole ainsi que celui d'export nucléaire sont aussi indiqués. Inspiré de (Hale et al., 2008b).

4.1.2 Fonctions dans la réplication virale

La protéine NS1 joue un rôle clé dans la modulation de la réponse de l'hôte mais aussi dans la réplication virale. Tout d'abord, NS1 peut réguler négativement l'épissage des segments 7 et 8 par plusieurs mécanismes différents (Fortes et al., 1994; Garaigorta and Ortin, 2007; Lu et al., 1994). Grâce à son domaine N-terminal, la protéine peut inhiber l'export nucléaire du segment 8 (Alonso-Caplen and Krug, 1991; Alonso-Caplen et al., 1992; Garaigorta and Ortin, 2007). NS1 pourrait aussi interagir avec une protéine cellulaire qui a été nommée *NS1-binding protein* (NS1-BP) (Fortes et al., 1995; Wolff et al., 1998) ou dissocier les complexes entre les *small nuclear RNA* (smRNA) qui sont aussi des composantes essentielles du complexe d'épissage (Lu et al., 1994; Qiu et al., 1995; Wang and Krug, 1998). Finalement, selon une étude récente, la capacité de contrôler l'épissage des segments 7 et 8 varie selon les souches et le virus de la grippe espagnole aurait peu de produits épissés, résultant en une quantité accrue de NS1, pouvant contribuer à la pathogenèse (Backstrom Winqvist et al., 2011). La protéine NS1 semble aussi favoriser la synthèse d'ARNv, mais le mécanisme précis par lequel elle le fait n'est pas bien connu et pourrait être spécifique à la souche (Falcon et al., 2004; Hatada and Fukuda, 1992; Hatada et al., 1997; Marion et al., 1997; Twu et al., 2007; Wolstenholme et al., 1980). Finalement, NS1 peut aussi favoriser la traduction des ARNm viraux (Enami et al., 1994). Pour ce faire, la protéine se lie aux régions 5' non-traduites (*untranslated regions*, UTR) des ARNm viraux ainsi qu'à plusieurs protéines cellulaires faisant partie du complexe de traduction dont eIF4GI, la sous-unité large de eIF4F et la *poly(A)-binding protein I* (PABPI) qui est une protéine

interagissant avec eIF4GI (Aragon et al., 2000; Burgui et al., 2003; Feigenblum and Schneider, 1993; Park and Katze, 1995). De plus, NS1 peut s'associer et provoquer la redistribution de hStaufen qui est responsable du transport microtubulaire des ARNm aux sites où s'effectue la traduction et ainsi diriger les ARNm viraux vers les sites cellulaires de traduction (Falcon et al., 1999).

4.1.3 Interaction entre NS1 et la survie cellulaire

Le rôle de NS1 dans la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose est encore mal compris puisqu'autant des fonctions pro- et anti-apoptotiques lui ont été attribuées. Ces résultats contradictoires pourraient être attribués aux différentes techniques, différents types cellulaires ou différentes souches utilisées. Alternativement, il se pourrait que NS1 inhibe l'apoptose à des stades précoces de la réplication et la déclenche à la fin du cycle de réplication afin de favoriser le relargage de particules virales. Les effets anti-apoptotiques de NS1 ont beaucoup été associés à son inhibition de la réponse aux IFN I. En effet, dans les cellules MDCK, des virus déficients en NS1 induisent une forte production d'IFN et beaucoup d'apoptose (Zhirnov et al., 2002). De plus, l'inhibition de PKR, OAS/RNaseL et de la voie de stress AP-1/JNK ou l'activation de la voie PI3K par NS1 contribue aux effets anti-apoptotiques (Ehrhardt et al., 2007; Ludwig et al., 2002; Min and Krug, 2006; Shin et al., 2007; Takizawa et al., 1996). En effet, NS1 peut se lier à la sous-unité p85 β de la PI3K kinase (Ehrhardt et al., 2007; Hale et al., 2006; Li et al., 2008; Shin et al., 2007; Zhang et al., 2010; Zhirnov and Klenk, 2007). De façon intéressante, la protéine NS1 de virus d'origine aviaire, mais pas celle des virus humains, provoquerait une hyper-activation de la PI3K en se liant à Crk et/ou CrkL. (Finkelstein et al., 2007; Heikkinen et al., 2008). À l'inverse, NS1 induit l'apoptose soit en activant p53 ou directement certaines caspases (Lam et al., 2008; Schultz-Cherry et al., 2001; Stasakova et al., 2005). Finalement, une étude a démontré que la présence de NS1 était associée à une plus forte activation de la voie PI3K dans les 9 premières heures suivant l'infection et ensuite à une induction de p53 de 17 h-20 h post-infection, corroborant l'hypothèse du double rôle de NS1 dans l'induction de l'apoptose (Zhirnov et al., 2002).

4.1.4 Interaction entre NS1 et le système immunitaire

4.1.4.1 Inhibition de la réponse aux IFN I

La première fonction décrite de NS1 par rapport à l'interaction avec le système immunitaire a été sa capacité d'interférer avec les IFN I. Des virus recombinants qui n'expriment pas NS1 (delNS1) sont atténués dans les cellules MDCK où ils induisent une forte production d'IFN. De

plus, les virus de NS1 ne peuvent causer une maladie et se répliquer que dans des souris déficientes en système d'IFN I (Garcia-Sastre et al., 1998b; Kochs et al., 2007b). NS1 peut inhiber la réponse aux IFN I soit de façon pré-transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle mais les mécanismes utilisés et les cibles visées varient selon les souches étudiées. Grâce à son domaine N-terminal, NS1 peut se lier à l'ARN double brin et ainsi entrer en compétition avec les protéines cellulaires qui détectent normalement ce type d'ARN et déclenchent la cascade des IFN I. Une arginine à la position 38 et une lysine à la position 41 sont essentielles pour cette fonction (Talon et al., 2000a). De plus, NS1 peut inhiber RIG-I qui est une protéine clé dans l'induction de la réponse aux IFN I. Par contre, il n'est pas encore clair si NS1 agit directement avec RIG-I ou si l'ARN double brin agit comme un intermédiaire pour favoriser l'interaction. En effet, l'association de RIG-I et NS1 est stabilisée en présence d'ARN dont l'extrémité 5' est triphosphatée (Guo et al., 2007; Mibayashi et al., 2007; Opitz et al., 2007; Pichlmair et al., 2006). Finalement, NS1 peut aussi inhiber l'activité de RIG-I en se liant à la *tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25) qui est essentielle pour l'activation de RIG-I en ajoutant des groupements ubiquitine au domaine CARD de RIG-I (Gack et al., 2009; Kato et al., 2011).

NS1 peut aussi inhiber la réponse aux IFN I en interférant avec les modifications post-transcriptionnelles des ARNm de l'hôte. En effet, le domaine C-terminal de NS1 interagit avec le *30 kDa subunit of cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF30) et avec la *poly(A)-binding protein II* (PABPII) (Chen et al., 1999; Nemeroff et al., 1998; Noah et al., 2003; Twu et al., 2006). L'interaction entre NS1 et CPSF30 bloque le clivage et la polyadénylation des ARNm de l'hôte mais n'affecte pas celle des ARN du virus car ces derniers n'utilisent pas la machinerie de l'hôte pour les modifications post-transcriptionnelles. Ceci s'avère une stratégie très efficace pour bloquer une grande partie des gènes induits dans les cellules infectées, dont ceux contribuant à la réponse antivirale. Une phénylalanine à la position 103 et une méthionine à la position 106 sont essentielles pour la liaison à CPSF30. En effet, la souche virale PR/8 possède des mutations à ces résidus et est conséquemment incapable de se lier à la protéine et interfère inefficacement avec l'induction des gènes antiviraux (Kochs et al., 2007b; Li et al., 2001; Noah et al., 2003). Plus récemment, il a été observé que le virus pandémique de 2009 est peu efficace à inhiber l'induction des gènes de l'hôte. Ces études ont permis de démontrer que les résidus aux positions 108, 125 et 189 étaient également importants pour l'interaction avec CPSF30 (Hale et al., 2010b). Une troisième stratégie utilisée par NS1 pour contrôler l'expression des gènes de l'hôte serait de provoquer la rétention nucléaire des ARNm de l'hôte. En effet, la protéine peut interagir avec les protéines cellulaires d'export nucléaire NXF1, p15, Rae1, E1B-AP5 et Nup98, bloquant l'export nucléaire (Satterly et al., 2007).

Finalement, NS1 peut aussi limiter l'action de deux protéines ayant des fonctions antivirales, soit OAS et PKR. Ces deux protéines sont des ISG et jouent un rôle dans la régulation de la transcription et traduction, induisent la réponse aux IFN I et l'apoptose (Garcia et al., 2006; Min and Krug, 2006; Silverman, 2007). L'activation de la réponse aux IFN I par ces deux protéines survient suite à la reconnaissance d'ARN double brin. Puisque le domaine N-terminal de NS1 se lie à ce type d'ARN, NS1 entre en compétition avec PKR et OAS pour la reconnaissance de sous-produits de la réplication. De plus, NS1 peut se lier directement à PKR, d'une façon indépendante de son domaine N-terminal et empêcher le changement de conformation nécessaire à l'activation de la protéine (Donelan et al., 2003; Li et al., 2006; Min et al., 2007; Silverman, 2007; Talon et al., 2000a; Tan and Katze, 1998).

4.1.4.2 Autres interactions avec le système immunitaire

Premièrement, la protéine NS1 peut inhiber la présentation antigénique. Toutefois, cela semble surtout lié à sa capacité d'interférer avec la réponse aux IFN I car plusieurs des gènes impliqués dans la présentation antigénique, dont les molécules HLA I et des sous-unités du protéasomes sont des ISG (Tisoncik et al., 2011). Par la suite, NS1 peut inhiber l'expression des gènes impliqués dans la maturation des cellules dendritiques dérivées de sang humain, la migration des cellules dendritiques ainsi que leur capacité à stimuler la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T auxiliaires (Fernandez-Sesma et al., 2006; Haye et al., 2009). Finalement, il a été observé que la protéine NS1 du virus de la grippe espagnole peut inhiber l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dont plusieurs ont une fonction anti-inflammatoire (Bannenberg and Serhan, 2010; Fessler and Parks, 2011). Le mécanisme précis par lequel l'inhibition s'effectue et si ce phénomène est commun à plusieurs souches virales ne sont pas encore connus (Billharz et al., 2009).

4.1.5 Contribution de NS1 à la virulence

Comme mentionné précédemment, des virus recombinants qui ne possèdent pas la protéine NS1 ne peuvent se répliquer que dans des cellules ou des souris qui sont déficientes en système d'IFN I (Garcia-Sastre et al., 1998b). Des résultats similaires ont été obtenus avec des virus recombinants dont la protéine NS1 avait été tronquée dans la région C-terminale. Ces virus, tout comme ceux déficients pour la protéine NS1, induisent une forte production d'IFN I dans les cellules humaines, aviaires et *in vivo* (Cauthen et al., 2007; Garcia-Sastre et al., 1998b; Solorzano et al., 2005).

La génération de virus recombinants possédant soit le segment NS entier ou codant pour la protéine NS1 du virus de la grippe espagnole a mené à des résultats contradictoires. En effet, lorsque le segment NS d'un virus adapté à la souris a été remplacé par celui du virus de la grippe espagnole, il a été observé que le virus recombinant se répliquait bien en culture cellulaire mais était atténué chez la souris (Basler et al., 2001). À l'opposé, dans les cellules pulmonaires humaines A549, le virus recombinant possédant le NS1 du virus de la grippe espagnole était plus efficace à inhiber la réponse aux IFN I que le virus parental (Billharz et al., 2009; Geiss et al., 2002; Tisoncik et al., 2011). Plus récemment, chez les furets, l'introduction du segment NS du virus de la grippe espagnole a été associée à une dissémination du virus du tractus respiratoire supérieur vers les poumons (Watanabe et al., 2009). Chez les macaques, l'introduction de la protéine semble avoir peu d'impact sur la virulence et sur le contrôle de la réponse inflammatoire (Baskin et al., 2007). Ces résultats discordants suggèrent que la fonctionnalité de NS1 pourrait varier entre différentes espèces. Dans le cas des virus H5N1, un virus recombinant codant pour la protéine NS1 du virus A/Hong Kong/156/97 (HK/97) induit une plus forte production de cytokines pro-inflammatoires et une plus faible production d'IL-10 (Lipatov et al., 2005). De plus, l'introduction du NS1 de HK/97 permet au virus recombinant de se répliquer en présence de TNF- α et d'IFN- α contrairement au virus parental. Cette capacité a été attribuée à un acide aspartique à la position 92. Ces derniers résultats suggèrent que le NS1 des virus H5N1 aurait évolué de façon à résister aux effets des cytokines et des IFN I sans nécessairement en inhiber l'induction. Ceci pourrait aussi laisser croire que la « tempête de cytokines » observée lors des infections par les virus H5N1 est causée par le fait que le système immunitaire développe une forte réponse pro-inflammatoire contre un virus qui peut résister à ses effets (Seo et al., 2002).

Mis à part sa capacité à interférer avec la production de cytokines, NS1 pourrait contribuer à la virulence en se liant et en interférant avec des protéines cellulaires. Le NS1 des virus d'origine aviaire possède une région pouvant se lier aux domaines PDZ (*PDZ domain ligand*, PL) à l'extrémité C-terminale. Le PL est localisé dans les a.a. 227-230 et a soit la séquence ESEV ou EPEV. La protéine NS1 des virus aviaires ainsi que celle du virus de la grippe espagnole peuvent interagir avec plus de 30 protéines humaines contenant des domaines PDZ tandis que la protéine NS1 des virus humains ne peut pas (Obenauer et al., 2006). L'insertion du PL dans un virus adapté à la souris augmente la virulence (Jackson et al., 2008). Plus récemment, il a été observé que la protéine NS1 de plusieurs virus H5N1 pouvait interagir avec Scribble,Dlg1, MAGI-1, MAGI-2, and MAGI-3 (Liu et al., 2010; Thomas et al., 2011; Yu et al., 2011a).

Finalement, il pourrait aussi être possible que d'autres fonctions de NS1, dont sa capacité à agir avec les protéines cellulaires Crk/CrkL afin d'hyperactiver la PI3K, puissent contribuer à la virulence. Néanmoins, dans le cas du virus pandémique, l'introduction de mutations permettant à la protéine de se lier aux protéines Crk/CrkL n'est pas associée à une augmentation de la virulence chez la souris et les furets (Hale et al., 2010a).

4.2 PB1-F2

4.2.1 Expression et localisation cellulaire

La protéine PB1-F2 a été identifiée pour la première fois en 2001 lors d'une étude visant à identifier de nouveaux épitopes T CD8⁺ codés par des cadres de lectures alternatifs dans les différents segments viraux (Chen et al., 2001). PB1-F2 est codée par un second cadre de lecture dans le segment PB1. Son expression varie beaucoup selon les souches étudiées : 96% des isolats aviaires possèdent une forme complète de PB1-F2 longue de 87-90 a.a., les virus porcins classiques expriment une forme tronquée de 11, 25 ou 34 a.a. et l'expression chez les virus humains varie selon les sous-types. Les virus H1N1 isolés entre 1918 et 1947 ont, quant à eux, une forme complète de la protéine qui a disparue dans les années 1950 suite à l'introduction d'un codon stop à la position 58 (Chen et al., 2004; McAuley et al., 2010b; Zell et al., 2007). Plus récemment, il a été rapporté que le virus pandémique de 2009 possède une forme tronquée de 11 a.a. (Krumbholz et al., 2011).

PB1-F2 est exclusivement retrouvée dans les cellules infectées et n'est pas une composante du virion. Son expression débute vers 2 h post-infection pour atteindre son maximum 3-5 h plus tard. Il est estimé que la protéine a une demie-vie de 30 min à 1 h et sa dégradation est dépendante du protéasome (Chen et al., 2001; Zamarin et al., 2006). PB1-F2 peut adopter différentes conformations selon le microenvironnement dans lequel elle se retrouve (Bruns et al., 2007; Chevalier et al., 2010).

La localisation cellulaire de PB1-F2 varie selon les souches étudiées. Les premières études ont démontré que la protéine était retrouvée de façon prédominante aux mitochondries mais pouvait aussi se retrouver au noyau et dans le cytoplasme (Chen et al., 2001; McAuley et al., 2010b). La localisation à la mitochondrie se fait grâce à deux signaux particuliers. Tout d'abord, des résidus hydrophobes localisés aux positions 69-75 permettent une interaction avec la membrane mitochondriale, particulièrement avec la protéine *translocase of the outer mitochondrial membrane 20* (TOM20) grâce à une région riche en leucines. Lorsque l'interaction est stabilisée,

l'hélice α composée de résidus chargés positivement (position 54-62) permet la translocation efficace vers les membranes externe et interne de la mitochondrie (Gibbs et al., 2003; Pfanner, 2000; Yamada et al., 2004). Par contre, la protéine PB1-F2 de plusieurs virus H5N1 ne possède pas de région riche en leucines, ce qui prévient son interaction avec TOM20 et PB1-F2 sera donc plutôt retrouvée de façon diffuse dans le cytoplasme (Chen et al., 2010).

4.2.2 Mécanismes d'action

Plusieurs études ont été menées afin de comprendre quelles pourraient être les fonctions de PB1-F2 et surtout, sa contribution à la virulence. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent que plusieurs fonctions sont spécifiques à chaque souche et varient selon le type cellulaire étudié.

4.2.2.1 Induction de l'apoptose

La première fonction décrite de PB1-F2 a été sa capacité d'induire l'apoptose. Lorsque la protéine est localisée à la mitochondrie, cela provoque un changement de morphologie, d'une forme tubulaire à une forme arrondie, une perte du potentiel membranaire ainsi qu'un relargage de cytochrome c dans le cytoplasme. Les premières études ont observé que l'induction de l'apoptose causée par PB1-F2 ne se produisait que dans les monocytes (Chen et al., 2001). De plus, la phosphorylation des résidus 27 et 35 serait importante à cet effet (Mitzner et al., 2009). Par la suite, des études ont démontré que la protéine pouvait interagir avec deux protéines mitochondriales, soit l'*adenine nucleotide translocator 3* (ANT3) et la *voltage-dependant ion channel 1* (VDAC1), favorisant la formation du complexe de pore de perméabilisation transitoire (*permeability transition pore complex* (PTPC)), menant ultimement à la présence de cytochrome c dans le cytoplasme (Vieira et al., 2000). La partie C-terminale de la protéine est nécessaire et suffisante à cet effet (Chen et al., 2010; McAuley et al., 2010a; Zamarin et al., 2005). Ces mêmes études ont démontré qu'en contribuant à la formation de pores dans la mitochondrie, PB1-F2 pouvait prédisposer les cellules épithéliales à l'apoptose suite à un stimulus au TNF- α (Zamarin et al., 2005). Par contre, l'induction de l'apoptose par PB1-F2 semble aussi beaucoup varier selon les souches virales. Tout d'abord, comme mentionné précédemment, la protéine PB1-F2 de plusieurs virus H5N1 ne contient pas le signal de localisation mitochondriale et ne pourra donc pas s'associer à l'organelle pour y induire l'apoptose (Chen et al., 2010). Deuxièmement, il a été démontré que le PB1-F2 du virus PR/8 peut induire l'apoptose dans les cellules épithéliales et dans les macrophages d'une façon dépendante de l'activation de BAK/BAX, celui du virus de la grippe espagnole le fait seulement dans les macrophages, tandis

que les PB1-F2 de certains virus H3N2 et H5N1 n'induisent l'apoptose dans aucun type cellulaire (McAuley et al., 2010a).

4.2.2.2 Interaction avec la réponse aux IFN I

La façon dont PB1-F2 interagit avec la réponse aux IFN reste controversée. Initialement, la présence de PB1-F2 a été associée avec une exacerbation de la production d'IFN- β dans les cellules épithéliales, mais pas dans les monocytes ni dans les lymphocytes (Le Goffic et al., 2010). À l'opposé, d'autres études ont démontré que PB1-F2 inhibe l'induction de la réponse aux IFN I au niveau de MAVS. Encore une fois, la partie C-terminale de la protéine est nécessaire pour cette fonction. Dans le cas d'un virus H5N1, PB1-F2 inhibe l'induction des IFN seulement dans les macrophages et non dans les cellules épithéliales et dendritiques. Ceci laisse croire que la capacité d'une protéine PB1-F2 à inhiber la réponse aux IFN I varie selon les souches virales et le type cellulaire. Finalement, la présence d'une sérine à la position 66 (66S) est associée une capacité accrue à inhiber l'induction des IFN I, *in vitro* et *in vivo* (Conenello et al., 2011; Schmolke et al., 2011; Varga et al., 2011). Ces résultats suggèrent que PB1-F2 et NS1 pourraient agir en synergie afin de bloquer l'induction des IFN I.

4.2.2.3 Modulation de l'activité du complexe de polymérase

Dans les cellules infectées, PB1-F2 se retrouve principalement dans le cytoplasme et aux mitochondries, mais peut aussi être localisé dans le noyau. À cet endroit, la protéine, grâce à son domaine C-terminal, peut interagir avec PB1 qui est une composante du complexe de polymérase. Chez des virus qui ne possèdent pas PB1-F2, l'activité du complexe de polymérase est diminuée et PB1 se retrouve dans le cytoplasme de façon plus précoce. Il a été émis comme hypothèse que PB1-F2 pourrait favoriser l'activité du complexe de polymérase en prévenant le transport trop rapide de PB1 dans le cytoplasme (Mazur et al., 2008). Par contre, des études plus récentes ont démontré que la contribution de PB1-F2 à la réplication virale varie selon les souches et selon les types cellulaires. De plus, même si une différence de l'activité du complexe de polymérase peut être observée *in vitro*, elle ne se traduit pas par une charge virale accrue chez les souris (McAuley et al., 2010b).

4.2.2.4 Exacerbation de la réponse inflammatoire et des infections secondaires

L'instillation chez la souris de peptides dérivés de la partie C-terminale de la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole, de PR/8, des virus H2N2, H3N2 et H5N1 provoque un recrutement de cellules immunitaires dans les poumons. À l'opposé, les peptides provenant de virus H3N2 établis dans la population humaine depuis plus longtemps ne sont pas associés à

une inflammation plus sévère. Le recrutement de cellules immunitaires dans les poumons, principalement des lymphocytes T, des cellules dendritiques, des macrophages et des neutrophiles, cause des dommages aux parois alvéolaires avec des dépôts de fibrine et une accumulation de cellules nécrotiques à l'intérieur des alvéoles, ce qui contribue à l'immunopathologie (McAuley et al., 2010a). De plus, l'instillation de peptides dérivés du PB1-F2 de PR/8 ou de façon plus prononcée avec celui du virus de la grippe espagnole, provoque l'exacerbation d'une infection bactérienne secondaire par *Streptococcus pneumoniae*. Ceci est associé à une plus grande mortalité, une plus grande production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à des dommages aux poumons plus importants (McAuley et al., 2007).

4.2.3 Contribution à la virulence

Plusieurs études ont été réalisées chez la souris afin d'évaluer la contribution de PB1-F2 à la virulence. Des virus recombinants qui n'expriment pas la protéine sont moins virulents et sont associés à moins d'immunopathologie aux poumons, mais ont une charge virale similaire au virus de type sauvage. De plus, la présence de PB1-F2 est associée avec une plus forte induction de cytokines pro-inflammatoires comme le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF), IL-6, TNF- α , KC, MCP-1, IFN- γ , MIP-1 α/β et RANTES mais moins d'IFN I et des gènes qu'ils induisent. En conséquence, ceci provoque un plus grand recrutement de cellules immunitaires au site d'infection chez les souris infectées avec des virus possédant PB1-F2. De plus, des virus possédant un PB1-F2 avec S66 causent une maladie plus sévère que les virus sauvages (Conenello et al., 2011; Conenello et al., 2007; Schmolke et al., 2011; Zamarin et al., 2006). Dans le cas du virus pandémique de 2009, l'introduction d'une forme complète de PB1-F2 cause une plus grande induction de cytokines pro-inflammatoires chez certaines souches de souris sans toutefois provoquer un grand changement dans la virulence. De plus, cela n'est pas associé à une exacerbation d'infections secondaires. Finalement, cela n'a pas non plus augmenté la sévérité de la maladie chez les furets (Hai et al., 2010).

La contribution de PB1-F2 à la virulence chez les canards a aussi récemment été étudiée. Normalement, le virus de la grippe cause une infection asymptomatique chez les oiseaux aquatiques mais les virus H5N1, particulièrement ceux de la classe 2.2 sont létaux (Kim et al., 2008b). L'absence de PB1-F2 provoque un retard d'un jour dans l'induction de la maladie tandis que la présence de S66 la devance d'un jour. De plus, les virus déficients en PB1-F2 sont retrouvés à des titres plus faibles dans les reins, dans la rate et dans le foie à un jour post-

infection mais à des titres similaires au virus sauvage et possédant S66 au jour 3. Finalement, la présence de PB1-F2 n'influencerait pas l'excrétion du virus puisque des virus déficients pour la protéine sont retrouvés à titres similaires au virus sauvage dans les prélèvements cloacaux (Schmolke et al., 2011).

4.3 Autres facteurs de virulence

4.3.1 Hémagglutinine

La protéine HA est un facteur clé pour déterminer le type d'hôte ciblé par un virus donné et joue un rôle important dans la pathogénicité. Comme mentionné précédemment, les virus aviaires reconnaissent des acides sialiques reliés à un galactose par un lien α -2,3 tandis que les virus humains se lient plutôt à des acides sialiques α -2,6 (Connor et al., 1994; Matrosovich et al., 2000; Rogers and Paulson, 1983; Rogers et al., 1983). Ces derniers sont majoritairement localisés dans le tractus respiratoire supérieur qui est le principal site d'infection par les virus humains saisonniers. La maladie associée est moyennement sévère et le virus peut se disséminer facilement dans la population humaine car les sécrétions nasales contiennent des titres viraux élevés. À l'opposé, les virus aviaires, comme les souches H5N1, infectent majoritairement les pneumocytes de type II, localisés au niveau des alvéoles, ce qui cause une pneumonie sévère chez l'homme mais la transmission du virus est très limitée (Fukuyama and Kawaoka, 2011; Nicholls et al., 2007; Shinya et al., 2006). Deux mutations dans HA, seules ou combinées, peuvent permettre aux virus aviaires de reconnaître les récepteurs humains (Yamada et al., 2006). L'hémagglutinine peut aussi influencer la virulence de par sa susceptibilité aux protéases de l'hôte. En effet, afin que les particules virales soit infectieuses, HA doit être clivée en deux sous-unités, soit HA1 et HA2. Les virus humains possèdent une arginine au site de clivage qui est reconnu par des protéases extracellulaires comme la plasmine et la tryptase Clara qui est sécrétée dans le tractus respiratoire (Kido et al., 1996; Kido et al., 1992; Lazarowitz et al., 1973). À l'opposé, la protéine HA des virus aviaires hautement pathogènes possèdent un site de clivage multi-basique qui est reconnu par des protéases ubiquitaires *subtilisine-like* sérine protéases comme la furine et PC6 localisées dans le réseau trans-Golgi (Horimoto et al., 1994). Puisque ces virus ne dépendent plus des protéases extracellulaires *trypsin-like*, ces virus peuvent se disséminer de façon systémique. Finalement, plusieurs études semblent démontrer un lien entre la glycosylation de HA et la virulence. En effet, une protéine HA possédant peu de sites glycosylés sera moins sensible à la neutralisation par les protéines du surfactant et aura

une virulence accrue chez la souris (Reading et al., 2008; Reading et al., 1997; Tate et al., 2011).

4.3.2 Neuraminidase

Certaines études ont démontré que la neuraminidase du virus murin WSN/33 était associée à une augmentation de la virulence chez la souris. La protéine NA de ce virus peut se lier au précurseur de la plasmine, le plasminogène, et augmenter ainsi le clivage de HA. Ceci a permis d'expliquer en partie le tropisme tissulaire plus large de cette souche (Goto et al., 2001; Sun et al., 2010). Cependant, ces résultats sont maintenant contestés car une étude plus récente soutient que NA n'est pas nécessaire pour cet effet (LeBouder et al., 2010). Il est tout de même soupçonné que l'acquisition de la capacité à lier le plasminogène pourrait contribuer à la virulence de nouvelles souches.

4.3.3 Complexe de polymérase

En général, l'activité du complexe de polymérase des virus aviaires chez les mammifères est faible (Li et al., 2005b). Toutefois, il a été observé que lors du passage des souches aviaires vers les mammifères, des mutations dans PB2 et dans PA sont acquises et permettent une meilleure réplication de ces virus chez les mammifères (Bussey et al., 2010; Bussey et al., 2011; Gabriel et al., 2005; Gabriel et al., 2008; Hatta et al., 2001; Salomon et al., 2006; Subbarao et al., 1993). Plus récemment, des études ont démontré que des mutations dans PA avaient permis une adaptation optimale du virus pandémique de 2009 chez les mammifères et certaines de ces mutations pouvaient conférer une virulence accrue chez la souris (Bussey et al., 2011).

5. Hypothèses et objectifs de travail

Le virus de la grippe cause une infection aiguë du tractus respiratoire qui est principalement contrôlée par le système immunitaire inné. De ce fait, l'inhibition de certaines voies de l'immunité innée, dont la réponse aux IFN I, ou la déplétion de cellules impliquées dans la réponse précoce suivant l'infection, a souvent été associée à une augmentation de la virulence et de la mortalité chez les souris (Garcia-Sastre et al., 1998a; Stein-Streilein and Guffee, 1986; Tumpey et al., 2005b). D'une part, il a été observé que plusieurs virus hautement pathogènes, dont celui de la grippe espagnole de 1918, possèdent des protéines qui inhibent de façon plus efficace l'induction d'une réponse du système immunitaire inné comparativement à des souches moins virulentes (Kobasa et al., 2007; Kochs et al., 2007a; Seo et al., 2002). D'autre part, ces mêmes virus vont souvent provoquer une dérégulation de la réponse immunitaire précoce, ce qui résulte en une surproduction de plusieurs cytokines pro-inflammatoires qui est maintenue au cours de l'infection (Kash et al., 2006; Kobasa et al., 2007; Perrone et al., 2008). Nous avons émis comme hypothèse que la capacité du virus de la grippe à inhiber la réponse immunitaire innée est en corrélation avec la sévérité de la maladie et qu'une dérégulation de cette réponse peut également contribuer à la pathologie. Afin de vérifier cette hypothèse, mon projet de doctorat a été divisé en trois objectifs spécifiques :

1. Évaluer la contribution de NS1 à la virulence;
2. Déterminer si PB1-F2 est important à la virulence et si oui, de quelle façon;
3. Comparer la virulence de deux isolats du virus pandémique de 2009.

Pour le premier objectif, nous avons évalué la contribution de NS1 à la virulence de virus humains saisonniers de type H1N1. À cette fin, j'ai généré des virus recombinants sous le fond génétique du virus humain saisonnier A/USSR/90/77 (USSR) possédant le NS1 de souches différant quant à leur virulence chez le furet. Un virus recombinant soit avec le NS1 du virus de la grippe espagnole de 1918 qui est hautement pathogène, soit avec le virus adapté à la souris PR/8 qui est faiblement pathogène ainsi que le virus parental USSR ont été produits (Svitek et al., 2008; Tumpey et al., 2005a). Puisque NS1 est principalement reconnue pour sa capacité à inhiber la réponse aux IFN I, la capacité des différentes protéines à interférer avec la signalisation et l'induction de la réponse aux IFN I a été évaluée par essai luciférase et par essai biologique. Finalement, des furets ont été infectés avec les différents virus et la pathogenèse, la réplication virale dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur ainsi que le profil des cytokines présentes dans les lavages nasaux ont été comparés.

Dans le cadre du deuxième objectif, nous avons déterminé la contribution de PB1-F2 à la virulence d'une souche humaine saisonnière et la réponse immunitaire qui lui est associée. Pour ce faire, j'ai généré des virus recombinants sous fond génétique USSR possédant soit son propre PB1-F2, qui est naturellement tronqué dans la partie C-terminale, soit en introduisant le PB1-F2 du virus de la grippe espagnole, ou soit en générant un virus déficient pour la protéine. La réplication des différents virus ainsi que leur capacité à induire l'apoptose et à moduler la réponse des cytokines ont tout d'abord été évalué dans un système de culture *ex vivo* de poumons de furets et de macaque. Puisque plusieurs études ont démontré que PB1-F2 semblait avoir un effet particulier sur les cellules d'origine monocytaire (Chen et al., 2001; Schmolke et al., 2011), le taux d'apoptose et le profil de cytokines induits suite à l'infection de macrophages dérivés des monocytes du sang de furet a aussi été comparé. Finalement, des furets ont été infectés avec les différents virus recombinants et la pathogenèse, la réplication virale ainsi que les cytokines induites dans les lavages nasaux ont été évalués.

Dans le cadre du dernier objectif, nous avons comparé la pathogenèse de deux isolats du virus pandémique de 2009 chez les furets. Ces deux virus, A/Mexico/InDRE4487/2009 et A/Canada-AB/RV1532/2009 ont été isolés tôt au cours de la pandémie. Une comparaison des séquences en acides aminés des différentes protéines virales a été réalisée. Par la suite, des furets ont été infectés avec les virus et la sévérité de la maladie a été évaluée. De plus, les titres viraux dans le tractus respiratoire supérieur, dans les poumons et dans les intestins ont été comparés. Des coupes histologiques des poumons ont été réalisées à différents temps post-infection afin de comparer la pathologie causée par les deux isolats et de détecter la présence d'antigènes viraux. Finalement, le profil de cytokines induit par les virus a été évalué et comparé à celui induit par le virus de la grippe espagnole.

CHAPITRE 2

PUBLICATIONS

Publication no. 1

**NS1-mediated Delay of Type I Interferon Induction Contributes to Influenza A
Virulence in Ferrets**

Isabelle Meunier and Veronika von Messling[†]

INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Quebec, Canada

Received: 10 March 2011

Accepted: 16 March 2011

Journal of General Virology (2011) 92:1635-44.

J'ai cloné les différents gènes des protéines NS1 dans les vecteurs d'expression et comparé leur capacité à interférer avec la signalisation des IFN I par essai luciférase. Par la suite, j'ai produit les différents virus recombinants et comparé leur cinétique de réplication et la quantité d'IFN I qu'ils induisaient. J'ai infecté les furets avec les différents virus et comparé la pathogenèse et les titres viraux. De plus, j'ai comparé la production de cytokines induites par les virus dans les lavages nasaux. J'ai finalement analysé toutes les données et participé activement à l'écriture de l'article. Pour ce faire, j'ai produit toutes les figures et écrit la première version des sections résultats, matériel et méthodes, les légendes des figures ainsi qu'une partie de la discussion. J'ai par la suite apporté les modifications demandées par ma directrice de recherche.

FOONOTE

[†]Present address: Duke-NUS Graduate Medical School, 8 College Road, 169857 Singapore.

Résumé

L'inhibition de la réponse aux interférons de type I (IFN I) par la protéine non-structurale NS1 du virus influenza A a abondamment été caractérisée *in vitro*. Afin d'évaluer la contribution de NS1 à la virulence d'une souche spécifique, nous avons généré des virus recombinants de sous-type H1N1 sous fond génétique USSR/90/77 exprimant les protéines NS1 de la souche atténuée PR/8/34 ou celle du virus hautement pathogène de la grippe espagnole de 1918. *In vitro*, la capacité des différents NS1 à interférer avec la production des IFN I était en corrélation avec la virulence des souches respectives. L'infection de furets a démontré que la présence du NS1 du virus de la grippe espagnole était associée à des scores cliniques généralement plus élevés et une à pathologie aux poumons plus importante. L'analyse de l'ARNm présent dans les lavages nasaux a révélé que les virus exprimant la protéine NS1 du virus de 1918 et, dans une moins grande mesure celle du virus USSR/90/77, causaient un retard dans l'induction des IFN I, comparativement au virus exprimant la protéine NS1 du virus PR/8/34, démontrant l'importance de la protéine dans le contrôle précoce de la réponse immunitaire de l'hôte et à la virulence.

Abstract

The interference of the influenza A non-structural protein NS1 with type I interferon (IFN) signaling has been characterized extensively *in vitro*. To assess the contribution of NS1 to the virulence of a specific strain, we generated recombinant USSR/90/77 viruses bearing the NS1 proteins of the attenuated strain PR/8/34 or the highly pathogenic 1918 "Spanish flu", all belonging to the H1N1 subtype. *In vitro*, the extent of interference with type I IFN production exerted by the different NS1 proteins correlated with the reported virulence of the respective strain. Infection of ferrets with the recombinant viruses revealed that the presence of the 1918 NS1 resulted in a slightly more severe disease with generally higher clinical scores and increased lung pathology. Analysis of mRNA from nasal wash cells revealed that the viruses carrying the 1918 and, to a lesser extent, USSR/90/77 NS1 proteins caused a delay in upregulation of type I IFNs compared with the NS1 PR/8/34-expressing virus, demonstrating the importance of NS1 for early host response control and virulence.

Introduction

In healthy immunocompetent individuals, most influenza viruses cause an infection of the upper respiratory tract lasting 6-10 days (Eccles, 2005). Due to the acute nature of the infection, elements of the innate immune response, especially type I interferons (IFNs), play an important role in its control (McGill et al., 2009). Type I IFNs are produced by most cell types in response to virus infection, resulting in the induction of an antiviral state in the infected, as well as neighboring, cells (Haller et al., 2006). To circumvent this response, influenza viruses have developed multiple mechanisms, including more rapid replication, interference with innate immune activation, and IFN resistance (Basler and Aguilar, 2008). Whilst specific mutations in the viral replication complex proteins are associated with higher replication efficiency, the non-structural NS1 protein has been identified as the main viral immune antagonist (Krug et al., 2003; Pappas et al., 2008), and may also contribute to IFN resistance (Billharz, 2009; Billharz et al., 2009; Kochs et al., 2007a). A virus lacking NS1 was a strong type I IFN and tumor necrosis factor- α (TNF- α) inducer, and replicated efficiently only in type I IFN-deficient cells or animals (Garcia-Sastre et al., 1998b).

In the infected cell, NS1 interferes with the initial activation of the IFN- β signaling cascade, most probably by preventing recognition of the viral ssRNA by retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) (Gack et al., 2009; Guo et al., 2007; Mibayashi et al., 2007; Pichlmair et al., 2006). In addition, many NS1 proteins interfere with the nuclear export of cellular mRNAs by inhibiting their 3'-end processing (Chen et al., 1999; Nemeroff et al., 1998) and subsequent complex formation with the nuclear-export machinery (Satterly et al., 2007). By blocking the activity of several antiviral proteins, NS1 further inhibits the production of type I IFNs and pro-inflammatory cytokines, thereby suppressing the induction of an antiviral state (Min and Krug, 2006; Min et al., 2007). Recent studies demonstrate that NS1 also prevents the maturation of infected dendritic cells, which are essential for an efficient adaptive immune response, suggesting that its immune interference activity extends beyond the innate immune system (Fernandez-Sesma et al., 2006; Haye et al., 2009).

The contribution of NS1 to pathogenesis has been examined in different viral backbones and animal models with variable results: replacement of the NS segment of the mouse-adapted WSN strain with that of the 1918 pandemic virus resulted in attenuation in mice, even though the recombinant virus was more efficient at blocking the induction of IFN-regulated genes in a human cell line (Basler et al., 2001). In contrast, A/Puerto Rico/8/34 (PR/8) viruses carrying the

NS gene of H5N1/97 strains, which are unable to block CPSF30 signaling (Tsu et al., 2007), retained the mortality of the parental virus in mice, whilst the CPSF30-blocking NS gene of H5N1/01 lineage resulted in attenuation (Lipatov et al., 2005). The former virus also displayed an increased virulence in pigs compared to the parental PR/8 strain, which is usually non-pathogenic in this model (Seo et al., 2002). Moreover, replacement of the NS segment of the highly virulent H5N1 strain Vietnam/1203/04 by that of a non-lethal avian H5N1 virus partially attenuated the virus in ferrets (Salomon et al., 2006), suggesting that NS1 activity is highly species- and strain-specific.

Even though NS1 proteins from highly virulent strains are generally more efficient at inhibiting type I IFN signaling *in vitro*, infection of primates, ferrets, and mice with these viruses is characterized by a strong induction of pro-inflammatory cytokines and severe inflammation in the lungs (Cameron et al., 2008; Kobasa et al., 2007; Perrone et al., 2008; Uyeki, 2009). To characterize the contribution of NS1 to type I IFN-mediated immune response control and virulence in a host that is naturally susceptible to human viruses, we introduced the NS1 or the entire NS of the attenuated H1N1 PR/8 or the highly virulent H1N1 A/Brevig Mission/1918 (1918) strains into the human seasonal H1N1 strain USSR/90/77. The replication efficacy and inhibition of type I IFN production of the resulting viruses were first determined *in vitro*, followed by pathogenesis assessment in ferrets. Finally, mRNA-expression profiles of pro-inflammatory cytokines, type I IFN, and type I IFN-stimulated genes with known antiviral activity were generated from nasal wash cells.

Results

NS1 proteins from virulent strains interfere more efficiently with cellular signaling. *In vitro*, NS1 proteins originating from virulent strains are more efficient in inhibiting type I IFN responses (Kochs et al., 2007a) and deletion of NS1 leads to attenuation *in vivo* (Garcia-Sastre et al., 1998b), but the contribution of NS1 to the virulence of a specific strain in a naturally susceptible host remains to be elucidated. To reduce the risk of incompatibility between NS1 and the genetic backbone, H1N1 viruses of the same lineage were chosen for this study (Nelson et al., 2008): the mouse-adapted strain PR/8, which is attenuated in ferrets; USSR, a seasonal strain with moderate virulence (Svitek et al., 2008), 1918, which is highly virulent (Tumpey et al., 2005a).

The three NS1 proteins shared an overall amino acid identity of 93-95%, with the PR/8 and 1918 NS1 being most closely related. None of the diverging residues in the amino-terminal region, which contains a RNA-binding domain (Chien et al., 2004), have been associated with a specific function (Fig. 1a). The PR/8 NS1 protein carries in its effector domain the mutations F103S and M106I, which partially abrogates binding to CPSF30, thereby impairing its capacity to inhibit host mRNA expression (Das et al., 2008; Kochs et al., 2007a). As part of a putative PDZ domain ligand, the lysine at position 227 in the 1918 NS1 was associated with higher pathogenicity and more widespread dissemination (Jackson et al., 2008). Finally, the USSR NS1 protein contains a 7 aa extension at its very carboxy-terminus, which creates a second nuclear and a nucleolar localization signal (Melen et al., 2007).

To compare the capacity of the different NS1 proteins to inhibit IFN signaling, HeLa cells were transfected with the respective plasmids and firefly luciferase under control of IFN-stimulated response element (ISRE) or Mx1 promoters, and stimulated with universal IFN- α for 16 h. Whilst the PR/8 NS1 protein was unable to inhibit type I IFN transcription, and even had an enhancing effect, USSR and 1918 NS1 expression resulted in almost 80% reduction in ISRE-mediated luciferase activity, and similar results were obtained for the IFN-stimulated gene Mx1 (Fig. 1b, c). The PR/8 NS1 was also unable to interfere with nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling upon TNF- α stimulation, whilst expression of the USSR NS1 protein yielded to 70% inhibition and the 1918 NS1 was slightly more efficient, reaching 80% inhibition (Fig. 1d). Analysis of NS1 protein levels in the transfected cells revealed that the lack of inhibition observed for PR/8 NS1 was not due to a reduced protein expression (Fig. 1e), indicating that the NS1 proteins of more virulent strains possess an inherently higher inhibitory activity.

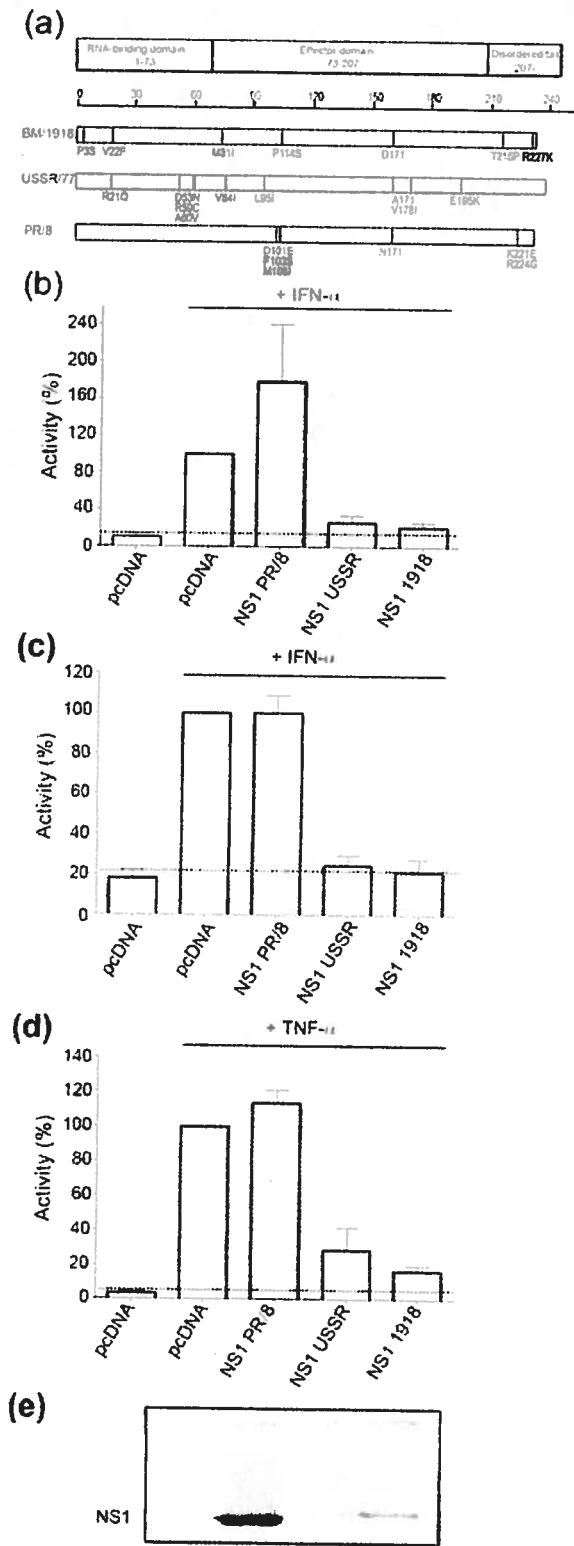


Figure 1: Characterization of the different NS1 proteins (a) Schematic representation of the NS1 proteins compared in the study. Protein sequences were aligned using MEGALIGN 8.0.2 Software. A scheme of the functional NS1 regions is shown, and each NS1 protein is represented by a bar. Divergences from the overall consensus are indicated below the respective protein, and amino acid known to contribute to virulence or to attenuation are highlighted in black. (b-d) Comparison of NS1-mediated inhibition of cellular signaling pathways. Inhibition of ISRE (b), Mx1 (c), or NF- κ B (d) promoter activation. HeLa cells were co-transfected with luciferase reporter gene plasmids under control of the respective promoters, with the different NS1 expression plasmids and a *Renilla* luciferase expression plasmid under control of a polymerase II promoter. Cells were stimulated 24 h post-transfection with 1000 U universal type I IFN- α ml⁻¹, for the assessment of ISRE and Mx1 activation, or 10 ng TNF- α ml⁻¹ for NF- κ B activation; firefly luciferase activity was measured 16 h later and normalized to *Renilla* luciferase levels. The inhibition associated with the respective NS1 protein is expressed as percentage activity compared to empty-vector control. The mean of three independent experiments performed in triplicates is shown; error bars illustrate SD. (e) Western blot analysis of NS1 protein expression. HeLa cells were transfected with 2 μ g of the different plasmids and harvested 36 h later. NS1 was detected using a rabbit anti-peptide hyperimmune serum specific to a conserved peptide in NS1.

Recombinant viruses with the NS1 protein from virulent strains are better inhibitors of type I IFN production *in vitro*. To gain insight in the contribution of NS1 to virulence, the different NS1 genes were introduced into the USSR background, yielding to rUSSR-NS1 PR/8, rUSSR and rUSSR-NS1 1918. A USSR 7:1 reassortant carrying the PR/8 NS segment, rUSSR-NS PR/8, was also generated. At 12 h post-infection, the recombinant viruses with PR/8 NS1 or NS resulted in 100-fold lower titres than the parental virus and the virus carrying the 1918 NS1 protein ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively) (Fig. 2a). However, whilst the titres of rUSSR-NS PR/8 reached levels similar to those of rUSSR and rUSSR-NS1 1918 at 24 h post-infection and thereafter, the replication of rUSSR-NS1 PR/8 remained impaired. Based on these results, rUSSR-NS PR/8 was used for all further experiments.

We next assessed the amount of type I IFN induced by each of the recombinant viruses in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, using a vesicular stomatitis virus (VSV) biological assay. A 10-fold inhibition of VSV replication was observed for the supernatant of rUSSR-NS PR/8 at all time points, indicating a rapid onset of type I IFN production (Fig. 2b). rUSSR and rUSSR-NS1 1918 inhibited type I IFN production, as demonstrated by near-wild type VSV titres at 8 and 16 h post-infection. As the infection progressed, the inhibitory effect began to decline, but the presence of the USSR or 1918 NS1 protein still resulted in a fivefold inhibitory effect at 24 h. Analysis of NS1 protein levels in the infected cells revealed that the PR/8 NS1 was expressed at levels comparable or superior to rUSSR and rUSSR-NS1 1918, indicating that the weaker inhibitory effect is not caused by a lower protein expression levels.

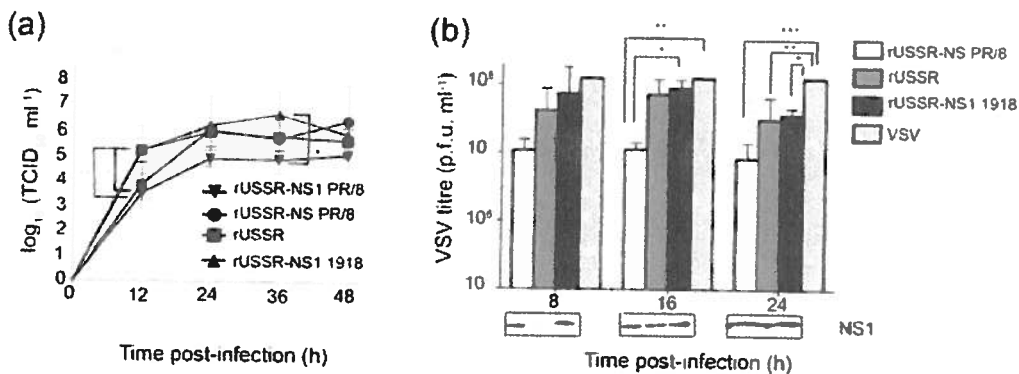


Figure 2: *In vitro* characterization of the recombinant viruses. (a) Growth kinetics in MDCK cells infected at a m.o.i. of 0.001. Titres are expressed as TCID₅₀ ml⁻¹, and the mean and SD based two independent experiments performed in duplicate are shown. (b) Comparison of type I IFN production following infection. MDCK cells were infected as described above and supernatants were harvested at the indicated time points. UV-inactivated supernatant were tested for inhibition of VSV replication. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The 1918 NS1 slightly increases USSR virulence. To evaluate the contribution of NS1 to virulence in a naturally susceptible host, eight ferrets were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of the respective virus. All animals experienced an increase in body temperature 1-2 days after infection, with the rUSSR-NS1 1918-infected group developing the highest peak temperature and longest duration (Fig. 3a). Infection with rUSSR-NS1 1918 resulted in moderate to severe clinical signs indicative of upper and lower respiratory tract involvement including large amounts of serous or seromucous nasal exudate, moderate congestion, frequent sneezing, and increased respiratory rates. The animals were moderately depressed and unwilling to exercise for 3 days after infection, and recovered slowly over the following 3-5 days (Fig. 3b). Both rUSSR and rUSSR-NS PR/8 resulted in an intermediate disease that was characterized by serous nasal exudate, mild congestion, occasional sneezing and transient reduction in activity and endurance (Fig. 3b). Peak nasal wash titres were detected 1 day after infection, and generally declined thereafter until the virus was cleared at day 6, even though animals infected with rUSSR secreted 10-fold more virus between days 1 and 3 (Fig. 3c).

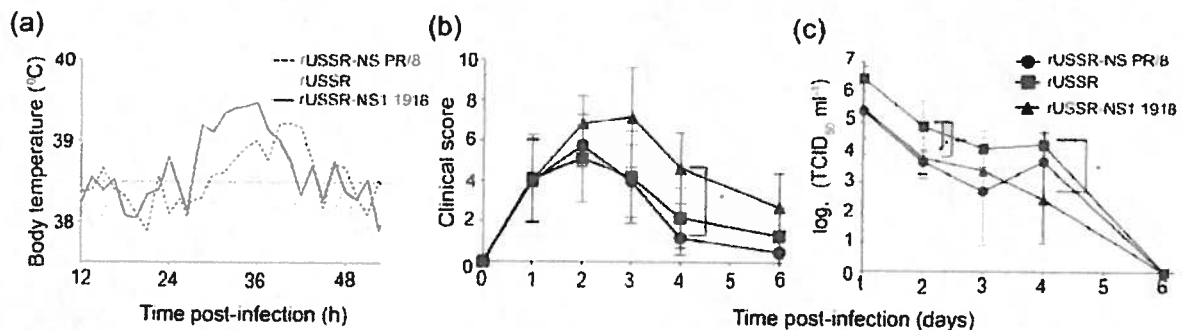


Figure 3: Clinical assessment of the infection. (a) Body temperature, (b) clinical scores and (c) nasal wash titres at various times after infection. Two groups of four ferrets were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of each of the recombinant viruses. Body temperature was recorded every 30 min by using a biometric system. The dotted line represents the normal body temperature. Days post-infection is shown on the x-axes and body temperature, clinical scores and nasal wash titres are plotted on the respective y-axis. The clinical score represents the sum of scores attributed to upper and lower respiratory signs, breathing rate, activity and endurance, as outlined in Methods. Error bars represent the sd. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

NS1 influences spread to and replication efficiency in the lower respiratory tract. To evaluate viral replication in the upper and lower respiratory tract, two animals of each group were sacrificed 2 and 4 days after infection, and nasal turbinates and lungs were harvested. All

viruses were able to infect the upper respiratory tract efficiently, reaching similar titres at 2 days post-infection (Fig. 4a). However, whilst one of the rUSSR-NS PR/8-infected animals had already cleared the virus on day 4 post-infection, rUSSR and rUSSR-NS1 1918 continued to replicate (Fig. 4b). In contrast to rUSSR and rUSSR-NS1 1918, which were detectable at day 2 post-infection and persisted at least to day 4, rUSSR-NS PR/8 was not found in the lungs.

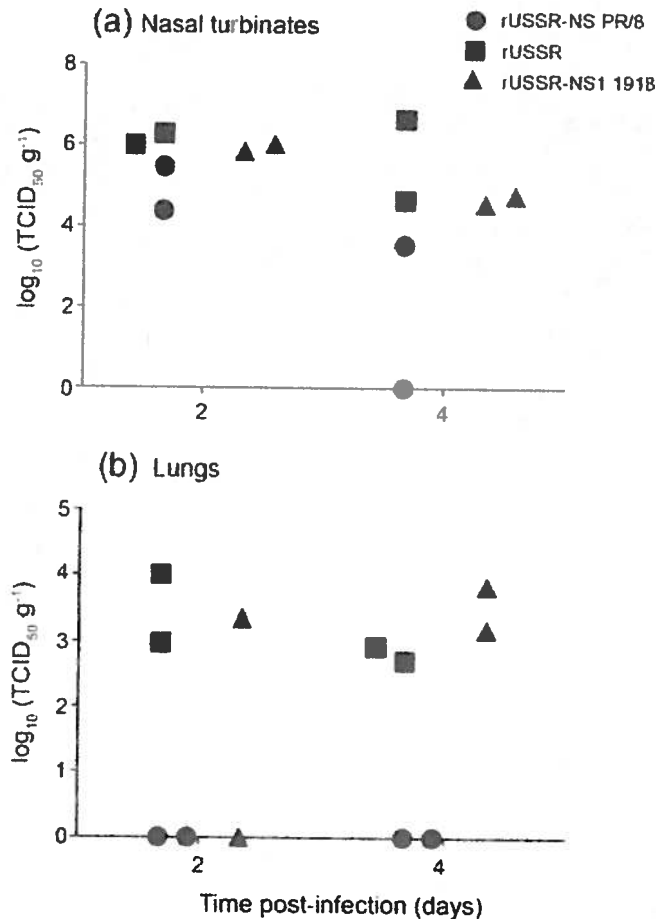


Figure 4: Viral replication in the upper and lower respiratory tract. Viral titres in (a) nasal turbinates and (b) lungs. Two ferrets of each group were sacrificed on days 2 and 4 post-infection, and nasal turbinates and the lower right lung lobe were harvested and homogenized for virus titration. The y-axis represents the virus titre expressed as $\log_{10} [\text{TCID}_{50} (\text{g tissue})^{-1}]$, and the x-axis indicates time post-infection.

Histopathological analysis of haematoxylin and eosin (H&E)-stained lung sections from animals sacrificed 2 days after infection revealed only discrete changes, characterized by localized loss of the epithelial layer in bronchi and minimal congestion (Fig. 5, left panel) in the case of rUSSR-

NS PR/8, which resolved completely by day 4 (data not shown). In contrast, rUSSR and rUSSR-NS1 1918 caused more severe pathology with widespread loss of the bronchial epithelial layer, congestion, and occasional oedema detectable on day 2 (Fig. 5, middle and right panels) that persisted until day 4 (data not shown).

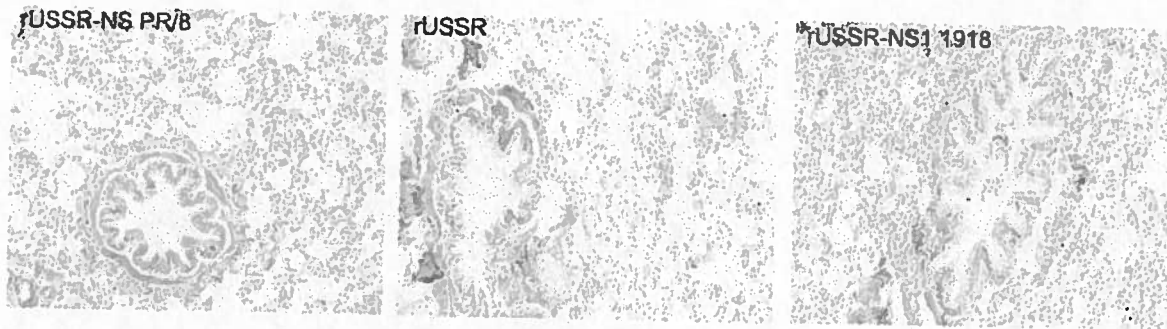


Figure 5: Histopathological changes in the lungs. Haematoxylin and eosin-stained sections of the lower right lung lobe of ferrets infected with rUSSR-NS PR/8, rUSSR, or rUSSR-NS1 1918 and sacrificed two days post-infection are shown at x 200 magnification.

Extent of NS1 interference with IFN signaling correlates with virulence. As the USSR and 1918 NS1 proteins were more efficient than the PR/8 NS1 at blocking IFN signaling *in vitro*, an mRNA profile of cytokines involved in innate immune activation was generated from nasal wash cells isolated at days 1 and 3 post-infection. Comparison of the pro-inflammatory cytokines IP-10 and TNF- α revealed that rUSSR-NS PR/8 induced the strongest and the most rapid response with tenfold more mRNA expression than rUSSR-NS1 1918 and USSR (Fig. 6a and b). Consistent with the weak inhibition of type I IFN production by the PR/8 NS1 observed *in vitro*, the virus carrying the PR/8 NS segment induced significantly more IFN- β at day 1 than rUSSR and rUSSR-NS1 1918 ($P < 0.05$) and at 3 days post-infection than rUSSR-NS1 1918 ($P < 0.05$) (Fig. 6c). Moreover, the presence of the PR/8 NS1 was associated with 100-fold higher IFN- α induction at day 1 post-infection compared with ferrets infected with rUSSR-NS1 1918, whilst rUSSR caused the highest IFN- α levels on day 3 (Fig. 6d). The presence of the USSR and 1918 NS1 protein was also associated with lower Mx1 induction (Fig. 6e).

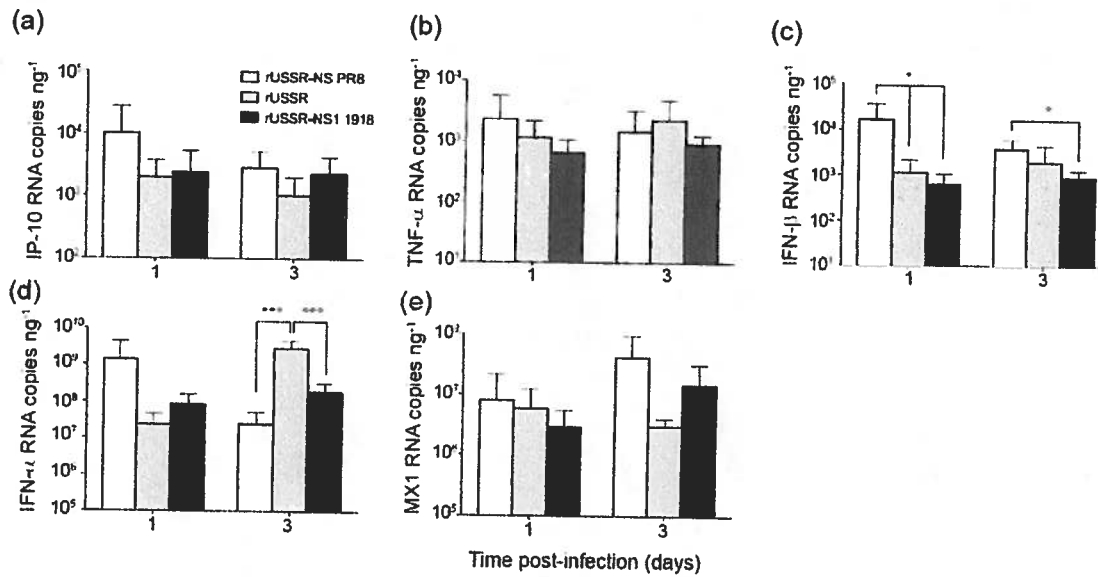


Figure 6: Comparison of the cytokine mRNA profiles in nasal wash cells. mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines, IP-10 (a) and TNF- α (b), type I IFNs, IFN- β (c) and IFN- α (d), and one type I IFN-inducible gene, Mx1 (e) were quantified by real-time RT-PCR. The RNA from the cells present in the nasal washes was extracted and 10 ng was used for each reaction. The copy number of the genes was calculated by extrapolating data from a standard curve generated from *in vitro* transcribed mRNA of known concentration. Each value represents the mean of at least six animals. Error bars indicate the SD. Statistical significance: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Discussion

By limiting virus replication and spread through induction of an antiviral state in infected and surrounding non-infected cells, type I IFNs are among the first line of defense against viral infections (Haller et al., 2006). Consequently, viruses have evolved strategies to counteract these responses. In the case of influenza A viruses, the NS1 protein contributes importantly to interference with innate immune activation, and viruses lacking NS1 were found to be attenuated in immunocompetent animals (Garcia-Sastre et al., 1998b; Kochs et al., 2007a). However, studies investigating the contribution of NS1 to the virulence and host response control *in vivo* have yielded contradictory results, which may be due to genetic incompatibility of NS1 and the respective viral backbone, or the susceptibility of the animal model. Here we evaluated the pathogenesis of recombinant H1N1 USSR/77 viruses carrying either their own NS1 protein, or that of the genetically similar H1N1 strains PR/8 or 1918 in ferrets, which closely reproduce clinical signs and disease severity seen in humans.

USSR and 1918 NS1 display similar levels of type I IFN inhibition *in vitro*. NS1 is a multifunctional protein that interferes with innate immune activation at pre- and post-transcriptional levels (Kuo et al.; Nemeroff et al., 1998). NS1 proteins from certain strains, including PR/8 and the pandemic H1N1 2009 viruses, are no longer able to block the post-transcriptional processing of host mRNAs due to mutations in the NS1 effector domain that prevent CPSF30 binding, which reduces their capacity to interfere with type I IFN and TNF- α signaling (Hale et al., 2011; Hayman et al., 2007; Kochs et al., 2007a). However, these NS1 proteins retain their ability to bind dsRNA efficiently and to block the activity of RIG-I and IPS (IFN promoter stimulator), thereby inhibiting IFN- β induction at the pre-transcriptional level (Hale et al.; Kochs et al., 2007a; Mibayashi et al., 2007; Pichlmair et al., 2006). Consistent with these reports, we observed that the PR/8 NS1 protein is unable to interfere with type I IFN signaling, but remains capable to inhibit its production, at least to a certain extent, as seen in the VSV bioassay, whilst the USSR and 1918 NS1 proteins are similarly efficient in interfering with IFN signaling and production *in vitro*. Thus, whilst well-suited to identification and characterization of functionally defective NS1 proteins, these *in vitro* assays may be limited in their ability to detect subtle differences in immune activation.

Insertion of the PR/8 NS segment results in attenuation while maintaining replication efficiency *in vivo*. PR/8 was one of the first mouse-adapted influenza strains and causes severe disease and death in mice (Blazejewska et al.; Grimm et al., 2007), whilst the disease in

ferrets is mild and short-lived (Svitek et al., 2008). Here we found that introduction of the PR/8 NS1 into the USSR background resulted in a 100-fold reduction in replication efficiency, which is similar to the reduction reported for NS1-deleted viruses (Garcia-Sastre et al., 1998b). In contrast, a 7:1 reassortant carrying the entire PR/8 NS segment displayed slightly delayed replication kinetics, but yielded maximum titres similar to the parental USSR. This observation suggests that PR/8 nuclear export protein (NEP) has evolved to compensate for the reduced innate immune interference capacity of PR/8 NS1, possibly by increasing viral transcription replication efficiency (Akarsu et al.; Robb et al., 2009). *In vivo*, the 7:1 reassortant replicated as efficiently as the parental USSR virus and resulted in similar clinical scores, but was restricted to the upper respiratory tract, most probably due to the rapid and vigorous local type I IFN response. Similar effects were observed in mice for viruses carrying NS1 deletions (Ferko et al., 2004), indicating that introduction of the PR/8 NS segment may be a simple and efficient approach to attenuate newly emerging influenza viruses.

How does NS1 contribute to virulence? Whilst the mechanisms of NS1 interference with IFN signaling and activation of the antiviral state have been characterized extensively *in vitro* (Hayman et al., 2007; Kochs et al., 2007a; Talon et al., 2000a; Wang et al., 2000), there is limited information on host-response differences in animal models. Infection of STAT1^{-/-} and IFN α R^{-/-} mice with the mouse-adapted WSN strain resulted in systemic infection, demonstrating the pivotal role of type I IFNs to control replication and to limit spread (Garcia-Sastre et al., 1998a). Moreover, the introduction of the 1918 NS in the seasonal H1N1 strain K173 led to dissemination to the lower respiratory tract of ferrets, in contrast to the parental virus, which replicated only in the upper respiratory tract (Watanabe et al., 2009). Infection of ferrets with rUSSR-NS PR/8 resulted in a rapid local immune response including high levels of type I IFNs and interferon gamma-induced protein (IP)-10, which translated into higher induction levels of Mx and likely other IFN-stimulated genes (ISGs), leading to rapid control of replication and spread. Conversely, the early inhibition of type I IFN induction mediated by the USSR and 1918 NS1 proteins was associated with a sustained replication and spread to the lungs. The sustained lack of type I IFN activation seen in the presence of 1918 NS1 may explain the more severe lung pathology seen in these animals compared to the USSR NS1 group, which experienced a peak in IFN- α transcription on day 3. Even though other NS1 functions certainly also contribute to the observed differences, our study establishes a correlation between the extent of NS1-mediated inhibition of innate immune activation at early infection stages and virulence.

Materials and methods

Cells and viruses. MDCK cells (ATCC CCL-34), 293 cells (ATCC CRL-1573), and HeLa cells (ATCC CCL-2) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 5 % FBS (Invitrogen). All influenza viruses were propagated in MDCK cells cultivated in DMEM with 2 $\mu\text{gTPCK-trypsin ml}^{-1}$ (Sigma). VSV strain Indiana was kindly provided by Dr. Alain Lamarre, INRS-Institut Armand-Frappier. Influenza virus titres were determined by limiting dilution and expressed as $\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$, whilst VSV titers were quantified by plaque assay and expressed as p.f.u. ml^{-1} .

Cloning of USSR/90/77 and NS1 genes. A bidirectional expression plasmid was generated by integrating the human RNA polymerase I promoter and terminator sequences separated by two *BsmBI* sites (Hoffmann et al., 2002) into pcDNA3.1Zeo(-), yielding pcDNApol. To clone the individual segments of USSR (Svitek and von Messling, 2007), RNA was isolated from infected MDCK cells (RNeasy; Qiagen) and transcribed into cDNA (Superscript III; Invitrogen) following the manufacturers' instructions. The segments were amplified by using universal influenza primers (Hoffmann et al., 2001), and cloned directly into pcDNApol. At least four clones of each segment were sequenced to establish the consensus sequence. The PR/8 NS segment was generated as described above, using RNA isolated from PR/8-infected MDCK cells. The PR/8 and 1918 NS1 genes were generated by introducing the respective amino acid-relevant changes into the USSR NS plasmid using site-directed mutagenesis based on the GenBank sequence EF467817 and AF333238.1 respectively. This mutagenesis did not result in changes of the NS2 amino acid sequence. For the luciferase assays, the NS1 were cloned into pcDNA3.1Zeo(-) using gene-specific primers.

Recovery of recombinant viruses. Recombinant viruses were recovered as described by (Hoffmann et al., 2000). Briefly, semi-confluent 293 cells in a six-well plate were transfected with 0.5 μg of each plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Two days after transfection, cells were trypsinized and transferred onto MDCK cells seeded in a six-well plate. Co-cultures were maintained in DMEM in the presence of 2 $\mu\text{g TPCK-trypsin ml}^{-1}$ until cytopathic effect was observed. Cells and supernatant were harvested and transferred onto fresh MDCK cells in a 75 cm^2 flask for the production of virus stocks. For growth kinetics, 90% confluent MDCK cells were seeded in a 12-well plate. The cells were washed twice with PBS (Invitrogen) prior to infection to remove the FBS-containing media. MDCK cells were infected at a m.o.i. of 0.001, medium was aspirated after 30 min to remove unbound virus, and cells were then cultivated in DMEM 2 μg

TPCK-trypsin ml^{-1} . Cells and supernatant were harvested every 12 h for 2 days and virus titres were determined by limiting dilution.

Luciferase reporter-gene assays. Triplicate wells of HeLa cells seeded in 24 well plates were transfected with 450 ng of the respective NS1 expression plasmids or empty-vector control, and 100 ng of phRG-TK (Promega) as internal control for transfection efficiency, in combination with either 450 ng of either pSRE-luc (Stratagene), for assessment of type I IFN-mediated activation, pMx1-luc (Schumacher et al., 1994) for natural IFN-stimulated gene activation, or NF- κ B-luc (Stratagene). At 24 h post-transfection, cells were stimulated with 1000 U of universal type I IFN- α ml^{-1} (PBL Interferon Source) or 10 ng of TNF- α ml^{-1} (R&D Systems). After 16 h, cells were scraped, centrifugated at 330 *g* and transferred in a black 96-well plate (BrandTek; Tekniscience) where they were lysed in Dual-Glo luciferase assay lysis buffer (Promega) and luciferase activity was measured using a TriLux luminometer (Perkin-Elmer). Values of firefly luciferase activity were normalized to *Renilla* luciferase activity, and results are expressed as a percentage of the empty-vector control-stimulated value.

Western blot. Cells were washed in cold PBS and lysed on ice in 200 μL of RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 1 % Triton X-100, 0.5 % deoxycholate, 0.1 % SDS and 500 mM NaCl] containing protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics). The lysate was centrifuged at 17 000 *g* for 30 min at 4 °C and stored at - 80 °C. Protein lysates were mixed with SDS/gel loading buffer containing 20 % β -mercaptoethanol (Sigma), separated by SDS-PAGE (12% gel), transferred on Immobilon-P PVDF membranes (Millipore Corporation), and blocked overnight in blocking buffer (Roche Diagnostics).

NS1 was detected using a rabbit anti-peptide hyperimmune serum raised against the keyhole limped hemagglutinin-coupled peptide DRLRRDQKSLRGRSC (Sheldon Biotechnology Centre, McGill University, Montreal, QC), which is conserved in NS1 proteins from different subtypes. After incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma), NS1 was visualized using the ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare) and exposed on a Kodak Image Station 2000.

VSV biological assay. MDCK cells were infected at a m.o.i. of 0.001 and supernatant was harvested at 8, 16 and 24 h post infection. IFN activity of UV-inactivated samples (Arnheiter and Staeheli, 1983) was quantified by treating fresh MDCK cells seeded in a 12-well plate with twofold dilution of the respective sample for 16 h. The cells were then infected with VSV at a

m.o.i. of 1. After 15 h, the supernatant was harvested, and the titre was determined by plaque assay.

Animal experiments. All animal experiments were approved by the institutional care and use committee of the INRS-Institut Armand-Frappier. Male ferrets (*Mustela putorius furo*) 16 weeks or older were purchased from Marshall Farms. All animals were seronegative for circulating H1N1 and H3N2 influenza viruses. Each virus was evaluated in two separate experiments involving groups of four ferrets. Animals were anesthetized with ketamine (1 mg kg⁻¹) and midazolam (10 mg kg⁻¹), and infected intranasally with 10⁵ TCID₅₀ of the respective virus. Body temperature was recorded every 30 min using intraperitoneal implants (DSI), starting 1 day before infection. Clinical signs and treadmill endurance were monitored daily for the first 4 days and every second day thereafter. The clinical score was established following a 0-1-2-3 scale, with 0 always representing the physiological range. Clinical signs were scored as follows: quantity of nasal exsudate: 1, little (wet nose); 2, larger amounts (runny nose); 3, copious amount. Quality of nasal exsudate: 1, serous; 2, sero-mucous; 3, muco-purulent. Sneezing: 1, rarely (once during observation period); 2, occasionally (2-5 times during observation period); 3, frequently (more than 5 times). Congestion: 1, mild (breathing sounds congested); 2, intermediate (occasional mouth breathing); 3, severe (mouth breathing). Coughing: 1, rarely (once during observation period); 2, occasionally (2-5 times during observation period); 3, frequently (more than 5 times). Respiratory rate min⁻¹: 1, 30-35; 2, 35-40; 3, > 40. Dyspnoea: 1, occasional wheezing; 2, continuous wheezing; 3, laboured breathing. Activity: 1, calm; 2, depressed; 3, inactive. Treadmill endurance: 1, 2-4 min; 2, < 2 min; 3, 0 min.

Nasal washes were collected daily for the first 4 days and on day 6. Towards this, 500 µl PBS was instilled in one nostril and the expectorate was collected in a 50 ml centrifuge tube. The procedure was repeated until a minimal volume of 400 µl was recovered. The virus was titrated by limited dilution and expressed as TCID₅₀ ml⁻¹. At days 2 and 4 post-infection, two animals were sacrificed and the nasal turbinates and the lower right lung lobe were collected for virus titration and histopathological analysis.

Tissue titration and histopathological analysis. Formalin-fixed tissues were paraffin-embedded, cut in 5 µm sections and stained with H&E. For the quantification of the viral load, tissues were weighed and homogenized in DMEM with 5% FBS on a bead mill homogenizer (Tissue Lyser; Qiagen). Cell debris was pelleted by centrifugation at 16 000 g for 30 s and the supernatant was titrated by limiting dilution. The titer is expressed as TCID₅₀ (g tissue)⁻¹.

Cytokine mRNA quantification by quantitative real-time PCR. Immediately after collection, 140 µl of nasal wash fluid was mixed with 560 µl of AVL buffer (QIAamp Viral RNA Mini Kit; Qiagen) and stored at -80 °C. The RNA was extracted following the manufacturer's instructions. The genes encoding for ferret IFN- α , IFN- β , TNF- α , Mx1 (GenBank Acc. No:JF906988), and IP-10 were cloned into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) based on previously published sequences (Danesh et al., 2008; Svitek et al., 2008; Svitek and von Messling, 2007). RNA standards for each gene were produced by *in vitro* transcription from the respective plasmid using T7 RNA polymerase (New England Biolabs). Serial dilutions of the RNA standards and the sample RNA were analyzed by real-time RT-PCR using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) as previously described (Svitek et al., 2008). The number of RNA copies was determined according to the following formula: number of copies = amount of RNA (ng) \times 6.022 \times 10²³ / gene length (bp) \times 10⁹ \times 340.

Statistical analysis. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0a. Data were analyzed by a one-way analysis of variance followed by Tukey's a posteriori test to determine significant differences.

Acknowledgements

We thank Dr. Karola Obojes for help with sequencing the ferret Mx. We are grateful to all laboratory members for stimulating discussions and critical comments on the manuscript, and to Chantal Thibault for continued technical support. We also thank Patricia Devaux and Julien Pothlichet for comments on the manuscript. This work was supported by grants #NIP-79937 and #83146 from the Canadian Institutes of Health Research and #9488 from the Canadian Foundation for Innovation to V.v.M., and an Armand-Frappier Foundation and FRSQ scholarships to I.M.

References

- Akarsu, H., Iwatsuki-Horimoto, K., Noda, T., Kawakami, E., Katsura, H., Baudin, F., Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. *Virus Res* **155**, 240-248.
- Arnheiter, H. & Staeheli, P. (1983). Expression of interferon dependent resistance to influenza virus in mouse embryo cells. *Arch Virol* **76**, 127-137.
- Basler, C. F. & Aguilar, P. V. (2008). Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* **79**, 166-178.
- Basler, C. F., Reid, A. H., Dybing, J. K., Janczewski, T. A., Fanning, T. G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M. L., Swayne, D. E., Garcia-Sastre, A., Palese, P. & Taubenberger, J. K. (2001). Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2746-2751.
- Billharz, R., Zeng, H., Proll, S. C., Korth, M. J., Lederer, S., Albrecht, R., Goodman, A. G., Rosenzweig, E., Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A. & Katze, M. G. (2009). The NS1 protein of the 1918 pandemic influenza virus blocks host interferon and lipid metabolism pathways. *J Virol* **83**, 10557-10570.
- Blazejewska, P., Koscinski, L., Viegas, N., Anhlan, D., Ludwig, S. & Schughart, K. (2011). Pathogenicity of different PR8 influenza A virus variants in mice is determined by both viral and host factors. *Virology*.
- Cameron, C. M., Cameron, M. J., Bermejo-Martin, J. F., Ran, L., Xu, L., Turner, P. V., Ran, R., Danesh, A., Fang, Y., Chan, P. K., Mytle, N., Sullivan, T. J., Collins, T. L., Johnson, M. G., Medina, J. C., Rowe, T. & Kelvin, D. J. (2008). Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets. *J Virol* **82**, 11308-11317.
- Chen, Z., Li, Y. & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* **18**, 2273-2283.
- Chien, C. Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J. M., Sahasrabudhe, P. V., Krug, R. M. & Montelione, G. T. (2004). Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry* **43**, 1950-1962.
- Danesh, A., Seneviratne, C., Cameron, C. M., Banner, D., Devries, M. E., Kelvin, A. A., Xu, L., Ran, L., Bosinger, S. E., Rowe, T., Czup, M., Jonsson, C. B., Cameron, M. J. &

- Kelvin, D. J. (2008).** Cloning, expression and characterization of ferret CXCL10. *Mol Immunol* **45**, 1288-1297.
- Das, K., Ma, L. C., Xiao, R., Radvansky, B., Aramini, J., Zhao, L., Marklund, J., Kuo, R. L., Twu, K. Y., Arnold, E., Krug, R. M. & Montellone, G. T. (2008).** Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 13093-13098.
- Eccles, R. (2005).** Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* **5**, 718-725.
- Ferko, B., Stasakova, J., Romanova, J., Kittel, C., Sereinig, S., Katinger, H. & Egorov, A. (2004).** Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* **78**, 13037-13045.
- Fernandez-Sesma, A., Marukian, S., Ebersole, B. J., Kaminski, D., Park, M. S., Yuen, T., Sealfon, S. C., Garcia-Sastre, A. & Moran, T. M. (2006).** Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol* **80**, 6295-6304.
- Gack, M. U., Albrecht, R. A., Urano, T., Inn, K. S., Huang, I. C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J. U. & Garcia-Sastre, A. (2009).** Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**, 439-449.
- Garcia-Sastre, A., Durbin, R. K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D. E. & Durbin, J. E. (1998a).** The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* **72**, 8550-8558.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998b).** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-330.
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martinez-Sobrido, L., Solorzano, A., Garcia-Sastre, A., Haller, O. & Kochs, G. (2007).** Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 6806-6811.
- Guo, Z., Chen, L. M., Zeng, H., Gomez, J. A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J. M., Donis, R. O. & Sambhara, S. (2007).** NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 263-269.
- Hale, B. G., Steel, J., Medina, R. A., Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., Hai, R., Schmolke, M., Lowen, A. C., Perez, D. R. & Garcia-Sastre, A. (2011).** Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **84**, 6909-6922.

- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**, 119-130.
- Haye, K., Burmakina, S., Moran, T., Garcia-Sastre, A. & Fernandez-Sesma, A. (2009). The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol* **83**, 6849-6862.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L. C., Goodbourn, S., McCauley, J. W. & Barclay, W. S. (2007). NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *J Virol* **81**, 2318-2327.
- Hoffmann, E., Krauss, S., Perez, D., Webby, R. & Webster, R. G. (2002). Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* **20**, 3165-3170.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6108-6113.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* **146**, 2275-2289.
- Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., Perez, D. R. & Lamb, R. A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4381-4386.
- Kobasa, D., Jones, S. M., Shinya, K., Kash, J. C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Kim, J. H., Halfmann, P., Hatta, M., Feldmann, F., Alimonti, J. B., Fernando, L., Li, Y., Katze, M. G., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. (2007). Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* **445**, 319-323.
- Kochs, G., Garcia-Sastre, A. & Martinez-Sobrido, L. (2007). Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**, 7011-7021.
- Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L. & Latham, A. G. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**, 181-189.
- Kuo, R. L., Zhao, C., Malur, M. & Krug, R. M. Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon-beta transcription. *Virology* **408**, 146-158.
- Lipatov, A. S., Andreansky, S., Webby, R. J., Hulse, D. J., Rehg, J. E., Krauss, S., Perez, D. R., Doherty, P. C., Webster, R. G. & Sangster, M. Y. (2005). Pathogenesis of Hong

- Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* **86**, 1121-1130.
- McGill, J., Heusel, J. W. & Legge, K. L. (2009).** Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol* **86**, 803-812.
- Melen, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K. Y., Krug, R. M. & Julkunen, I. (2007).** Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol* **81**, 5995-6006.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr. & Garcia-Sastre, A. (2007).** Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**, 514-524.
- Min, J. Y. & Krug, R. M. (2006).** The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7100-7105.
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C. & Krug, R. M. (2007).** A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**, 236-243.
- Nelson, M. I., Viboud, C., Simonsen, L., Bennett, R. T., Griesemer, S. B., St George, K., Taylor, J., Spiro, D. J., Sengamalay, N. A., Ghedin, E., Taubenberger, J. K. & Holmes, E. C. (2008).** Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog* **4**, e1000012.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. (1998).** Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**, 991-1000.
- Pappas, C., Aguilar, P. V., Basler, C. F., Solorzano, A., Zeng, H., Perrone, L. A., Palese, P., Garcia-Sastre, A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2008).** Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3064-3069.
- Perrone, L. A., Plowden, J. K., Garcia-Sastre, A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2008).** H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* **4**, e1000115.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006).** RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001.

- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. (2009).** NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* **90**, 1398-1407.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E. A., Ilyushina, N. A., Yen, H. L., Hulse-Post, D. J., Humberd, J., Trichet, M., Rehg, J. E., Webby, R. J., Webster, R. G. & Hoffmann, E. (2006).** The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* **203**, 689-697.
- Satterly, N., Tsai, P. L., van Deursen, J., Nussenzweig, D. R., Wang, Y., Faria, P. A., Levay, A., Levy, D. E. & Fontoura, B. M. (2007).** Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1853-1858.
- Schumacher, B., Bernasconi, D., Schultz, U. & Staeheli, P. (1994).** The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* **203**, 144-148.
- Seo, S. H., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2002).** Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**, 950-954.
- Svitek, N., Rudd, P. A., Obojes, K., Pillet, S. & von Messling, V. (2008).** Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* **376**, 53-59.
- Svitek, N. & von Messling, V. (2007).** Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* **362**, 404-410.
- Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2000).** Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**, 7989-7996.
- Tumpey, T. M., Basler, C. F., Aguilar, P. V., Zeng, H., Solorzano, A., Swayne, D. E., Cox, N. J., Katz, J. M., Taubenberger, J. K., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2005).** Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* **310**, 77-80.
- Twu, K. Y., Kuo, R. L., Marklund, J. & Krug, R. M. (2007).** The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J Virol* **81**, 8112-8121.
- Uyeki, T. M. (2009).** Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin Infect Dis* **49**, 279-290.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & Garcia-Sastre, A. (2000).** Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **74**, 11566-11573.

Watanabe, T., Watanabe, S., Shinya, K., Kim, J. H., Hatta, M. & Kawaoka, Y. (2009). Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 588-592.

Publication no. 2

PB1-F2 Modulates Early Host Responses but Does not Affect the Pathogenesis of H1N1 Seasonal Influenza Virus

Isabelle Meunier¹ and Veronika von Messling^{1,2}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Quebec, Canada

² Emerging Infectious Diseases Program, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore

Received: 2 January 2012

Accepted: 30 January 2012

Journal of Virology (2012) 86:4271-8.

Pour cet article, j'ai généré les différents virus recombinants et comparé les cinétiques de réplication. J'ai établi un système de cultures de poumons *ex vivo* de furet et de macaque. Pour ce faire, j'ai dû optimiser tous les détails concernant la procédure d'injection de l'agarose dans les poumons (comment injecter l'agarose afin que tous les lobes soient gonflés sans qu'ils ne le soient trop, pourcentage d'agarose, temps alloué pour la solidification), les conditions de culture (coupes des morceaux de poumons, milieu de culture utilisé) et d'infection (dose, volume d'innoculation, procédure d'innoculation). Par la suite, ces cultures m'ont permis d'analyser la réponse des cytokines, comparer la réplication et évaluer le taux d'apoptose associés aux différents virus. De plus, j'ai optimisé le système de macrophages dérivés du sang périphérique de furets et de macaque et analysé les mêmes paramètres que ceux mentionnés précédemment. Par la suite, j'ai infecté les animaux et comparé la réplication virale et la réponse des cytokines. Finalement, j'ai analysé toutes les données et participé activement à l'écriture de l'article. Pour ce faire, j'ai produit toutes les figures et écrit la première version de l'article au complet. J'ai par la suite effectué les corrections demandées par ma directrice de recherche concernant le texte ainsi que les figures. Finalement, j'ai participé aux étapes de soumission de l'article et écrit la première version de la lettre de réponse à l'éditeur.

Résumé

Dans le contexte d'infections avec des virus de la grippe hautement pathogènes, la protéine PB1-F2 contribue à la virulence et est associée à une augmentation de l'inflammation aux poumons. Par ailleurs, son rôle à la pathogénèse dans le contexte des virus de la grippe saisonniers n'est pas encore bien compris, particulièrement dans le cas des virus H1N1 qui possèdent soit une protéine de 87-90 acides aminés, soit une forme tronquée de 57 acides aminés ou ne l'expriment pas. Afin de comprendre la contribution de la protéine à virulence, nous avons introduit la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole de 1918 ou empêché son expression dans le virus A/USSR/90/77, une souche saisonnière qui exprime naturellement la forme tronquée de la protéine. Tous les virus se répliquaient de façon similaire et induisaient une réponse de cytokines comparable dans les cultures *ex vivo* de poumons de furet et de macaque. Par contre, le virus exprimant la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole était associée à un retard dans l'induction des cytokines pro-inflammatoires dans des macrophages dérivés du sang de furet, tandis que le virus n'exprimant pas la protéine induisait une réponse plus rapide. Un retard similaire, mais moins drastique, était aussi observé dans les lavages nasaux des furets infectés avec le virus exprimant la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole. Par contre, les trois virus ne différaient pas quant à leur virulence ou à la sévérité de la maladie, supportant les spéculations selon lesquelles la diversité de l'expression de PB1-F2 par les virus reflète son importance limitée dans la pathogénèse d'une infection primaire par des virus H1N1 saisonniers.

Abstract

In the context of infections with highly pathogenic influenza A viruses the PB1-F2 protein contributes to virulence and enhances lung inflammation. In contrast, its role in the pathogenesis of seasonal influenza strains is less clear, especially in the H1N1 subtype, where strains can have a full length 87-90 amino acid protein, a truncated 57 amino acid version, or lack the protein altogether. Towards this, we introduced the full length 1918 PB1-F2, or prevented PB1-F2 expression, in H1N1 A/USSR/90/77, a seasonal strain that naturally expresses a truncated PB1-F2. All viruses replicated with similar efficiency in ferret or macaque *ex vivo* lung cultures and elicited similar cytokine mRNA profiles. In contrast, the virus expressing the 1918 PB1-F2 protein caused a delay of pro-inflammatory responses in ferret blood-derived macrophages, while the PB1-F2 KO virus resulted in a more rapid response. A similar but less pronounced delay in innate immune activation was also observed in the nasal wash cells of ferrets infected with the 1918 PB1-F2-expressing virus. However, the three viruses did not differ in their virulence or clinical course in ferrets, supporting speculations that PB1-F2 is of limited importance for the pathogenesis of primary viral infection with human seasonal H1N1 viruses.

Introduction

Most influenza A viruses cause a mild infection of the upper respiratory tract that is usually cleared within 1-2 weeks (6), however, certain strains result in more severe disease (12, 29). There is thus considerable interest in identifying and characterizing potential virulence factors. PB1-F2, a small 87-90 amino acid protein encoded by a +1 open reading frame in the PB1 segment, is one of the proposed candidates (2). While the PB1 gene in most avian viruses encodes a full-length PB1-F2, mammalian viruses frequently carry truncated forms due to accumulation of premature stop codons (14). Within the H1N1 subtype, human viruses isolated between 1918 and 1947 express a full-length PB1-F2 protein. In 1950, a stop codon was introduced after amino acid residue 57, resulting in a C-terminally truncated protein (35), and the recently emerged pandemic 2009 H1N1 viruses have a stop codon at residue 11 (9).

The role of PB1-F2 in influenza pathogenesis remains controversial. The full-length H1N1 PB1-F2 protein, which carries a mitochondrial targeting sequence in its carboxy-terminal portion, enhances apoptosis and contributes to virulence in mice (2, 34). In contrast, the PB1-F2 protein found in H5N1 viruses does not localize to the mitochondria and has no apoptosis-enhancing effect (1). PB1-F2 also interacts with PB1 and regulates viral polymerase activity in a cell type- and strain-specific manner (13, 17, 20), and a role of PB1-F2 in the interaction with the cellular antiviral response has been reported. However, while one study observed a PB1-F2-mediated exacerbation of interferon (IFN)- β expression in human lung epithelial cells, a different study demonstrated an inhibition of type I IFN signaling associated with interaction of PB1-F2 with the mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) (15, 30). Finally, intranasal administration of synthetic full-length or carboxy-terminal portions of A/Brevig Mission/1/1918 (1918) and A/Puerto Rico/8/34 (PR8) PB1-F2 peptides led to recruitment of white blood cells into the lungs and exacerbated secondary bacterial infection in mice (18, 20).

To date, the contribution of PB1-F2 to virulence has been mostly investigated in mice using mouse-adapted viruses, revealing that the absence of PB1-F2 results in a reduction of virulence and lung inflammation, even though PB1-F2 deleted viruses reach wild type titers in the lungs (15, 20, 34). Introduction of the H1N1 1918 or the H5N1 A/Hong Kong/156/97 (HK/97) PB1-F2 into mouse-adapted strains revealed that a single amino acid change at position 66 (N66S) is responsible for the observed increased virulence in mice (3, 4, 19). Presence of the HK/97 PB1-F2 also resulted in a delayed onset of type I IFN and pro-inflammatory cytokine production, leading to more efficient replication and more severe lung pathology (3). In contrast, introducing

a functional PB1-F2 in the 2009 pandemic H1N1 A/California/04/09 (Cal/09) had little impact on virulence in mice and ferrets despite an increased induction of pro-inflammatory cytokine in mice (9).

To characterize the contribution of PB1-F2 to the virulence of a seasonal H1N1 virus in a naturally susceptible host, we generated recombinant viruses in the A/USSR/90/77 (USSR) background that expressed the 1918 PB1-F2 or that no longer produced the protein. After demonstrating that all viruses replicated with similar efficiency, we characterized the induction of pro-inflammatory cytokines and apoptosis in ferret and macaque *ex vivo* lung cultures and ferret blood-derived macrophages. The pathogenesis, cytokine responses, histopathological changes and extent of apoptosis were then compared in ferrets.

Materials and Methods

Cells and viruses. MDCK cells (ATCC CCL-34) and 293 cells (ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbeccos's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 5% FBS (Invitrogen). All influenza viruses were propagated in MDCK cells cultivated in DMEM with 2 µg/ml of TPCK-trypsin (DMEM-TPCK, Sigma). Virus titers were quantified by limiting dilution method and expressed as 50% tissue culture infectious dose per ml (TCID₅₀/ml).

Construction and recovery of recombinant viruses. To generate a USSR/90/77 (USSR) PB1 gene expressing the 1918 PB1-F2 open reading frame, the necessary nucleotide changes were introduced into the bi-directional PB1 expression plasmid (21) by site-directed mutagenesis taking care not to alter the PB1 open reading frame. The PB1-F2 KO virus was generated by disrupting the start codon and introducing a stop codon after 11 residues as previously described (20). None of the introduced changes alter the PB1 protein sequence or affect the N40 start codon (32).

Recombinant viruses were recovered as previously described (10). Briefly, semi-confluent 293 cells in a six-well plate were transfected with 0.5 µg of bi-directional expression plasmids containing each of the eight USSR segments using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Two days after transfection, the cells were trypsinized and transferred onto MDCK cells. The co-cultures were maintained in DMEM-TPCK trypsin until cytopathic effect was observed. The supernatant was then transferred on fresh MDCK cells to produce viral stocks.

For growth kinetics, 90% confluent MDCK cells were washed twice with PBS and infected at an MOI of 0.001 in DMEM-TPCK. After 30 min, the medium was changed, and cells and supernatant were harvested every 12 h for 2 days and the virus was titrated by limiting dilution method.

Ex vivo lung cultures. Lung slice cultures were generated from three ferrets (*Mustela putorius furo*) and one cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) based on a previously published protocol (26). Briefly, lungs were inflated by infusion with a 1:1 solution of DMEM/F12 (Invitrogen) and 0.8% low melting agarose (Fisher Scientific) at 50°C. After incubation on ice for 30 min, 3 mm thick sections were cut. Lung slices were infected with 3 x 10⁴ TCID₅₀ of the recombinant viruses and placed in a 1:1 solution of DMEM/F12 and DMEM media with antibiotics. At 24 and 48 h post-infection, the supernatant and the lungs were harvested for titration, immunohistochemistry, and RNA extraction.

Milliplex analysis. Cultured macaque lung slices were homogenized in 400 μ L of RIPA buffer (1% Triton X-100, 1mM DTT, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 10% glycerol) in a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen), and debris was pelleted by centrifugation at 14 000 g for 20 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by Bradford assay (Thermo Scientific) and 12.5 μ g of the cell lysate was used for each reaction. Concentrations of active caspase 3, GAPDH, and cleaved PARP were determined using the 3-Plex apoptosis signaling kit (EMD Millipore), while the concentrations of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF, and TNF- α were quantified with the non-human cytokine Milliplex map kit (EMD Millipore) following the manufacturer's instructions. Plates were read with a Bio-Plex 200 system (Biorad).

Differentiation of ferret blood-derived macrophages. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll (GE Healthcare) gradient centrifugation at 400 g for 40 min. Adherent monocytes were isolated by seeding PBMCs in 12-well plates overnight followed by a careful medium change, and macrophage differentiation was induced with 5 ng/ml of human GM-CSF (R&D System). After 6 days, the cells were infected with 3×10^4 TCID₅₀ of the recombinant viruses and harvested at 8, 16, and 24 h post-infection for RNA extraction and TUNEL staining.

Animal experiments. All animal studies were approved by the Institutional Care and Use committee of the INRS-Institut Armand-Frappier. Only ferrets seronegative for circulating influenza strains were used. Groups of at least 6 animals were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of the respective recombinant virus. Body temperature was recorded every 30 min using intraperitoneal implants (DSI) starting one day before infection. Clinical signs were monitored daily for the first four days and every second day thereafter. Clinical score was established according to a 0-1-2-3 scale, with 0 representing physiological range as previously described (21). Nasal washes were collected daily for the first four days and at day 6, and two animals were sacrificed on days two and four post-infection, and nasal turbinates and lungs were harvested. Data shown for rUSSR were obtained from 8 animals infected in the context of an earlier study (21).

Immunohistochemistry and titration. One third of the nasal turbinate and lung tissue were formalin-fixed, paraffin-embedded and cut in 5 microns sections. The slides were deparaffinized and rehydrated following standard immunohistochemistry protocols, and hematoxylin and eosin (H&E) stained. For the detection of infected cells by immunohistochemistry, the slides were microwaved for 15 min in 10 mM sodium citrate (pH 6) solution (Fisher Scientific) for antigen retrieval. After blocking with a 1:50 dilution of rabbit serum in PBS for 30 min, an influenza-specific antiserum (OBT1551, AbD Serotec) was added for 90 min at room temperature. The slides were washed three times with PBS and a biotinylated secondary antibody was added for 30 min followed by 30 min incubation with Alexa Fluor 488-labeled streptavidin. Nuclei were counterstained with DAPI and coverslips were mounted with Mowiol (Calbiochem).

For titration, tissues were weighed and homogenized in DMEM with a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen). Cell debris was removed by centrifugation and the supernatant was titrated by limiting dilution method. Titers are expressed as TCID₅₀/g.

TUNEL assay. The number of apoptotic cells was determined by TUNEL staining, using the *In situ* cell death detection kit TMR red (Roche) as previously described (24). Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate, and incubated for 1 h at 37°C with the TUNEL reaction mixture. Slides were washed twice with PBS and counterstained with DAPI. For infected macrophages, DAPI- and TUNEL-positive cells were counted in each well and the percentage of apoptotic cells was calculated. Results are expressed as fold change compared to non-infected cells.

RNA extraction and cytokine mRNA quantification by real time RT-PCR analysis. Immediately after collection, 140 µl of nasal wash was mixed with 560 µl of AVL buffer (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen) and stored at -80 °C. Lung *ex vivo* culture samples were placed in RNALater (Qiagen) and stored at -80 °C. For RNA isolation, samples were homogenized with a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen) in 350 µL of RLT buffer (RNeasy RNA extraction kit) supplemented with 1 % of β-mercaptoethanol. The RNA from the nasal washes, macrophages, and tissues was extracted following the manufacturer's instructions for the respective kit.

Ferret cytokine mRNA was quantified as previously described (21). Briefly, 10 ng of sample RNA was used for each reaction. The genes encoding for type I IFN, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , -6, -8 and CCL5 (GenBank accession no. AB513129.1) were cloned into pCR2.1-TOPO based on previously published sequences (22, 27, 28) and *in vitro* transcribed using T7 polymerase (New England Biolabs). Serial dilutions of the standards and samples were analysed by real-time RT-PCR using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen). The gene copy numbers were calculated by extrapolating data from the standard curve.

Statistical analysis. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0a. P values were calculated by individually comparing the different groups using an unpaired Mann-Whitney test.

Results

Characterization of recombinant viruses with altered PB1-F2 proteins. There is considerable variation in the length of PB1-F2 open reading frame within the H1N1 subtype, ranging from a full-length 87-90 amino acid protein for viruses isolated before 1950, over a truncated protein of 57 amino acids in the later strains including USSR, to a complete deletion in the recently emerged 2009 pandemic H1N1 viruses (9). To evaluate the contribution of PB1-F2 to the virulence of H1N1 viruses, we introduced the 1918 PB1-F2 open reading frame in the seasonal USSR strain by site-directed mutagenesis, carefully avoiding changes to the USSR PB1 protein sequence. In addition, a virus lacking PB1-F2 was produced by mutation of the start codon and introduction of a stop codon after 11 amino acids (20). The 1918 and USSR PB1-F2 proteins share 86% amino acid identity. However, the shorter USSR PB1-F2 lacks the C-terminal domain, which contains a mitochondrial targeting sequence, mediates PB1 binding, promotes inflammation, and interferes with type I IFN signaling (2, 17, 20, 30). In addition to a full-length C-terminal domain, the 1918 PB1-F2 protein has a serine at position 66 (Fig.1A), which was associated with increased pathogenicity of H5N1 and H1N1 viruses in mice (4). None of the other diverging residues have been associated with virulence or specific functions (Fig. 1A). While direct detection of PB1-F2 was not possible due to the lack of USSR PB1-F2 specific antibodies, the sequence of the PB1 segments was confirmed for each virus. Growth kinetics of recombinant and parental viruses in MDCK cells were not significantly different, even though replication of the PB1-F2 KO virus was slightly delayed (Fig.1B), confirming previous reports that PB1-F2 slightly enhances the viral polymerase activity (20).

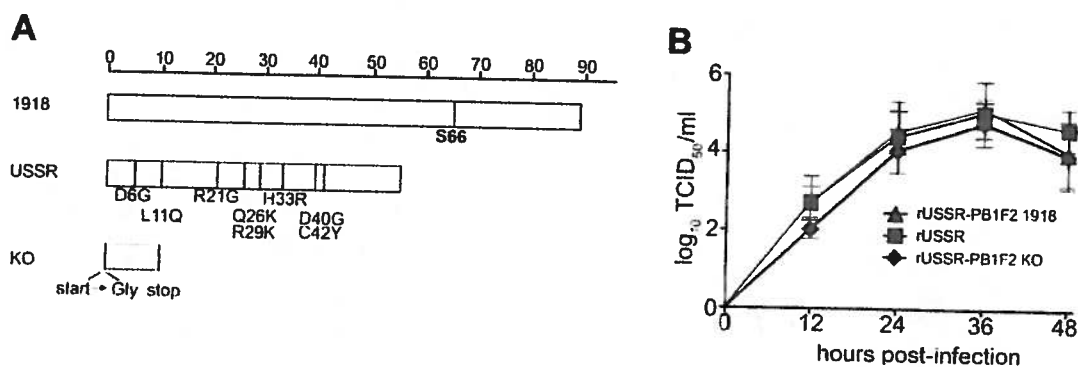


Figure 1: Generation of recombinant viruses. (A) Schematic representation of the different PB1-F2 proteins. Amino acid sequences were aligned using the Megalign 8.0.2 software. Each PB1-F2 protein is represented by a bar, and residues that differ between the 1918 and USSR PB1-F2 proteins are indicated below the USSR protein. The serine at position 66, which has been associated with increased virulence, is highlighted in bold. (B) Growth kinetics of the recombinant viruses. MDCK cells were infected at an MOI of 0.001 and the supernatant was harvested at the indicated time points. Each value represents the mean of three independent experiments performed in triplicate; error bars indicate the standard deviation (SD).

Infection efficacy and cytokine profiles in ferret and macaque *ex vivo* lung cultures are PB1-F2-independent. The presence of a full-length PB1-F2 protein has been associated with increased lung pathology and inflammation in mice (3, 19). To directly compare the contribution of PB1-F2 to infection efficacy and inflammatory responses in the lung of naturally susceptible host species, we established ferret and macaque *ex vivo* lung cultures. Lungs from healthy animals were inflated with a mixture of DMEM/F12 media and 0.8% low melting agarose to preserve the lung anatomy and structure, and cut in slices of approximately 3 mm thickness. The lung slices maintained a typical pulmonary parenchyma with alveolar septa of normal thickness, uniformly expanded alveoli without areas of atelectasis or over-inflated regions (Fig. 2A). Since viability started to decrease on day 3 after isolation (data not shown), samples were analyzed 24 and 48 h after infection with 3×10^4 TCID₅₀ of the recombinant viruses. At these time points, no difference in frequency and morphology of infected cells was detected (Fig. 2B and data not shown), and all viruses reached similar titers in tissue homogenates (Fig. 2C).

To determine if PB1-F2 altered the induction or magnitude of type I IFNs and pro-inflammatory cytokines, we generated cytokine mRNA profiles from the lung homogenates. An upregulation of IFN- β , IL-6, IL-8, and CCL5 mRNAs was observed at 24 or 48 h post-infection (Fig. 2D), with USSR generally inducing a weaker but not statistically significantly different response, while IFN- α , IFN- γ , and IL-1 β mRNA expression was not induced (data not shown). Since full length PB1-

F2 with the mitochondrial targeting sequence in its carboxy-terminus has been associated with increased apoptosis (2, 33), we performed TUNEL assays on paraffin-embedded lung slices. However, only few apoptotic cells were observed 24 h or 48 h after infection, and there was no difference between the viruses (data not shown).

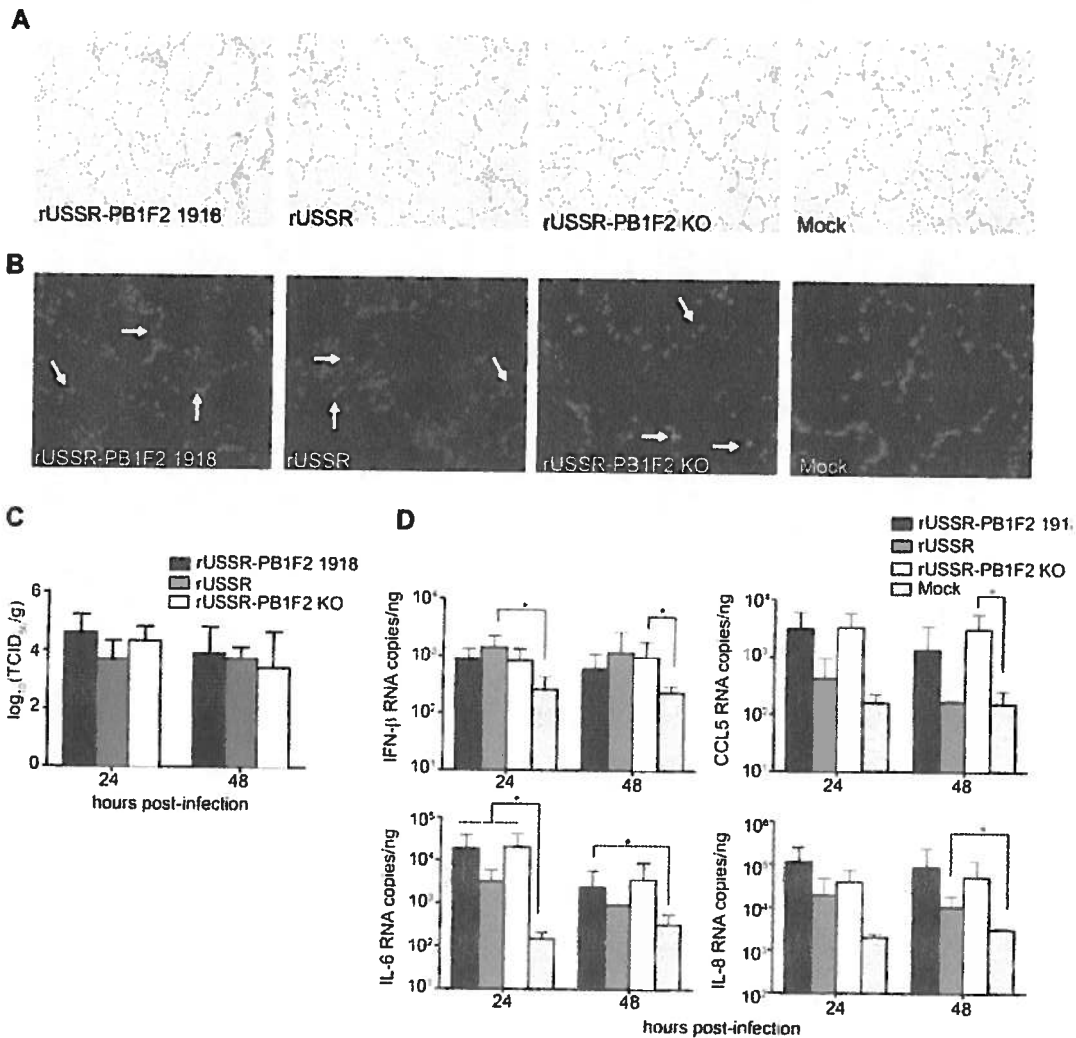


Figure 2: Infection and cellular responses in ferret *ex vivo* lung cultures. (A) H&E and (B) immunohistochemical staining of lung sections. Lung slices were harvested 24 h after infection with 3×10^4 TCID₅₀ of the respective viruses, paraffin-embedded, and H&E stained or stained with a polyclonal anti-influenza antibody and counterstained with DAPI. Arrows indicate the infected cells. Pictures are taken at 200- or 400-fold magnifications. (C) Viral titers in the homogenized lung slices expressed as TCID₅₀/g. (D) Cytokine responses induced by the recombinant viruses. Infected lung slices were harvested at the indicated time points, total RNA was extracted, and 10 ng was used for each reaction. The copy number was extrapolated from an *in vitro*-transcribed mRNA of known concentration. Mean and SD, based on three independent experiments performed in duplicate, are shown.

Since mRNA levels do not always reflect cytokine protein levels, we repeated the experiment in *ex vivo* lung cultures from cynomolgus macaques, for which sensitive protein-based cytokine assays are available. Consistent with the results obtained in ferret cultures, no differences in infection and replication efficiency were observed for the three recombinant viruses (Fig. 3 A and B). The Milliplex cytokine profiles in lung homogenates revealed only a weak induction of IL-8 and IL-1 β at 48 h after infection, with USSR again resulting in lower levels. However, protein concentrations did not differ significantly between the viruses and mock-infected control lysates (Fig.3C). Cytokines that are mainly produced by immune cells, such as MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF, IL-10, and IL-17 were not induced in our cultures (data not shown). Furthermore, protein concentrations of active caspase-3 and cleaved PARP were also independent of the virus used, suggesting that PB1-F2 has no impact on the induction of apoptosis in *ex vivo* lung slice cultures (data not shown). Taken together, these results indicate that PB1-F2 alone has little effect on infection efficiency and local cytokine responses in isolated lung tissue.

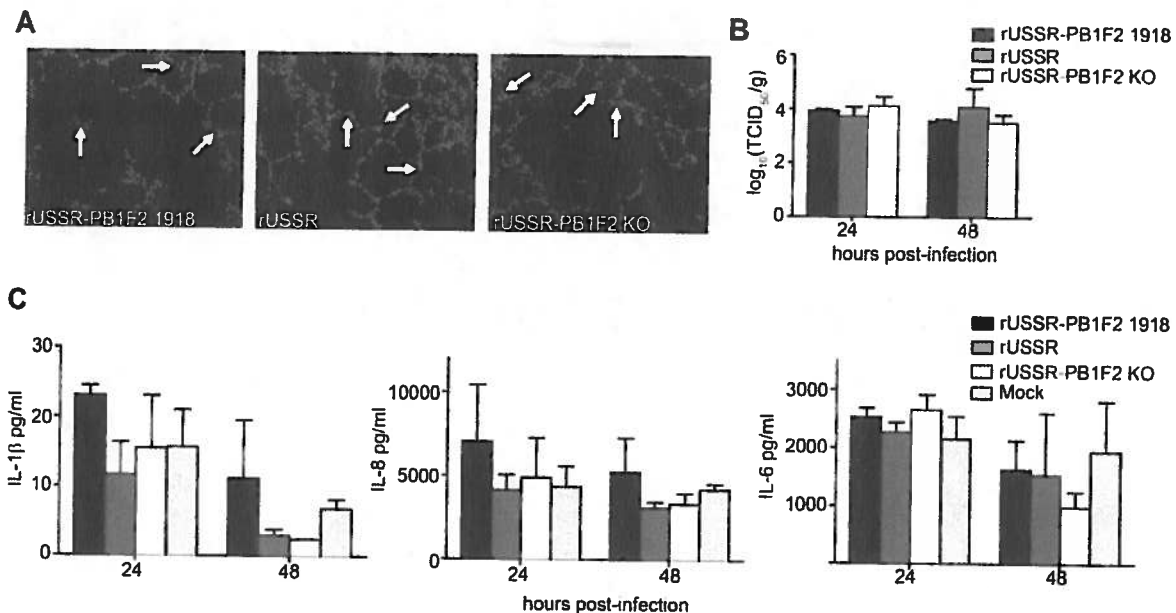


Figure 3: Infection and cytokine profiles in macaque lung *ex vivo* cultures. (A) Detection of the infected cells in paraffin sections from tissue harvested 24 h after infection was performed as previously described. Pictures were taken at a 400-fold magnification and arrows indicate infected cells. (B) The titers of homogenized lung slices were determined by limiting dilution method and are expressed as TCID₅₀/g. (C) Quantification of IL-1 β , IL-8, and IL-6 production at 24 and 48 h post-infection. Tissues were homogenized in RIPA buffer and 12.5 μ g of each sample were analyzed by bioplex assay. Values represent the mean of three samples and error bars indicate the SD.

PB1-F2 modulates cytokine responses in ferret blood-derived macrophages. Previous studies propose that the PB1-F2-mediated induction of apoptosis and cytokine responses may be immune cell-specific (2, 25). We thus compared cytokine profiles in ferret blood-derived macrophages infected with the recombinant viruses. All viruses resulted in similar NP mRNA levels (Fig. 4A), confirming that there were no differences in infection efficiency. While the virus lacking PB1-F2 resulted in an upregulation of IL-1 β , IL-6, and IL-8 mRNA levels, indicative of a pro-inflammatory response, rUSSR only displayed a mild and delayed response, and rUSSR-PB1F2 1918 viruses prevented all immune activation (Fig. 4B). None of the recombinant viruses induced IFN- α , IFN- γ or CCL5 expression (Fig. 4B and data not shown), indicating that PB1-F2 modulates the induction of certain pro-inflammatory cytokines in ferret macrophages. The corresponding analysis of protein-based cytokine profiles in macaque blood-derived macrophages was not possible due to insufficient protein concentrations.

Exposure to the 1918 PB1-F2 peptide induced apoptosis in a murine macrophage cell line, but this effect was lost when the peptide was expressed in the context of PR8 (18). To investigate the effect of PB1-F2 during infection of ferret blood-derived macrophages, we determined the increase of TUNEL-positive apoptotic cells associated with each virus. After 8 h, there were around twice as many apoptotic cells in rUSSR-PB1F2 1918-infected cultures compared to the parental USSR or the PB1-F2 KO virus, while the levels of apoptosis after 16 h were similar for all samples (Fig. 4C), demonstrating that PB1-F2 proteins carrying a mitochondrial localisation signal more rapidly induce apoptosis in ferret blood-derived macrophages.

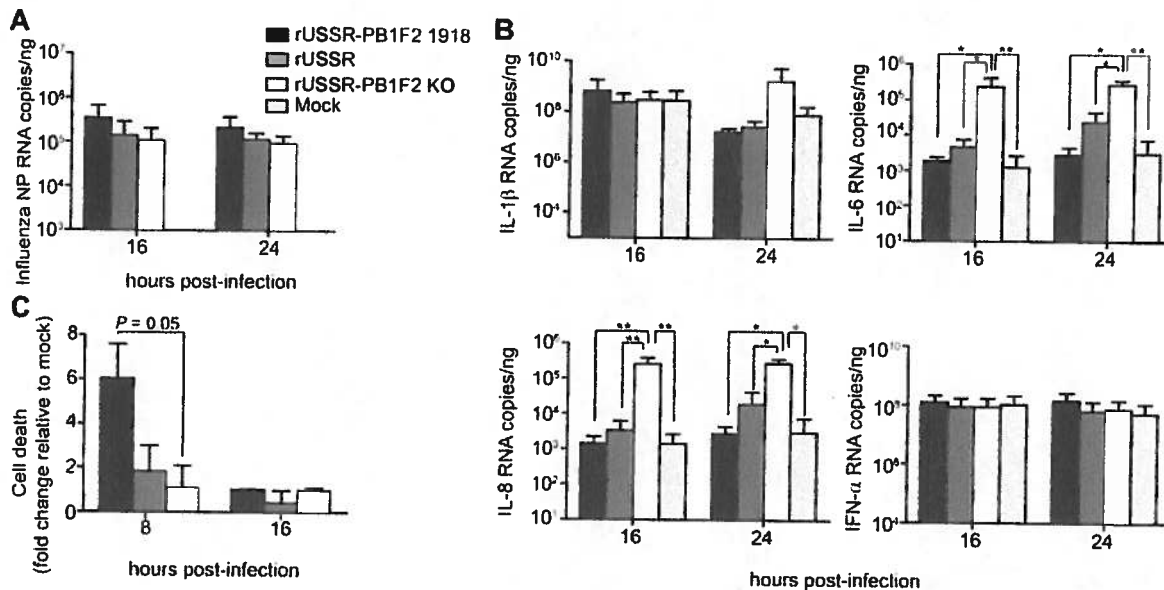


Figure 4: Cytokine responses in ferret blood-derived macrophages. (A) Copy numbers of influenza NP RNA, and (B) of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, and IFN- α at 16 and 24 h post-infection. Blood-derived macrophages were infected with 3×10^4 TCID₅₀ of the respective viruses. Copy numbers were quantified by real-time RT-PCR using 10 ng of total RNA. Mean and SD, based on three independent experiments performed in duplicate, are shown. (C) Induction of apoptosis in ferret blood-derived macrophages. The cells were infected with the recombinant viruses and TUNEL staining was performed after 8 h or 16 h, respectively. Values represent the mean of at least two independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was determined using an unpaired Mann-Whitney test. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.01$.

PB1-F2 does not affect the virulence of a seasonal H1N1 strain in ferrets. To evaluate the contribution of PB1-F2 to the virulence of a seasonal influenza strain in a naturally susceptible host, groups of 6-8 ferrets were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of the respective recombinant virus. All animals developed a fever that peaked between day 1 and 2 post-infection and rapidly declined (data not shown). The different viruses caused an overall similar disease, with moderate clinical signs indicative of an upper and lower respiratory tract infection (Fig. 5A). Some of the rUSSR-PB1F2 1918 infected animals developed more severe clinical signs between days 2 and 4 post-infection, with an increased quantity of seromucous nasal exudates compared to the other groups. However, none of these differences were statistically significant.

To compare viral replication in the upper and lower respiratory tract, two ferrets of each group were sacrificed at days 2 and 4 post-infection and the nasal turbinates and lungs were harvested. Similar titers were found for the different viruses in both the upper and lower respiratory tract (Fig. 5B and C), indicating that PB1-F2 does not influence replication efficacy in ferrets, thus reproducing results obtained in mice (9, 20, 34). Histological examination of H&E stained lung sections from animals sacrificed on day 2 after infection revealed discrete changes characterized by thickening of the alveolar walls, partial loss of the epithelial layer in the bronchi, and recruitment of inflammatory cells that seemed slightly more pronounced in rUSSR-PB1F2 1918 and rUSSR-infected animals (Fig. 5D). TUNEL assays were performed on the lung slides and no difference in the number of apoptotic cells was observed (data not shown).

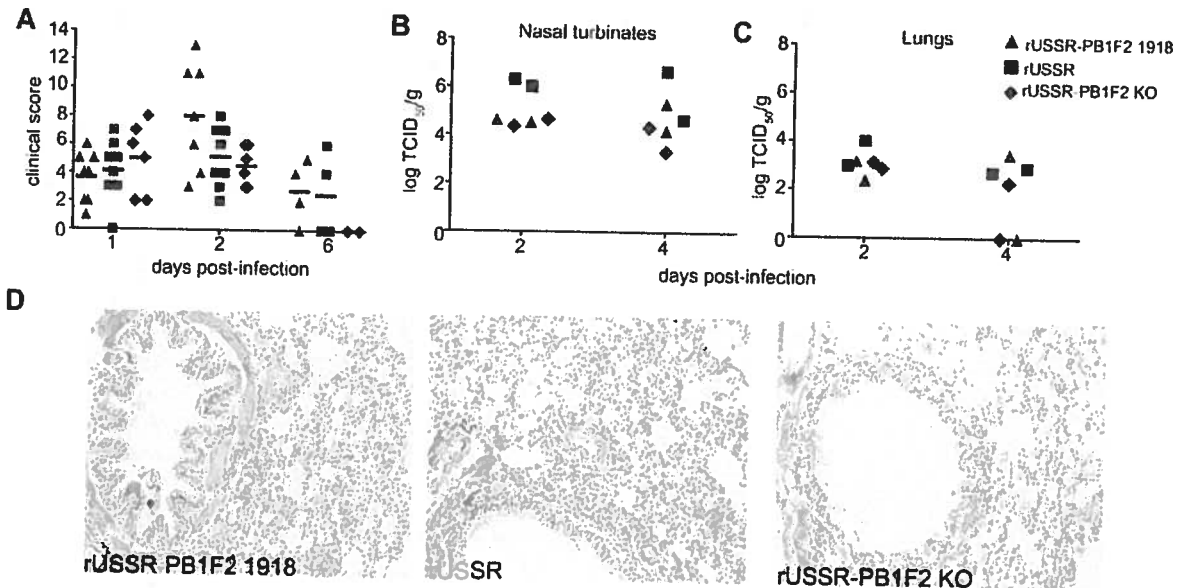


Figure 5: Pathogenesis and virulence of the recombinant viruses in ferrets. (A) Clinical scores, (B) nasal turbinates and lung titers. Ferrets were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of the respective virus (n=8 for rUSSR-PB1-F2 1918, n=6 for rUSSR-PB1-F2 KO). For rUSSR, data from 8 animals infected with USSR during an earlier study (21) are shown. (A) Clinical scores represent the sum of the activity and respiratory signs of disease scored as outlined in the material and methods. (B) At days 2 and 4 post-infection, two ferrets of each group were sacrificed, and nasal turbinates and the lower right lung lobe were harvested and homogenized for tissue titration or fixed for histopathological analysis. Days post-infection are indicated on the x axis, and clinical scores and virus titers, expressed as TCID₅₀/g, are plotted on the respective y axes. Each symbol represents one animal. (C) Histopathological changes in the lungs. The lower right lobe of ferrets sacrificed at day 2 post-infection was haematoxylin and eosin-stained and pictures were taken at a 400-fold magnification.

The presence of the 1918 PB1-F2 is associated with a stronger induction of IL-1 β but less IFN- α and IL-6 *in vivo*. Previous studies *in vitro* and in mice demonstrated that PB1-F2 influences the pro-inflammatory response and inhibits type I IFN production (19, 30). To determine if PB1-F2 had similar effect in the context of an infection of a naturally susceptible host with a seasonal strain, we generated cytokine profiles from nasal wash cells mRNA at different times over the course of the infection. One day after infection, the virus with the 1918 PB1-F2 induced the weakest IFN- α response, with 10-fold lower expression levels than the two other viruses (Fig.6A, $P < 0.001$). However, there was no difference in IFN- β production (Fig. 6B). We next analyzed the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-8, and IL-6. The presence of PB1-F2 resulted in significantly higher IL-1 β mRNA levels, but the response associated with the 1918 PB1-F2 was significantly lower than that induced by rUSSR ($P < 0.01$) (Fig. 6C). No difference in IL-8 mRNA levels was observed (Fig. 6D), while the 1918 PB1-F2 virus induced a weaker IL-6 expression than rUSSR and rUSSR-PB1F2 KO ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) (Fig. 6E). At later time points, differences between the groups were less pronounced, most likely reflecting the overall mild course of disease (data not shown). Similar cytokine profiles and kinetics were observed in cells from bronchoalveolar lavages (data not shown), indicating that the 1918 PB1-F2 reduces the initial type I IFN and pro-inflammatory cytokine response in the upper and lower respiratory tract.

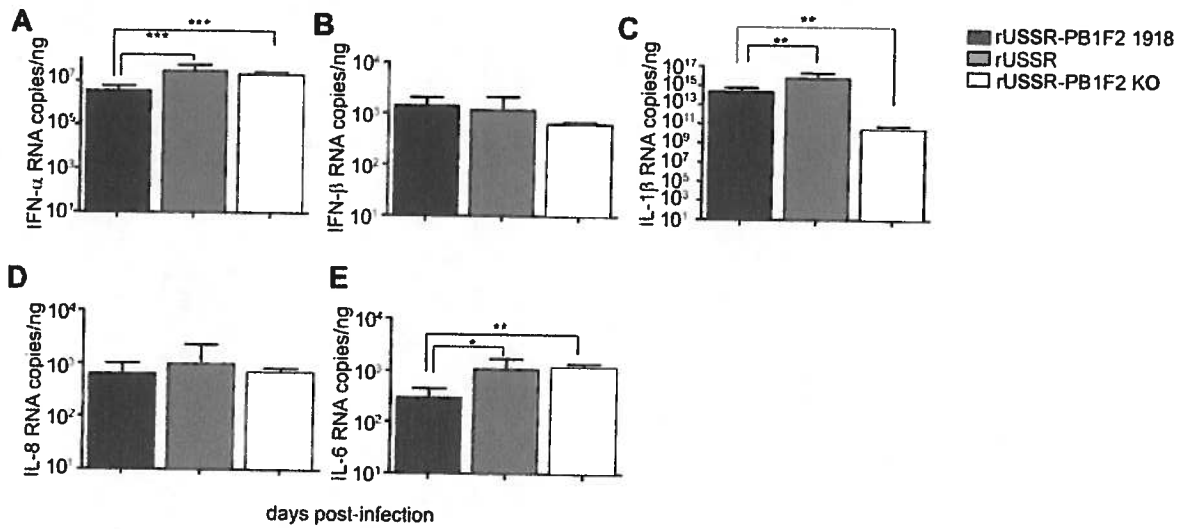


Figure 6: Comparison of cytokine mRNA expression in ferret nasal washes. Copy numbers of the type I IFN, (A) IFN- α and (B) IFN- β , and the pro-inflammatory cytokines (C) IL-1 β , (D) IL-8, and (E) IL-6 at day 1 post-infection were quantified by real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from nasal wash cells and 10 ng was used for each reaction. The copy number was extrapolated from *in vitro*-transcribed mRNA of known concentration. Each value represents the mean of at least 6 animals and error bars reflect the SD. Statistical significance was determined using an unpaired Mann-Whitney test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$.

Discussion

Since its discovery as an accessory viral protein, PB1-F2 has been extensively investigated. *In vitro*, PB1-F2 induces apoptosis and modulates pro-inflammatory cytokine and type I IFN expression (2, 15, 16, 30), and studies in mice with mouse-adapted viruses revealed increased innate immune activation and lung inflammation in the presence of PB1-F2 from virulent strains (4, 19). Here we investigated the role of PB1-F2 in the context of a seasonal human influenza strain in a naturally susceptible host. While PB1-F2 had little impact on the replication and cellular responses in *ex vivo* lung cultures, presence of the full-length 1918 PB1-F2 protein resulted in a delay of pro-inflammatory responses in ferret blood-derived macrophages and to a lesser extent in the nasal wash cells of infected ferrets. However, neither the presence of the full-length 1918 PB1-F2 nor its deletion altered the course or severity of disease in ferrets, indicating that the contribution of PB1-F2 to the pathogenesis of primary viral infection with seasonal influenza viruses is minor.

PB1-F2 delays pro-inflammatory responses in macrophages. In mice, introduction of the entire 1918 PB1-F2, or the N66S mutation alone, into the context of the mouse-adapted H1N1 WSN/33 strain resulted in an increased production of pro-inflammatory cytokines at later infection stages (3, 4, 19). However, further characterization of the N66S mutant revealed decreased type I IFN production during the initial phase of the infection (3, 5, 30). Comparison of the PB1-F2-associated cellular responses in different cell types revealed a reduced type I IFN and pro-inflammatory response in blood-derived macrophages and dendritic cells, while no differences were observed in epithelial cells (25). We also did not observe any effect of PB1-F2 on the cytokine profile in ferret and macaque lung *ex vivo* cultures, confirming that the contribution of the protein to the induction of an inflammatory response in lung cells is limited. In ferret blood-derived macrophages, the absence of PB1-F2 resulted in a strong induction of IL-1 β , IL-6, and IL-8, while the differences in pro-inflammatory responses between the truncated 57 residue USSR PB1-F2 and the full-length 1918 protein with a serine at position 66 were modest, suggesting that this residue is less important in the context of a seasonal virus. However, the 1918 PB1-F2 protein was consistently associated with the lowest responses, reproducing the overall tendencies reported for WSN/33 viruses in murine cells (25). Our study thus provides further evidence for an immune cell-specific activity of PB1-F2 in mammals.

PB1-F2 contributes little to the primary viral pathogenesis of seasonal influenza viruses. In mice, which are only susceptible to mouse-adapted or highly pathogenic influenza viruses,

PB1-F2 deletion or the presence of asparagine at position 66 result in reduced disease severity, while the change of position 66 to serine increases mortality (3, 18, 19, 34). In contrast, results obtained in ferrets are less clear-cut. A recombinant seasonal H1N1 virus carrying the 1918 PB1 segment led to efficient spread to and replication in the lung (31), implicating PB1-F2 as a contributing factor, while restoration of a full length PB1-F2 in a H1N1 pandemic 2009 virus regardless of position 66 did not increase virulence (9). Consistent with the latter report, we did not detect significant differences in the disease severity, lung pathology, and viral load in the upper or lower respiratory tract of ferrets infected with the different USSR-based PB1-F2 mutant viruses, indicating that PB1-F2 does not influence the clinical disease caused by seasonal influenza viruses alone. However, its contribution to disease severity in the context of viral or bacterial co-infections underlying a large proportion of severe influenza cases (7, 8) remains to be determined. While the mouse studies indicate a role of PB1-F2 in the primary viral pathogenesis of highly virulent influenza viruses in mammals, the extent of its contribution has to be validated ferrets or macaques, which more closely reproduce the disease seen in human patients.

Only the 1918 PB1-F2 protein modulates local cytokine responses *in vivo*. An early delay in innate immune activation has been observed in lung tissue of mice infected with a sublethal mouse-adapted virus carrying the PB1-F2 N66S mutation (3), supporting a growing body of evidence from *in vitro* studies that PB1-F2 delays innate immune activation (5, 30). Here we observed that only the N66S carrying 1918 PB1-F2 protein was associated with an inhibition of IFN- α , IL-1 β , and IL-6 induction in ferret nasal wash cells at day 1 after infection, providing further evidence for an immunomodulatory role of full-length PB1-F2 proteins with this mutation. However, in contrast to the results obtained in blood-derived macrophages, where absence of PB1-F2 led to ten- to hundredfold increases in cytokine mRNAs, the differences associated with the 1918 PB1-F2 *in vivo*, though statistically significant, were only around three- to fivefold. By demonstrating that PB1-F2 contributes little to innate immune activation and overall inflammatory responses in the context of a primary seasonal influenza infection, where infection of macrophages and other immune cells is rare, our results support an increasing body of evidence that this protein is not a major virulence factor in mammals. However, the observed PB1-F2-mediated delayed activation of inflammatory cells represents a possible mechanism of virulence enhancement in the context of infections with already highly pathogenic strains or co-infections with several pathogens, which result in increased influx of immune cells (11, 23).

Acknowledgments

We thank all laboratory members for continuing support and lively discussions, and Alain Lamarre for his helpful comments on the manuscript. We are particularly grateful to Bevan Sawatsky and Margarita Legaspi for help with the animal studies. This work was supported by grants #NIP-79937 and #83146 from the Canadian Institutes of Health Research and #9488 from the Canadian Foundation for Innovation to V.v.M., and Armand-Frappier Foundation and FRSQ scholarships to I.M.

References

1. **Chen, C. J., G. W. Chen, C. H. Wang, C. H. Huang, Y. C. Wang, and S. R. Shih.** 2010. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J Virol* **84**:10051-10062.
2. **Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**:1306-1312.
3. **Conenello, G. M., J. R. Tisoncik, E. Rosenzweig, Z. T. Varga, P. Palese, and M. G. Katze.** 2011. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol* **85**:652-662.
4. **Conenello, G. M., D. Zamarin, L. A. Perrone, T. Tumpey, and P. Palese.** 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**:1414-1421.
5. **Dudek, S. E., L. Wixler, C. Nordhoff, A. Nordmann, D. Anhlan, V. Wixler, and S. Ludwig.** 2011. The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biol Chem* **392**:1135-1144.
6. **Eccles, R.** 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* **5**:718-725.
7. **Esper, F. P., T. Spahlinger, and L. Zhou.** 2011. Rate and influence of respiratory virus co-infection on pandemic (H1N1) influenza disease. *J Infect* **63**:260-266.
8. **Estenssoro, E., F. G. Rios, C. Apezteguia, R. Reina, J. Neira, D. H. Ceraso, C. Orlandi, R. Valentini, N. Tiribelli, M. Brizuela, C. Balasini, S. Mare, G. Domeniconi, S. Ilutovich, A. Gomez, J. Giuliani, C. Barrios, and P. Valdez.** 2010. Pandemic 2009 influenza A in Argentina: a study of 337 patients on mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* **182**:41-48.
9. **Hai, R., M. Schmolke, Z. T. Varga, B. Manicassamy, T. T. Wang, J. A. Belser, M. B. Pearce, A. Garcia-Sastre, T. M. Tumpey, and P. Palese.** 2010. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol* **84**:4442-4450.

10. **Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster.** 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6108-6113.
11. **Kash, J. C., K. A. Walters, A. S. Davis, A. Sandouk, L. M. Schwartzman, B. W. Jagger, D. S. Chertow, Q. Li, R. E. Kuestner, A. Ozinsky, and J. K. Taubenberger.** 2011. Lethal synergism of 2009 pandemic H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses. *MBio* **2**
12. **Khanna, M., P. Kumar, K. Choudhary, B. Kumar, and V. K. Vijayan.** 2008. Emerging influenza virus: a global threat. *J Biosci* **33**:475-482.
13. **Kosik, I., I. Krejnusova, M. Bystricka, K. Polakova, and G. Russ.** 2011. N-terminal region of the PB1-F2 protein is responsible for increased expression of influenza A viral protein PB1. *Acta Virol* **55**:45-53.
14. **Krumbholz, A., A. Philipps, H. Oehring, K. Schwarzer, A. Eitner, P. Wutzler, and R. Zell.** 2011. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* **200**:69-75.
15. **Le Goffic, R., E. Bouguyon, C. Chevalier, J. Vidic, B. Da Costa, O. Leymarie, C. Bourdieu, L. Decamps, S. Dhone-Pollet, and B. Delmas.** 2010. Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* **185**:4812-4823.
16. **Le Goffic, R., O. Leymarie, C. Chevalier, E. Rebours, B. Da Costa, J. Vidic, D. Descamps, J. M. Sallenave, M. Rauch, M. Samson, and B. Delmas.** 2011. Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein. *PLoS Pathog* **7**:e1002202.
17. **Mazur, I., D. Anhlan, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert, and S. Ludwig.** 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**:1140-1152.
18. **McAuley, J. L., J. E. Chipuk, K. L. Boyd, N. Van De Velde, D. R. Green, and J. A. McCullers.** 2010. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog* **6**:e1001014.

19. **McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell, and J. A. McCullers.** 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2:240-249.
20. **McAuley, J. L., K. Zhang, and J. A. McCullers.** 2010. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *J Virol* 84:558-564.
21. **Meunier, I., and V. von Messling.** 2011. NS1-mediated delay of type I interferon induction contributes to influenza A virulence in ferrets. *J Gen Virol* 92:1635-1644.
22. **Nakata, M., T. Itou, and T. Sakai.** 2008. Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of the ferret (*Mustela putorius furo*). *J Vet Med Sci* 70:543-550.
23. **Perrone, L. A., J. K. Plowden, A. Garcia-Sastre, J. M. Katz, and T. M. Tumpey.** 2008. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* 4:e1000115.
24. **Rudd, P. A., L. E. Bastien-Hamel, and V. von Messling.** 2010. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J Gen Virol* 91:980-989.
25. **Schmolke, M., B. Manicassamy, L. Pena, T. Sutton, R. Hai, Z. T. Varga, B. G. Hale, J. Steel, D. R. Perez, and A. Garcia-Sastre.** 2011. Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathog* 7:e1002186.
26. **Siminski, J. T., T. J. Kavanagh, E. Chi, and G. Raghu.** 1992. Long-term maintenance of mature pulmonary parenchyma cultured in serum-free conditions. *Am J Physiol* 262:L105-10.
27. **Svitek, N., P. A. Rudd, K. Obojes, S. Pillet, and V. von Messling.** 2008. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376:53-59.
28. **Svitek, N., and V. von Messling.** 2007. Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* 362:404-410.

29. **Tang, J. W., N. Shetty, T. T. Lam, and K. L. Hon.** 2010. Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans. *Infect Dis Clin North Am* **24**:603-617.
30. **Varga, Z. T., I. Ramos, R. Hai, M. Schmolke, A. Garcia-Sastre, A. Fernandez-Sesma, and P. Palese.** 2011. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog* **7**:e1002067.
31. **Watanabe, T., S. Watanabe, K. Shinya, J. H. Kim, M. Hatta, and Y. Kawaoka.** 2009. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:588-592.
32. **Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay, and P. Digard.** 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**:8021-8031.
33. **Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang, and P. Palese.** 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**:e4.
34. **Zamarin, D., M. B. Ortigoza, and P. Palese.** 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**:7976-7983.
35. **Zell, R., A. Krumbholz, A. Eitner, R. Krieg, K. J. Halbhuber, and P. Wutzler.** 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol* **88**:536-546.

Publication no. 3

Virulence differences of closely related pandemic 2009 H1N1 isolates correlate with increased inflammatory responses in ferrets

Isabelle Meunier ^a, Carissa Embury-Hyatt ^b, Shane Stebner ^c, Michael Gray ^c, Nathalie Bastien ^c, Yan Li ^c, Francis Plummer ^{d,e,c}, Gary P. Kobinger ^{c,d,e}, Veronika von Messling ^{a,f}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada

^b National Centre for Foreign Animal Disease, Canadian Food Inspection Agency, Winnipeg, Manitoba, Canada

^c National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Manitoba, Canada

^d Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

^e Department of Immunology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

^f Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore

Received: 5 August 2011

Accepted: 19 October 2011

Virology (2012) 422:125-31.

Pour cet article, j'ai réalisé le tableau 1 et la figure 5. Pour le tableau, les séquences de plusieurs isolats du virus pandémique ont été utilisées pour établir une séquence consensus. Cette séquence a été comparée avec celle des deux isolats testés dans cet article et les acides aminés différents de la séquence consensus ont été notés. Pour la figure 5, j'ai analysé par RT-PCR quantitatif les cytokines présentes dans les lavages nasaux. J'ai finalement analysé toutes les données, généré les figures et participé à la rédaction de l'article. Plus précisément, j'ai écrit la première version des légendes des figures, la section résultats (sauf celle concernant les coupes histologiques) et le matériel et méthodes.

Résumé

Plusieurs des isolats obtenus tôt au début de la pandémie du virus de la grippe H1N1 ont causé une maladie sévère dans des modèles animaux différents, tandis que la majorité des autres isolats ont plutôt induit une maladie moyennement sévère, comparable à celle des virus saisonniers. Dans cette étude, la pathogenèse de l'isolat virulent A/Mexico/InDRE4487/2009 et celle de l'isolat canadien moyennement virulent A/Canada-AB/RV1532/2009 a été comparée chez les furets. Ces deux virus ne diffèrent que par neuf acides aminés, aucun n'ayant précédemment été identifié comme facteur de virulence. L'isolat mexicain a causé la maladie la plus sévère, avec un plus grand taux de mortalité et a atteint des titres élevés dans les lavages nasaux. Les deux virus se répliquaient de façon comparable dans le tractus respiratoire, mais seulement l'isolat virulent a été détecté dans les intestins après 3 jours post-infection. Pendant la phase aiguë de la maladie, les deux virus étaient associés à une pathologie similaire dans les poumons. Par contre, même après qu'il soit éliminé, le virus mexicain causait une inflammation sévère aux poumons. Ce dernier était aussi associé à une réponse plus rapide et plus soutenue de cytokines pro-inflammatoires, indiquant que la dérégulation précoce de la réponse immunitaire contribue de façon importante à l'issue de la maladie.

Abstract

Several early pandemic H1N1 influenza isolates cause severe disease in different animal models, while most strains result in mild clinical signs similar to seasonal influenza. In this study, the pathogenesis of the virulent Mexican isolate A/Mexico/InDRE4487/2009 and a mild Canadian isolate A/Canada-AB/RV1532/2009 was compared in ferrets. These viruses differed at nine residues, none of which has been previously identified as virulence factor. The Mexican isolate caused more severe disease and higher mortality, and reached higher peak nasal wash titers. Both viruses grew similarly in the respiratory tract, but only the virulent virus was detected in the gut after day 3. During the acute phase, both strains caused similar lung pathology, however the Mexican isolate induced severe inflammation even after virus clearance. This virus was also associated with a rapid and sustained induction of inflammatory cytokines, indicating that early dysregulation of the host response contributes importantly to the disease outcome.

Introduction

In April 2009, a novel reassortant H1N1 influenza virus emerged, combining segments of human, avian, and Eurasian and North American porcine origin (Smith et al., 2009). In contrast to contemporary seasonal influenza strains, most pandemic H1N1 2009 (pH1N1) viruses express a truncated PB1-F2 protein, a putative virulence factor, but its reconstitution did not result in increased virulence (Hai et al., 2010). Furthermore, the pH1N1 NS1 protein carries amino acid changes abolishing its ability to block host gene expression and lacks the 11 C terminal residues, compared to NS1 proteins originating from seasonal human strains (Hale et al., 2010a; Hale et al., 2010b). However, restoration of host gene expression inhibition and expression of the full length protein did not result in increased virulence in mice or ferrets (Hale et al., 2010a; Hale et al., 2010b), while introduction of mutations in the C-terminal part that result in a PDZ domain as found in NS1 proteins of seasonal viruses increased the virulence in mice (Ozawa et al., 2011). Similarly, mutation PB2 residues E627K and D701N, which contribute importantly to mammalian host adaptation, from the avian consensus originally found in pH1N1 viruses to the mammalian consensus did not increase replication efficiency in mammalian cells or virulence (Herfst et al., 2010). More recently, a contribution to virulence was proposed for the D222G mutation in the hemagglutinin (HA) protein found in several severe clinical cases, but further characterization revealed an alteration in receptor binding but no increase in virulence or transmissibility (Chutinimitkul et al., 2010). However, despite the absence of most known virulence-enhancing mutations, this virus rapidly spread worldwide, causing the first pandemic of the 21st century (Fraser et al., 2009; Garten et al., 2009).

Even though the disease severity and case fatality rate associated with pH1N1 has been similar to seasonal influenza (Pebody et al., 2010; Khandaker et al., 2011), an increased incidence of pneumonia and deaths has been observed in young adults (Chowell et al., 2009). Compared to seasonal H1N1 strains, pH1N1 viruses have a stronger tropism to the lower respiratory tract and cause more severe inflammatory changes in the lung in different animal models, even though the clinical disease is similar (Itoh et al., 2009; Maines et al., 2009). However, certain early isolates cause more severe disease in ferrets and cynomolgus macaques (Kobinger et al., 2010; Safronetz et al., 2011), indicating that the few genetic differences between pH1N1 strains importantly influence their virulence.

The present study compares the pathogenesis and host responses of a virulent early Mexican isolate and a mild Canadian isolate in ferrets. We observed that both viruses caused similar

inflammation in the lung at early disease stages and replicated with similar efficiency. However, the more virulent strain was associated with higher peak nasal wash titers, prolonged presence in the gastro-intestinal tract, sustained inflammation after virus clearance and a distinct cytokine profile.

Results

The virulent Mexican and mild Canadian isolates differ by only nine amino acids. To investigate the heterogeneity in disease severity observed for early pH1N1 viruses, we chose the Mexican isolate A/Mexico/InDRE4487/2009 (MX4487) obtained from a patient with severe disease, and the Canadian isolate A/Canada-AB/RV1532/2009 (RV1532), which originated from a patient with unremarkable influenza-like symptoms. The PB1 and M segments are completely identical for both viruses and correspond to the pH1N1 consensus, while one conservative amino acid exchange is found in each of the PA, NP, and NS1 genes (Tab. 1). In addition, the PB2, HA, and NA segments differ at two amino acids. Compared to the pH1N1 consensus, there is one additional amino acid difference in PA, and two in HA. The amino acid substitution in NS1 is located in the PKR-binding domain of the protein and varies among pandemic strains (Pan et al., 2010), while HA serine 203 (mature HA numbering), located in the Ca1 epitope, is proposed to be under selective pressure to change to tyrosine (Ding et al., 2010). However, none of the differing residues have been identified as virulence markers.

Segment	Consensus pH1N1	MX4487	RV1532
Seg. 1 (PB2)			
Pos 30	Ile	Ile	Val
Pos 82	Asn	Ser	Asn
Seg. 3 (PA)			
Pos 224	Pro	Ser	Ser
Pos 275	Leu	Ile	Leu
Seg. 4 (HA)^a			
Pos 83	Pro	Ser	Ser
Pos 87	Asn	Asn	Lys
Pos 203	Ser	Ser	Thr
Pos 321	Ile	Val	Val
Seg. 5 (NP)			
Pos 100	Val	Val	Ile
Seg. 6 (NA)			
Pos 106	Val	Val	Ile
Pos 248	Asp	Asn	Asp
Seg. 8 (NS1)			
Pos 123	Ile	Ile	Val

^a Mature H1N1 HA numbering.

Table 1: Amino acid differences between MX10 and RV1532. Protein sequences were aligned using the MegAlign 8.0.2 Software. The position and the amino acid that differ in each segment are noted for both isolates. MX4478 positions that differ from the pH1N1 consensus are indicated in bold.

MX4487 causes a more severe disease than RV1532. To assess the virulence of the two strains in ferrets, nine animals were infected intranasally with 5×10^5 PFU of either isolate. All animals rapidly developed a fever that peaked at day 1 post-infection and elevated body temperatures were observed for the following 3-4 days (Fig. 1A). Regardless of the virus used, an up to 12% weight loss was observed over the first week followed by a gradual recovery until the end of the study (data not shown). With the exception of one animal that developed severe disease and had to be sacrificed on day 6, RV1532-infected ferrets experienced mild to moderate congestion, some sneezing, and mild depression during the first week after infection and had completely recovered by day 12 (Fig. 1B). In contrast, MX4487-infected animals rapidly developed severe signs of disease including purulent nasal exudate, moderate to severe congestion, irregular and laboured breathing, and frequent sneezing and coughing, as well as severe depression (Fig. 1B). One of the animals was euthanized on day 6 after being found unresponsive (Fig. 1C), and three animals reached experimental endpoints and were sacrificed on day 9, resulting in 44% mortality. Even though larger group sizes would be required to determine if this difference in mortality is statistically significant, there was a clear difference in the disease severity observed.

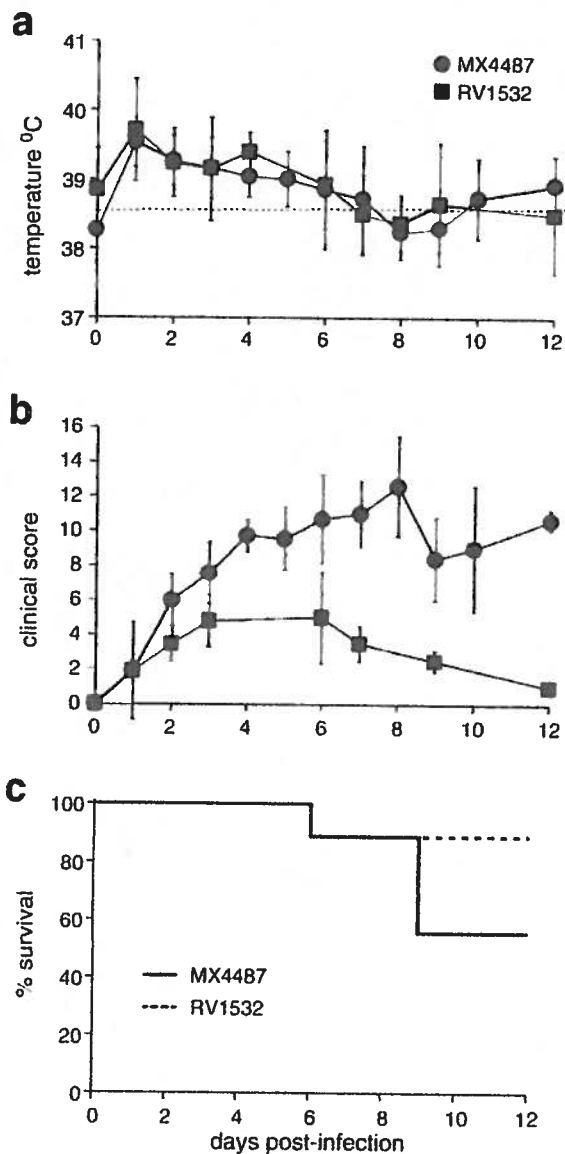


Figure 1: Pathogenesis and virulence of the different isolates. Body temperature (A), clinical scores (B), and survival curves (C) at various times after infection. Groups of nine ferrets were infected with 5×10^5 PFU of the different isolates and the infection was monitored daily. Days post-infection are indicated on the X axis, clinical score, body temperature, and percent survival are plotted on the respective Y axes. The clinical score represents the sum of activity, and upper and lower respiratory sign scores, each graded on a 0–1–2–3 scale, as outlined in the material and methods. Error bars represent the standard deviation (SD).

MX4487 and RV1532 replicate with similar efficiency in the respiratory tract. We next compared the replication of the two viruses. For both viruses, peak nasal wash titers were observed at day 1 post-infection, but MX4487-infected animals reached around tenfold higher

levels ($p < 0.0001$). Titers declined gradually until the virus was cleared on day 7 (Fig. 2A), with genome copies being detectable in both cases until the end of the study on day 12 (data not shown). To evaluate the replication of the viruses in different tissues, two animals of each group were sacrificed at days 3, 6, and 9 post-infection, and trachea, lungs, and small intestine were harvested. Both replicated efficiently in the upper and lower respiratory tract, reaching comparable titers at day 3 post-infection (Fig. 2B and C). However, while RV1532 sustained replication through day 6, MX4487 was rapidly cleared. Quantification of viral genome copy numbers in rectal swabs revealed that both viruses were detectable at similar levels on day 3 (Fig. 2D), but only MX4487 was found at later time points ($p < 0.05$ on day 6) and could be isolated from the small intestine on days 3 and 6 (Fig. 2E).

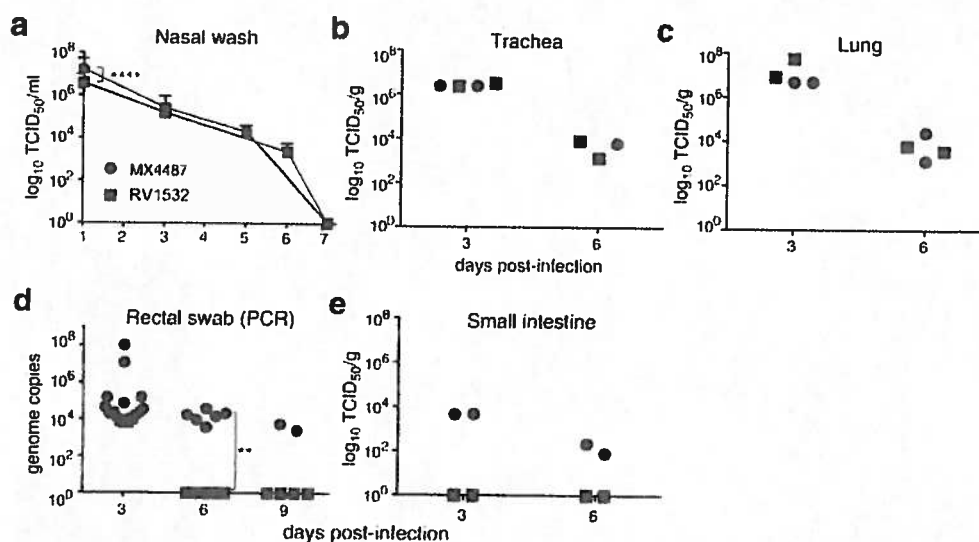


Figure 2: Viral load in nasal wash fluid and different tissues. Viral titers in nasal washes (A), trachea (B), lungs (C), genome copies in rectal swabs (D), and virus titers in small intestine (E), and. Nasal washes and rectal swabs were collected at days 1, 3, 5/6, 7, 9 and 12 post-infection. The nasal wash was directly titrated by limiting dilution on MDCK cells and is expressed as TCID₅₀/ml. At days 3, 6, and 9 after infection, two ferrets of each group was sacrificed and the trachea and lower right lung lobe were harvested for titration. The titer is expressed as TCID₅₀/g. For rectal swabs, the RNA was isolated and the genome copy number was determined by extrapolating data from a standard curve. Error bars represent the SD. Statistical significance was determined using the Mann Whitney test, and two stars indicate $p < 0.05$ and four stars $p < 0.0001$.

MX4487 causes more sustained and widespread lung damage. As reported previously, pH1N1 viruses cause more severe lung pathology than seasonal strains (Itoh et al., 2009). Both isolates analyzed here caused similar histopathological changes at early disease stages, but the

damage was more widespread in the case of MX4487. Three days after infection, lesions were characterized by severe alveolitis and bronchiolitis with necrosis and loss of bronchiolar epithelium and accumulation of neutrophils and necrotic debris within bronchiolar lumina, as well as alveolar and perivascular oedema (Fig. 3A and B, stars). Alveolar walls were expanded by inflammatory cells, oedema and hyperplastic pneumocytes, and frequent perivascular cuffing was observed (Fig. 3A and B, arrows). At day 6, there was widespread acute and severe alveolitis in MX4487 sections characterized by alveoli filled with oedema, fibrin, hemorrhage and extensive infiltrates consisting of neutrophils and macrophages (Fig. 3C, stars) as well as thickening of alveolar walls by inflammatory infiltrates. Many bronchioles were destroyed with evidence of extensive necrosis and neutrophil infiltration leaving only a remnant of smooth muscle tissue. Large consolidated areas with complete loss of alveolar spaces and severely damaged bronchioles containing central areas of fibroblast proliferation were observed (data not shown). In contrast, RV1532 lung sections were characterized by hyperplasia of the airway epithelium, lymphocyttoplasmatic cuffing of small airways, and vessels and multifocal areas of pneumocyte hyperplasia (Fig. 3D). At day 9, lung tissue from MX4487-infected animals still contained large areas of consolidation with perivascular cuffing (Fig. 3E, stars). Some of the more severely affected bronchioles had been destroyed, while others were undergoing repair as indicated by regenerating epithelium (Fig. 3E, arrow), and had evidence of bronchiolitis obliterans. In contrast, only focal mild consolidation was seen in RV1532 sections with multifocal areas of bronchiolar epithelial hyperplasia (Fig. 3F, arrow), and lymphocytoplasmatic cuffing around airways and arterioles. For both viruses, there was widespread infection of bronchial epithelia on day 3, but viral antigen was only detected occasionally on day 6 in MX4487 tissues, while infection levels were moderately higher in RV1532 sections with approximately twice the number of infected cells (Fig. 4), consistent with the higher viral titers observed (Fig. 2C). All sections were negative on day 9 (data not shown). Colonization of the respiratory tract by bacteria as another possible contributor of inflammation and damages was not detected at any timepoint.

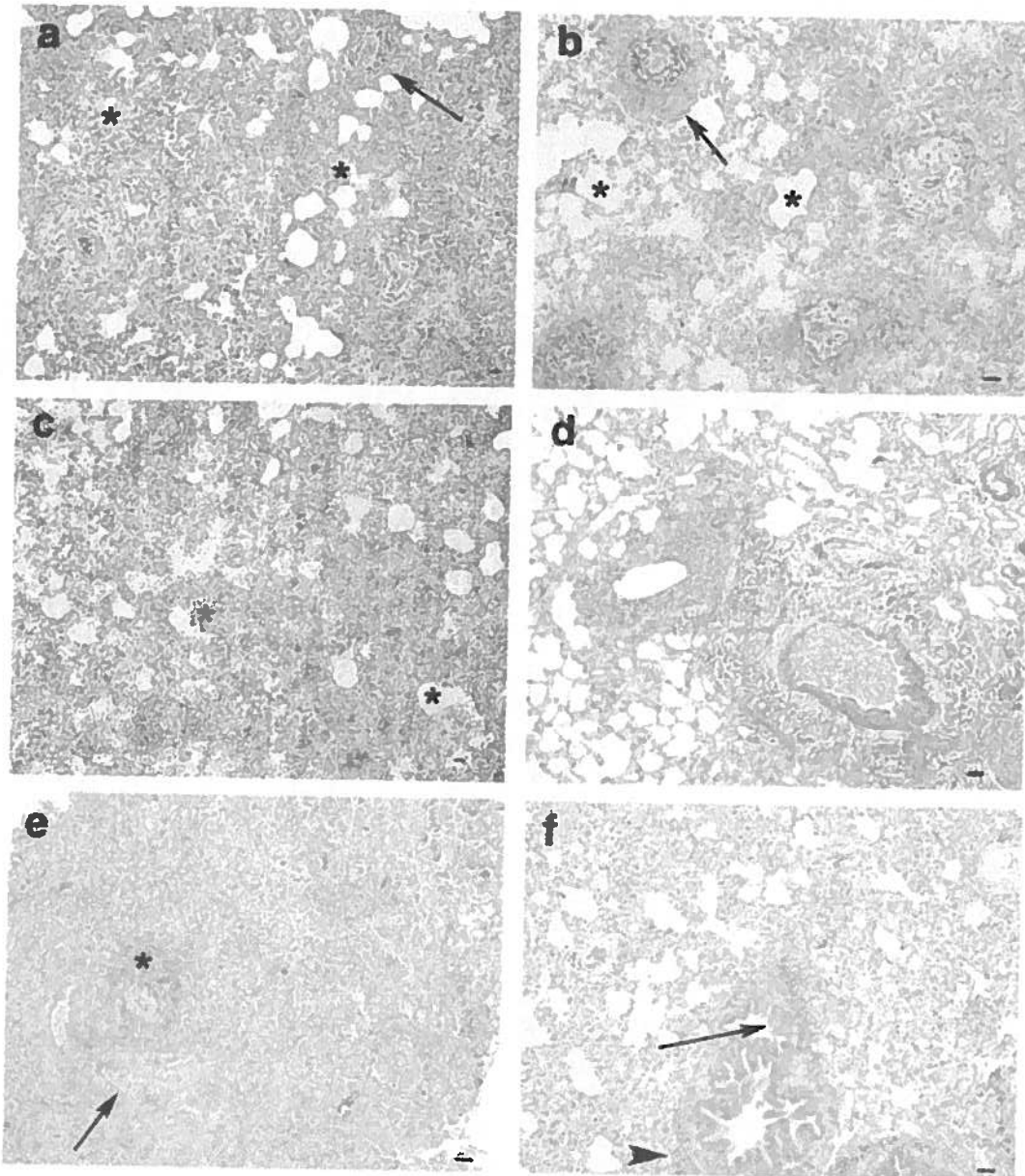


Figure 3: Histopathological examination of lung tissue. H&E stained slides from animals infected with MX4487 or RV1532, respectively, and sacrificed at days 3 (A, B), 6 (C, D), and 9 (E, F) were examined for pathological changes. (A and B) At 3 dpi there is expansion of alveolar walls due to inflammatory infiltrates and hyperplastic pneumocytes. Alveolar spaces contain edema (*) and lymphohistiocytic perivascular cuffing is observed (arrow). (C) At 6 dpi there is alveolitis with edema, fibrin, haemorrhage and inflammatory infiltrates (*). (D) At 6 dpi the most prominent lesion is multifocal bronchiolitis. (E) Large areas of the lung remain consolidated at 9 dpi. Note perivascular cuffing (*). A bronchiole undergoes remodeling and repair evidenced by luminal fibroblastic proliferation and regenerating epithelium (arrow). (F) At 9 dpi there is bronchiolar epithelial hyperplasia (arrow) and peribronchiolar lymphoplasmacytic cuffing (arrowhead). Bar=50 μ m.

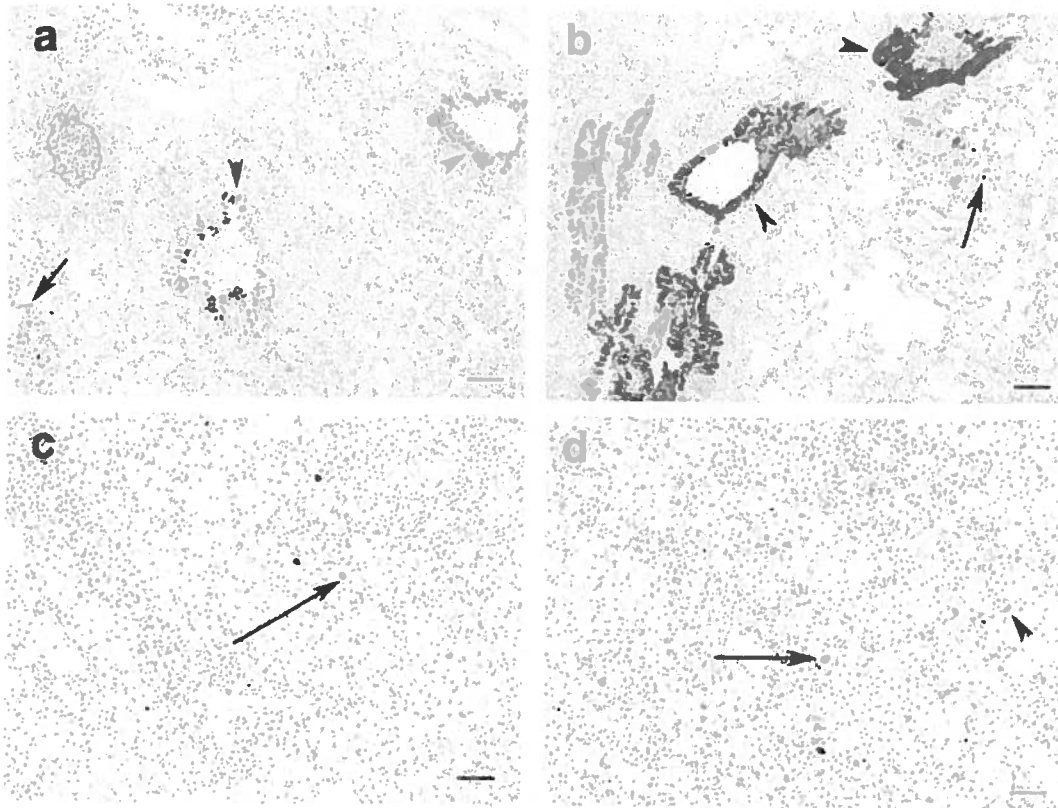


Figure 4: Immunohistochemical detection of infected cells. Lung sections stained with an influenza A-specific antiserum from animals infected with MX4487 or RV1532, respectively, and sacrificed at days 3 (A, B) and 6 (C, D). At 3 dpi, lung tissue from ferrets infected with (A) MX4487 and (B) RV1532 shows detection of viral antigen extensively in bronchiolar epithelium (arrowheads) as well as within alveolar walls (arrows). Bar=100 μ m. (C) Lung tissue at 6 dpi from Mx4487-infected ferret shows scattered immunopositive cells (arrow). Bar=50 μ m. (D) Lung tissue at 6 dpi from RV1532-infected ferret show moderate numbers of immunopositive cells including alveolar macrophages (arrow) as well as pneumocytes (arrowhead). Bar=50 μ m.

MX4487 induces a strong inflammatory response. To evaluate the contribution of the local innate host response to the differences in pathogenesis, we compared the nasal wash cytokine profiles including IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- α , and IFN- γ induced by the two pH1N1 strains with samples of the highly virulent H1N1 strain A/BM/1/1918 (1918) collected during a previous experiment (Pillet et al., 2011). Towards this, cytokine mRNA present in the nasal washes at days 1 and 3 post-infection were quantified by semi-quantitative real-time RT-PCR. On day 1, MX4487 induced significantly higher levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and TNF- α , than RV1532 or 1918 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively) (Fig. 5A-C). A similar trend was observed at day 3 post-infection, although the differences were not statistically

significant. Consistent with the previously reported initial type I IFN antagonizing capacity of the 1918 virus in macaques (Kobasa et al., 2007), this virus was also the weakest inducer of IFN- α on day 1 with levels being more than tenfold lower than in MX4487-infected animals ($P < 0.05$) (Fig. 5D). However, MX4487 and 1918 both induced tenfold more IFN- α than RV1532 ($P < 0.05$) on day 3, again reproducing the pattern observed in macaques (Kobasa et al., 2007). Both pH1N1 strains resulted in rapid upregulation of IFN- γ , with MX4487 reaching tenfold higher levels, and expression was sustained through day 3 (Fig. 5E). In contrast, the 1918 virus resulted in IFN- γ downregulation on day 1 and returned to baseline levels on day 3 (Fig. 5E), indicating that there was no local type II IFN induction in nasal wash cells of these animals.

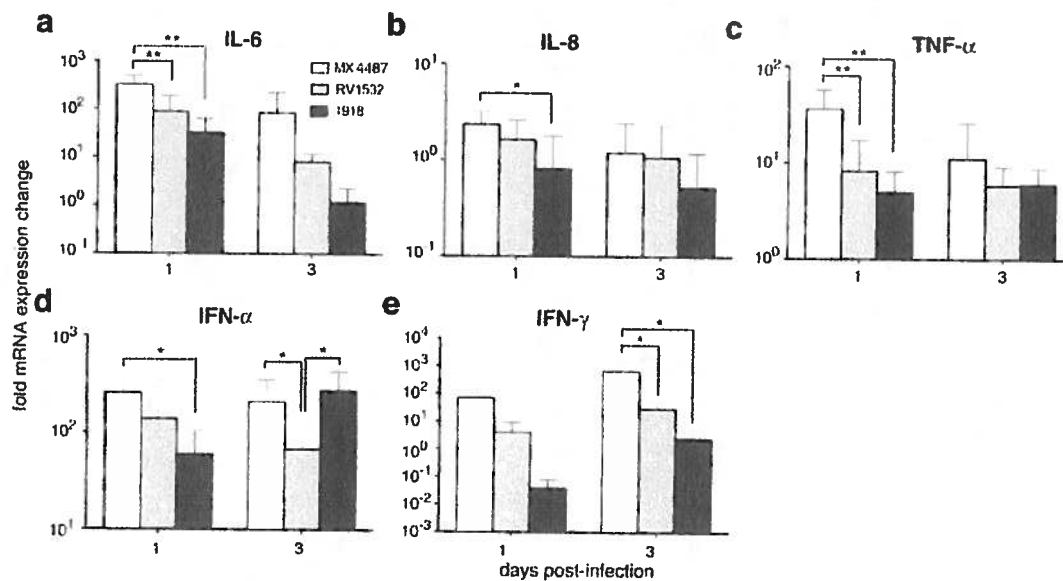


Figure 5: Comparison of the cytokine response induced by the different isolates. Expression of IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C), IFN- α (D) and IFN- γ (E). mRNA from cells present in the nasal washes at days 1 and 3 post-infection was extracted and 10 ng was used for each reaction. Each value represents the mean of at least five animals. Error bars indicate the SD. Data were analyzed by a one-way analysis of variance followed by Tukey's a posteriori test to determine significant differences. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

Discussion

Despite their overall genetic similarity, early pH1N1 strains vary considerably in their virulence in different animal models (Itoh et al., 2009; Safronetz et al., 2011). To characterize pathogenesis differences of mild and severe disease in more detail, we compared the disease severity, viral load, pathology, and nasal wash cytokine profile of the highly virulent Mexican strain MX4487 and the mild Canadian strain RV1532 in ferrets. MX4487 and RV1532 differ at HA residues N87K and S203T, and both strains have an exchange at positions 83 (P83S) and 321 (I321V) compared to the pH1N1 consensus sequence. A comparison of MX4487 with the mild Mexican strain A/Mexico/4108/2009 and a consensus pH1N1 sequence revealed one additional difference at residue V427I (Safronetz et al., 2011). However, none of these changes have been implicated as virulence factors, and all of them are found in the respective mild strain. Similarly, of the two amino acid changes in NA, RV1532 diverges at position V106I from the overall pH1N1 consensus, and the N248D exchange found in the virulent strain is not thought to alter the protein structure or function (Morlighem et al., 2011), indicating that the observed differences in virulence are not due to altered receptor binding or entry.

While PB1 is completely conserved among all strains, one change each was found in PB2 and PA. These two exchanges, N82S in PB2 and L275I in PA, represent amino acids in which MX4487 differs from the overall pH1N1 consensus, suggesting a contribution of the replication complex to the observed increase in virulence. MX4487 did indeed result in tenfold higher peak nasal wash titers on day 1 post-infection, but the titers at later times and in respiratory tissues were similar for both strains. In ferrets, the highly pathogenic H1N1 1918 strain also results in hundred- to thousandfold higher nasal wash titers compared to seasonal H1N1 strains (Tumpey et al., 2007; Pillet et al., 2011), indicating a correlation between replication efficiency at very early disease stages and virulence for H1N1 and possibly human influenza viruses of other subtypes.

Consistent with other pH1N1 studies in ferrets (Maines et al., 2009), we detected viral RNA in rectal swabs from both groups on day 3 after infection. However, our comparison of the two closely related strains revealed that only RNA of the virulent strain MX4487 was detectable on days 6 and 9, linking sustained viral presence in the intestinal tract to more severe disease. This is supported by the report of diarrhea in up to 30% of clinical pH1N1 patients (McLean et al., 2010; Di Giambenedetto et al., 2011), and frequent detection of viral RNA in stool samples of clinical cases (To et al., 2010). In ferrets, infection of the gastro-intestinal tract is regularly

observed in the context of H5N1 infections and has been described for other avian viruses (Kawaoka et al., 1987). It has recently been proposed that H5N1 viruses or inflammatory cytokines produced in the gut may be transported to the lung via the intestinal lymphatic system, which drains into the junction of the jugular and subclavian veins, thereby providing direct access to the pulmonary circulation (Shinya et al., 2011). It is thus conceivable that a local inflammatory response elicited by prolonged replication of MX4487 in the gastrointestinal tract contributes to the exacerbated lung inflammation observed.

The rapid induction of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α as well as IFN- α seen only in MX4487-infected animals supports the correlation between a dysregulation of the host response at early infection stages and increased mortality associated with more virulent pH1N1 strains. In contrast, the highly pathogenic H1N1 1918, which has a similar mortality rate (Tumpey et al., 2007; Memoli et al., 2009), initially delays the inflammatory response with IFN- α starting to be upregulated only on day 3. This observation reproduces microarray results obtained from 1918-infected macaques, where the activation of the innate and inflammatory response was also delayed compared to a seasonal strain (Kobasa et al., 2007). Taken together, our study indicates that excessive inflammatory responses, possibly triggered by rapid replication during the first infection stages and exacerbated by sustained replication in the gut, play an important role in severe pH1N1 disease, suggesting that appropriately timed immunosuppressive treatment in conjunction with anti-viral therapy may be beneficial.

Materials and methods

Cells and viruses. Virus isolates A/Mexico/InDRE4487/2009 (MX4487) and A/Canada-AB/RV1532/2009 (RV1532) were obtained by direct passage of a patient bronchial aspirate specimen on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC CCL-34) in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ TPCK-trypsin (Sigma, Oakville, ON) in minimal essential medium (MEM, Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 0.1% bovine serum albumin and antibiotics (MEM/BSA). All viruses used for experimentation were from the second passage in MDCK cells. Viral titers were determined by plaque assay on MDCK cells and are expressed as plaque-forming units (PFU).

Animal experiments. All animal experiments were approved by the institutional animal care and use committee of the National Microbiology Laboratory (NML) and performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Four to six months old female ferrets were purchased from Marshall Farms (North Rose, NY) and confirmed to be seronegative for circulating H1N1 and H3N2 influenza viruses. Groups of nine ferrets were intranasally infected with 5×10^5 PFU of the respective virus, and body temperature and weight were recorded daily. To capture differences between moderate and severe disease, a new 0-1-2-3 scoring scale was established, with 0 representing a physiological state, evaluating the following eight criteria: (1) nasal exsudate quality: serous/mucous/purulent; (2) nasal exsudate quantity: little (wet nose)/larger amount (runny nose)/copious amounts (nose running continuously); (3) congestion: breathing sounds congested/occasional mouth breathing/continuous mouth breathing; (4) sneezing: rarely/occasionally/frequently; (5) coughing: rarely/occasionally/frequently; (6) respiratory rate: 30-40/min / 40-50/min / >50/min; (7) dyspnea: occasional wheezing/continuous wheezing/labored breezing; (8) activity: calm/depressed/inactive.

On days 1, 3, 5, 7, 9 and 12 after infection, animals were anesthetized using isofluran and nasal washes and rectal swabs were collected. Toward this, 500 μL of PBS was instilled in one nostril and the expectorate was collected in a 50 ml tube. The procedure was repeated until a minimal volume of 400 μL was harvested. Rectal swabs were collected into 1ml of MEM/BSA. On day 3, 6, and 9 post-infection, two animals were sacrificed and tissues were harvested for titration and histopathological examination. Tissue samples were placed into RNeasy (Qiagen) for RNA preservation and subsequent RNA extraction (Qiagen RNeasy), and additional samples of fresh tissue were immediately frozen for viral isolation. The remainder of the tissue was fixed in 10% phosphate-buffered formalin.

Virus titration and viral RNA quantification. Tissues were homogenized in MEM/BSA using a bead mill homogenizer (Tissue Lyser, Qiagen). Cell debris was pelleted by centrifugation and supernatant was titrated on MDCK cells using the limited dilution method. At 72-96 h post-infection the plates were scored for cytopathic effect and titers were expressed as 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀) per g tissue or per ml rectal swab suspension or nasal wash fluid.

RNA later-preserved tissues were homogenized using a bead mill homogenizer, and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). For RNA isolation from nasal washes and rectal swabs the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) was used. Viral RNA was detected by quantitative real-time RT-PCR using the LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche) assay targeting nucleotides 714-815 of the HA gene as described previously (Kobinger et al., 2010).

Histology. Tissue samples were fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin (NBF), embedded in paraffin, cut into 5- μ m-thick sections, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examination. For immunohistochemistry, 5 μ m sections were cut, air-dried overnight and placed into a 60°C oven for one hour. The deparaffinized and rehydrated sections were quenched for 10 minutes in aqueous 3% hydrogen peroxide, rinsed in MilliQ water and placed into Tris-buffered saline plus Tween (TBST) for 5 minutes. Epitopes were retrieved using proteinase K (Dako CA, USA) for 15 minutes. After 2 TBST rinses, the slides were incubated with a H1N1 polyclonal goat antibody (AbD Serotec, OBT1551) at a dilution of 1:1200 for 1 hour, followed by a Goat HRP-Polymer kit (horse radish peroxidase labeled; BioCare Medical, CA) and a TBST rinse. Diaminobenzidine (DAB) was used as the substrate chromogen and the slides were counterstained with Gill's hematoxylin.

Cytokine mRNA quantification by real time RT-PCR. Cytokine and GAPDH mRNAs were quantified by semi-quantitative real-time RT-PCR using the Quantitect SYBR Green RT PCR kit (Qiagen, Mississauga, ON) as previously described (Svitek et al., 2008). Briefly, ten nanograms of RNA isolated from cells present in nasal wash fluids was used in each reaction. Samples originating from animals infected with the highly pathogenic H1N1 strain BM/1/1918 (Pillet et al., 2011) were also included in the study. Each sample was analyzed in duplicate and repeated twice or more if the variation was more than 10%. The fold change ratios between experimental and control samples for each gene were calculated and normalized against GAPDH using the $\Delta\Delta$ Ct method (Schmittgen et al., 2000).

Statistical analysis. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0a. Data were analyzed by Mann Whitney test to identify significant differences in virus titers between the two isolates or with a one-way analysis of variance followed by Tukey's a posteriori test for comparison between the two isolates and the A/BM/1/1918.

Acknowledgments

The authors thank Gregory Schumer, Estella Moffat, Shelley Ganske and Brad Collignon for technical assistance with the animals and immunocytochemistry. This work was supported by the Public Health Agency of Canada and CIHR Team Grant #310641 and a FRSQ scholarship to I.M.

References

- CHOWELL, G., BERTOZZI, S. M., COLCHERO, M. A., LOPEZ-GATELL, H., ALPUCHE-ARANDA, C., HERNANDEZ, M., AND MILLER, M. A. (2009). Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med* **361**, 674-679.
- CHUTINIMITKUL, S., HERFST, S., STEEL, J., LOWEN, A. C., YE, J., VAN RIEL, D., SCHRAUWEN, E. J., BESTEBROER, T. M., KOEL, B., BURKE, D. F., SUTHERLAND-CASH, K. H., WHITTLESTON, C. S., RUSSELL, C. A., WALES, D. J., SMITH, D. J., JONGES, M., MEIJER, A., KOOPMANS, M., RIMMELZWAAN, G. F., KUIKEN, T., OSTERHAUS, A. D., GARCÍA-SASTRE, A., PEREZ, D. R., AND FOUCHIER, R. A. (2010). Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *J Virol* **84**, 11802-11813.
- DI GIAMBENEDETTO, S., ZILERI DAL VERME, L., SALI, M., FARINA, S., DI CRISTO, V., MANZARA, S., DE LUCA, A., PIGNATARO, G., PROSPERI, M., DI FRANCO, A., GENTILONI SILVERI, N., DELOGU, G., CAUDA, R., FABBIANI, M., AND FADDA, G. (2011). Clinical presentation, microbiological features and correlates of disease severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**, 541-549.
- DING, X., JIANG, L., KE, C., YANG, Z., LEI, C., CAO, K., XU, J., XU, L., YANG, X., ZHANG, Y., HUANG, P., HUANG, W., ZHU, X., HE, Z., LIU, L., LI, J., YUAN, J., WU, J., TANG, X., AND LI, M. (2010). Amino acid sequence analysis and identification of mutations under positive selection in hemagglutinin of 2009 influenza A (H1N1) isolates. *Virus Genes* **41**, 329-340.
- FRASER, C., DONNELLY, C. A., CAUCHEMEZ, S., HANAGE, W. P., VAN KERKHOVE, M. D., HOLLINGSWORTH, T. D., GRIFFIN, J., BAGGALEY, R. F., JENKINS, H. E., LYONS, E. J., JOMBART, T., HINSLEY, W. R., GRASSLY, N. C., BALLOUX, F., GHANI, A. C., FERGUSON, N. M., RAMBAUT, A., PYBUS, O. G., LOPEZ-GATELL, H., ALPUCHE-ARANDA, C. M., CHAPELA, I. B., ZAVALA, E. P., GUEVARA, D. M., CHECCHI, F., GARCIA, E., HUGONNET, S., AND ROTH, C. (2009). Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* **324**, 1557-1561.
- GARTEN, R. J., DAVIS, C. T., RUSSELL, C. A., SHU, B., LINDSTROM, S., BALISH, A., SESSIONS, W. M., XU, X., SKEPNER, E., DEYDE, V., OKOMO-ADHIAMBO, M., GUBAREVA, L., BARNES, J., SMITH, C. B., EMERY, S. L., HILLMAN, M. J., RIVAILLER, P., SMAGALA, J., DE GRAAF, M., BURKE, D. F., FOUCHIER, R. A.,

- PAPPAS, C., ALPUCHE-ARANDA, C. M., LOPEZ-GATELL, H., OLIVERA, H., LOPEZ, I., MYERS, C. A., FAIX, D., BLAIR, P. J., YU, C., KEENE, K. M., DOTSON, P. D. J., BOXRUD, D., SAMBOL, A. R., ABID, S. H., ST GEORGE, K., BANNERMAN, T., MOORE, A. L., STRINGER, D. J., BLEVINS, P., DEMMLER-HARRISON, G. J., GINSBERG, M., KRINER, P., WATERMAN, S., SMOLE, S., GUEVARA, H. F., BELONGIA, E. A., CLARK, P. A., BEATRICE, S. T., DONIS, R., KATZ, J., FINELLI, L., BRIDGES, C. B., SHAW, M., JERNIGAN, D. B., UYEKI, T. M., SMITH, D. J., KLIMOV, A. I., AND COX, N. J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**, 197-201.
- HAI, R., SCHMOLKE, M., VARGA, Z. T., MANICASSAMY, B., WANG, T. T., BELSER, J. A., PEARCE, M. B., GARCÍA-SASTRE, A., TUMPEY, T. M., AND PALESE, P. (2010). PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol* **84**, 4442-4450.
- HALE, B. G., STEEL, J., MANICASSAMY, B., MEDINA, R. A., YE, J., HICKMAN, D., LOWEN, A. C., PEREZ, D. R., AND GARCÍA-SASTRE, A. (2010a). Mutations in the NS1 C-terminal tail do not enhance replication or virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *J Gen Virol* **91**, 1737-1742.
- HALE, B. G., STEEL, J., MEDINA, R. A., MANICASSAMY, B., YE, J., HICKMAN, D., HAI, R., SCHMOLKE, M., LOWEN, A. C., PEREZ, D. R., AND GARCÍA-SASTRE, A. (2010b). Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **84**, 6909-6922.
- HERFST, S., CHUTINIMITKUL, S., YE, J., DE WIT, E., MUNSTER, V. J., SCHRAUWEN, E. J., BESTEBROER, T. M., JONGES, M., MEIJER, A., KOOPMANS, M., RIMMELZWAAN, G. F., OSTERHAUS, A. D., PEREZ, D. R., AND FOUCHIER, R. A. (2010). Introduction of virulence markers in PB2 of pandemic swine-origin influenza virus does not result in enhanced virulence or transmission. *J Virol* **84**, 3752-3758.
- ITOH, Y., SHINYA, K., KISO, M., WATANABE, T., SAKODA, Y., HATTA, M., MURAMOTO, Y., TAMURA, D., SAKAI-TAGAWA, Y., NODA, T., SAKABE, S., IMAI, M., HATTA, Y., WATANABE, S., LI, C., YAMADA, S., FUJII, K., MURAKAMI, S., IMAI, H., KAKUGAWA, S., ITO, M., TAKANO, R., IWATSUKI-HORIMOTO, K., SHIMOJIMA, M., HORIMOTO, T., GOTO, H., TAKAHASHI, K., MAKINO, A., ISHIGAKI, H., NAKAYAMA, M., OKAMATSU, M., TAKAHASHI, K., WARSHAUER, D., SHULT, P. A., SAITO, R., SUZUKI, H., FURUTA, Y., YAMASHITA, M., MITAMURA, K., NAKANO, K., NAKAMURA, M., BROCKMAN-SCHNEIDER, R., MITAMURA, H., YAMAZAKI, M., SUGAYA, N.,

- SURESH, M., OZAWA, M., NEUMANN, G., GERN, J., KIDA, H., OGASAWARA, K., AND KAWAOKA, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* **460**, 1021-1025.
- KAWAOKA, Y., BORDWELL, E., AND WEBSTER, R. G. (1987). Intestinal replication of influenza A viruses in two mammalian species. Brief report. *Arch Virol* **93**, 303-308.
- KHANDAKER, G., DIERIG, A., RASHID, H., KING, C., HERON, L., AND BOOY, R. (2011). Systematic review of clinical and epidemiological features of the pandemic influenza A (H1N1) 2009. *Influenza Other Respi Viruses* **5**, 148-156.
- KOBASA, D., JONES, S. M., SHINYA, K., KASH, J. C., COPPS, J., EBIHARA, H., HATTA, Y., KIM, J. H., HALFMANN, P., HATTA, M., FELDMANN, F., ALIMONTI, J. B., FERNANDO, L., LI, Y., KATZE, M. G., FELDMANN, H., AND KAWAOKA, Y. (2007). Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* **445**, 319-323.
- KOBINGER, G. P., MEUNIER, I., PATEL, A., PILLET, S., GREN, J., STEBNER, S., LEUNG, A., NEUFELD, J. L., KOBASA, D., AND VON MESSLING, V. (2010). Assessment of the efficacy of commercially available and candidate vaccines against a pandemic H1N1 2009 virus. *J Infect Dis* **201**, 1000-1006.
- MAINES, T. R., JAYARAMAN, A., BELSER, J. A., WADFORD, D. A., PAPPAS, C., ZENG, H., GUSTIN, K. M., PEARCE, M. B., VISWANATHAN, K., SHRIVER, Z. H., RAMAN, R., COX, N. J., SASISEKHARAN, R., KATZ, J. M., AND TUMPEY, T. M. (2009). Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* **325**, 484-487.
- MCLEAN, E., PEBODY, R. G., CAMPBELL, C., CHAMBERLAND, M., HAWKINS, C., NGUYEN-VAN-TAM, J. S., OLIVER, I., SMITH, G. E., IHEKWEAZU, C., BRACEBRIDGE, S., MAGUIRE, H., HARRIS, R., KAFATOS, G., WHITE, P. J., WYNNE-EVANS, E., GREEN, J., MYERS, R., UNDERWOOD, A., DALLMAN, T., WREGHITT, T., ZAMBON, M., ELLIS, J., PHIN, N., SMYTH, B., MCMENAMIN, J., AND WATSON, J. M. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 influenza in the UK: clinical and epidemiological findings from the first few hundred (FF100) cases. *Epidemiol Infect* **138**, 1531-1541.
- MEMOLI, M. J., TUMPEY, T. M., JAGGER, B. W., DUGAN, V. G., SHENG, Z. M., QI, L., KASH, J. C., AND TAUBENBERGER, J. K. (2009). An early 'classical' swine H1N1 influenza virus shows similar pathogenicity to the 1918 pandemic virus in ferrets and mice. *Virology* **393**, 338-345.

- MORLIGHEM, J. E., AOKI, S., KISHIMA, M., HANAMI, M., OGAWA, C., JALLOH, A., TAKAHASHI, Y., KAWAI, Y., SAGA, S., HAYASHI, E., BAN, T., IZUMI, S., WADA, A., MANO, M., FUKUNAGA, M., KIJIMA, Y., SHIOMI, M., INOUE, K., HATA, T., KORETSUNE, Y., KUDO, K., HIMENO, Y., HIRAI, A., TAKAHASHI, K., SAKAI-TAGAWA, Y., IWATSUKI-HORIMOTO, K., KAWAOKA, Y., HAYASHIZAKI, Y., AND ISHIKAWA, T. (2011). Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic. *PLoS One* **6**, e18956.
- OZAWA, M., BASNET, S., BURLEY, L. M., NEUMANN, G., HATTA, M., AND KAWAOKA, Y. (2011). Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *J Virol* **85**, 4596-4601.
- PAN, C., CHEUNG, B., TAN, S., LI, C., LI, L., LIU, S., AND JIANG, S. (2010). Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS ONE* **5**, e9549.
- PEBODY, R. G., MCLEAN, E., ZHAO, H., CLEARY, P., BRACEBRIDGE, S., FOSTER, K., CHARLETT, A., HARDELID, P., WAIGHT, P., ELLIS, J., BERMINGHAM, A., ZAMBON, M., EVANS, B., SALMON, R., MCMENAMIN, J., SMYTH, B., CATCHPOLE, M., AND WATSON, J. (2010). Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and mortality in the United Kingdom: risk factors for death, April 2009 to March 2010. *Euro Surveill* **15**.
- PILLET, S., KOBASA, D., MEUNIER, I., GRAY, M., LADDY, D., WEINER, D. B., VON MESSLING, V., AND KOBINGER, G. P. (2011). Cellular immune response in the presence of protective antibody levels correlates with protection against 1918 influenza in ferrets. *Vaccine* .
- SAFRONETZ, D., ROCKX, B., FELDMANN, F., BELISLE, S. E., PALERMO, R. E., BRINING, D., GARDNER, D., PROLL, S. C., MARZI, A., TSUDA, Y., LACASSE, R. A., KERCHER, L., YORK, A., KORTH, M. J., LONG, D., ROSENKE, R., SHUPERT, W. L., ARANDA, C. A., MATTOON, J. S., KOBASA, D., KOBINGER, G., LI, Y., TAUBENBERGER, J. K., RICHT, J. A., PARNELL, M., EBHARA, H., KAWAOKA, Y., KATZE, M. G., AND FELDMANN, H. (2011). Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques. *J Virol* **85**, 1214-1223.
- SHINYA, K., MAKINO, A., TANAKA, H., HATTA, M., WATANABE, T., LE, M. Q., IMAI, H., AND KAWAOKA, Y. (2011). Systemic dissemination of H5N1 influenza A viruses in ferrets and hamsters after direct intragastric inoculation. *J Virol* **85**, 4673-4678.
- SMITH, G. J., VIJAYKRISHNA, D., BAHL, J., LYCETT, S. J., WOROBAY, M., PYBUS, O. G., MA, S. K., CHEUNG, C. L., RAGHWANI, J., BHATT, S., PEIRIS, J. S., GUAN, Y., AND

- RAMBAUT, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**, 1122-1125.
- SVITEK, N., RUDD, P. A., OBOJES, K., PILLET, S., AND VON MESSLING, V. (2008). Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* **376**, 53-59.
- TO, K. K., CHAN, K. H., LI, I. W., TSANG, T. Y., TSE, H., CHAN, J. F., HUNG, I. F., LAI, S. T., LEUNG, C. W., KWAN, Y. W., LAU, Y. L., NG, T. K., CHENG, V. C., PEIRIS, J. S., AND YUEN, K. Y. (2010). Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* **82**, 1-7.
- TUMPEY, T. M., MAINES, T. R., VAN HOEVEN, N., GLASER, L., SOLÓRZANO, A., PAPPAS, C., COX, N. J., SWAYNE, D. E., PALESE, P., KATZ, J. M., AND GARCÍA-SASTRE, A. (2007). A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* **315**, 655-659.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Bien que le virus de la grippe soit généralement associé à une infection légère ou moyennement sévère, il arrive que certaines souches causent une maladie plus grave, associée à une pneumonie pouvant dégénérer en un syndrome de détresse respiratoire aiguë menant au décès. Ce fût le cas, entre autres, du virus de la grippe espagnole de 1918 qui a été responsable d'environ 30 à 50 millions de décès dans le monde, mais c'est aussi le cas de certains virus H5N1 dont le taux de mortalité est de plus de 60 % (Neumann et al., 2010; Patterson and Pyle, 1991; Watanabe and Kawaoka, 2011). La raison pour laquelle certains virus sont plus virulents que d'autres n'est pas encore bien comprise. Néanmoins, il apparaît de plus en plus clair qu'autant certains facteurs présents chez l'hôte et certaines composantes virales ont un impact important sur l'issue de la maladie (Basler and Aguilar, 2008; Fukuyama and Kawaoka, 2011; Neumann and Kawaoka, 2006; Trammell et al., 2012). Parmi les facteurs viraux associés à une maladie plus sévère, plusieurs agissent sur l'induction de la réponse immunitaire innée. Dans mon projet de doctorat, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la virulence d'une souche est associée à sa capacité d'inhiber certaines voies du système immunitaire inné et qu'une dérégulation de la réponse immunitaire précoce peut contribuer à la pathogénèse.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la protéine NS1 du virus de la grippe contribuait à la virulence des virus saisonniers humains H1N1. L'introduction d'une protéine NS1 qui inhibait efficacement la signalisation aux IFN I et au TNF- α *in vitro* dans un virus saisonnier était associée à une maladie plus sévère chez les furets, à une dissémination du virus du tractus respiratoire supérieur vers les poumons, ainsi qu'à une inhibition de la réponse aux IFN I chez les animaux, à des moments précoces de l'infection. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la contribution de la protéine PB1-F2 à la virulence des virus H1N1 saisonniers. Nous avons observé que l'effet de la protéine sur l'hôte semblait être spécifique au type de cellule étudié. En effet, alors que les tissus pulmonaires n'étaient pas affectés par la présence de PB1-F2, des macrophages infectés avec un virus n'exprimant pas la protéine produisaient une plus grande quantité de certaines cytokines pro-inflammatoires, suggérant que PB1-F2 pourrait avoir un rôle inhibiteur de la réponse immunitaire chez ces cellules. Malgré le fait que la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole semblait avoir un effet inhibiteur sur la réponse aux IFN I et certaines cytokines pro-inflammatoires chez les furets, cela ne semblait pas suffisant pour avoir un impact notable sur la sévérité de la maladie puisque les scores cliniques, la charge virale et la pathologie aux poumons étaient relativement semblable entre les différents groupes. Ceci suggère que la contribution de PB1-F2 à la virulence de virus humains saisonniers est très limitée. Finalement, nous avons comparé la pathogénicité de deux isolats du virus pandémique de 2009 chez les furets. Malgré le fait que les animaux infectés par les deux virus avaient une

charge virale similaire dans le tractus respiratoire, les furets infectés avec le virus A/Mexico/InDRE4487/2009 (MX10) avaient un taux de mortalité plus élevé et une pathologie aux poumons plus importante et de plus longue durée. De plus, l'isolat le plus virulent, MX10, induisait une plus grande production de plusieurs cytokines dans les lavages nasaux. Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation de la réponse immunitaire à des stades précoces de l'infection peut contribuer à la sévérité de la maladie causée par le virus de la grippe.

3.1 Les souches plus virulentes utilisent souvent plusieurs mécanismes différents pour interférer avec la réponse aux IFN I.

La réponse aux IFN I est une des premières lignes de défense contre plusieurs infections et est produite par la majorité des cellules. Non seulement elle permet l'expression de plusieurs ISG ayant une activité antivirale dans la cellule infectée mais la production des IFN I par ces cellules induira un état antiviral dans les cellules avoisinantes, les rendant plus réfractaires à l'infection (Sadler and Williams, 2008; Takaoka and Yanai, 2006). En raison de son effet délétère sur le cycle de vie des virus, il n'est pas surprenant que plusieurs d'entre eux aient développé des stratégies pour en contrecarrer les effets. En effet, la protéine VP35 du virus de l'Ebola inhibe la reconnaissance de l'ARNdb par RIG-I afin de prévenir l'activation du promoteur des IFN- α/β (Basler et al., 2000; Cardenas et al., 2006), tandis que la phosphoprotéine du virus de la rage peut inhiber la production des IFN I en prévenant l'activation d'IRF3 (Brzozka et al., 2005; Rieder et al., 2011). Le fait que presque la moitié des virus qui possèdent des protéines inhibant la réponse aux IFN I interfèrent à plusieurs endroits dans la cascade de signalisation illustre bien l'importance pour les virus d'empêcher l'induction des IFN I. De plus, environ le tiers de ces virus codent des protéines multifonctionnelles pouvant inhiber la signalisation des IFN I à plusieurs endroits (Versteeg and Garcia-Sastre, 2010). Par exemple, le virus de l'hépatite C peut inhiber l'induction des IFN I par sa protéine NS3/4a qui cible autant les MAVS que TBK1, mais aussi par la protéine NS5a qui interfère avec PKR (Gale et al., 1997; Li et al., 2005a; Otsuka et al., 2005). Dans le cas du virus de la grippe, il a été démontré la protéine NS1 pouvait inhiber la réponse aux IFN I à différents endroits, selon les souches étudiées. Dans nos études, les protéines NS1 des virus USSR et du virus de la grippe espagnole pouvaient inhiber efficacement l'induction de la réponse aux IFN I autant au niveau pré-transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. À l'opposé, la protéine NS1 du virus PR/8 ne peut contrôler la production des IFN qu'au niveau pré-transcriptionnel, ce qui corrélait avec une plus faible virulence chez les furets (Kochs et al., 2007a; Meunier and von Messling, 2011). Ceci suggère

que la capacité de la protéine NS1 à inhiber la réponse aux IFN I à plusieurs endroits à la fois dans la cascade de signalisation confère un avantage au virus. Finalement, dans nos études, nous avons observé que le virus recombinant rUSSR-NS1 PR/8 était atténué par rapport au virus rUSSR-NS PR/8. Ceci suggère que NS2/NEP, qui est produit suite à l'épissage alternatif du segment NS, pourrait avoir évolué pour compenser le manque d'inhibition de la réponse immunitaire, possiblement en augmentant la réplication virale. Par contre, des études plus approfondies sur le rôle de NS2/NEP dans la réplication ce virus devrait être effectuées et pourraient aussi inclure une comparaison entre un virus rUSSR-NS1 1918 et rUSSR NS 1918.

Dans le cas de PB1-F2, il a été démontré que la protéine pouvait inhiber la réponse aux IFN I au niveau des MAVS (Varga et al., 2011). Dans nos études, nous avons vu que la présence de la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole était associée à une moins grande induction d'IFN- α chez les furets. Par contre, aucun effet sur l'induction des IFN I n'était observé *in vitro*, autant dans les cultures de poumons que dans les macrophages dérivés du sang périphérique de furet. Mettant en lumière un effet probablement spécifique à l'espèce mais aussi au type cellulaire, d'autres études ont observé que la protéine PB1-F2 du virus de la grippe espagnole inhibait l'induction des IFN I dans les DC et macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris mais pas dans les cellules épithéliales (Schmolke et al., 2011). Néanmoins, *in vivo*, PB1-F2 semble contribuer à l'inhibition des IFN I chez les furets (nos études) et chez les souris (Schmolke et al., 2011) et pourrait ainsi agir en synergie avec NS1. Finalement, les protéines PB2 et PA de certaines souches virales ont aussi été associées à une inhibition de la réponse aux IFN I, indiquant que la relation entre le virus de la grippe et les IFN I est beaucoup plus complexe qu'il ne l'a originalement été pensé. Cela suggère aussi que certaines souches virales pourraient posséder plusieurs protéines agissant en synergie pour inhiber plus efficacement l'induction de la réponse aux IFN (Graef et al., 2010; Iwai et al., 2010) (**Figure 5**). Des études évaluant l'importance relative de chacune de ces protéines dans un contexte biologique et leur contribution globale à l'inhibition de la réponse aux IFN I par le virus seraient importantes. En particulier, puisque nos études démontrent que NS1 et PB1-F2 ont un effet sur la production d'IFN I chez les furets et que des études *in vitro* suggèrent que les deux protéines pourraient agir en synergie, il serait intéressant d'évaluer la virulence d'un virus possédant à la fois le NS1 et le PB1-F2 du virus de la grippe espagnole.

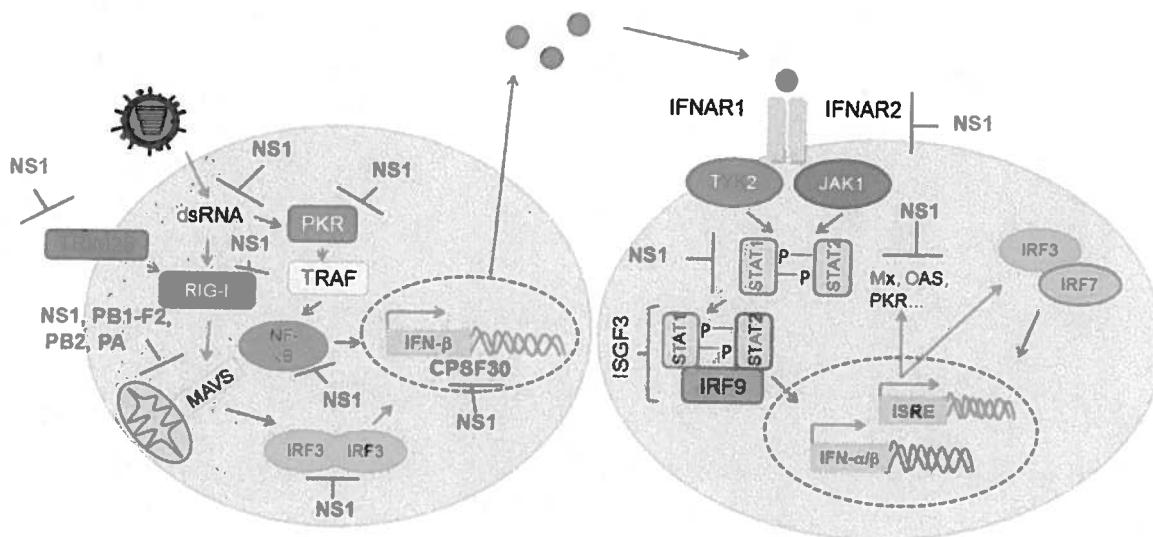


Figure 5: Plusieurs stratégies différentes peuvent être utilisées par le virus de la grippe pour inhiber la réponse aux IFN I. La protéine NS1 peut interférer avec la signalisation aux IFN I soit en inhibant TRIM25 ou en empêchant la translocation nucléaire de NF-κB et IRF3. Elle peut aussi empêcher la phosphorylation des STAT et prévenir l'expression du récepteur IFNAR. Finalement, elle empêche l'action de CPSF30, peut inhiber directement RIG-I et PKR et d'autres ISG. Les protéines NS1, PB1-F2, PA et PB2 bloquent la signalisation aux IFN I au niveau de MAVS.

3.2 L'importance de la réponse aux IFN I dans le contrôle du virus de la grippe et de sa dissémination.

En permettant l'induction d'un état antiviral dans les cellules avoisinantes, la réponse aux IFN I limite non seulement la propagation du virus vers d'autres cellules mais aussi, vers d'autres organes. Lors d'une infection avec le virus du Nil Occidental, la réponse aux IFN I prévient la dissémination du virus vers les organes périphériques et au système nerveux central (*central nervous system*, CNS), ce qui est associé à un meilleur taux de survie (Lazear et al., 2011; Samuel and Diamond, 2005; Samuel et al., 2006). De façon similaire, le virus de l'herpès simplex 1 et le virus Sindbis causent une infection systémique et se disséminent au CNS chez des souris IFNAR^{-/-} (Luker et al., 2003; Ryman et al., 2000). Dans le cas du virus de la grippe, l'infection de souris STAT1^{-/-} ou IFNAR^{-/-} par la souche WSN/33 ou un virus H5N1 résulte en une infection systémique, à une présence du virus dans le foie et au CNS ainsi qu'à une augmentation de la susceptibilité à l'infection (Garcia-Sastre et al., 1998a; Szretter et al., 2009). De plus, l'introduction du segment NS du virus de la grippe espagnole dans le virus humain

saisonnier A/Kawasaki/173/2001 résulte en une dissémination dans les poumons chez les furets, contrairement au virus parental qui ne se réplique qu'au tractus respiratoire supérieur (Watanabe et al., 2009). Par ailleurs, la réponse immunitaire induite chez les animaux n'a pas été comparée. Dans nos études, nous avons vu que la présence de la protéine NS1 d'un virus qui inhibait bien la réponse aux IFN I *in vitro*, soit celle du virus USSR et du virus de la grippe espagnole, était associée à une réplication plus soutenue dans le tractus respiratoire supérieur mais surtout à une dissémination vers les poumons, ce qui n'était pas le cas du virus recombinant exprimant la protéine NS1 de PR/8 (Meunier and von Messling, 2011). Ceci suggère que le contrôle de la réponse de l'hôte par le virus, particulièrement de la réponse aux IFN I, peut influencer en partie le tropisme viral. Par ailleurs, contrairement aux études chez la souris et avec d'autres virus, cela n'est pas associé à une infection systémique chez les furets dans le cas des virus de la grippe saisonniers. Ceci pourrait être dû au fait que l'inhibition de la production des IFN I n'est pas complète comme dans le cas de souris KO, mais cela laisse aussi croire que d'autres facteurs viraux influencent le tropisme cellulaire. Parmi ceux-ci, la protéine HA influence le tropisme de par la spécificité des acides sialiques qu'elle reconnaît et de par son site de clivage (Connor et al., 1994; Horimoto et al., 1994; Kido et al., 1996; Kido et al., 1992; Matrosovich et al., 2000; Rogers and Paulson, 1983; Rogers et al., 1983). L'insertion d'un site de clivage multi-basique dans la protéine HA d'un virus humain H3N2 n'influence ni le tropisme viral, ni la sévérité de la maladie chez les furets (Schrauwen et al., 2011). Dans le cas des virus H1N1, le remplacement du site de clivage monobasique par un site multi-basique semble associé à la présence du virus dans le tractus gastro-intestinal sans toutefois avoir un impact sur la virulence chez les furets (Somo Youmbi *et al*, manuscrit en préparation). Finalement, l'introduction des protéines HA et NS du virus hautement virulent H5N1 A/Vietnam/UT3062/04 (UT3062) dans le fond génétique du virus H5N1 A/Vietnam/UT3028/03 (UT3028), moins virulent, est associé à une infection systémique ainsi qu'à une augmentation de la pathogénèse et de la mortalité chez les furets. Une comparaison des séquences en a.a. révèle que dans la protéine HA, les résidus de la souche virulente UT3062 modifient la spécificité du récepteur. De plus, dans le cas de la protéine NS, les a.a. présents chez la souche UT3062 confère une meilleure activité antagoniste des IFN I (Imai et al., 2010). Ces études suggèrent donc que les deux protéines pourraient agir en synergie afin d'influencer le tropisme viral et la virulence. Il serait donc intéressant de déterminer si, dans le cas des virus humains H1N1 saisonniers, les protéines HA et NS peuvent agir en synergie afin d'affecter la distribution du virus dans l'organisme et la virulence.

3.3 Pourquoi l'impact de PB1-F2 sur la modulation de la réponse inflammatoire est si subtil *in vivo*?

L'infection par les virus hautement pathogènes est souvent associée à une hyperinduction de cytokines pro-inflammatoires, mais les facteurs associés à cette dérégulation de la réponse immunitaire ne sont pas encore connus. Parmi les protéines virales, PB1-F2 a été identifié comme facteur potentiel pouvant moduler la réponse inflammatoire (Krumbholz et al., 2011; Maines et al., 2008; Watanabe and Kawaoka, 2011). L'instillation de peptides PB1-F2 dérivés du virus de la grippe espagnole chez des souris provoque une induction de plusieurs cytokines et chimiokines ainsi qu'un recrutement de cellules immunitaires aux poumons (McAuley et al., 2007). Plus récemment, il a été observé que la capacité de la protéine à moduler la production de cytokines variait selon le type cellulaire et que PB1-F2 avait un effet inhibiteur seulement dans les macrophages et les DC (Schmolke et al., 2011).

Dans nos études, nous avons également observé que la présence de PB1-F2 n'avait aucun impact sur le profil de cytokines retrouvées dans les cultures *ex vivo* de poumons de furets et de macaque, qui représentent principalement une réponse des cellules épithéliales, mais était associée à une inhibition de la production d'IL-6 et IL-8 chez les macrophages dérivés du sang de furet (Meunier and von Messling, 2012). Ces résultats reproduisent ceux obtenus par un autre groupe dans des cellules de souris (Schmolke et al., 2011). Depuis sa découverte dans les années 2000, il a été observé que PB1-F2 avait des effets seulement dans certains types cellulaires, principalement dans sa capacité d'induire l'apoptose (Chen et al., 2001). La façon dont la protéine induit une réponse de cytokines dans des types cellulaires différents n'est pas encore connue. Bien que les différences observées entre le virus possédant le PB1-F2 du virus de la grippe espagnole et celui déficient pour la protéine étaient marquées dans les macrophages *in vitro*, l'effet de PB1-F2 était beaucoup plus subtil chez les furets, ce qui peut expliquer pourquoi la contribution de la protéine à la pathogenèse *in vivo* est marginale. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la proportion de macrophages et de DC infectées par les virus humains saisonniers est relativement basse (Manicassamy et al., 2010; van Riel et al., 2011). Conséquemment, seulement une faible proportion des cellules pouvant être affectées par PB1-F2 entre contact avec la protéine. Il pourrait donc être intéressant de déterminer si PB1-F2 peut davantage contribuer à la virulence dans le contexte d'un virus qui infecte plus efficacement les cellules dans lesquelles la protéine a un effet.

3.4 Est-ce que la fonction de PB1-F2 serait spécifique à l'hôte?

La majorité des virus H3N2, qu'ils soient d'origine porcine ou humaine, codent pour une forme complète de la protéine PB1-F2 qui a subi plusieurs changements depuis son adaptation chez l'humain (Zell et al., 2007). Même si la protéine n'a aucun effet sur l'induction de l'apoptose dans des cellules murines, humaines et de furets et n'influence pas l'activité du complexe de polymérase, elle aurait toutefois des propriétés pro-inflammatoires, selon les isolats étudiés (Alymova et al., 2011; McAuley et al., 2010a; McAuley et al., 2010b). En effet, seulement le peptide PB1-F2 provenant de l'isolat pandémique de 1968 cause une inflammation dans les poumons de souris, par opposition à celui dérivé d'un virus H3N2 circulant dans la population humaine depuis 1995, suggérant que la propriété pro-inflammatoire de la protéine a été perdue lors de l'adaptation à l'humain (McAuley et al., 2010a). Il est intéressant de noter que le segment PB1 du virus pandémique de 1968, et donc, la protéine PB1-F2 qu'il encode, est d'origine aviaire (Kawaoka et al., 1989). Dans le cas des virus H1N1, l'expression de la protéine varie beaucoup selon l'origine du segment PB1. La majorité des virus porcins de lignée européenne possède une forme complète de PB1-F2. À l'opposé, les virus porcins de la lignée classique, dont provient le segment PB1 du virus pandémique de 2009, possèdent une forme tronquée de 11 a.a. Finalement, les virus H1N1 humains expriment une forme tronquée de 11 ou 57 a.a. depuis les années 1950 (Garten et al., 2009; Smith et al., 2009; Zell et al., 2007). Dans le cas du virus de la grippe espagnole dont le segment PB1 est d'origine aviaire, PB1-F2 a aussi une activité pro-inflammatoire chez les souris sans toutefois moduler l'apoptose et l'activité du complexe de polymérase (Chen et al., 2001; Mazur et al., 2008; McAuley et al., 2010a; McAuley et al., 2007; McAuley et al., 2010b). Ces mêmes études ont démontré que la partie C-terminale était nécessaire et suffisante, entre autres pour les propriétés pro-inflammatoires, laissant croire que la protéine PB1-F2 tronquée des virus H1N1 contemporains n'est pas fonctionnelle (McAuley et al., 2010a; McAuley et al., 2007). Dans le cas du virus pandémique de 2009, l'introduction d'une forme complète de PB1-F2 est associée à une modulation de la réponse inflammatoire chez les souris, sans toutefois affecter la virulence (Hai et al., 2010). Bref, tous ces résultats suggèrent fortement que l'adaptation du virus chez l'humain et chez le porc est associée à une perte de fonctionnalité de la protéine.

En contrepartie, 96 % des isolats aviaires expriment une forme complète de la protéine, laissant croire qu'il y a une forte pression de sélection pour la conserver et suggérant qu'elle aurait un rôle important chez le réservoir du virus, soit les oiseaux aquatiques (Zell et al., 2007). Les seules études effectuées chez le canard ont été réalisées dans le contexte de virus hautement

pathogènes qui ont un taux de mortalité élevé, ce qui n'est pas le cas de la majorité des virus aviaires qui causent une infection asymptomatique chez cette espèce. Néanmoins, ces études ont démontré que la protéine PB1-F2 favorisait une dissémination plus rapide du virus vers d'autres organes mais sa contribution à l'activité du complexe de polymérase est controversée (Marjuki et al., 2010; Schmolke et al., 2011). Puisque les oiseaux aquatiques sont le réservoir du virus, il serait intéressant de déterminer si PB1-F2 a un rôle important pour le virus dans un contexte qui n'est pas hautement pathogène. À cet effet, la protéine pourrait être importante pour assurer une réplication efficace chez le canard, pourrait moduler la réponse immunitaire de l'hôte ou pourrait être importante pour l'excrétion du virus.

3.5 L'utilisation des cultures *ex vivo* de poumons : potentiel et pistes de recherche.

Plusieurs études sur le virus de la grippe sont réalisées en utilisant des lignées cellulaires ou des cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires. Bien que ces cellules permettent de tirer certaines conclusions quant à la réplication virale et la réponse cellulaire, elles ne représentent pas les conditions physiologiques naturelles des poumons, ni la complexité cellulaire présente dans le tractus respiratoire. Dans ce but, nous avons élaboré un système de culture de poumons *ex vivo* de furets et de macaque afin de comparer différents virus recombinants. Ces cultures nous ont permis de confirmer la permissivité des poumons de furets et de macaque à l'infection par un virus humain ainsi que d'évaluer la réponse immunitaire locale induite (Meunier and von Messling, 2012).

Les systèmes de cultures *ex vivo* de poumons mais aussi de trachée et du nasopharynx sont de plus en plus utilisés pour étudier les interactions entre le système respiratoire et divers agents pathogènes. En effet, des cultures humaines de nasopharynx, d'amygdales et de poumons ont permis de caractériser le tropisme cellulaire des virus H5N1 ainsi que celui des virus saisonniers humains H1N1 et H3N2 (Nicholls et al., 2007; van Riel et al., 2011). De plus, des études similaires ont été réalisées chez les porcs afin d'évaluer l'expression des acides sialiques α -2,3 et α -2,6 dans différents tissus du tractus respiratoire ainsi que leur susceptibilité aux virus humains et aviaires. Ceci a permis de confirmer le rôle important des porcs dans l'adaptation des virus aviaires aux mammifères. Ces cultures représentent donc un outil très intéressant pour l'étude des facteurs viraux et de l'hôte contribuant à l'adaptation et au réassortiment (Van Poucke et al., 2010). Un système similaire a récemment été utilisé afin d'évaluer la contribution de PB1-F2 à la virulence chez les porcs (Pena et al., 2012). Finalement, des cultures *ex vivo* de

poumons humains sont de plus en plus utilisées afin de tester le potentiel de nouvelles drogues antivirales, comme il en a été le cas pour le DAS181 (Chan et al., 2009).

En raison du fort potentiel des cultures *ex vivo* pour l'étude du cycle de vie du virus mais aussi dans ses interactions avec l'hôte, il serait très intéressant de développer davantage notre système. Tout d'abord, afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble des interactions entre le virus et le tractus respiratoire supérieur et inférieur, des cultures *ex vivo* de trachée et de nasopharynx de furets et de macaques pourraient être développées afin de comparer les réponses induites par les virus dans divers sites du système respiratoire. De plus, les cultures de poumons pourraient être divisées en deux catégories, soit en effectuant des coupes proximales (près des bronches) ou distales (près des alvéoles). Une caractérisation plus approfondie des types cellulaires présents dans chacun des échantillons ainsi que de la distribution des acides sialiques, grâce à l'utilisation des lectines de *Maackia amurensis* (MAL-II) et de l'agglutinine de *Sambucus nigra* (SNA-I) qui reconnaissent les acides sialiques α -2,6 et α -2,3 respectivement (Shinya et al., 2006) devrait être effectué. Ceci nous permettrait alors de déterminer la susceptibilité à l'infection de souches aviaires et de mammifères pour mieux comprendre le rôle de ces récepteurs dans le tropisme cellulaire et la dissémination virale. En combinaison avec les technologies permettant l'analyse des cellules individuelles, ces cultures permettraient aussi l'identification des cellules productrices de certaines cytokines (Rudd et al., 2010).

3.6 Réponse aux IFN et virus de la grippe : nouveaux traitements et vaccins potentiels.

Les IFN I sont des médiateurs clés de l'immunité innée car ils induisent l'expression de plusieurs ISG qui permettent l'établissement d'un état antiviral dans les cellules. Le fait que la majorité des virus aient développé des stratégies pour inhiber soit la production des IFN I, soit certaines protéines qu'ils induisent ou soit les deux à la fois, démontre bien l'effet délétère que la réponse aux IFN I a sur la survie virale. En conséquence, cela suggère aussi que les IFN I pourraient être utilisés comme approche thérapeutique. En effet, l'IFN- α pegylé est couramment utilisé dans le traitement contre le virus de l'hépatite C conjointement avec la ribavirine (Ilyas and Vierling, 2011) et des essais pré-cliniques indiquent que l'IFN- α est aussi efficace contre le virus de l'hépatite B (Giacchino and Cappelli, 2010; Liaw, 2009; Yuen and Lai, 2011) et possiblement contre le virus du syndrome respiratoire aiguë sévère (SRAS) (Haagmans et al., 2004; Stockman et al., 2006). Dans le cas du virus de la grippe, des premières études cliniques ont

démontré que le traitement à l'IFN permettait de réduire les symptômes de la maladie mais provoquait l'irritation de la muqueuse nasale et dans quelque cas, des saignements nasaux (Finter et al., 1991; Isomura et al., 1982; Phillipotts et al., 1984). Depuis, son efficacité a été testée dans différents modèles animaux. Chez les souris et les cochons d'Inde, l'administration d'IFN- α de 8 à 12 h avant l'infection est associée à une diminution de la charge virale et protège contre une infection létale avec le virus de la grippe espagnole et un virus H5N1 (Tumpey et al., 2007b; Van Hoeven et al., 2009a). Chez les furets, ce même traitement permet de réduire le titre viral et les signes cliniques associés à une infection avec une souche humaine saisonnière mais ne confère aucun avantage dans le cas d'une infection létale avec un virus H5N1 (Kugel et al., 2009). Finalement, une étude récente a démontré que l'instillation d'IFN- α chez des macaques 24 h avant l'infection permet également de diminuer la charge virale et les signes cliniques suite à l'infection avec un virus saisonnier (Matzinger et al., 2011).

Malgré le fait que ces études démontrent un potentiel intéressant pour le traitement aux IFN I, il est important de noter qu'elles ont toutes été réalisées dans un contexte prophylactique. En effet, des études *in vitro* ont démontré que lorsque les cellules sont traitées après infection, il y a peu d'effet sur le titre viral (Szretter et al., 2009). En conséquence, l'utilisation des IFN I comme approche thérapeutique est plutôt restreinte à la prévention de l'infection. Néanmoins, d'autres sous-types d'IFN I, dont l'IFN- ω et - τ semblent efficaces pour inhiber les virus de l'immunodéficience humaine et féline ainsi que le virus du papillome humain *in vitro* et il pourrait être intéressant d'investiguer davantage leur effet sur le virus de la grippe (Chon and Bixler, 2010; Xu et al., 2011). Finalement, des traitements visant à stimuler la production d'IFN I en utilisant du poly (I:C) encapsulé dans des liposomes permettent de protéger des souris contre une infection létale avec le virus de la grippe et des essais cliniques sont présentement en cours pour évaluer la toxicité du composé (Saravolac et al., 2001).

À l'opposé, nous avons aussi vu que certains virus provoquent une dérégulation de la réponse immunitaire caractérisée par une hyperinduction de cytokines pro-inflammatoires ce qui cause beaucoup de dommage aux tissus pulmonaires et peut causer le syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère (Strieter et al., 1994; Strieter and Kunkel, 1993; Suzuki et al., 2008). En conséquence, l'utilisation de drogues inhibant le système immunitaire, dont les stéroïdes, a été testée dans le cas d'infections par différents virus respiratoires (De Pascale et al., 2011). L'utilisation de stéroïdes suite à l'infection par le virus du SRAS est encore un sujet de débat puisque certaines études semblent démontrer une amélioration du taux de survie des patients tandis que d'autres démontrent le contraire (Bernard et al., 1987; Booth et al., 2003; Fowler et

al., 2003; Lee et al., 2003; Lew et al., 2003). De plus, les effets secondaires que ces drogues peuvent provoquer ainsi que le fait qu'elles peuvent prédisposer à certaines infections secondaires semblent argumenter en défaveur de leur utilisation (Wang et al., 2003). À l'opposé, plusieurs études cliniques démontrent un rôle protecteur dans les cas de complication suite à l'infection par le virus respiratoire syncytial (Bentur et al., 2005; Matsuse et al., 2006; Somers et al., 2009). Finalement, l'utilisation de stéroïdes suite à l'infection avec le virus de la grippe reste aussi controversée. Dans le cas d'infections par les virus H5N1, le traitement aux stéroïdes n'améliore pas le taux de survie des souris (Salomon et al., 2007; Xu et al., 2009) et aucune étude clinique n'a réussi à démontrer un avantage dans l'amélioration du taux de survie (Hien et al., 2009; Yu et al., 2008). Le traitement aux stéroïdes a aussi été évaluée suite à l'infection avec le virus pandémique qui peut également provoquer une hyperinduction de cytokines (Itoh et al., 2009; Lee et al., 2011; Meunier et al., 2012; Yu et al., 2011b). Encore une fois, les résultats varient beaucoup selon les études. Dans certains cas, le traitement aux stéroïdes a été associé à une dégradation de l'état des patients, dans d'autres, cela n'avait aucun effet et finalement, pour certains, il y avait une amélioration (Diaz et al., 2012; Han et al., 2011; Linko et al., 2011; Quispe-Laime et al., 2010). Bref, il est très difficile pour l'instant de déterminer si des traitements immunomodulateurs peuvent avoir des effets bénéfiques puisque ces études ont souvent été réalisées à différentes doses ou les patients ont été traités à différents temps post-infection. Conséquemment, il serait important d'effectuer des études comparant les différentes doses, à quel moment post-infection la drogue doit être administrée et l'effet sur plusieurs souches virales. Finalement, l'injection d'anticorps anti-TNF- α chez la souris diminue la pathologie aux poumons, augmente le taux de survie et ne nuit pas à l'élimination du virus. Des études plus approfondies et dans d'autres modèles animaux permettraient de confirmer ces résultats et de déterminer le potentiel de cette approche thérapeutique (Hussell et al., 2001; Peper and Van Campen, 1995).

Puisque la protéine NS1 a un rôle très important dans l'inhibition de la réponse aux IFN I, des virus défectueux pour la protéine sont atténués *in vitro* et *in vivo* (Garcia-Sastre et al., 1998b). L'utilisation de virus possédant une protéine NS1 tronquée dans sa partie C-terminale comme vaccin a été testée dans plusieurs modèles animaux (Baskin et al., 2007; Quinlivan et al., 2005; Richt et al., 2006; Solorzano et al., 2005; Talon et al., 2000a; Vincent et al., 2007). Ces virus sont partiellement atténués car ils ne peuvent inhiber la réponse immunitaire. Néanmoins, ils sont tout de même capable de se répliquer à de faibles titres, ce qui fait en sorte qu'ils induisent une réponse humorale et cellulaire, ainsi que systémique et mucoale (Ferko et al.,

2004; Talon et al., 2000b). Une stratégie alternative pourrait être basée sur l'introduction de mutations spécifiques dans la protéine la rendant moins efficace à inhiber la réponse immunitaire (Hale et al., 2008b). Par contre, le désavantage principal de cette stratégie vaccinale est qu'il y a plus de chance de réversion. En effet, le virus pourrait acquérir des mutations lui permettant de revenir à un phénotype sauvage. En conséquence, il pourrait être intéressant d'évaluer la stabilité génétique de ces virus. De plus, l'utilisation de virus de la grippe atténués suscite encore de la controverse quant au risque de réassortiment possible entre le vaccin et une souche circulante. Des études visant à évaluer à sécurité de ces vaccins sont donc encore nécessaires.

3.7 Qu'est-ce qui contribue à la pathogenèse du virus de la grippe?

La pathogenèse causée par le virus de la grippe est très complexe et dépend de plusieurs facteurs (**Figure 6**). Tout d'abord, une partie de la pathologie peut être directement imputable à la réplication virale. En effet, le virus provoque la mort des cellules infectées par lyse, ce qui est à la fois associé au relargage de nouvelles particules virales ainsi qu'à celle de médiateurs pro-inflammatoires ou nocifs pour l'environnement extracellulaire (Julkunen et al., 2001). Le virus peut aussi induire l'apoptose dans les cellules infectées, autant par voie intrinsèque qu'extrinsèque (Choi et al., 2006; Mirandola et al., 2004; Topham et al., 1997; Xing et al., 2011). Les effets des dommages sur les cellules épithéliales persistent généralement pour 5 à 6 jours chez les humains, concordant avec le cycle de réplication viral. La destruction des cellules alvéolaires par le virus provoque de l'œdème pulmonaire, ce qui mène à une diminution des échanges gazeux et ce qui peut entraîner à une détresse respiratoire (Nakajima et al., 2010; Sanders et al., 2011). Par contre, les virus de la grippe diffèrent dans leur capacité d'induire la mort cellulaire. Le virus de la grippe espagnole, celui de la grippe pandémique de 2009 ainsi que plusieurs virus H5N1 causent une plus grande destruction des cellules épithéliales des voies respiratoires et des alvéoles avec de l'œdème. Par opposition, les virus saisonniers endommagent rarement les alvéoles. La capacité d'induire la mort cellulaire pourrait donc en partie expliquer la virulence. De plus, la localisation de l'inflammation et des dommages reflètent la présence du virus dans différents types cellulaires. Les virus plus pathogènes sont retrouvés principalement dans les cellules épithéliales du nasopharynx et des bronchioles, dans les macrophages alvéolaires et dans les pneumocytes, tandis que les virus moins virulents sont plutôt limités aux cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur (Gu et al., 2007; Guarner and Falcon-Escobedo, 2009). En corrélation avec ces données, nos études ont aussi démontré

qu'un isolat plus virulent du virus pandémique de 2009 causait plus de dommages aux poumons et sur une période plus longue comparativement à un isolat moins virulent (Meunier et al., 2012). L'étendue et la durée des dommages aux cellules pulmonaires a aussi un impact sur le temps requis au processus de réparation du tissu et donc, la durée des problèmes pulmonaires. Dans certains cas, si la structure du tissu est trop endommagée, il n'y aura pas de réparation et une perte de fonction sera permanente (Strieter, 2008).

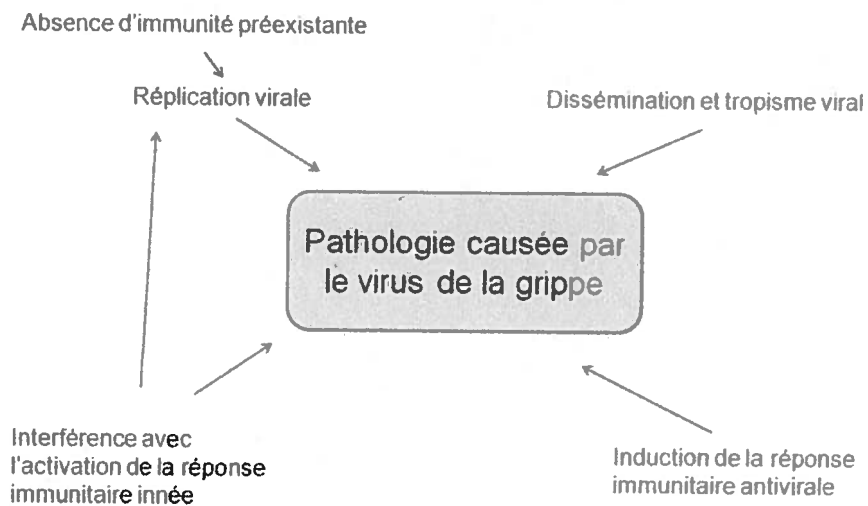


Figure 6: Mécanismes pouvant possiblement contribuer à la pathogenèse causée par le virus de la grippe. La réplication virale peut directement influencer la sévérité de la maladie en endommageant les cellules du système respiratoire. La charge virale peut être influencée par l'existence d'une immunité préexistante et par la capacité du virus à inhiber la réponse immunitaire. La pathogenèse peut être aggravée selon le tropisme tissulaire et cellulaire et la dissémination du virus. Finalement, l'amplitude de la réponse immunitaire induite pourrait augmenter la sévérité de la maladie. Inspiré de (Peiris et al., 2009).

La capacité des virus à se répliquer peut dépendre de plusieurs facteurs dont le statut immunitaire de l'hôte avant l'infection. En effet, la présence d'une immunité pré-existante peut contribuer à diminuer la réplication virale. Dans le cas des H5N1, l'absence d'immunité pré-existante contribue en partie aux hauts titres viraux observés chez les patients, entre autres car la majorité de la population humaine, qui est principalement exposée aux virus saisonniers, a peu d'immunité contre ces virus (de Jong et al., 2005; Peiris et al., 2009). Comme discuté précédemment, une capacité accrue du virus à résister aux effets du système immunitaire peut influencer la charge virale et la durée de la réplication et avoir un impact sur la sévérité des

dommages associés à l'infection. Finalement, l'activité du complexe de polymérase a une influence majeure sur le taux de réplication du virus. Le complexe de polymérase contribue à la virulence des virus H5N1 et du virus de la grippe espagnole, et un acide glutamique à la position 627 dans la protéine PB2 augmente l'efficacité de réplication et la virulence chez la souris (Basler and Aguilar, 2008; de Jong et al., 2005; McMichael et al., 1983; Watanabe et al., 2009). De plus, le virus pandémique de 2009 possède des mutations uniques dans la protéine PA qui augmentent l'activité du complexe de polymérase, ce qui pourrait en partie expliquer pourquoi ce virus se réplique à de hauts titres (Bussey et al., 2011). Il a aussi été remarqué que les protéines PB1 d'origine aviaire confèrent un avantage répliatif dans les cellules de mammifères (Naffakh et al., 2000). Puisque le segment PB1 de tous les derniers virus pandémiques étaient d'origine aviaire, il serait intéressant de caractériser par quel mécanisme cet avantage répliatif est conféré.

Comme discuté précédemment, la dissémination du virus à l'extérieur du tractus respiratoire ainsi que son tropisme pour certains types cellulaires influence la sévérité de la maladie. Dans le cas un peu plus extrême des virus H5N1, le virus infecte principalement les cellules du tractus respiratoire inférieur, avec une préférence pour les pneumocytes de type II et peut aussi être retrouvé à l'extérieur du tractus respiratoire, ce qui a en partie été attribué au site de clivage multi-basique de la protéine HA (Fukuyama and Kawaoka, 2011; Horimoto et al., 1994; Nicholls et al., 2007; Shinya et al., 2006). Quant à lui, le virus de la grippe espagnole est retrouvé autant dans le tractus respiratoire supérieur qu'aux poumons, mais également à de faibles titres dans les ganglions lymphatiques drainants, dans la rate et dans le cœur des macaques, contrairement à un virus saisonnier qui était restreint au tractus respiratoire supérieur (Kobasa et al., 2007). Dans nos études sur la protéine NS1, nous avons vu que les virus rUSSR et rUSSR-NS1 1918, qui causaient une maladie plus sévère chez les furets, était détectés dans les poumons, ce qui n'était pas le cas du virus moins virulent rUSSR-NS PR/8 (Meunier and von Messling, 2011). Similairement, une étude comparant la virulence de quatre virus chez les furets a démontré que des antigènes viraux des souches plus virulentes étaient retrouvés dans les poumons, par opposition aux souches moins pathogènes pour lesquelles peu ou pas d'antigènes viraux étaient présents (Svitek et al., 2008). Puisque le développement d'une pneumonie virale suite à l'infection avec le virus de la grippe est souvent associé à un mauvais pronostic, la dissémination au tractus respiratoire inférieur contribue beaucoup à la sévérité de la maladie (Beigel et al., 2005; Bouvier and Lowen, 2010; Oseasohn et al., 1959; Rello and Pop-Vicas, 2009; Walsh et al., 1961). Par ailleurs, lorsque nous avons comparé la virulence de deux

isolats du virus pandémique de 2009, nous avons observé que malgré le fait que les deux virus étaient retrouvés à des titres semblables dans le tractus respiratoire supérieur et inférieur, ils différaient quand même quant à leur virulence (Meunier et al., 2012). Ceci suggère donc que des facteurs autres que la réplication virale, la dissémination et le tropisme cellulaire influencent la virulence.

De plus en plus d'études avec différents virus suggèrent que la réponse immunitaire peut également contribuer à la pathologie. Entre autres, la fièvre hémorragique ou le syndrome de choc causé par le virus de la dengue est associée à une concentration sérique très élevée de plusieurs cytokines dont l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β (Chakravarti and Kumaria, 2006; Nguyen et al., 2005; Perez et al., 2004). Ce phénomène est aussi amplifié par le fait que plusieurs de ces cytokines ont des effets synergistiques (Burke-Gaffney and Keenan, 1993). L'activation du complément par la protéine NS1 du virus de la dengue contribue également à l'immunopathologie en provoquant une accumulation de l'anaphylatoxine C5a qui cause l'hyperperméabilité vasculaire (Avirutnan et al., 2011; Avirutnan et al., 2006). De façon similaire, le virus du SRAS est également reconnu pour induire une tempête de cytokines. En effet, chez les patients ayant succombé à l'infection, une concentration élevée d'IL-6, d'IFN- γ , de CXCL10 et d'IL-18 était retrouvée dans le sérum, même lorsque la charge virale commençait à diminuer (Huang et al., 2005; Peiris et al., 2003; Wong et al., 2004). L'IFN- γ est suspecté comme médiateur important dans l'immunopathologie associée au SRAS car il inhibe la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires et favorise l'induction de l'apoptose d'une manière Fas-dépendante (Theron et al., 2005).

Une dérégulation de la réponse immunitaire a aussi été documentée suite à l'infection avec des virus de la grippe hautement pathogènes. Dans le cas des virus H5N1, plusieurs études suggèrent maintenant que la réponse immunitaire pourrait être en bonne partie responsable de la sévérité de la maladie (de Jong et al., 2006; To et al., 2001). L'infection est associée à une forte concentration sérique de plusieurs chimiokines dont CXCL10, CXCL2, IL-8 mais aussi des cytokines dont l'IL-6, -10 et l'IFN- γ . Les patients ayant succombé à la maladie démontraient une plus forte concentration sérique que ceux ayant survécus (de Jong et al., 2006; Peiris et al., 2004). Similairement, l'infection de souris, de furets et de macaques avec des virus H5N1 induit une forte production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires ce qui provoque un recrutement massif de cellules immunitaires (Baskin et al., 2009; Cameron et al., 2008; Perrone et al., 2008; Szretter et al., 2007; Tumpey et al., 2000), dont les macrophages et les neutrophiles qui produisent de larges quantités de réactifs oxygénés, pouvant causer des dommages importants

aux poumons (Imai et al., 2008; Oda et al., 1989). Cette hyperproduction de cytokines a entre autres été associée aux hauts titres viraux et à la protéine NS1. En effet, cette dernière provoque l'hyperactivation de la voie p38/MAPK, causant une production accrue de TNF- α qui est reconnu pour contribuer grandement à la pathogenèse du virus de la grippe (Belisle et al., 2010; Szretter et al., 2007). D'autre part, la protéine NS1 des virus H5N1 ne semble pas associée à une meilleure inhibition de la production de cytokines mais confère plutôt une résistance à leurs effets. Il a donc été émis comme hypothèse que la tempête de cytokines induites par ces virus pourrait en partie être causée par le fait que le système immunitaire produit une forte réponse contre un virus qui lui serait déjà résistant. Agissant en boucle amplificatrice, la réplication virale contribue à maintenir cette réponse immunitaire (Cheung et al., 2002; Lee et al., 2005; Seo et al., 2002). De plus, il a récemment été démontré que des souris infectées par certains virus H5N1 démontraient une concentration élevée de C5a aux poumons, ce qui pourrait aussi contribuer à l'immunopathologie, tout comme pour le virus de la dengue (O'Brien et al., 2011). Dans le cas du virus de la grippe espagnole, chez les souris et les macaques, l'infection est associée à une induction forte et prolongée d'IL-6, MIP-1 α et d'IL-1 β mais à une faible production d'IFN I. Dans les deux cas, cette dérégulation de la réponse immunitaire a été associée à une pathologie sévère aux poumons (Kash et al., 2006; Kobasa et al., 2007; Perrone et al., 2008). Finalement, la sévérité de la maladie causée par le virus pandémique de 2009 démontre beaucoup d'hétérogénéité, passant à de cas bénins à de la mortalité (Chowell et al., 2009; Khandaker et al., 2011; Pebody et al., 2010). Les cas répertoriés tôt dans la pandémie étaient souvent plus sévères et des études chez les macaques et les souris ont démontré que certains de ces isolats induisaient une plus forte production de cytokines comparativement à des virus saisonniers (Itoh et al., 2009; Safronetz et al., 2011). Dans nos études, nous avons observé que l'infection avec l'isolat plus virulent MX10 induisait une forte production de plusieurs cytokines ce qui était corrélé avec une augmentation des scores cliniques et de la pathologie aux poumons (Meunier et al., 2012). Les virus RV1532 et MX10 ne diffèrent que par quelques acides aminés dans les protéines PB2, PA, HA, NP, NA et NS1 et des études visant à déterminer quel(s) sont le ou les facteurs provoquant cette réponse immunitaire différente seraient importantes. De plus, il pourrait aussi être intéressant d'évaluer si des traitements inhibant la réponse immunitaire, comme les stéroïdes ou des anticorps anti-TNF- α pourraient améliorer la maladie.

Dans nos études, nous avons principalement étudié l'impact de la production de diverses cytokines sur la sévérité de la maladie. Par contre, plusieurs autres médiateurs ayant des

propriétés pro-inflammatoires contribuent très probablement à la pathologie observée. Comme discuté précédemment, le complément est un effecteur important du système immunitaire inné mais il peut également contribuer à la pathologie lorsqu'il est induit de façon disproportionnée. Tout d'abord, les complexes immuns sont reconnus comme des activateurs de la cascade du complément par la voie classique, ce qui mène à la synthèse de plusieurs sous-produits pro-inflammatoires dont C4d, C3a et C5a (Czermak et al., 1998). Dans le cas de certaines infections virales, dont celle du virus de Marburg, de la dengue et du virus respiratoire syncytial, la présence d'anticorps non-neutralisants et de faible avidité provoque une activation du complément qui aggrave la maladie causée par ces virus (Delgado et al., 2009; Nakayama et al., 2011; Pang et al., 2007; Polack et al., 2002). Récemment, il a été observé que les patients ayant succombé au virus de la grippe pandémique de 2009 avaient des anticorps de faible avidité contre le virus et une accumulation de molécules de C4d aux poumons. Ces résultats suggèrent que le complément a une importance dans la pathologie causée par le virus chez des individus ayant une immunité pré-existante (Monsalvo et al., 2011). Par ailleurs, des souris naïves infectées par un virus hautement pathogène H5N1 produisent une plus grande quantité de C5a ce qui corrèle avec une plus grande pathologie aux poumons ainsi qu'à un taux de mortalité plus élevé. De plus, l'infection de furets séronégatifs pour les virus H5N1, H1N1 et H3N2 infectés avec un virus hautement pathogène H5N1 est associé à une plus forte induction du complément par la voie des lectines, comparativement à un virus humain saisonnier (Cameron et al., 2008; O'Brien et al., 2011). Ensemble, ces deux études suggèrent que les virus hautement pathogènes de type H5N1 activent d'une façon particulière le complément ce qui peut contribuer à la virulence. En conséquence, des études visant à comprendre comment les virus H5N1 activent le complément et les conséquences sur l'hôte seraient intéressantes.

Plusieurs types de cellules peuvent produire des réactifs oxygénés (*reactive oxygen species*, ROS) dont les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales et endothéliales (Bhatia and Mochhala, 2004). La libération de ces molécules a plusieurs effets dans l'environnement pulmonaire dont une dysfonction des cellules épithéliales pulmonaires, l'activation de PKC, MAP kinases et la disruption du réseau d'actine (Gutteridge and Mitchell, 1999; Hu et al., 1994; Lum and Roebuck, 2001; Szabo et al., 1997; Waters et al., 1997). L'infection par le virus de la grippe induit la production de ROS ce qui contribue à la pathologie dans les poumons (Akaike et al., 1996; Imai et al., 2008). L'inhibition de la superoxyde dismutase, l'enzyme qui catalyse la réaction de synthèse des ROS, est associée à augmentation du taux de survie chez les souris. Cet effet protecteur est aussi présent lorsque les souris sont traitées de 5 à 8 jours après

l'infection (Oda et al., 1989). Conséquemment, il serait intéressant d'évaluer si l'inhibition de la superoxyde dismutase a aussi des effets bénéfiques lors d'infections avec des virus saisonniers.

Finalement, la substance P pourrait aussi contribuer à la réponse inflammatoire et à la pathologie observée dans les poumons. Il s'agit d'un peptide de 11 a.a. libéré par les nerfs dans plusieurs tissus différents qui a un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires comme l'asthme, l'arthrite et des dommages aux poumons (Bowden et al., 1994; Thurston et al., 1996). En effet, des hautes concentrations de substance P sont présentes dans les lavages broncho-alvéolaires de patients souffrant du syndrome de détresse aiguë respiratoire sévère (Espiritu et al., 1992). Aucune étude jusqu'à maintenant n'a été effectuée à savoir s'il y avait une corrélation entre la substance P, l'infection par le virus de la grippe et la pathologie.

CONCLUSION

Plusieurs facteurs influencent la pathologie causée par le virus de la grippe: d'une part, des facteurs spécifiques à l'hôte dont le statut immunitaire et le type de réponse induite sont importants et, d'autre part, l'interférence avec la réponse immunitaire et l'effet cytotoxique de plusieurs protéines virales peuvent contribuer à augmenter la sévérité de la maladie. Dans le cadre de mes études doctorales, nous avons tout d'abord démontré que la protéine NS1 contribue à la virulence des virus humains H1N1 en ralentissant l'induction de la réponse aux IFN I. Ceci est associé à une dissémination du virus du tractus respiratoire supérieur vers les poumons ainsi qu'à une maladie plus sévère chez les furets. Dans un deuxième temps, nous avons observé que bien que la protéine PB1-F2 pouvait influencer la production de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages, elle avait peu d'impact sur la virulence de virus saisonniers chez les furets. Bien que certaines protéines virales, dont NS1, contribuent individuellement à la virulence, il semble de plus en plus clair que la virulence d'une souche spécifique n'est pas attribuable à une seule protéine mais bien à la constellation de gènes que le virus possède.

Finalement, la comparaison de l'infection par deux isolats du virus pandémique de 2009 a démontré que la réponse immunitaire induite pouvait également être un facteur contribuant à la sévérité de la maladie. En effet, bien que les deux virus se répliquaient de façon similaire dans le tractus respiratoire et dans les intestins, l'isolat plus virulent MX10 induisait une plus forte production de cytokines ce qui était associé à une pathologie plus importante dans les poumons et plus soutenue dans le temps. Ces résultats renforcent des observations avec d'autres virus hautement pathogènes et démontrent que bien que la réponse immunitaire soit généralement bénéfique et contribue à l'élimination du virus, elle peut aussi contribuer à la maladie lorsqu'elle est induite de façon disproportionnée et prolongée. Jusqu'à maintenant, il y a peu d'information sur la façon dont les virus de la grippe peuvent provoquer cette dérégulation de la réponse immunitaire et des études visant à comprendre les mécanismes impliqués seraient très intéressantes.

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Abou-Donia, H., Jennings, R., Potter, C.W., 1980. Growth of influenza A viruses in hamsters. *Arch Virol* 65, 99-107.
- Air, G.M., Laver, W.G., 1989. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins* 6, 341-356.
- Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Suga, M., Zheng, Y.M., Dietzschold, B., Maeda, H., 1996. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2448-2453.
- Akarsu, H., Iwatsuki-Horimoto, K., Noda, T., Kawakami, E., Katsura, H., Baudin, F., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. *Virus Res* 155, 240-248.
- Alarcon, J.B., Hartley, A.W., Harvey, N.G., Mikszta, J.A., 2007. Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 14, 375-381.
- Ali, M.J., Teh, C.Z., Jennings, R., Potter, C.W., 1982. Transmissibility of influenza viruses in hamsters. *Arch Virol* 72, 187-197.
- Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., Ting, J.P., 2009. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30, 556-565.
- Almansa, R., Socias, L., Ramirez, P., Martin-Loeches, I., Valles, J., Loza, A., Rello, J., Kelvin, D.J., Leon, C., Blanco, J., Andaluz, D., Micheloud, D., Maravi, E., Ortiz de Lejarazu, R., Bermejo-Martin, J.F., 2011. Imbalanced pro- and anti-Th17 responses (IL-17/granulocyte colony-stimulating factor) predict fatal outcome in 2009 pandemic influenza. *Crit Care* 15, 448.
- Alonso-Caplen, F.V., Krug, R.M., 1991. Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA. *Mol Cell Biol* 11, 1092-1098.
- Alonso-Caplen, F.V., Nemeroff, M.E., Qiu, Y., Krug, R.M., 1992. Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes Dev* 6, 255-267.

- Alymova, I.V., Green, A.M., van de Velde, N., McAuley, J.L., Boyd, K.L., Ghoneim, H.E., McCullers, J.A., 2011. Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82. *J Virol* 85, 12324-12333.
- Antunes, I., Kassiotis, G., 2010. Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice. *J Virol* 84, 12564-12575.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J., Nieto, A., 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* 20, 6259-6268.
- Arnheiter, H., Staeheli, P., 1983. Expression of interferon dependent resistance to influenza virus in mouse embryo cells. *Arch. Virol.* 76, 127-137.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., Mandelboim, O., 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31, 2680-2689.
- Avirutnan, P., Hauhart, R.E., Somnuk, P., Blom, A.M., Diamond, M.S., Atkinson, J.P., 2011. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol* 187, 424-433.
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Pattanakitsakul, S.N., Yenichitsomanus, P.T., Mongkolsapaya, J., Kasinrerker, W., Sittisombut, N., Husmann, M., Blettner, M., Vasanawathana, S., Bhakdi, S., Malasit, P., 2006. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 193, 1078-1088.
- Azoulay-Dupuis, E., Lambre, C.R., Soler, P., Moreau, J., Thibon, M., 1984. Lung alterations in guinea-pigs infected with influenza virus. *J Comp Pathol* 94, 273-283.
- Baas, T., Baskin, C.R., Diamond, D.L., Garcia-Sastre, A., Bielefeldt-Ohmann, H., Tumpey, T.M., Thomas, M.J., Carter, V.S., Teal, T.H., Van Hoeven, N., Proll, S., Jacobs, J.M., Caldwell, Z.R., Gritsenko, M.A., Hukkanen, R.R., Camp, D.G., 2nd, Smith, R.D., Katze, M.G., 2006. Integrated molecular signature of disease: analysis of influenza virus-infected macaques through functional genomics and proteomics. *J Virol* 80, 10813-10828.
- Backstrom Winqvist, E., Abdurahman, S., Tranell, A., Lindstrom, S., Tingsborg, S., Schwartz, S., 2011. Inefficient splicing of segment 7 and 8 mRNAs is an inherent property of influenza virus A/Brevig Mission/1918/1 (H1N1) that causes elevated expression of NS1 protein. *Virology*.
- Bannenberg, G., Serhan, C.N., 2010. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta* 1801, 1260-1273.

- Barnard, D.L., 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82, A110-122.
- Baskin, C.R., Bielefeldt-Ohmann, H., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T.M., Van Hoesen, N., Carter, V.S., Thomas, M.J., Proll, S., Solorzano, A., Billharz, R., Fornek, J.L., Thomas, S., Chen, C.H., Clark, E.A., Murali-Krishna, K., Katze, M.G., 2007. Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus. *J Virol* 81, 11817-11827.
- Baskin, C.R., Bielefeldt-Ohmann, H., Tumpey, T.M., Sabourin, P.J., Long, J.P., Garcia-Sastre, A., Tolnay, A.E., Albrecht, R., Pyles, J.A., Olson, P.H., Aicher, L.D., Rosenzweig, E.R., Murali-Krishna, K., Clark, E.A., Kotur, M.S., Fornek, J.L., Proll, S., Palermo, R.E., Sabourin, C.L., Katze, M.G., 2009. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3455-3460.
- Basler, C.F., Aguilar, P.V., 2008. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* 79, 166-178.
- Basler, C.F., Reid, A.H., Dybing, J.K., Janczewski, T.A., Fanning, T.G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M.L., Swayne, D.E., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Taubenberger, J.K., 2001. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2746-2751.
- Basler, C.F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.D., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12289-12294.
- Becker, S., Quay, J., Soukup, J., 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 147, 4307-4312.
- Beigel, J.H., Farrar, J., Han, A.M., Hayden, F.G., Hyer, R., de Jong, M.D., Lochindarat, S., Nguyen, T.K., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nicoll, A., Touch, S., Yuen, K.Y., 2005. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 353, 1374-1385.
- Belisle, S.E., Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Carter, V.S., Proll, S.C., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M., Tumpey, T.M., Katze, M.G., 2010. Genomic profiling of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor and interleukin-1 receptor knockout mice reveals a link between TNF-alpha signaling and increased severity of 1918 pandemic influenza virus infection. *J Virol* 84, 12576-12588.

- Belser, J.A., Lu, X., Maines, T.R., Smith, C., Li, Y., Donis, R.O., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2007. Pathogenesis of avian influenza (H7) virus infection in mice and ferrets: enhanced virulence of Eurasian H7N7 viruses isolated from humans. *J Virol* 81, 11139-11147.
- Belser, J.A., Wadford, D.A., Pappas, C., Gustin, K.M., Maines, T.R., Pearce, M.B., Zeng, H., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2010. Pathogenesis of pandemic influenza A (H1N1) and triple-reassortant swine influenza A (H1) viruses in mice. *J Virol* 84, 4194-4203.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., Heath, W.R., 2004. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8670-8675.
- Bentur, L., Shoseyov, D., Feigenbaum, D., Gorichovsky, Y., Bibi, H., 2005. Dexamethasone inhalations in RSV bronchiolitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Acta Paediatr* 94, 866-871.
- Bernard, G.R., Luce, J.M., Sprung, C.L., Rinaldo, J.E., Tate, R.M., Sibbald, W.J., Kariman, K., Higgins, S., Bradley, R., Metz, C.A., et al., 1987. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 317, 1565-1570.
- Betts, R.J., Ho, A.W., Kemeny, D.M., 2011. Partial Depletion of Natural CD4CD25 Regulatory T Cells with Anti-CD25 Antibody Does Not Alter the Course of Acute Influenza A Virus Infection. *PLoS One* 6, e27849.
- Bhatia, M., Mochhala, S., 2004. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202, 145-156.
- Billharz, R., Zeng, H., Proll, S.C., Korth, M.J., Lederer, S., Albrecht, R., Goodman, A.G., Rosenzweig, E., Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., 2009. The NS1 protein of the 1918 pandemic influenza virus blocks host interferon and lipid metabolism pathways. *J Virol* 83, 10557-10570.
- Billharz, R., Zeng, H., Proll, S.C., Korth, M.J., Lederer, S., Albrecht, R., Goodman, A.G., Rosenzweig, E., Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., 2009. The NS1 Protein of the 1918 Pandemic Influenza Virus Blocks Host Interferon and Lipid Metabolism Pathways. *J. Virol.*
- Blazejewska, P., Koscinski, L., Viegas, N., Anhlan, D., Ludwig, S., Schughart, K., 2011. Pathogenicity of different PR8 influenza A virus variants in mice is determined by both viral and host factors. *Virology*.

- Boon, A.C., de Mutsert, G., Graus, Y.M., Fouchier, R.A., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., 2002. The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol* 76, 582-590.
- Booth, C.M., Matukas, L.M., Tomlinson, G.A., Rachlis, A.R., Rose, D.B., Dwosh, H.A., Walmsley, S.L., Mazzulli, T., Avendano, M., Derkach, P., Ephtimios, I.E., Kitai, I., Mederski, B.D., Shadowitz, S.B., Gold, W.L., Hawryluck, L.A., Rea, E., Chenkin, J.S., Cescon, D.W., Poutanen, S.M., Detsky, A.S., 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 289, 2801-2809.
- Bornholdt, Z.A., Prasad, B.V., 2006. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Biol* 13, 559-560.
- Botos, I., Liu, L., Wang, Y., Segal, D.M., Davies, D.R., 2009. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta* 1789, 667-674.
- Bouvier, N.M., Lowen, A.C., 2010. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses* 2, 1530-1563.
- Bowden, J.J., Garland, A.M., Baluk, P., Lefevre, P., Grady, E.F., Vigna, S.R., Bunnett, N.W., McDonald, D.M., 1994. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8964-8968.
- Brown, D.M., Roman, E., Swain, S.L., 2004. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol* 16, 171-177.
- Bruns, K., Studrucker, N., Sharma, A., Fossen, T., Mitzner, D., Eissmann, A., Tessmer, U., Roder, R., Henklein, P., Wray, V., Schubert, U., 2007. Structural characterization and oligomerization of PB1-F2, a proapoptotic influenza A virus protein. *J Biol Chem* 282, 353-363.
- Brzozka, K., Finke, S., Conzelmann, K.K., 2005. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79, 7673-7681.
- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J., Nieto, A., 2003. PABP1 and eIF4G1 associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* 84, 3263-3274.
- Burke-Gaffney, A., Keenan, A.K., 1993. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology* 25, 1-9.

- Bussey, K.A., Bousse, T.L., Desmet, E.A., Kim, B., Takimoto, T., 2010. PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol* 84, 4395-4406.
- Bussey, K.A., Desmet, E.A., Mattiaccio, J.L., Hamilton, A., Bradel-Tretheway, B., Bussey, H.E., Kim, B., Dewhurst, S., Takimoto, T., 2011. PA residues in the 2009 H1N1 pandemic influenza virus enhance avian influenza virus polymerase activity in mammalian cells. *J Virol* 85, 7020-7028.
- Cameron, C.M., Cameron, M.J., Bermejo-Martin, J.F., Ran, L., Xu, L., Turner, P.V., Ran, R., Danesh, A., Fang, Y., Chan, P.K., Mytle, N., Sullivan, T.J., Collins, T.L., Johnson, M.G., Medina, J.C., Rowe, T., Kelvin, D.J., 2008. Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets. *J Virol* 82, 11308-11317.
- Cardenas, W.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R., Martinez-Sobrido, L., Saphire, E.O., Basler, C.F., 2006. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* 80, 5168-5178.
- Carragher, D.M., Kaminski, D.A., Moquin, A., Hartson, L., Randall, T.D., 2008. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol* 181, 4168-4176.
- Carrasco, M., Amorim, M.J., Digard, P., 2004. Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane. *Traffic* 5, 979-992.
- Castrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193, 503-506.
- Cate, T.R., 1987. Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am J Med* 82, 15-19.
- Cauthen, A.N., Swayne, D.E., Sekellick, M.J., Marcus, P.I., Suarez, D.L., 2007. Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J Virol* 81, 1838-1847.
- Chakravarti, A., Kumaria, R., 2006. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* 123, 25-30.
- Chan, M.C., Chan, R.W., Yu, W.C., Ho, C.C., Yuen, K.M., Fong, J.H., Tang, L.L., Lai, W.W., Lo, A.C., Chui, W.H., Sihoe, A.D., Kwong, D.L., Wong, D.S., Tsao, G.S., Poon, L.L., Guan, Y., Nicholls, J.M., Peiris, J.S., 2010. Tropism and innate host responses of the 2009

- pandemic H1N1 influenza virus in ex vivo and in vitro cultures of human conjunctiva and respiratory tract. *Am J Pathol* 176, 1828-1840.
- Chan, R.W., Chan, M.C., Wong, A.C., Karamanska, R., Dell, A., Haslam, S.M., Sihoe, A.D., Chui, W.H., Triana-Baltzer, G., Li, Q., Peiris, J.S., Fang, F., Nicholls, J.M., 2009. DAS181 inhibits H5N1 influenza virus infection of human lung tissues. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3935-3941.
- Chen, C.J., Chen, G.W., Wang, C.H., Huang, C.H., Wang, Y.C., Shih, S.R., 2010. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J Virol* 84, 10051-10062.
- Chen, G.W., Yang, C.C., Tsao, K.C., Huang, C.G., Lee, L.A., Yang, W.Z., Huang, Y.L., Lin, T.Y., Shih, S.R., 2004. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates. *Emerg Infect Dis* 10, 630-636.
- Chen, J., Deng, Y.M., 2009. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virol J* 6, 30.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7, 1306-1312.
- Chen, Z., Li, Y., Krug, R.M., 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18, 2273-2283.
- Cheung, C.Y., Poon, L.L., Lau, A.S., Luk, W., Lau, Y.L., Shortridge, K.F., Gordon, S., Guan, Y., Peiris, J.S., 2002. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360, 1831-1837.
- Chevalier, C., Al Bazzal, A., Vidic, J., Fevrier, V., Bourdieu, C., Bouguyon, E., Le Goffic, R., Vautherot, J.F., Bernard, J., Moudjou, M., Noinville, S., Chich, J.F., Da Costa, B., Rezaei, H., Delmas, B., 2010. PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem* 285, 13233-13243.
- Chien, C.Y., Tejero, R., Huang, Y., Zimmerman, D.E., Rios, C.B., Krug, R.M., Montelione, G.T., 1997. A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. *Nat Struct Biol* 4, 891-895.
- Chien, C.Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J.M., Sahasrabudhe, P.V., Krug, R.M., Montelione, G.T., 2004. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry* 43, 1950-1962.

- Choi, Y.K., Kim, T.K., Kim, C.J., Lee, J.S., Oh, S.Y., Joo, H.S., Foster, D.N., Hong, K.C., You, S., Kim, H., 2006. Activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway in swine influenza virus-mediated cell death. *Exp Mol Med* 38, 11-17.
- Chon, T.W., Bixler, S., 2010. Interferon-tau: current applications and potential in antiviral therapy. *J Interferon Cytokine Res* 30, 477-485.
- Chowell, G., Bertozzi, S.M., Colchero, M.A., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C., Hernandez, M., Miller, M.A., 2009. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza. *N Engl J Med* 361, 674-679.
- Chu, C.M., Dawson, I.M., Elford, W.J., 1949. Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus. *Lancet* 1, 602.
- Cianci, C., Tiley, L., Krystal, M., 1995. Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* 69, 3995-3999.
- Ciencewicki, J.M., Brighton, L.E., Jaspers, I., 2009. Localization of type I interferon receptor limits interferon-induced TLR3 in epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 29, 289-297.
- Cilloniz, C., Shinya, K., Peng, X., Korth, M.J., Proll, S.C., Aicher, L.D., Carter, V.S., Chang, J.H., Kobasa, D., Feldmann, F., Strong, J.E., Feldmann, H., Kawaoka, Y., Katze, M.G., 2009. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS Pathog* 5, e1000604.
- Civas, A., Island, M.L., Genin, P., Morin, P., Navarro, S., 2002. Regulation of virus-induced interferon-A genes. *Biochimie* 84, 643-654.
- Cleaveland, S., Meslin, F.X., Breiman, R., 2006. Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. *Nature* 440, 605.
- Conenello, G.M., Tisoncik, J.R., Rosenzweig, E., Varga, Z.T., Palese, P., Katze, M.G., 2011. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol* 85, 652-662.
- Conenello, G.M., Zamarin, D., Perrone, L.A., Tumpey, T., Palese, P., 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* 3, 1414-1421.
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., Paulson, J.C., 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205, 17-23.
- Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.K., Krug, A., Hopfner, K.P., 2008. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 29, 169-179.

- Czermak, B.J., Lentsch, A.B., Bless, N.M., Schmal, H., Friedl, H.P., Ward, P.A., 1998. Role of complement in in vitro and in vivo lung inflammatory reactions. *J Leukoc Biol* 64, 40-48.
- Danesh, A., Seneviratne, C., Cameron, C.M., Banner, D., Devries, M.E., Kelvin, A.A., Xu, L., Ran, L., Bosinger, S.E., Rowe, T., Czub, M., Jonsson, C.B., Cameron, M.J., Kelvin, D.J., 2008. Cloning, expression and characterization of ferret CXCL10. *Mol. Immunol.* 45, 1288-1297.
- Daniels, M.J., Selgrade, M.K., Doerfler, D., Gilmour, M.I., 2003. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp Med* 53, 293-298.
- Das, K., Ma, L.C., Xiao, R., Radvansky, B., Aramini, J., Zhao, L., Marklund, J., Kuo, R.L., Twu, K.Y., Arnold, E., Krug, R.M., Montelione, G.T., 2008. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13093-13098.
- Dawson, T.C., Beck, M.A., Kuziel, W.A., Henderson, F., Maeda, N., 2000. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol* 156, 1951-1959.
- de Jong, M.D., Bach, V.C., Phan, T.Q., Vo, M.H., Tran, T.T., Nguyen, B.H., Beld, M., Le, T.P., Truong, H.K., Nguyen, V.V., Tran, T.H., Do, Q.H., Farrar, J., 2005. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 352, 686-691.
- de Jong, M.D., Simmons, C.P., Thanh, T.T., Hien, V.M., Smith, G.J., Chau, T.N., Hoang, D.M., Chau, N.V., Khanh, T.H., Dong, V.C., Qui, P.T., Cam, B.V., Ha do, Q., Guan, Y., Peiris, J.S., Chinh, N.T., Hien, T.T., Farrar, J., 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12, 1203-1207.
- De Pascale, G., Bello, G., Antonelli, M., 2011. Steroids in severe pneumonia: a literature review. *Minerva Anesthesiol* 77, 902-910.
- de Vries, E., Tscherne, D.M., Wienholts, M.J., Cobos-Jimenez, V., Scholte, F., Garcia-Sastre, A., Rottier, P.J., de Haan, C.A., 2011. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog* 7, e1001329.
- Delgado, M.F., Coviello, S., Monsalvo, A.C., Melendi, G.A., Hernandez, J.Z., Batalle, J.P., Diaz, L., Trento, A., Chang, H.Y., Mitzner, W., Ravetch, J., Melero, J.A., Irusta, P.M., Polack, F.P., 2009. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 15, 34-41.

- Deng, T., Vreede, F.T., Brownlee, G.G., 2006. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* 80, 2337-2348.
- Dev, A., Iyer, S., Razani, B., Cheng, G., 2011. NF-kappaB and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 349, 115-143.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., Ruigrok, R.W., 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914-918.
- Diaz, E., Martin-Loeches, I., Canadell, L., Vidaur, L., Suarez, D., Socias, L., Estella, A., Gil-Rueda, B., Guerrero, J.E., Valverde-Vidal, M., Vergara, J.C., Lopez-Pueyo, M.J., Magret, M., Recio, T., Lopez, D., Rello, J., Rodriguez, A., 2012. Corticosteroid therapy in patients with primary viral pneumonia due to pandemic (H1N1) 2009 influenza. *J Infect.*
- Dietzman, D.E., Schaller, J.G., Ray, C.G., Reed, M.E., 1976. Acute myositis associated with influenza B infection. *Pediatrics* 57, 255-258.
- Doherty, P.C., Topham, D.J., Tripp, R.A., Cardin, R.D., Brooks, J.W., Stevenson, P.G., 1997. Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol Rev* 159, 105-117.
- Donelan, N.R., Basler, C.F., Garcia-Sastre, A., 2003. A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J Virol* 77, 13257-13266.
- Draghi, M., Pashine, A., Sanjanwala, B., Gendzekhadze, K., Cantoni, C., Cosman, D., Moretta, A., Valiante, N.M., Parham, P., 2007. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* 178, 2688-2698.
- Driskell, E.A., Jones, C.A., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., Tompkins, S.M., 2010. Avian influenza virus isolates from wild birds replicate and cause disease in a mouse model of infection. *Virology* 399, 280-289.
- Durbin, J.E., Fernandez-Sesma, A., Lee, C.K., Rao, T.D., Frey, A.B., Moran, T.M., Vukmanovic, S., Garcia-Sastre, A., Levy, D.E., 2000. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J Immunol* 164, 4220-4228.
- Dybing, J.K., Schultz-Cherry, S., Swayne, D.E., Suarez, D.L., Perdue, M.L., 2000. Distinct pathogenesis of hong kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J Virol* 74, 1443-1450.

- Eccles, R., 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 5, 718-725.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., Schmolke, M., Ludwig, S., 2007. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* 81, 3058-3067.
- Eichelberger, M.C., 2007. The cotton rat as a model to study influenza pathogenesis and immunity. *Viral Immunol* 20, 243-249.
- Eichelberger, M.C., Prince, G.A., Ottolini, M.G., 2004. Influenza-induced tachypnea is prevented in immune cotton rats, but cannot be treated with an anti-inflammatory steroid or a neuraminidase inhibitor. *Virology* 322, 300-307.
- Ekiert, D.C., Bhabha, G., Elsliger, M.A., Friesen, R.H., Jongeneelen, M., Throsby, M., Goudsmit, J., Wilson, I.A., 2009. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251.
- Ekiert, D.C., Friesen, R.H., Bhabha, G., Kwaks, T., Jongeneelen, M., Yu, W., Ophorst, C., Cox, F., Korse, H.J., Brandenburg, B., Vogels, R., Brakenhoff, J.P., Kompier, R., Koldijk, M.H., Cornelissen, L.A., Poon, L.L., Peiris, M., Koudstaal, W., Wilson, I.A., Goudsmit, J., 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333, 843-850.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., Digard, P., 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75, 408-419.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S., Enami, M., 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* 68, 1432-1437.
- Espiritu, R.F., Pittet, J.F., Matthay, M.A., Goetzl, E.J., 1992. Neuropeptides in pulmonary edema fluid of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 16, 509-517.
- Falcon, A.M., Fortes, P., Marion, R.M., Beloso, A., Ortin, J., 1999. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 27, 2241-2247.
- Falcon, A.M., Marion, R.M., Zurcher, T., Gomez, P., Portela, A., Nieto, A., Ortin, J., 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* 78, 3880-3888.
- Fan, J., Liang, X., Horton, M.S., Perry, H.C., Citron, M.P., Heidecker, G.J., Fu, T.M., Joyce, J., Przysiecki, C.T., Keller, P.M., Garsky, V.M., Ionescu, R., Rippeon, Y., Shi, L., Chastain, M.A., Condra, J.H., Davies, M.E., Liao, J., Emini, E.A., Shiver, J.W., 2004. Preclinical

- study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* 22, 2993-3003.
- Fan, S., Gao, Y., Shinya, K., Li, C.K., Li, Y., Shi, J., Jiang, Y., Suo, Y., Tong, T., Zhong, G., Song, J., Zhang, Y., Tian, G., Guan, Y., Xu, X.N., Bu, Z., Kawaoka, Y., Chen, H., 2009. Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates. *PLoS Pathog* 5, e1000409.
- Fang, Y., Rowe, T., Leon, A.J., Banner, D., Danesh, A., Xu, L., Ran, L., Bosinger, S.E., Guan, Y., Chen, H., Cameron, C.C., Cameron, M.J., Kelvin, D.J., 2010. Molecular characterization of in vivo adjuvant activity in ferrets vaccinated against influenza virus. *J Virol* 84, 8369-8388.
- Fechter, P., Brownlee, G.G., 2005. Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol* 86, 1239-1249.
- Feigenblum, D., Schneider, R.J., 1993. Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. *J Virol* 67, 3027-3035.
- Ferko, B., Stasakova, J., Romanova, J., Kittel, C., Sereinig, S., Katinger, H., Egorov, A., 2004. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* 78, 13037-13045.
- Fernandez-Sesma, A., Marukian, S., Ebersole, B.J., Kaminski, D., Park, M.S., Yuen, T., Sealson, S.C., Garcia-Sastre, A., Moran, T.M., 2006. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol* 80, 6295-6304.
- Fessler, M.B., Parks, J.S., 2011. Intracellular lipid flux and membrane microdomains as organizing principles in inflammatory cell signaling. *J Immunol* 187, 1529-1535.
- Finkelstein, D.B., Mukatira, S., Mehta, P.K., Obenauer, J.C., Su, X., Webster, R.G., Naeve, C.W., 2007. Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81, 10292-10299.
- Finter, N.B., Chapman, S., Dowd, P., Johnston, J.M., Manna, V., Sarantis, N., Sheron, N., Scott, G., Phua, S., Tatum, P.B., 1991. The use of interferon-alpha in virus infections. *Drugs* 42, 749-765.
- Fischer, A., Nash, S., Beverley, P.C., Feldmann, M., 1982. An influenza virus matrix protein-specific human T cell line with helper activity for in vitro anti-hemagglutinin antibody production. *Eur J Immunol* 12, 844-849.
- Fleischer, B., 1985. A human helper-dependent influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clone restricted by HLA-DR2. *Tissue Antigens* 26, 248-253.

- Fortes, P., Beloso, A., Ortin, J., 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J* 13, 704-712.
- Fortes, P., Lamond, A.I., Ortin, J., 1995. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 1001-1007.
- Fowler, R.A., Lapinsky, S.E., Hallett, D., Detsky, A.S., Sibbald, W.J., Slutsky, A.S., Stewart, T.E., 2003. Critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA* 290, 367-373.
- Francis, T., Magill, T.P., 1935. Immunological Studies with the Virus of Influenza. *J Exp Med* 62, 505-516.
- Francis, T., Stuart-Harris, C.H., 1938a. Studies on the Nasal Histology of Epidemic Influenza Virus Infection in the Ferret : I. The Development and Repair of the Nasal Lesion. *J Exp Med* 68, 789-802.
- Francis, T., Stuart-Harris, C.H., 1938b. Studies on the Nasal Histology of Epidemic Influenza Virus Infection in the Ferret : Iii. Histological and Serological Observations on Ferrets Receiving Repeated Inoculations of Epidemic Infuenza Virus. *J Exp Med* 68, 813-830.
- Fraser, C., Donnelly, C.A., Cauchemez, S., Hanage, W.P., Van Kerkhove, M.D., Hollingsworth, T.D., Griffin, J., Baggaley, R.F., Jenkins, H.E., Lyons, E.J., Jombart, T., Hinsley, W.R., Grassly, N.C., Balloux, F., Ghani, A.C., Ferguson, N.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C.M., Chapela, I.B., Zavala, E.P., Guevara, D.M., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S., Roth, C., 2009. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324, 1557-1561.
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79, 3766-3774.
- Fukuyama, S., Kawaoka, Y., 2011. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 23, 481-486.
- Furuse, Y., Oshitani, H., 2011. Evolution of the influenza A virus untranslated regions. *Infect Genet Evol* 11, 1150-1154.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H.D., Stech, J., 2005. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18590-18595.
- Gabriel, G., Herwig, A., Klenk, H.D., 2008. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4, e11.

- Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.S., Huang, I.C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., Garcia-Sastre, A., 2009. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 5, 439-449.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G., 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217-227.
- Gao, X.M., Liew, F.Y., Tite, J.P., 1989. Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of influenza A virus. *J Immunol* 143, 3007-3014.
- Gao, X.M., Liew, F.Y., Tite, J.P., 1990. A dominant Th epitope in influenza nucleoprotein. Analysis of the fine specificity and functional repertoire of T cells recognizing a single determinant. *J Immunol* 144, 2730-2737.
- Gao, Y., Zhang, Y., Shinya, K., Deng, G., Jiang, Y., Li, Z., Guan, Y., Tian, G., Li, Y., Shi, J., Liu, L., Zeng, X., Bu, Z., Xia, X., Kawaoka, Y., Chen, H., 2009. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog* 5, e1000709.
- Garaigorta, U., Ortin, J., 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* 35, 4573-4582.
- Garcia-Sastre, A., Durbin, R.K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D.E., Durbin, J.E., 1998a. The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* 72, 8550-8558.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P., Muster, T., 1998b. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252, 324-330.
- Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., Esteban, M., 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060.
- Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C.B., Emery, S.L., Hillman, M.J., Rivallier, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D.F., Fouchier, R.A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C.M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C.A., Faix, D., Blair, P.J., Yu, C., Keene, K.M., Dotson, P.D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A.R., Abid, S.H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A.L., Stringer, D.J., Blevins, P.,

- Demmler-Harrison, G.J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H.F., Belongia, E.A., Clark, P.A., Beatrice, S.T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C.B., Shaw, M., Jernigan, D.B., Uyeki, T.M., Smith, D.J., Klimov, A.I., Cox, N.J., 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201.
- Geiss, G.K., Salvatore, M., Tumpey, T.M., Carter, V.S., Wang, X., Basler, C.F., Taubenberger, J.K., Bumgarner, R.E., Palese, P., Katze, M.G., Garcia-Sastre, A., 2002. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10736-10741.
- Genin, P., Lin, R., Hiscott, J., Civas, A., 2009. Differential regulation of human interferon A gene expression by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* 29, 3435-3450.
- Gerhard, W., 2001. The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 260, 171-190.
- Gerhard, W., Hackett, C., Melchers, F., 1983. The recognition specificity of a murine helper T cell for hemagglutinin of influenza virus A/PR/8/34. *J Immunol* 130, 2379-2385.
- Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Webster, R., 1981. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* 290, 713-717.
- Giacchino, R., Cappelli, B., 2010. Treatment of viral hepatitis B in children. *Expert Opin Pharmacother* 11, 889-903.
- Gibbs, J.S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2003. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* 77, 7214-7224.
- Giese, M., Harder, T.C., Teifke, J.P., Klopffleisch, R., Breithaupt, A., Mettenleiter, T.C., Vahlenkamp, T.W., 2008. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 14, 308-310.
- Gill, J.R., Sheng, Z.M., Ely, S.F., Guinee, D.G., Beasley, M.B., Suh, J., Deshpande, C., Mollura, D.J., Morens, D.M., Bray, M., Travis, W.D., Taubenberger, J.K., 2010. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch Pathol Lab Med* 134, 235-243.
- Glaser, L., Conenello, G., Paulson, J., Palese, P., 2007. Effective replication of human influenza viruses in mice lacking a major alpha2,6 sialyltransferase. *Virus Res* 126, 9-18.

- Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I.A., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T.M., Basler, C.F., Taubenberger, J.K., Palese, P., 2005. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 79, 11533-11536.
- Gog, J.R., Afonso Edos, S., Dalton, R.M., Leclercq, I., Tiley, L., Elton, D., von Kirchbach, J.C., Naffakh, N., Escriou, N., Digard, P., 2007. Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals. *Nucleic Acids Res* 35, 1897-1907.
- Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A., Portela, A., 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 74, 11538-11547.
- Gong, J., Xu, W., Zhang, J., 2007. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* 14, 113-122.
- Gorman, O.T., Bean, W.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* 64, 1487-1497.
- Gotch, F., McMichael, A., Smith, G., Moss, B., 1987. Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 165, 408-416.
- Goto, H., Wells, K., Takada, A., Kawaoka, Y., 2001. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J Virol* 75, 9297-9301.
- Graef, K.M., Vreede, F.T., Lau, Y.F., McCall, A.W., Carr, S.M., Subbarao, K., Fodor, E., 2010. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J Virol* 84, 8433-8445.
- Greenspan, D., Palese, P., Krystal, M., 1988. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol* 62, 3020-3026.
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martinez-Sobrido, L., Solorzano, A., Garcia-Sastre, A., Haller, O., Kochs, G., 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6806-6811.
- Gu, J., Xie, Z., Gao, Z., Liu, J., Korteweg, C., Ye, J., Lau, L.T., Lu, J., Zhang, B., McNutt, M.A., Lu, M., Anderson, V.M., Gong, E., Yu, A.C., Lipkin, W.I., 2007. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* 370, 1137-1145.
- Guarner, J., Falcon-Escobedo, R., 2009. Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1, and H3N2 influenza viruses. *Arch Med Res* 40, 655-661.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S., 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., Si-Tahar, M., 2005. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280, 5571-5580.
- Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O., Sambhara, S., 2007. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 263-269.
- Gutteridge, J.M., Mitchell, J., 1999. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 55, 49-75.
- Haagmans, B.L., Kuiken, T., Martina, B.E., Fouchier, R.A., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., de Jong, T., Itamura, S., Chan, K.H., Tashiro, M., Osterhaus, A.D., 2004. Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nat Med* 10, 290-293.
- Hai, R., Schmolke, M., Varga, Z.T., Manicassamy, B., Wang, T.T., Belser, J.A., Pearce, M.B., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T.M., Palese, P., 2010. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol* 84, 4442-4450.
- Hale, B.G., Barclay, W.S., Randall, R.E., Russell, R.J., 2008a. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology* 378, 1-5.
- Hale, B.G., Jackson, D., Chen, Y.H., Lamb, R.A., Randall, R.E., 2006. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14194-14199.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., Jackson, D., 2008b. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89, 2359-2376.
- Hale, B.G., Steel, J., Manicassamy, B., Medina, R.A., Ye, J., Hickman, D., Lowen, A.C., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2010a. Mutations in the NS1 C-terminal tail do not enhance replication or virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *J Gen Virol* 91, 1737-1742.
- Hale, B.G., Steel, J., Medina, R.A., Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., Hai, R., Schmolke, M., Lowen, A.C., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2010b. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 84, 6909-6922.
- Hale, B.G., Steel, J., Medina, R.A., Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., Hai, R., Schmolke, M., Lowen, A.C., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2011. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 84, 6909-6922.

- Haller, O., Kochs, G., Weber, F., 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130.
- Han, K., Ma, H., An, X., Su, Y., Chen, J., Lian, Z., Zhao, J., Zhu, B.P., Fontaine, R.E., Feng, Z., Zeng, G., 2011. Early use of glucocorticoids was a risk factor for critical disease and death from pH1N1 infection. *Clin Infect Dis* 53, 326-333.
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., Steven, A.C., 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19123-19127.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., White, D.W., 2000. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18, 275-308.
- Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., 2007. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J Immunol* 178, 2448-2457.
- Hatada, E., Fukuda, R., 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* 73 (Pt 12), 3325-3329.
- Hatada, E., Saito, S., Okishio, N., Fukuda, R., 1997. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* 78 (Pt 5), 1059-1063.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawakami, Y., 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, 1840-1842.
- Haye, K., Burmakina, S., Moran, T., Garcia-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., 2009. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol* 83, 6849-6862.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L.C., Goodbourn, S., McCauley, J.W., Barclay, W.S., 2007. NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *J. Virol.* 81, 2318-2327.
- Heikkinen, L.S., Kazlauskas, A., Melen, K., Wagner, R., Ziegler, T., Julkunen, I., Saksela, K., 2008. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J Biol Chem* 283, 5719-5727.
- Herlocher, M.L., Elias, S., Truscon, R., Harrison, S., Mindell, D., Simon, C., Monto, A.S., 2001. Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus. *J Infect Dis* 184, 542-546.
- Herold, S., Steinmueller, M., von Wulffen, W., Cakarova, L., Pinto, R., Pleschka, S., Mack, M., Kuziel, W.A., Corazza, N., Brunner, T., Seeger, W., Lohmeyer, J., 2008. Lung epithelial

- apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Exp Med* 205, 3065-3077.
- Herold, S., von Wulffen, W., Steinmueller, M., Pleschka, S., Kuziel, W.A., Mack, M., Srivastava, M., Seeger, W., Maus, U.A., Lohmeyer, J., 2006. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. *J Immunol* 177, 1817-1824.
- Hien, N.D., Ha, N.H., Van, N.T., Ha, N.T., Lien, T.T., Thai, N.Q., Trang, V.D., Shimbo, T., Takahashi, Y., Kato, Y., Kawana, A., Akita, S., Kudo, K., 2009. Human infection with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in northern Vietnam, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 15, 19-23.
- Hoffmann, E., Krauss, S., Perez, D., Webby, R., Webster, R.G., 2002. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20, 3165-3170.
- Hoffmann, E., Lipatov, A.S., Webby, R.J., Govorkova, E.A., Webster, R.G., 2005. Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12915-12920.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., Webster, R.G., 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6108-6113.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275-2289.
- Holt, P.G., 1978. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *Am Rev Respir Dis* 118, 791-793.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.
- Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S.P., Kawaoka, Y., 1994. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* 68, 6074-6078.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Hu, P., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S., Matalon, S., 1994. Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 266, L628-634.

- Huang, K.J., Su, I.J., Theron, M., Wu, Y.C., Lai, S.K., Liu, C.C., Lei, H.Y., 2005. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol* 75, 185-194.
- Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R.A., Ye, Z., 2001. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology* 287, 405-416.
- Hussell, T., Pennycook, A., Openshaw, P.J., 2001. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol* 31, 2566-2573.
- Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., Digard, P., 2010. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 91, 313-328.
- Hutchinson, E.C., Wise, H.M., Kudryavtseva, K., Curran, M.D., Digard, P., 2009. Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine* 27, 6270-6275.
- Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M.J., Newby, C., Battaile, J.T., Brown, E.G., Holtzman, M.J., Brody, S.L., 2006. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80, 7469-7480.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Iwasaki, A., 2010. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 11, 404-410.
- Ilyas, J.A., Vierling, J.M., 2011. An overview of emerging therapies for the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 15, 515-536.
- Imai, H., Shinya, K., Takano, R., Kiso, M., Muramoto, Y., Sakabe, S., Murakami, S., Ito, M., Yamada, S., Le, M.T., Nidom, C.A., Sakai-Tagawa, Y., Takahashi, K., Omori, Y., Noda, T., Shimajima, M., Kakugawa, S., Goto, H., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2010. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog* 6, e1001106.
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G.G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y.H., Wang, H., Liu, H., Sun, Y., Pasparakis, M., Kopf, M., Mech, C., Bavari, S., Peiris, J.S., Slutsky, A.S., Akira, S., Hultqvist, M., Holmdahl, R., Nicholls, J., Jiang, C., Binder, C.J., Penninger, J.M., 2008. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 133, 235-249.
- Inglis, S.C., Barrett, T., Brown, C.M., Almond, J.W., 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3790-3794.

- Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Bai, G.R., Matsuda, K., Umemura, T., Kida, H., 2006. Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol* 151, 1267-1279.
- Isomura, S., Ichikawa, T., Miyazu, M., Naruse, H., Shibata, M., Imanishi, J., Matsuo, A., Kishida, T., Karaki, T., 1982. The preventive effect of human interferon-alpha on influenza infection; modification of clinical manifestations of influenza in children in a closed community. *Biken J* 25, 131-137.
- Ito, T., Couceiro, J.N., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y., 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72, 7367-7373.
- Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P.A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., Kawaoka, Y., 2009. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
- Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H., Miyazaki, T., 2010. Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1. *J Biol Chem* 285, 32064-32074.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H., 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 226, 57-79.
- Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., Lamb, R.A., 2008. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4381-4386.
- Jackson, S., Van Hoeven, N., Chen, L.M., Maines, T.R., Cox, N.J., Katz, J.M., Donis, R.O., 2009. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment. *J Virol* 83, 8131-8140.
- Jameson, J., Cruz, J., Ennis, F.A., 1998. Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses. *J Virol* 72, 8682-8689.

- Jennings, R., Potter, C.W., McLaren, C., 1974. Effect of preinfection and preimmunization on the serum antibody response to subsequent immunization with heterotypic influenza vaccines. *J Immunol* 113, 1834-1843.
- Joseph, T., McAuliffe, J., Lu, B., Jin, H., Kemble, G., Subbarao, K., 2007. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza A H7 subtype viruses in a mouse model. *J Virol* 81, 10558-10566.
- Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melen, K., Matikainen, S., 2001. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 171-180.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 14, 207-232.
- Karaca, K., Swayne, D.E., Grosenbaugh, D., Bublot, M., Robles, A., Spackman, E., Nordgren, R., 2005. Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1340-1342.
- Kash, J.C., Tumpey, T.M., Prohl, S.C., Carter, V., Perwitasari, O., Thomas, M.J., Basler, C.F., Palese, P., Taubenberger, J.K., Garcia-Sastre, A., Swayne, D.E., Katze, M.G., 2006. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* 443, 578-581.
- Kato, H., Takahashi, K., Fujita, T., 2011. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev* 243, 91-98.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S., 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5, 1061-1068.
- Kawaoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G., 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63, 4603-4608.
- Khandaker, G., Zurynski, Y., Lester-Smith, D., Kesson, A., Heron, L., Dwyer, D.E., Elliott, E.J., Booy, R., 2011. Clinical features, oseltamivir treatment and outcome in infants aged <12 months with laboratory-confirmed influenza A in 2009. *Antivir Ther* 16, 1005-1010.
- Kido, H., Towatari, T., Niwa, Y., Okumura, Y., Beppu, Y., 1996. Cellular proteases involved in the pathogenicity of human immunodeficiency and influenza viruses. *Adv Exp Med Biol* 389, 233-240.

- Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., Kishino, Y., Fukutomi, A., Katunuma, N., 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 267, 13573-13579.
- Kim, H.M., Lee, Y.W., Lee, K.J., Kim, H.S., Cho, S.W., van Rooijen, N., Guan, Y., Seo, S.H., 2008a. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J Virol* 82, 4265-4274.
- Kim, J.K., Seiler, P., Forrest, H.L., Khalenkov, A.M., Franks, J., Kumar, M., Karesh, W.B., Gilbert, M., Sodnomdarjaa, R., Douangngeun, B., Govorkova, E.A., Webster, R.G., 2008b. Pathogenicity and vaccine efficacy of different clades of Asian H5N1 avian influenza A viruses in domestic ducks. *J Virol* 82, 11374-11382.
- Kim, Y.H., Kim, H.S., Cho, S.H., Seo, S.H., 2009. Influenza B virus causes milder pathogenesis and weaker inflammatory responses in ferrets than influenza A virus. *Viral Immunol* 22, 423-430.
- Knipe, D., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E., 2005. *Fields Virology*, 5 edition ed.
- Kobasa, D., Jones, S.M., Shinya, K., Kash, J.C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Kim, J.H., Halfmann, P., Hatta, M., Feldmann, F., Alimonti, J.B., Fernando, L., Li, Y., Katze, M.G., Feldmann, H., Kawaoka, Y., 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445, 319-323.
- Kobasa, D., Takada, A., Shinya, K., Hatta, M., Halfmann, P., Theriault, S., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitamura, K., Sugaya, N., Usui, T., Murata, T., Maeda, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., Feldmann, H., Kawaoka, Y., 2004. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431, 703-707.
- Kochs, G., Garcia-Sastre, A., Martinez-Sobrido, L., 2007a. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 81, 7011-7021.
- Kochs, G., Koerner, I., Thiel, L., Kothlow, S., Kaspers, B., Ruggli, N., Summerfield, A., Pavlovic, J., Stech, J., Staeheli, P., 2007b. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J Gen Virol* 88, 1403-1409.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J., Murali-Krishna, K., 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 202, 637-650.

- Kreijtz, J.H., Fouchier, R.A., Rimmelzwaan, G.F., 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res* 162, 19-30.
- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L., Latham, A.G., 2003. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* 309, 181-189.
- Krumbholz, A., Philipps, A., Oehring, H., Schwarzer, K., Eitner, A., Wutzler, P., Zell, R., 2011. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* 200, 69-75.
- Kugel, D., Kochs, G., Obojes, K., Roth, J., Kobinger, G.P., Kobasa, D., Haller, O., Staeheli, P., von Messling, V., 2009. Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *J Virol* 83, 3843-3851.
- Kuo, R.L., Zhao, C., Malur, M., Krug, R.M., Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon-beta transcription. *Virology* 408, 146-158.
- Kupradinun, S., Peanpijit, P., Bhodhikosoom, C., Yoshioka, Y., Endo, A., Nerome, K., 1991. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol* 118, 289-297.
- Kwon, Y.K., Lipatov, A.S., Swayne, D.E., 2009. Bronchointerstitial pneumonia in guinea pigs following inoculation with H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Vet Pathol* 46, 138-141.
- Laddy, D.J., Yan, J., Khan, A.S., Andersen, H., Cohn, A., Greenhouse, J., Lewis, M., Manischewitz, J., King, L.R., Golding, H., Draghia-Akli, R., Weiner, D.B., 2009. Electroporation of synthetic DNA antigens offers protection in nonhuman primates challenged with highly pathogenic avian influenza virus. *J Virol* 83, 4624-4630.
- Lam, W.Y., Tang, J.W., Yeung, A.C., Chiu, L.C., Sung, J.J., Chan, P.K., 2008. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells. *J Virol* 82, 2741-2751.
- Lamb, J.R., Woody, J.N., Hartzman, R.J., Eckels, D.D., 1982. In vitro influenza virus-specific antibody production in man: antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *J Immunol* 129, 1465-1470.
- Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4908-4912.
- Lamb, R.A., Lai, C.J., 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21, 475-485.

- Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 3, 994-1003.
- Lawrence, C.W., Ream, R.M., Braciale, T.J., 2005. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. *J Immunol* 174, 5332-5340.
- Lazarowitz, S.G., Goldberg, A.R., Choppin, P.W., 1973. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology* 56, 172-180.
- Lazear, H.M., Pinto, A.K., Vogt, M.R., Gale, M., Jr., Diamond, M.S., 2011. Beta interferon controls West Nile virus infection and pathogenesis in mice. *J Virol* 85, 7186-7194.
- Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M., Si-Tahar, M., 2006. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* 2, e53.
- Le Goffic, R., Bouguyon, E., Chevalier, C., Vidic, J., Da Costa, B., Leymarie, O., Bourdieu, C., Decamps, L., Dhome-Pollet, S., Delmas, B., 2010. Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 185, 4812-4823.
- LeBouder, F., Lina, B., Rimmelzwaan, G.F., Riteau, B., 2010. Plasminogen promotes influenza A virus replication through an annexin 2-dependent pathway in the absence of neuraminidase. *J Gen Virol* 91, 2753-2761.
- Lecat, A., Piette, J., Legrand-Poels, S., 2010. The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem Pharmacol* 80, 2021-2031.
- Lee, D.C., Cheung, C.Y., Law, A.H., Mok, C.K., Peiris, M., Lau, A.S., 2005. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J Virol* 79, 10147-10154.
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G.M., Ahuja, A., Yung, M.Y., Leung, C.B., To, K.F., Lui, S.F., Szeto, C.C., Chung, S., Sung, J.J., 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 348, 1986-1994.
- Lee, N., Wong, C.K., Chan, P.K., Chan, M.C., Wong, R.Y., Lun, S.W., Ngai, K.L., Lui, G.C., Wong, B.C., Lee, S.K., Choi, K.W., Hui, D.S., 2011. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. *PLoS One* 6, e26050.

- Legge, K.L., Braciale, T.J., 2003. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity* 18, 265-277.
- Lehmann, N.I., Gust, I.D., 1971. Viraemia in influenza. A report of two cases. *Med J Aust* 2, 1166-1169.
- Lew, T.W., Kwek, T.K., Tai, D., Earnest, A., Loo, S., Singh, K., Kwan, K.M., Chan, Y., Yim, C.F., Bek, S.L., Kor, A.C., Yap, W.S., Chelliah, Y.R., Lai, Y.C., Goh, S.K., 2003. Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *JAMA* 290, 374-380.
- Li, S., Min, J.Y., Krug, R.M., Sen, G.C., 2006. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13-21.
- Li, X.D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., Chen, Z.J., 2005a. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17717-17722.
- Li, Y., Anderson, D.H., Liu, Q., Zhou, Y., 2008. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J Biol Chem* 283, 23397-23409.
- Li, Y., Chen, Z.Y., Wang, W., Baker, C.C., Krug, R.M., 2001. The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA* 7, 920-931.
- Li, Y., Yamakita, Y., Krug, R.M., 1998. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4864-4869.
- Li, Z., Chen, H., Jiao, P., Deng, G., Tian, G., Li, Y., Hoffmann, E., Webster, R.G., Matsuoka, Y., Yu, K., 2005b. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 79, 12058-12064.
- Liaw, Y.F., 2009. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int* 29 Suppl 1, 100-107.
- Linko, R., Pettila, V., Ruokonen, E., Varpula, T., Karlsson, S., Tenhunen, J., Reinikainen, M., Saarinen, K., Perttila, J., Parviainen, I., Ala-Kokko, T., 2011. Corticosteroid therapy in intensive care unit patients with PCR-confirmed influenza A(H1N1) infection in Finland. *Acta Anaesthesiol Scand* 55, 971-979.
- Lipatov, A.S., Andreansky, S., Webby, R.J., Hulse, D.J., Rehg, J.E., Krauss, S., Perez, D.R., Doherty, P.C., Webster, R.G., Sangster, M.Y., 2005. Pathogenesis of Hong Kong H5N1

- influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* 86, 1121-1130.
- Lipatov, A.S., Kwon, Y.K., Sarmiento, L.V., Lager, K.M., Spackman, E., Suarez, D.L., Swayne, D.E., 2008. Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *PLoS Pathog* 4, e1000102.
- Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T., Rice, A.P., 2010. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J Virol* 84, 11164-11174.
- Liu, J., Lynch, P.A., Chien, C.Y., Montelione, G.T., Krug, R.M., Berman, H.M., 1997. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol* 4, 896-899.
- Liu, Y., Wang, W., Li, X., Wang, H., Luo, Y., Wu, L., Guo, X., 2011. Geographic Distribution and Risk Factors of the Initial Adult Hospitalized Cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in Mainland China. *PLoS One* 6, e25934.
- Long, B.R., Michaelsson, J., Loo, C.P., Ballan, W.M., Vu, B.A., Hecht, F.M., Lanier, L.L., Chapman, J.M., Nixon, D.F., 2008. Elevated frequency of gamma interferon-producing NK cells in healthy adults vaccinated against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol* 15, 120-130.
- Lowen, A.C., Mubareka, S., Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2006. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9988-9992.
- Lowen, A.C., Steel, J., Mubareka, S., Carnero, E., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2009. Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. *J Virol* 83, 2803-2818.
- Lu, X., Tumpey, T.M., Morken, T., Zaki, S.R., Cox, N.J., Katz, J.M., 1999. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol* 73, 5903-5911.
- Lu, Y., Qian, X.Y., Krug, R.M., 1994. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 8, 1817-1828.
- Ludwig, S., Schultz, U., Mandler, J., Fitch, W.M., Scholtissek, C., 1991. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 183, 566-577.

- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G., Wolff, T., 2002. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* 76, 11166-11171.
- Luker, G.D., Prior, J.L., Song, J., Pica, C.M., Leib, D.A., 2003. Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *J Virol* 77, 11082-11093.
- Lum, H., Roebuck, K.A., 2001. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C719-741.
- Ma, W., Lager, K.M., Vincent, A.L., Janke, B.H., Gramer, M.R., Richt, J.A., 2009. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses Public Health* 56, 326-337.
- Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J., Richt, J.A., 2007. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20949-20954.
- Maher, J.A., DeStefano, J., 2004. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 33, 50-53.
- Maines, T.R., Jayaraman, A., Belser, J.A., Wadford, D.A., Pappas, C., Zeng, H., Gustin, K.M., Pearce, M.B., Viswanathan, K., Shriver, Z.H., Raman, R., Cox, N.J., Sasisekharan, R., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2009. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325, 484-487.
- Maines, T.R., Szretter, K.J., Perrone, L., Belser, J.A., Bright, R.A., Zeng, H., Tumpey, T.M., Katz, J.M., 2008. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol Rev* 225, 68-84.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., Porgador, A., 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., Garcia-Sastre, A., 2010. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11531-11536.
- Marion, R.M., Zurcher, T., de la Luna, S., Ortin, J., 1997. Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo. *J Gen Virol* 78 (Pt 10), 2447-2451.
- Marjuki, H., Scholtissek, C., Franks, J., Negovetich, N.J., Aldridge, J.R., Salomon, R., Finkelstein, D., Webster, R.G., 2010. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks. *Arch Virol* 155, 925-934.

- Marrack, P., Kappler, J., Mitchell, T., 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 189, 521-530.
- Martin, C.M., Kunin, C.M., Gottlieb, L.S., Finland, M., 1959. Asian influenza A in Boston, 1957-1958. II. Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza. *AMA Arch Intern Med* 103, 532-542.
- Martinon, F., Tschopp, J., 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561-574.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., Simons, K., 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* 91, 601-613.
- Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kawaoka, Y., 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74, 8502-8512.
- Matsumoto, M., Oshiumi, H., Seya, T., 2011. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway. *Rev Med Virol*.
- Matsuse, H., Kondo, Y., Machida, I., Kawano, T., Saeki, S., Tomari, S., Obase, Y., Fukushima, C., Mizuta, Y., Kohno, S., 2006. Effects of anti-inflammatory therapies on recurrent and low-grade respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 97, 55-60.
- Matzinger, S.R., Carroll, T.D., Fritts, L., McChesney, M.B., Miller, C.J., 2011. Exogenous IFN-alpha Administration Reduces Influenza A Virus Replication in the Lower Respiratory Tract of Rhesus Macaques. *PLoS One* 6, e29255.
- Mazur, I., Anhlan, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., Ludwig, S., 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* 10, 1140-1152.
- McAuley, J.L., Chipuk, J.E., Boyd, K.L., Van De Velde, N., Green, D.R., McCullers, J.A., 2010a. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog* 6, e1001014.
- McAuley, J.L., Hornung, F., Boyd, K.L., Smith, A.M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J.W., McCullers, J.A., 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2, 240-249.
- McAuley, J.L., Zhang, K., McCullers, J.A., 2010b. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *J Virol* 84, 558-564.

- McGill, J., Heusel, J.W., Legge, K.L., 2009. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J. Leukoc. Biol.* 86, 803-812.
- McMichael, A.J., Gotch, F.M., Noble, G.R., Beare, P.A., 1983. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 309, 13-17.
- Melen, K., Kinnunen, L., Fagerlund, R., Ikonen, N., Twu, K.Y., Krug, R.M., Julkunen, I., 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 81, 5995-6006.
- Mendelson, M., Tekoah, Y., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Gazit, R., Achdout, H., Bovin, N.V., Meningher, T., Mandelboim, M., Mandelboim, O., David, A., Porgador, A., 2010. NKp46 O-glycan sequences that are involved in the interaction with hemagglutinin type 1 of influenza virus. *J Virol* 84, 3789-3797.
- Meunier, I., Embury-Hyatt, C., Stebner, S., Gray, M., Bastien, N., Li, Y., Plummer, F., Kobinger, G.P., von Messling, V., 2012. Virulence differences of closely related pandemic 2009 H1N1 isolates correlate with increased inflammatory responses in ferrets. *Virology* 422, 125-131.
- Meunier, I., von Messling, V., 2011. NS1-mediated delay of type I interferon induction contributes to influenza A virulence in ferrets. *J Gen Virol* 92, 1635-1644.
- Meunier, I., von Messling, V., 2012. PB1-F2 Modulates Early Host Responses but Does not Affect the Pathogenesis of H1N1 Seasonal Influenza Virus. *J Virol.*
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y.M., Cardenas, W.B., Gale, M., Jr., Garcia-Sastre, A., 2007. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* 81, 514-524.
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., Matikainen, S., 2001. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2, 349-355.
- Mills, J., Chanock, V., Chanock, R.M., 1971. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. I. Behavior in tissue culture and in experimental animals. *J Infect Dis* 123, 145-157.
- Min, J.Y., Krug, R.M., 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7100-7105.
- Min, J.Y., Li, S., Sen, G.C., Krug, R.M., 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* 363, 236-243.
- Mirandola, P., Ponti, C., Gobbi, G., Sponzilli, I., Vaccarezza, M., Cocco, L., Zauli, G., Secchiero, P., Manzoli, F.A., Vitale, M., 2004. Activated human NK and CD8+ T cells express both

- TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 104, 2418-2424.
- Mishin, V.P., Nedyalkova, M.S., Hayden, F.G., Gubareva, L.V., 2005. Protection afforded by intranasal immunization with the neuraminidase-lacking mutant of influenza A virus in a ferret model. *Vaccine* 23, 2922-2927.
- Mitzner, D., Dudek, S.E., Studtrucker, N., Anhlan, D., Mazur, I., Wissing, J., Jansch, L., Wixler, L., Bruns, K., Sharma, A., Wray, V., Henklein, P., Ludwig, S., Schubert, U., 2009. Phosphorylation of the influenza A virus protein PB1-F2 by PKC is crucial for apoptosis promoting functions in monocytes. *Cell Microbiol* 11, 1502-1516.
- Monsalvo, A.C., Batalle, J.P., Lopez, M.F., Krause, J.C., Klemenc, J., Hernandez, J.Z., Maskin, B., Bugna, J., Rubinstein, C., Aguilar, L., Dalurzo, L., Libster, R., Savy, V., Baumeister, E., Cabral, G., Font, J., Solari, L., Weller, K.P., Johnson, J., Echavarria, M., Edwards, K.M., Chappell, J.D., Crowe, J.E., Jr., Williams, J.V., Melendi, G.A., Polack, F.P., 2011. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes. *Nat Med* 17, 195-199.
- Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Palese, P., Garcia-Sastre, A., 2002. Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *J Virol* 76, 3544-3553.
- Mozdzanowska, K., Maiese, K., Furchner, M., Gerhard, W., 1999. Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 254, 138-146.
- Mulder, J., Masurel, N., 1958. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of Asiatic influenza in serum of older people living in the Netherlands. *Lancet* 1, 810-814.
- Munster, V.J., de Wit, E., van den Brand, J.M., Herfst, S., Schrauwen, E.J., Bestebroer, T.M., van de Vijver, D., Boucher, C.A., Koopmans, M., Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2009. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325, 481-483.
- Murayama, R., Harada, Y., Shibata, T., Kuroda, K., Hayakawa, S., Shimizu, K., Tanaka, T., 2007. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 880-885.

- Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Crescenzo-Chaigne, B., van der Werf, S., 2000. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* 81, 1283-1291.
- Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M.A., van der Werf, S., 2008. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* 62, 403-424.
- Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kuroda, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T., 2010. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn J Infect Dis* 63, 67-71.
- Nakayama, E., Tomabechi, D., Matsuno, K., Kishida, N., Yoshida, R., Feldmann, H., Takada, A., 2011. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *J Infect Dis* 204 Suppl 3, S978-985.
- Nallagatla, S.R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C.E., Bevilacqua, P.C., 2007. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* 318, 1455-1458.
- Nayak, D.P., Hui, E.K., Barman, S., 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106, 147-165.
- Nelson, M.I., Viboud, C., Simonsen, L., Bennett, R.T., Griesemer, S.B., St George, K., Taylor, J., Spiro, D.J., Sengamalay, N.A., Ghedin, E., Taubenberger, J.K., Holmes, E.C., 2008. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog.* 4, e1000012.
- Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., Li, Y., Keller, W., Krug, R.M., 1998. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* 1, 991-1000.
- Nemeroff, M.E., Utans, U., Kramer, A., Krug, R.M., 1992. Identification of cis-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting presplicing complexes. *Mol Cell Biol* 12, 962-970.
- Nerome, K., Ishida, M., Oya, A., Kanai, C., Suwicha, K., 1982. Isolation of an influenza H1N1 virus from a pig. *Virology* 117, 485-489.
- Neumann, G., Brownlee, G.G., Fodor, E., Kawaoka, Y., 2004. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 121-143.

- Neumann, G., Chen, H., Gao, G.F., Shu, Y., Kawaoka, Y., 2010. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Res* 20, 51-61.
- Neumann, G., Hughes, M.T., Kawaoka, Y., 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* 19, 6751-6758.
- Neumann, G., Kawaoka, Y., 2006. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 12, 881-886.
- Newby, C.M., Sabin, L., Pekosz, A., 2007. The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells. *J Virol* 81, 9469-9480.
- Nguyen, T.H., Nguyen, T.L., Lei, H.Y., Lin, Y.S., Le, B.L., Huang, K.J., Lin, C.F., Do, Q.H., Vu, T.Q., Lam, T.M., Yeh, T.M., Huang, J.H., Liu, C.C., Halstead, S.B., 2005. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 72, 370-374.
- Nicholls, J.M., Chan, M.C., Chan, W.Y., Wong, H.K., Cheung, C.Y., Kwong, D.L., Wong, M.P., Chui, W.H., Poon, L.L., Tsao, S.W., Guan, Y., Peiris, J.S., 2007. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med* 13, 147-149.
- Noah, D.L., Twu, K.Y., Krug, R.M., 2003. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology* 307, 386-395.
- Nobusawa, E., Sato, K., 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* 80, 3675-3678.
- Normile, D., 2005. Avian influenza. Pandemic skeptics warn against crying wolf. *Science* 310, 1112-1113.
- O'Brien, K.B., Morrison, T.E., Dundore, D.Y., Heise, M.T., Schultz-Cherry, S., 2011. A protective role for complement C3 protein during pandemic 2009 H1N1 and H5N1 influenza A virus infection. *PLoS One* 6, e17377.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., Moroiianu, J., 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* 270, 22701-22704.
- O'Neill, R.E., Talon, J., Palese, P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 17, 288-296.

- Obenauer, J.C., Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D.B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K.M., Webster, R.G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., Naeve, C.W., 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311, 1576-1580.
- Oda, T., Akaike, T., Hamamoto, T., Suzuki, F., Hirano, T., Maeda, H., 1989. Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* 244, 974-976.
- Olson, D.R., Simonsen, L., Edelson, P.J., Morse, S.S., 2005. Epidemiological evidence of an early wave of the 1918 influenza pandemic in New York City. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11059-11063.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., Wolff, T., 2007. IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol* 9, 930-938.
- Oseasohn, R., Adelson, L., Kaji, M., 1959. Clinicopathologic study of thirty-three fatal cases of Asian influenza. *N Engl J Med* 260, 509-518.
- Oslund, K.L., Baumgarth, N., 2011. Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity. *Future Virol* 6, 951-962.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., Kawabe, T., Omata, M., 2005. Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 41, 1004-1012.
- Ottolini, M.G., Blanco, J.C., Eichelberger, M.C., Porter, D.D., Pletneva, L., Richardson, J.Y., Prince, G.A., 2005. The cotton rat provides a useful small-animal model for the study of influenza virus pathogenesis. *J Gen Virol* 86, 2823-2830.
- Oxford, J.S., Lambkin, R., Sefton, A., Daniels, R., Elliot, A., Brown, R., Gill, D., 2005. A hypothesis: the conjunction of soldiers, gas, pigs, ducks, geese and horses in northern France during the Great War provided the conditions for the emergence of the "Spanish" influenza pandemic of 1918-1919. *Vaccine* 23, 940-945.
- Pang, T., Cardosa, M.J., Guzman, M.G., 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85, 43-45.
- Pappas, C., Aguilar, P.V., Basler, C.F., Solorzano, A., Zeng, H., Perrone, L.A., Palese, P., Garcia-Sastre, A., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2008. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3064-3069.

- Parekh, B.S., Maniatis, T., 1999. Virus infection leads to localized hyperacetylation of histones H3 and H4 at the IFN-beta promoter. *Mol Cell* 3, 125-129.
- Park, Y.W., Katze, M.G., 1995. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* 270, 28433-28439.
- Parvin, J.D., Palese, P., Honda, A., Ishihama, A., Krystal, M., 1989. Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. *J Virol* 63, 5142-5152.
- Patterson, K.D., Pyle, G.F., 1991. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med* 65, 4-21.
- Patterson, S., Oxford, J.S., Dourmashkin, R.R., 1979. Studies on the mechanism of influenza virus entry into cells. *J Gen Virol* 43, 223-229.
- Pavlovic, J., Haller, O., Staeheli, P., 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol* 66, 2564-2569.
- Paz, S., Sun, Q., Nakhaei, P., Romieu-Mourez, R., Goubau, D., Julkunen, I., Lin, R., Hiscott, J., 2006. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52, 17-28.
- Pebody, R.G., McLean, E., Zhao, H., Cleary, P., Bracebridge, S., Foster, K., Charlett, A., Hardelid, P., Waight, P., Ellis, J., Bermingham, A., Zambon, M., Evans, B., Salmon, R., McMenamin, J., Smyth, B., Catchpole, M., Watson, J., 2010. Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and mortality in the United Kingdom: risk factors for death, April 2009 to March 2010. *Euro Surveill* 15.
- Peiris, J.S., Cheung, C.Y., Leung, C.Y., Nicholls, J.M., 2009. Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? *Trends Immunol* 30, 574-584.
- Peiris, J.S., Chu, C.M., Cheng, V.C., Chan, K.S., Hung, I.F., Poon, L.L., Law, K.I., Tang, B.S., Hon, T.Y., Chan, C.S., Chan, K.H., Ng, J.S., Zheng, B.J., Ng, W.L., Lai, R.W., Guan, Y., Yuen, K.Y., 2003. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772.
- Peiris, J.S., Yu, W.C., Leung, C.W., Cheung, C.Y., Ng, W.F., Nicholls, J.M., Ng, T.K., Chan, K.H., Lai, S.T., Lim, W.L., Yuen, K.Y., Guan, Y., 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363, 617-619.
- Pena, L., Vincent, A.L., Loving, C.L., Henningson, J.N., Lager, K.M., Lorusso, A., Perez, D.R., 2012. Restoring PB1-F2 into the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus has minimal effects in swine. *J Virol*.

- Peper, R.L., Van Campen, H., 1995. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia. *Microb Pathog* 19, 175-183.
- Perez-Padilla, R., de la Rosa-Zamboni, D., Ponce de Leon, S., Hernandez, M., Quinones-Falconi, F., Bautista, E., Ramirez-Venegas, A., Rojas-Serrano, J., Ormsby, C.E., Corrales, A., Higuera, A., Mondragon, E., Cordova-Villalobos, J.A., 2009. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 361, 680-689.
- Perez, A.B., Garcia, G., Sierra, B., Alvarez, M., Vazquez, S., Cabrera, M.V., Rodriguez, R., Rosario, D., Martinez, E., Denny, T., Guzman, M.G., 2004. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* 73, 230-234.
- Perrone, L.A., Plowden, J.K., Garcia-Sastre, A., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2008. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* 4, e1000115.
- Pfanner, N., 2000. Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol* 10, R412-415.
- Phair, J.P., Kauffman, C.A., Jennings, R., Potter, C.W., 1979. Influenza virus infection of the guinea pig: immune response and resistance. *Med Microbiol Immunol* 165, 241-254.
- Phillpotts, R.J., Higgins, P.G., Willman, J.S., Tyrrell, D.A., Freestone, D.S., Shepherd, W.M., 1984. Intranasal lymphoblastoid interferon ("Wellferon") prophylaxis against rhinovirus and influenza virus in volunteers. *J Interferon Res* 4, 535-541.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., Reis e Sousa, C., 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001.
- Polack, F.P., Teng, M.N., Collins, P.L., Prince, G.A., Exner, M., Regele, H., Lirman, D.D., Rabold, R., Hoffman, S.J., Karp, C.L., Kleeberger, S.R., Wills-Karp, M., Karron, R.A., 2002. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J Exp Med* 196, 859-865.
- Pollard, A.M., Lipscomb, M.F., 1990. Characterization of murine lung dendritic cells: similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J Exp Med* 172, 159-167.
- Potter, C.W., Jennings, R., 1976. The hamster as a model system for the study of influenza vaccines. *Postgrad Med J* 52, 345-351.

- Price, G.E., Gaszewska-Mastarlarz, A., Moskophidis, D., 2000. The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice. *J Virol* 74, 3996-4003.
- Privalsky, M.L., Penhoet, E.E., 1981. The structure and synthesis of influenza virus phosphoproteins. *J Biol Chem* 256, 5368-5376.
- Qi, L., Kash, J.C., Dugan, V.G., Wang, R., Jin, G., Cunningham, R.E., Taubenberger, J.K., 2009. Role of sialic acid binding specificity of the 1918 influenza virus hemagglutinin protein in virulence and pathogenesis for mice. *J Virol* 83, 3754-3761.
- Qiu, Y., Nemeroff, M., Krug, R.M., 1995. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* 1, 304-316.
- Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T., Palese, P., 2005. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J Virol* 79, 8431-8439.
- Quispe-Laime, A.M., Bracco, J.D., Barberio, P.A., Campagne, C.G., Rolfo, V.E., Umberger, R., Meduri, G.U., 2010. H1N1 influenza A virus-associated acute lung injury: response to combination oseltamivir and prolonged corticosteroid treatment. *Intensive Care Med* 36, 33-41.
- Reading, P.C., Bozza, S., Gilbertson, B., Tate, M., Moretti, S., Job, E.R., Crouch, E.C., Brooks, A.G., Brown, L.E., Bottazzi, B., Romani, L., Mantovani, A., 2008. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol* 180, 3391-3398.
- Reading, P.C., Morey, L.S., Crouch, E.C., Anders, E.M., 1997. Collectin-mediated antiviral host defense of the lung: evidence from influenza virus infection of mice. *J Virol* 71, 8204-8212.
- Reeve, P., 1978. Growth of some attenuated influenza A viruses in hamsters. *Med Microbiol Immunol* 166, 133-139.
- Reeve, P., Pibermann, M., Gerendas, B., 1981. Studies with some influenza B viruses in cell cultures, hamsters and hamster tracheal organ cultures. *Med Microbiol Immunol* 169, 179-186.
- Reid, A.H., Fanning, T.G., Hultin, J.V., Taubenberger, J.K., 1999. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1651-1656.
- Reid, A.H., Fanning, T.G., Janczewski, T.A., Lourens, R.M., Taubenberger, J.K., 2004. Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. *J Virol* 78, 12462-12470.

- Reid, A.H., Fanning, T.G., Janczewski, T.A., McCall, S., Taubenberger, J.K., 2002. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J Virol* 76, 10717-10723.
- Reid, A.H., Fanning, T.G., Janczewski, T.A., Taubenberger, J.K., 2000. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6785-6790.
- Rello, J., Pop-Vicas, A., 2009. Clinical review: primary influenza viral pneumonia. *Crit Care* 13, 235.
- Richardson, J.C., Akkina, R.K., 1991. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 116, 69-80.
- Richman, D.D., Murphy, B.R., Baron, S., Uhlenhof, C., 1976. Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J Clin Microbiol* 3, 223-226.
- Richt, J.A., Lekcharoensuk, P., Lager, K.M., Vincent, A.L., Loiacono, C.M., Janke, B.H., Wu, W.H., Yoon, K.J., Webby, R.J., Solorzano, A., Garcia-Sastre, A., 2006. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J Virol* 80, 11009-11018.
- Rieder, M., Brzozka, K., Pfaller, C.K., Cox, J.H., Stitz, L., Conzelmann, K.K., 2011. Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J Virol* 85, 842-852.
- Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T., van Amerongen, G., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., 2001. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J Virol* 75, 6687-6691.
- Rimmelzwaan, G.F., van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T.M., van Amerongen, G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2006. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol* 168, 176-183; quiz 364.
- Robb, N.C., Smith, M., Vreede, F.T., Fodor, E., 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J. Gen. Virol.* 90, 1398-1407.
- Robertson, M.J., Ritz, J., 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.
- Rogers, G.N., D'Souza, B.L., 1989. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 173, 317-322.

- Rogers, G.N., Paulson, J.C., 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127, 361-373.
- Rogers, G.N., Pritchett, T.J., Lane, J.L., Paulson, J.C., 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 131, 394-408.
- Rossman, J.S., Lamb, R.A., 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229-236.
- Rudd, P.A., Bastien-Hamel, L.E., von Messling, V., 2010. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J Gen Virol* 91, 980-989.
- Rutigliano, J.A., Doherty, P.C., Franks, J., Morris, M.Y., Reynolds, C., Thomas, P.G., 2008. Screening monoclonal antibodies for cross-reactivity in the ferret model of influenza infection. *J Immunol Methods* 336, 71-77.
- Ryman, K.D., Klimstra, W.B., Nguyen, K.B., Biron, C.A., Johnston, R.E., 2000. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J Virol* 74, 3366-3378.
- Sabbah, A., Chang, T.H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P.H., Xiang, Y., Bose, S., 2009. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* 10, 1073-1080.
- Sadler, A.J., Williams, B.R., 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-568.
- Safronetz, D., Rockx, B., Feldmann, F., Belisle, S.E., Palermo, R.E., Brining, D., Gardner, D., Prohl, S.C., Marzi, A., Tsuda, Y., Lacasse, R.A., Kercher, L., York, A., Korth, M.J., Long, D., Rosenke, R., Shupert, W.L., Aranda, C.A., Mattoon, J.S., Kobasa, D., Kobinger, G., Li, Y., Taubenberger, J.K., Richt, J.A., Parnell, M., Ebihara, H., Kawaoka, Y., Katze, M.G., Feldmann, H., 2011. Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques. *J Virol* 85, 1214-1223.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E.A., Ilyushina, N.A., Yen, H.L., Hulse-Post, D.J., Humberd, J., Trichet, M., Rehg, J.E., Webby, R.J., Webster, R.G., Hoffmann, E., 2006. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* 203, 689-697.

- Salomon, R., Hoffmann, E., Webster, R.G., 2007. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12479-12481.
- Samuel, M.A., Diamond, M.S., 2005. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol* 79, 13350-13361.
- Samuel, M.A., Whitby, K., Keller, B.C., Marri, A., Barchet, W., Williams, B.R., Silverman, R.H., Gale, M., Jr., Diamond, M.S., 2006. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol* 80, 7009-7019.
- Sanders, C.J., Doherty, P.C., Thomas, P.G., 2011. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res* 343, 13-21.
- Saravolac, E.G., Sabuda, D., Crist, C., Blasetti, K., Schnell, G., Yang, H., Kende, M., Levy, H.B., Wong, J.P., 2001. Immunoprophylactic strategies against respiratory influenza virus infection. *Vaccine* 19, 2227-2232.
- Saslaw, S., Wilson, H.E., Doan, C.A., Woolpert, O.C., Schwab, J.L., 1946. Reactions of Monkeys to Experimentally Induced Influenza Virus a Infection : An Analysis of the Relative Roles of Humoral and Cellular Immunity under Conditions of Optimal or Deficient Nutrition. *J Exp Med* 84, 113-125.
- Satterly, N., Tsai, P.L., van Deursen, J., Nussenzveig, D.R., Wang, Y., Faria, P.A., Levay, A., Levy, D.E., Fontoura, B.M., 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1853-1858.
- Schafer, J.R., Kawaoka, Y., Bean, W.J., Suss, J., Senne, D., Webster, R.G., 1993. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology* 194, 781-788.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., Reed, M.W., 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285, 194-204.
- Schmolke, M., Manicassamy, B., Pena, L., Sutton, T., Hai, R., Varga, Z.T., Hale, B.G., Steel, J., Perez, D.R., Garcia-Sastre, A., 2011. Differential contribution of PB1-F2 to the virulence of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mammalian and avian species. *PLoS Pathog* 7, e1002186.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., Rott, R., 1978. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87, 13-20.

- Schrauwen, E.J., Bestebroer, T.M., Munster, V.J., de Wit, E., Herfst, S., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2011. Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. *J Gen Virol* 92, 1410-1415.
- Schulman, J.L., 1968. The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection. *Am J Public Health Nations Health* 58, 2092-2096.
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hinshaw, V.S., 2001. Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol* 75, 7875-7881.
- Schumacher, B., Bernasconi, D., Schultz, U., Staeheli, P., 1994. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 203, 144-148.
- Schwarzmann, S.W., Adler, J.L., Sullivan, R.J., Jr., Marine, W.M., 1971. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med* 127, 1037-1041.
- Seo, S.H., Hoffmann, E., Webster, R.G., 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses. *Nat Med* 8, 950-954.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Chen, Z.J., 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.
- Shih, S.R., Krug, R.M., 1996. Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: the cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells. *EMBO J* 15, 5415-5427.
- Shih, S.R., Nemeroff, M.E., Krug, R.M., 1995. The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6324-6328.
- Shin, Y.K., Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., Zhou, Y., 2007. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol* 88, 13-18.
- Shinde, V., Bridges, C.B., Uyeki, T.M., Shu, B., Balish, A., Xu, X., Lindstrom, S., Gubareva, L.V., Deyde, V., Garten, R.J., Harris, M., Gerber, S., Vagasky, S., Smith, F., Pascoe, N., Martin, K., Dufficy, D., Ritger, K., Conover, C., Quinlisk, P., Klimov, A., Bresee, J.S., Finelli, L., 2009. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 360, 2616-2625.

- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., Kawaoka, Y., 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435-436.
- Shope, R.E., 1934. The Infection of Ferrets with Swine Influenza Virus. *J Exp Med* 60, 49-61.
- Sieczkarski, S.B., Whittaker, G.R., 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 76, 10455-10464.
- Silverman, R.H., 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81, 12720-12729.
- Simonsen, L., Clarke, M.J., Schonberger, L.B., Arden, N.H., Cox, N.J., Fukuda, K., 1998. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 178, 53-60.
- Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J.S., Guan, Y., Rambaut, A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122-1125.
- Smith, H., Sweet, C., 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev Infect Dis* 10, 56-75.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Sutton, V.R., Davis, J.E., Browne, K.A., Sayers, T.J., Trapani, J.A., 2001. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J Leukoc Biol* 70, 18-29.
- Solorzano, A., Webby, R.J., Lager, K.M., Janke, B.H., Garcia-Sastre, A., Richt, J.A., 2005. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol* 79, 7535-7543.
- Somers, C.C., Ahmad, N., Mejias, A., Buckingham, S.C., Carubelli, C., Katz, K., Leos, N., Gomez, A.M., DeVincenzo, J.P., Ramilo, O., Jafri, H.S., 2009. Effect of dexamethasone on respiratory syncytial virus-induced lung inflammation in children: results of a randomized, placebo controlled clinical trial. *Pediatr Allergy Immunol* 20, 477-485.
- Srivastava, B., Blazejewski, P., Hessmann, M., Bruder, D., Geffers, R., Mauel, S., Gruber, A.D., Schughart, K., 2009. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One* 4, e4857.
- Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J.G., Haller, O., 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol* 8, 4518-4523.
- Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, H., Egorov, A., 2005. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1

- activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol* 86, 185-195.
- Steel, J., Lowen, A.C., Mubareka, S., Palese, P., 2009. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* 5, e1000252.
- Stegmann, T., Morselt, H.W., Scholma, J., Wilschut, J., 1987. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* 904, 165-170.
- Stein-Streilein, J., Guffee, J., 1986. In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *J Immunol* 136, 1435-1441.
- Stertz, S., Dittmann, J., Blanco, J.C., Pletneva, L.M., Haller, O., Kochs, G., 2007. The antiviral potential of interferon-induced cotton rat Mx proteins against orthomyxovirus (influenza), rhabdovirus, and bunyavirus. *J Interferon Cytokine Res* 27, 847-855.
- Stockman, L.J., Bellamy, R., Garner, P., 2006. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med* 3, e343.
- Straight, T.M., Ottolini, M.G., Prince, G.A., Eichelberger, M.C., 2008. Antibody contributes to heterosubtypic protection against influenza A-induced tachypnea in cotton rats. *Viol J* 5, 44.
- Strickland, D.H., Thepen, T., Kees, U.R., Kraal, G., Holt, P.G., 1993. Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunology* 80, 266-272.
- Strieter, R.M., 2008. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 5, 305-310.
- Strieter, R.M., Koch, A.E., Antony, V.B., Fick, R.B., Jr., Standiford, T.J., Kunkel, S.L., 1994. The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Lab Clin Med* 123, 183-197.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., 1993. The immunopathology of chemotactic cytokines. *Adv Exp Med Biol* 351, 19-28.
- Stumbles, P.A., Upham, J.W., Holt, P.G., 2003. Airway dendritic cells: co-ordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract. *APMIS* 111, 741-755.
- Subbarao, E.K., London, W., Murphy, B.R., 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67, 1761-1764.
- Sui, J., Hwang, W.C., Perez, S., Wei, G., Aird, D., Chen, L.M., Santelli, E., Stec, B., Cadwell, G., Ali, M., Wan, H., Murakami, A., Yammanuru, A., Han, T., Cox, N.J., Bankston, L.A.,

- Donis, R.O., Liddington, R.C., Marasco, W.A., 2009. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 16, 265-273.
- Sun, X., Tse, L.V., Ferguson, A.D., Whittaker, G.R., 2010. Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J Virol* 84, 8683-8690.
- Surls, J., Nazarov-Stoica, C., Kehl, M., Casares, S., Brumeanu, T.D., 2010. Differential effect of CD4+Foxp3+ T-regulatory cells on the B and T helper cell responses to influenza virus vaccination. *Vaccine* 28, 7319-7330.
- Suzuki, T., Chow, C.W., Downey, G.P., 2008. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1348-1361.
- Svitek, N., Rudd, P.A., Obojes, K., Pillet, S., von Messling, V., 2008. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376, 53-59.
- Svitek, N., von Messling, V., 2007. Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* 362, 404-410.
- Sweet, C., Bird, R.A., Coates, D.M., Overton, H.A., Smith, H., 1985. Recent H1N1 viruses (A/USSR/90/77, A/Fiji/15899/83, A/Firenze/13/83) replicate poorly in ferret bronchial epithelium. Brief report. *Arch Virol* 85, 305-311.
- Sweet, C., Jakeman, K.J., Bush, K., Wagaman, P.C., McKown, L.A., Streeter, A.J., Desai-Krieger, D., Chand, P., Babu, Y.S., 2002. Oral administration of cyclopentane neuraminidase inhibitors protects ferrets against influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 996-1004.
- Szabo, C., Saunders, C., O'Connor, M., Salzman, A.L., 1997. Peroxynitrite causes energy depletion and increases permeability via activation of poly (ADP-ribose) synthetase in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 105-109.
- Szretter, K.J., Gangappa, S., Belser, J.A., Zeng, H., Chen, H., Matsuoka, Y., Sambhara, S., Swayne, D.E., Tumpey, T.M., Katz, J.M., 2009. Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice. *J Virol* 83, 5825-5834.
- Szretter, K.J., Gangappa, S., Lu, X., Smith, C., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Sambhara, S., Tumpey, T.M., Katz, J.M., 2007. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Virol* 81, 2736-2744.
- Takaoka, A., Yanai, H., 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8, 907-922.

- Takizawa, T., Ohashi, K., Nakanishi, Y., 1996. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol* 70, 8128-8132.
- Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P., Garcia-Sastre, A., 2000a. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 74, 7989-7996.
- Talon, J., Salvatore, M., O'Neill, R.E., Nakaya, Y., Zheng, H., Muster, T., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2000b. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4309-4314.
- Tan, S.L., Katze, M.G., 1998. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* 18, 757-766.
- Tang, X., Chong, K.T., 2009. Histopathology and growth kinetics of influenza viruses (H1N1 and H3N2) in the upper and lower airways of guinea pigs. *J Gen Virol* 90, 386-391.
- Tate, M.D., Brooks, A.G., Reading, P.C., 2011. Specific sites of N-linked glycosylation on the hemagglutinin of H1N1 subtype influenza A virus determine sensitivity to inhibitors of the innate immune system and virulence in mice. *J Immunol* 187, 1884-1894.
- Taubenberger, J.K., Kash, J.C., 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7, 440-451.
- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Janczewski, T.A., Fanning, T.G., 2001. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1829-1839.
- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Krafft, A.E., Bijwaard, K.E., Fanning, T.G., 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 275, 1793-1796.
- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Lourens, R.M., Wang, R., Jin, G., Fanning, T.G., 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437, 889-893.
- Tay, C.H., Szomolanyi-Tsuda, E., Welsh, R.M., 1998. Control of infections by NK cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 230, 193-220.
- Thanos, D., Maniatis, T., 1995a. Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol Cell Biol* 15, 152-164.
- Thanos, D., Maniatis, T., 1995b. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83, 1091-1100.
- Theron, M., Huang, K.J., Chen, Y.W., Liu, C.C., Lei, H.Y., 2005. A probable role for IFN-gamma in the development of a lung immunopathology in SARS. *Cytokine* 32, 30-38.

- Thomas, M., Kranjec, C., Nagasaka, K., Matlashewski, G., Banks, L., 2011. Analysis of the PDZ binding specificities of Influenza A virus NS1 proteins. *Virology* 438, 25.
- Thomas, P.G., Dash, P., Aldridge, J.R., Jr., Ellebedy, A.H., Reynolds, C., Funk, A.J., Martin, W.J., Lamkanfi, M., Webby, R.J., Boyd, K.L., Doherty, P.C., Kanneganti, T.D., 2009. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* 30, 566-575.
- Thurston, G., Baluk, P., Hirata, A., McDonald, D.M., 1996. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271, H2547-2562.
- Tisoncik, J.R., Billharz, R., Burmakina, S., Belisle, S.E., Proll, S.C., Korth, M.J., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., 2011. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways. *J Gen Virol* 92, 2093-2104.
- To, K.F., Chan, P.K., Chan, K.F., Lee, W.K., Lam, W.Y., Wong, K.F., Tang, N.L., Tsang, D.N., Sung, R.Y., Buckley, T.A., Tam, J.S., Cheng, A.F., 2001. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 63, 242-246.
- Topham, D.J., Tripp, R.A., Doherty, P.C., 1997. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 159, 5197-5200.
- Trammell, R.A., Liberati, T.A., Toth, L.A., 2012. Host genetic background and the innate inflammatory response of lung to influenza virus. *Microbes Infect* 14, 50-58.
- Treanor, J.D., 2007. Influenza--the goal of control. *N Engl J Med* 357, 1439-1441.
- Treanor, J.J., Snyder, M.H., London, W.T., Murphy, B.R., 1989. The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology* 171, 1-9.
- Treanor, J.J., Tierney, E.L., Zebedee, S.L., Lamb, R.A., Murphy, B.R., 1990. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol* 64, 1375-1377.
- Trinchieri, G., 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Tumpey, T.M., Basler, C.F., Aguilar, P.V., Zeng, H., Solorzano, A., Swayne, D.E., Cox, N.J., Katz, J.M., Taubenberger, J.K., Palese, P., Garcia-Sastre, A., 2005a. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 310, 77-80.
- Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J.K., Palese, P., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M.J., Schultz-Cherry, S., Solorzano, A., Van Rooijen, N., Katz, J.M., Basler, C.F., 2005b. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus:

- functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol* 79, 14933-14944.
- Tumpey, T.M., Lu, X., Morken, T., Zaki, S.R., Katz, J.M., 2000. Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol* 74, 6105-6116.
- Tumpey, T.M., Maines, T.R., Van Hoesen, N., Glaser, L., Solorzano, A., Pappas, C., Cox, N.J., Swayne, D.E., Palese, P., Katz, J.M., Garcia-Sastre, A., 2007a. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 315, 655-659.
- Tumpey, T.M., Szretter, K.J., Van Hoesen, N., Katz, J.M., Kochs, G., Haller, O., Garcia-Sastre, A., Staeheli, P., 2007b. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81, 10818-10821.
- Twu, K.Y., Kuo, R.L., Marklund, J., Krug, R.M., 2007. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J Virol* 81, 8112-8121.
- Twu, K.Y., Noah, D.L., Rao, P., Kuo, R.L., Krug, R.M., 2006. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J Virol* 80, 3957-3965.
- Uyeki, T.M., 2009. Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin. Infect. Dis.* 49, 279-290.
- Vahlenkamp, T.W., Harder, T.C., Giese, M., Lin, F., Teifke, J.P., Klopffleisch, R., Hoffmann, R., Tarpey, I., Beer, M., Mettenleiter, T.C., 2008. Protection of cats against lethal influenza H5N1 challenge infection. *J Gen Virol* 89, 968-974.
- van der Laan, J.W., Herberts, C., Lambkin-Williams, R., Boyers, A., Mann, A.J., Oxford, J., 2008. Animal models in influenza vaccine testing. *Expert Rev Vaccines* 7, 783-793.
- van der Sluijs, K.F., van der Poll, T., Lutter, R., Juffermans, N.P., Schultz, M.J., 2010. Bench-to-bedside review: bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications. *Crit Care* 14, 219.
- Van Hoesen, N., Belser, J.A., Szretter, K.J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D.E., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2009a. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol* 83, 2851-2861.
- Van Hoesen, N., Pappas, C., Belser, J.A., Maines, T.R., Zeng, H., Garcia-Sastre, A., Sasisekharan, R., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2009b. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3366-3371.

- Van Poucke, S.G., Nicholls, J.M., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K., 2010. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology* 7, 38.
- Van Reeth, K., 2000. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Veterinary Microbiology* 74, 109-116.
- van Riel, D., Leijten, L.M., van der Eerden, M., Hoogsteden, H.C., Boven, L.A., Lambrecht, B.N., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2011. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. *PLoS Pathogens* 7, e1002099.
- van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2006. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 312, 399.
- van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *American Journal of Pathology* 171, 1215-1223.
- Varga, Z.T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., Garcia-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., Palese, P., 2011. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathogens* 7, e1002067.
- Versteeg, G.A., Garcia-Sastre, A., 2010. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Current Opinion in Microbiology* 13, 508-516.
- Vieira, H.L., Haouzi, D., El Hamel, C., Jacotot, E., Belzacq, A.S., Brenner, C., Kroemer, G., 2000. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death and Differentiation* 7, 1146-1154.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., Webby, R.J., Garcia-Sastre, A., Richt, J.A., 2007. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 25, 7999-8009.
- von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J.A., Strickland, D.H., Holt, P.G., Stumbles, P.A., 2005. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *Journal of Immunology* 175, 1609-1618.
- Walsh, J.J., Dietlein, L.F., Low, F.N., Burch, G.E., Mogabgab, W.J., 1961. Bronchotracheal response in human influenza. Type A, Asian strain, as studied by light and electron microscopic examination of bronchoscopic biopsies. *Archives of Internal Medicine* 108, 376-388.
- Wan, H., Sorrell, E.M., Song, H., Hossain, M.J., Ramirez-Nieto, G., Monne, I., Stevens, J., Cattoli, G., Capua, I., Chen, L.M., Donis, R.O., Busch, J., Paulson, J.C., Brockwell, C., Webby, R., Blanco, J., Al-Natour, M.Q., Perez, D.R., 2008. Replication and transmission

- of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential. *PLoS One* 3, e2923.
- Wang, H., Ding, Y., Li, X., Yang, L., Zhang, W., Kang, W., 2003. Fatal aspergillosis in a patient with SARS who was treated with corticosteroids. *N Engl J Med* 349, 507-508.
- Wang, K., Xie, S., Sun, B., 2011. Viral proteins function as ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1808, 510-515.
- Wang, M., Lamberth, K., Harndahl, M., Roder, G., Stryhn, A., Larsen, M.V., Nielsen, M., Lundegaard, C., Tang, S.T., Dziegiel, M.H., Rosenkvist, J., Pedersen, A.E., Buus, S., Claesson, M.H., Lund, O., 2007. CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 25, 2823-2831.
- Wang, P., Palese, P., O'Neill, R.E., 1997. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* 71, 1850-1856.
- Wang, W., Krug, R.M., 1998. U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. *RNA* 4, 55-64.
- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C.Y., Montelione, G.T., Krug, R.M., 1999. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 5, 195-205.
- Wang, X., Basler, C.F., Williams, B.R., Silverman, R.H., Palese, P., Garcia-Sastre, A., 2002. Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol* 76, 12951-12962.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., Garcia-Sastre, A., 2000. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 74, 11566-11573.
- Watanabe, T., Kawaoka, Y., 2011. Pathogenesis of the 1918 pandemic influenza virus. *PLoS Pathog* 7, e1001218.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Shinya, K., Kim, J.H., Hatta, M., Kawaoka, Y., 2009. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 588-592.
- Waters, C.M., Savla, U., Panos, R.J., 1997. KGF prevents hydrogen peroxide-induced increases in airway epithelial cell permeability. *Am J Physiol* 272, L681-689.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56, 152-179.

- Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Jr., Turner, B., Shortridge, K.F., 1977. Influenza viruses from avian and porcine sources and their possible role in the origin of human pandemic strains. *Dev Biol Stand* 39, 461-468.
- Webster, R.G., Laver, W.G., 1972. The origin of pandemic influenza. *Bull World Health Organ* 47, 449-452.
- Webster, R.G., Peiris, M., Chen, H., Guan, Y., 2006. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 12, 3-8.
- Weidle, U., Weissmann, C., 1983. The 5'-flanking region of a human IFN-alpha gene mediates viral induction of transcription. *Nature* 303, 442-446.
- Weingartl, H.M., Albrecht, R.A., Lager, K.M., Babiuk, S., Marszal, P., Neufeld, J., Embury-Hyatt, C., Lekcharoensuk, P., Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Richt, J.A., 2009. Experimental infection of pigs with the human 1918 pandemic influenza virus. *J Virol* 83, 4287-4296.
- Whittaker, G., Bui, M., Helenius, A., 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* 70, 2743-2756.
- Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., Digard, P., 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 83, 8021-8031.
- Wolff, T., O'Neill, R.E., Palese, P., 1998. NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* 72, 7170-7180.
- Wolstenholme, A.J., Barrett, T., Nichol, S.T., Mahy, B.W., 1980. Influenza virus-specific RNA and protein syntheses in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins. *J Virol* 35, 1-7.
- Wong, C.K., Lam, C.W., Wu, A.K., Ip, W.K., Lee, N.L., Chan, I.H., Lit, L.C., Hui, D.S., Chan, M.H., Chung, S.S., Sung, J.J., 2004. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol* 136, 95-103.
- Wright, P.F., Thompson, J., Karzon, D.T., 1980. Differing virulence of H1N1 and H3N2 influenza strains. *Am J Epidemiol* 112, 814-819.
- Xing, Z., Harper, R., Anunciacion, J., Yang, Z., Gao, W., Qu, B., Guan, Y., Cardona, C.J., 2011. Host immune and apoptotic responses to avian influenza virus H9N2 in human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 24-33.
- Xu, C., Song, X., Fu, L., Dong, D., Wu, S., Li, G., Yi, S., Yu, T., Yu, R., Hou, L., Chen, W., 2011. Antiviral potential of exogenous human omega interferon to inhibit pandemic 2009 A (H1N1) influenza virus. *Viral Immunol* 24, 369-374.

- Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., Shu, H.B., 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19, 727-740.
- Xu, T., Qiao, J., Zhao, L., He, G., Li, K., Wang, J., Tian, Y., Wang, H., 2009. Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice. *Eur Respir J* 33, 852-860.
- Yamada, H., Chounan, R., Higashi, Y., Kurihara, N., Kido, H., 2004. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett* 578, 331-336.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M.Q., Nidom, C.A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L.F., Stevens, D.J., Russell, R.J., Gamblin, S.J., Skehel, J.J., Kawaoka, Y., 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444, 378-382.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., Ishihama, A., 1993. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196, 249-255.
- Yewdell, J.W., Bennink, J.R., Smith, G.L., Moss, B., 1985. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1785-1789.
- Yin, C., Khan, J.A., Swapna, G.V., Ertekin, A., Krug, R.M., Tong, L., Montelione, G.T., 2007. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 282, 20584-20592.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T., 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.
- Yu, H., Gao, Z., Feng, Z., Shu, Y., Xiang, N., Zhou, L., Huai, Y., Feng, L., Peng, Z., Li, Z., Xu, C., Li, J., Hu, C., Li, Q., Xu, X., Liu, X., Liu, Z., Xu, L., Chen, Y., Luo, H., Wei, L., Zhang, X., Xin, J., Guo, J., Wang, Q., Yuan, Z., Zhang, K., Zhang, W., Yang, J., Zhong, X., Xia, S., Li, L., Cheng, J., Ma, E., He, P., Lee, S.S., Wang, Y., Uyeki, T.M., Yang, W., 2008. Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection in China. *PLoS One* 3, e2985.
- Yu, J., Li, X., Wang, Y., Li, B., Li, H., Li, Y., Zhou, W., Zhang, C., Rao, Z., Bartlam, M., Cao, Y., 2011a. PDIIM2 selectively interacts with the PDZ binding motif of highly pathogenic avian H5N1 influenza A virus NS1. *PLoS One* 6, e19511.

- Yu, X., Zhang, X., Zhao, B., Wang, J., Zhu, Z., Teng, Z., Shao, J., Shen, J., Gao, Y., Yuan, Z., Wu, F., 2011b. Intensive Cytokine induction in Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection Accompanied by Robust Production of IL-10 and IL-6. *PLoS One* 6, e28680.
- Yuen, M.F., Lai, C.L., 2011. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 138-143.
- Zakstelskaja, L.J., Yakhno, M.A., Isacenko, V.A., Molibog, E.V., Hlustov, S.A., Antonova, I.V., Klitsunova, N.V., Vorkunova, G.K., Burkrinskaja, A.G., Bykovsky, A.F., Hohlova, G.G., Ivanova, V.T., Zdanov, V.M., 1978. Influenza in the USSR in 1977: recurrence of influenzavirus A subtype H1N1. *Bull World Health Organ* 56, 919-922.
- Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., Palese, P., 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1, e4.
- Zamarin, D., Ortigoza, M.B., Palese, P., 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* 80, 7976-7983.
- Zebedee, S.L., Lamb, R.A., 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* 62, 2762-2772.
- Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halbhuber, K.J., Wutzler, P., 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol* 88, 536-546.
- Zhang, D.G., Li, W.Z., Wang, G.F., Su, Y., Zeng, J., Zhang, C., Zeng, X.X., Chen, X.X., Xu, Y.X., Li, K.S., 2010. Heterologous SH3-p85beta inhibits influenza A virus replication. *Virol J* 7, 170.
- Zhdanov, V.M., Lvov, D.K., Zakstelskaya, L.Y., Yakhno, M.A., Isachenko, V.I., Braude, N.A., Reznik, V.I., Pysina, T.V., Andreyev, V.P., Podchernyaeva, R.Y., 1978. Return of epidemic A1 (H1N1) influenza virus. *Lancet* 1, 294-295.
- Zhirnov, O.P., Klenk, H.D., 2007. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* 12, 1419-1432.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Wolff, T., Klenk, H.D., 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol* 76, 1617-1625.
- Zohari, S., Gyarmati, P., Thoren, P., Czifra, G., Brojer, C., Belak, S., Berg, M., 2008. Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes* 36, 117-125.

ANNEXE I: CONTRIBUTIONS SUPPLÉMENTAIRES

Les IFN I stimulent l'activation de l'inflammasome dépendant de RIG-I/TLR3/NLRP3 dans les cellules infectées par le virus de la grippe

Julien Pothlichet, Isabelle Meunier, Beckley K. Davis, Jenny P.-Y. Ting, Veronika von Messling, Silvia M. Vidal.

Soumis au Journal of Molecular Cell Biology.

Dans cet article, des virus recombinants que j'ai produits dans mon étude sur la protéine NS1 ont été utilisés. Des données de la même étude précédente ont été utilisées pour créer le schéma de la figure 7A et j'ai analysé par RT-PCR quantitatif la réponse de l'IL-1 β et l'IFN- β chez les animaux.

Résumé

Le virus de la grippe cause une maladie respiratoire contagieuse et potentiellement létale. Une réponse protectrice de l'IL-1 β est médiée par les récepteurs de l'immunité innée présents chez les macrophages et les cellules épithéliales. À cet effet, NLRP3 est crucial pour les macrophages, par contre, le récepteur induisant la sécrétion de l'IL-1 β dans les cellules épithéliales pulmonaires reste indéterminé. Dans cet article, nous décrivons pour la première fois la contribution relative des récepteurs RIG-I (DDX58), TLR3 et NLRP3 à la production de l'IL-1 β dans des cellules épithéliales primaires de poumons. Afin d'activer la sécrétion d'IL-1 β , ces cellules emploient un mécanisme de reconnaissance du pathogène partiellement redondant qui diffère de celui observé chez les macrophages. Le récepteur RIG-I s'est avéré le plus important, agissant par un mécanisme MAVS/TRIM25/Riplet dépendant de la signalisation des IFN I en amont de TLR3 et NLRP. Conséquemment, la protéine NS1, un facteur de virulence ciblant la signalisation de RIG-I, module fortement la réponse à l'IL-1 β dans les cellules pulmonaires épithéliales et chez les furets. La protéine NS1 de souches hautement pathogènes inhibe la sécrétion de la cytokine, en comparaison avec celle de souches moins pathogènes. Ces résultats démontrent que, dans les cellules pulmonaires infectées par le virus de la grippe, RIG-I est essentiel pour l'activation de l'inflammasome par un mécanisme dépendant de la production d'IFN I.

1
2
3
4 **Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome**
5
6 **activation in influenza A virus infected cells**
7
8
9

10
11 Julien Pothlichet^{1,2*}, Isabelle Meunier³, Beckley K. Davis^{4,5,6}, Jenny P.-Y. Ting^{4,5}, Veronika von
12
13 Messling³, Silvia M. Vidal^{1,2,7,8*}
14

15
16
17
18 ¹McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, H3H 2R9, Canada; ²McGill Centre for the
19
20 Study of Host Resistance, McGill University, Montreal, Quebec, H3G 0B1, Canada; ³INRS-Institut
21
22 Armand-Frappier, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada; ⁴Department of immunology and
23
24 microbiology, ⁵Lineberger Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill,
25
26 NC 27599, USA. ⁷Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Quebec, H3A
27
28 1B1, Canada; ⁸Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal,
29
30 Quebec, H3A 2B4, Canada; ⁶current address Department of Biology, Franklin and Marshall
31
32 College Lancaster PA 17604, USA
33
34
35
36
37
38

39 **Running title: IAV induces inflammasome through RIG-I/TLR3/NLRP3**
40
41
42
43

44 ***Address correspondence:** Julien Pothlichet and Silvia Vidal, Bellini Life Sciences Pavilion, 3649
45
46 Prom. Sir William Osler, Rm 367, Montreal, Quebec, Canada, H3G 0B1, E-mail:
47
48 Dr Julien Pothlichet, julien.pothlichet@mail.mcgill.ca; Dr. Silvia Vidal, silvia.vidal@mcgill.ca
49
50 Phone#:514-398-2360/514-398-2362; Fax#:514-398-260
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Influenza A virus (IAV) triggers a contagious and potentially lethal respiratory disease. A protective IL-1 β response is mediated by innate receptors in macrophages and lung epithelial cells. NLRP3 is crucial in macrophages; however, which sensors elicit IL-1 β secretion in lung epithelial cells remains undetermined. Here we describe for the first time the relative roles of host innate receptors RIG-I (DDX58), TLR3, and NLRP3 in the IL-1 β response in primary lung epithelial cells. To activate IL-1 β secretion, these cells employed partially redundant recognition mechanisms that differed from those seen in macrophages. RIG-I had the strongest effect through a MAVS/TRIM25/Riplet-dependent type I IFN signalling pathway upstream of TLR3 and NLRP3. Thus, NS1, an influenza virulence factor that targets the RIG-I pathway, strongly modulated the IL-1 β response in lung epithelial cells and in ferrets. NS1 from highly pathogenic strains inhibited secretion of IL-1 β compared to the least pathogenic virus strains. These findings demonstrate that in IAV infected lung epithelial cells RIG-I is central to inflammasome activation through a type I interferon-positive feedback loop.

INTRODUCTION

Influenza A virus (IAV) is the etiological agent of a contagious acute respiratory disease, and it is responsible for severe illness and considerable mortality worldwide due to seasonal and, more rarely, pandemic strains such as the deadly 1918 H1N1 virus (Taubenberger and Morens, 2008; Tscherne and Garcia-Sastre, 2011). The outcome of IAV infections is largely determined by complex interactions between the virus and the innate immune system; therefore, a detailed understanding of the molecular mechanisms involved in innate immune recognition and response can provide a valuable framework for therapeutic developments.

A protective IL-1 β response primarily mediated by macrophages and lung epithelial cells is a key component of the innate immune response to influenza infection (Allen et al., 2009). At least four pattern recognition receptors (PRR) that sense IAV infection may be involved: toll-like receptor 3 (TLR3), TLR7; retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I, also known as DDX58); and NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3). Lung epithelial cells that line the respiratory track are the primary targets of influenza infection (Le Goffic et al., 2007; Pothlichet et al., 2008; Reynolds, 2002; Sanders et al., 2011). However, the mechanisms of IL-1 β secretion in lung epithelial cells remain unresolved

In macrophages and dendritic cells, genomic IAV RNA is detected by TLR7, leading to stimulation of interferon- α (IFN- α) production (Diebold et al., 2004) and synthesis of the immature ("pro") form of interleukin 1 β (IL-1 β) (Ichinohe et al., 2010). This upregulation of biologically inactive pro-IL-1 β is the first signal needed to produce a bioactive mature form of IL-1 β via formation of an NLRP3 inflammasome. To this end, NLRP3, in complex with the adaptor protein ASC (also known as PYCARD), first induces proteolytic activation of caspase 1. In turn, activated caspase 1 cleaves pro-IL-1 β and promotes secretion of mature IL-1 β by a nonconventional pathway

1
2
3 (Ichinohe et al., 2010). Several mechanisms have been proposed to explain activation of the
4
5 NLRP3 inflammasome in IAV-infected macrophages, including lysosomal maturation, release of
6
7 reactive oxygen species (Allen et al., 2009), and perturbation of ionic concentration through IAV
8
9 M2 ion channel expressed in the *trans* Golgi network (Ichinohe et al., 2010). In macrophages, type
10
11 I IFNs have also been shown to negatively regulate IL-1 β production through incompletely
12
13 understood mechanisms (Guarda et al., 2011).
14
15

16
17 In lung epithelial cells, both TLR3 and RIG-I receptors play a critical role in the pathology
18
19 of, and immune response to IAV infection (Allen et al., 2011; Le Goffic et al., 2006; Le Goffic et
20
21 al., 2007). TLR3 primarily elicits a pro-inflammatory response upon binding to double-stranded
22
23 RNA species produced during IAV infection (Le Goffic et al., 2007). By contrast, RIG-I
24
25 recognizes cytosolic single-stranded RNA genomes (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006)
26
27 and by interacting with the mitochondrial adaptor MAVS/IPS-1/cardif/VISA elicits both pro-
28
29 inflammatory and antiviral responses through the transcription factors NF- κ B and IRF-3,
30
31 respectively (Le Goffic et al., 2007). Further underscoring their relevance in the host response (Loo
32
33 and Gale, 2011), RIG-I responses are tightly regulated either positively, by TRIM25 (Gack et al.,
34
35 2009) and Riplet (Oshiumi et al., 2010), or negatively, by suppressor of cytokine signalling
36
37 (SOCS)1 and SOCS3 (Pothlichet et al., 2008).
38
39
40
41
42

43
44 On the virus side, the nonstructural protein 1 (NS1) is the main IAV IFN antagonist (Gack
45
46 et al., 2009; Meunier and von Messling, 2011; Tscherne and Garcia-Sastre, 2011). NS1 interacts
47
48 with RIG-I and its co-activator TRIM25, leading to impaired activation of the transcription factors
49
50 that drive IFN- β expression (Gack et al., 2009). In addition, in macrophages, NS1 also inhibits
51
52 caspase 1 activation and IL-1 β production (Stasakova et al., 2005).
53
54

55
56 To clarify the host-virus interactions that shape the IL-1 β response in human lung
57
58 epithelial cells, we first examined the relative roles of host innate receptors RIG-I, TLR3, and
59
60

1
2
3 NLRP3 in the IL-1 β response in transformed and primary cells. We next analyzed the impact of
4
5 IAV NS1 on this response in association with virulence in ferrets. We provide evidence that IL-1 β
6
7 secretion is controlled by parallel pathways involving RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent
8
9 inflammasomes, with RIG-I at the most upstream position. Furthermore, we show that type I IFNs
10
11 are required for inflammasome activation and that these cytokines mediate RIG-I-dependent
12
13 regulation of TLR3 and NLRP3 expression. In support of a role for RIG-I in lung epithelial cells,
14
15 we show that NS1 modulates IL-1 β secretion. Recombinant viruses carrying NS1 from the highly
16
17 pathogenic 1918 strain inhibited IL-1 β secretion by interfering with RIG-I protein expression and
18
19 type I IFN secretion. Furthermore, 1918 NS1-dependent virulence correlated with inhibition of
20
21 both type I IFN and IL-1 β expression in IAV-infected ferrets. Altogether, our findings demonstrate
22
23 that RIG-I is pivotal to activation of the IL-1 β response of lung epithelial cells, which involves a
24
25 type I IFN-positive feedback loop.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS**Virus strain-dependent and cell type-specific IL-1 β response to IAV infection in lung epithelial cells and macrophages**

To examine inflammasome activation in response to IAV infection in lung epithelial cells, we first compared IL-1 β production in NCI-H292 lung epithelial cells with the prototypical IL-1 β response in THP-1 macrophages. Kinetics and dose-response studies with the H1N1 viruses A/Puerto Rico/8/34 (PR8) and seasonal A/USSR/90/77 (USSR), which result in low and moderate virulence respectively (Svitek et al., 2008), revealed that PR8 induced IL-1 β secretion in epithelial cells at significantly higher levels than USSR infection; this response was reversed in macrophages (Figures 1A and S1A). Despite the variable strain-dependent responses, the amount of viral RNA was not significantly different in NCI-H292 and THP-1 cells, although uniquely at 13 h it was 2-fold lower in THP-1 cells infected with PR8 compared to USSR (Figure S1B).

The abundance of IL-1 β transcripts in epithelial cells mirrored the regulation of extracellular protein concentration with a peak at 13 h post-infection (Figure S1C). By contrast, macrophages had a much higher basal level of IL-1 β mRNA compared to NCI-H292 cells (more than 1,000-fold higher basal level, and 50-fold higher after IAV infection; data not shown) which did not significantly increase in response to either PR8 or USSR infection. This suggests that post-translational mechanisms are mainly responsible for the protein response in this cell type (Figure S1C). Furthermore, in PR8- and USSR-infected cells, lactate dehydrogenase (LDH) levels (indicative of infection-induced cell death) differed by 5% in epithelial cells and 15% in macrophages (Figure S1D). These results indicate that the IL-1 β response to IAV infection in lung epithelial cells is virus specific and independent of cell death, although cell death may play a minor role in the IL-1 β response of macrophages. Pretreatment of lung epithelial cells with the pan-

1
2
3 caspase inhibitor zVAD abolished IL-1 β secretion, and the specific caspase 1 inhibitor yVAD
4
5 resulted in statistically significant inhibition (Figure 1B). Moreover, zVAD pretreatment also
6
7 inhibited p20 active caspase 1 secretion by IAV-infected cells (Figure 1C). Thus, lung epithelial
8
9 cells and macrophages IL-1 β responses depend on the activation of caspase 1 yet are differently
10
11 regulated upon IAV infection. This suggests a cell type-dependent involvement of different innate
12
13 receptors.
14
15
16
17
18
19

20 **RIG-I and TLR3 play a critical role in the IL-1 β response to IAV in a lung epithelial cell line**

21
22 RIG-I, TLR3 and NLRP3 are expressed in lung epithelial cells (Allen et al., 2009; Le Goffic et al.,
23
24 2007) To characterize the mechanism underlying the observed variations in the IL-1 β response, we
25
26 first monitored the expression levels of these three PRRs in NCI-H292 lung epithelial cells versus
27
28 THP-1 macrophages infected with PR8 and USSR (Figure 1D). Both strains upregulated the
29
30 expression levels of RIG-I and TLR3; peak levels were reached at 13 h in epithelial cells and 18 h
31
32 in macrophages (Figure 1D). RIG-I transcript levels increased 3-fold more in lung epithelial cells
33
34 than in macrophages only upon infection ($p<0.01$). By contrast, TLR3 expression was the highest
35
36 in lung epithelial cells and NLRP3 transcript levels were the highest in macrophages ($p<0.0001$)
37
38 and IAV infection uniquely upregulated NLRP3 transcript levels in NCI-H292 cells (a 10-fold
39
40 increase, $p<0.0001$). Thus, the three PRRs are differentially expressed and upregulated in response
41
42 to IAV infection in lung epithelial and macrophage cell lines.
43
44
45
46
47

48
49 To examine the respective roles of the aforementioned innate receptors in the secretion of
50
51 IL-1 β from lung epithelial cells in response to IAV infection, we used short interfering RNA
52
53 (siRNA) to specifically knock down RIG-I, TLR3, or NLRP3 expression. At 24 h post-infection,
54
55 we observed a >90% decrease in transcript (for the three receptors) and protein (for RIG-I and
56
57 TLR3) levels (Figures S1E and F; NLRP3 protein levels were undetectable). Inhibition of RIG-I
58
59
60

1
2
3 and TLR3 expression resulted in 94% and 65% decreases, respectively, in IL-1 β secretion in
4 response to IAV infection, while no effect was observed in NLRP3 knockdown cells (Figure 1E).
5
6 These results suggest that RIG-I and, to a lesser extent, TLR3 play a critical role in the IL-1 β
7 response of lung epithelial cells to IAV infection.
8
9
10
11
12
13
14

15 **RIG-I, TLR3 and NLRP3 contribute to the IL-1 β response in primary lung epithelial cells** 16 **infected by IAV**

17
18
19 To confirm our findings, we studied the relative roles of RIG-I, TLR3 and NLRP3 receptors in the
20 IL-1 β response of primary normal human bronchial epithelial cells (NHBE) isolated from five
21 donors (Table S1). First, we determined receptor transcript levels in the various cell types at the
22 peak of expression in NCI-H292 cells at 13h. PRR transcript levels in NHBE cells were generally
23 lower than in NCI-H292 cells. Compared to THP-1 cells, primary NHBE cells also expressed less
24 RIG-I and NLRP3, but had increased TLR3 expression levels (Figure 2A) (donors are presented
25 separately in Figure S2). When evaluating the NHBE IL-1 β response to PR8 and USSR infection,
26 we observed that both strains induced similar IL-1 β production, with levels significantly higher
27 than in NCI-H292 cells (12.5-fold higher; Figure 2B). Notably, the efficient and specific
28 knockdown of TLR3, RIG-I and NLRP3 receptors (Figures 2C and D) in primary NHBE cells
29 significantly reduced secretion of the active form of IL-1 β (p17) into the cell supernatant (Figure
30 2D and E). When we measured NS1 protein levels on the same immunoblots, we did not detect a
31 decrease in the intracellular or supernatant levels of NS1 protein from experimental siRNA-treated
32 cells compared to those treated with control siRNA (Figure 2D). This demonstrates that siRNA
33 treatment did not prevent or attenuate infection. The results were confirmed in cells from 3-5
34 donors using PR8 and USSR viruses (Figures 3A and B and S3E), further indicating that the
35 observed changes in IL-1 β secretion were PRR-dependent.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 We next examined the function of individual PRR in NHBE cells in more detail. Among
4 the PRRs tested, RIG-I downregulation had the strongest effect, resulting in 3.1-fold and 3.7-fold
5 greater inhibition than TLR3 and NLRP3 siRNA treatments, respectively, in both USSR- and PR8-
6 infected primary NHBE cells (Figures 2D and E, 3B, and S3E; $p < 0.0001$). The contribution of
7 TLR3 and NLRP3 to IL-1 β production in NHBE cells was confirmed using the specific agonists:
8 synthetic dsRNAs poly(I:C) and poly(A:U) for TLR3, and the pore-forming microbial toxin
9 nigericin for NLRP3 (Fig S4). The role of RIG-I was further studied using siRNA to knock down
10 the expression of its signalling partners MAVS, TRIM25 (Gack et al., 2009) and Riplet (Oshiumi
11 et al., 2010) (Figures 2C and D). Downregulation of each of these transcripts resulted in a
12 significant inhibition of the secretion of cleaved IL-1 β (Figures 2D and E) upon IAV infection.
13 Altogether, these data indicate that IAV infection triggers a potent IL-1 β response in primary
14 human lung epithelial cells. This response involved RIG-I, TLR3, and NLRP3, and RIG-I had the
15 strongest effect through a MAVS/TRIM25/Riplet-dependent signalling pathway.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **RIG-I is a pivotal regulator of inflammasome activation in IAV-infected primary lung** 37 **epithelial cells** 38 39

40 To further investigate the mechanisms of the IL-1 β response to IAV infection in primary lung
41 epithelial cells, we studied the contribution of each PRR to intracellular or activated forms of IL-1 β
42 and caspase 1 protein levels. In the absence of IAV infection, we observed that levels of
43 intracellular IL-1 β protein were diminished in cells treated with experimental versus control
44 siRNA, suggesting that RIG-I, TLR3, and NLRP3 each contribute to the IL-1 β intracellular pool in
45 primary NHBE cells (Figure 4A). During IAV infection, however, intracellular levels of IL-1 β
46 protein in epithelial cell samples treated with experimental or control siRNAs were not notably
47 different (Figure 4A). By contrast, the absolute level of IL-1 β that had undergone post-translational
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 modification and was secreted (Figure 4B), the level of activated caspase 1 (p20) in the supernatant
4 (Figure 4C), and the percentage of IL-1 β secretion (which corresponds to secreted IL-1 β
5 normalized with respect to intracellular and secreted IL-1 β) (Figure 4D) was significantly reduced
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

modification and was secreted (Figure 4B), the level of activated caspase 1 (p20) in the supernatant (Figure 4C), and the percentage of IL-1 β secretion (which corresponds to secreted IL-1 β normalized with respect to intracellular and secreted IL-1 β) (Figure 4D) was significantly reduced by downregulation of RIG-I; TLR3; NLRP3; or the RIG-I-signalling partners MAVS, TRIM25, and Riplet. The stable pro-caspase 1 observed in all samples (Figures 4E and S5A) illustrates that these siRNAs specifically inhibited caspase 1 activation.

To rule out cell death as the cause for the observed differences in IL-1 β secretion, we determined the levels of caspase 3 cleavage, a common marker of apoptosis, by immunoblot and quantified the proportion of living cells by LDH assay, a measurement of cell membrane integrity. We did not observe any differences in cleaved caspase 3 levels (Figure 4E), LDH activity (Figure 4F), or cell number (Figure S5B) between IAV-infected samples treated with control or experimental siRNAs. Taken together, these results indicate that TLR3 and NLRP3, as well as RIG-I and its downstream signalling partners MAVS, Riplet, and TRIM25, elicited inflammasome activation in response to IAV infection by regulating caspase 1 activation and consequently IL-1 β secretion independent of cell death.

To investigate possible cross-regulation between PRRs during IAV infection, we evaluated RIG-I, TLR3, and NLRP3 transcript expression in IAV-infected primary human lung epithelial cells treated with siRNAs against each PRR (Figure 4G). In the context of IAV infection, RIG-I expression was not affected by TLR3 or NLRP3 downregulation, while TLR3 and NLRP3 expression was significantly inhibited in RIG-I knockdown cells (Figure 4G). These results indicate that TLR3 and NLRP3 transcript expression is RIG-I dependent in lung epithelial cells.

To better characterize the role of RIG-I in the caspase 1-dependent IL-1 β response to IAV infection, we developed a HEK 293T reporter cell assay in which the different components required for IL-1 β activation (ASC, pro-caspase 1, and pro-IL-1 β) are produced from expression

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

vectors in the presence or absence (empty vector–transfected cells) of wild-type (WT) RIG-I protein. As a negative control, we used S183I, a loss-of-function variant of RIG-I that is unable to trigger antiviral and pro-inflammatory responses to IAV (Pothlichet et al., 2009). In the presence of WT RIG-I protein, there was a significant upregulation of the IL-1 β response to IAV PR8 (Figures 4H-I) or USSR (Figure 4I) compared to empty vector–transfected control cells. This IL-1 β response was significantly inhibited in the absence of pro-caspase 1 (Figure 4H) or in the presence of S183I (Figure 4H and I). Moreover, coimmunoprecipitation experiments revealed a direct interaction between WT RIG-I and cleaved caspase 1 only in PR8-infected cells; this correlated with the highest IL-1 β levels (ELISA, Figure 4I). By contrast, S183I RIG-I formed prominent complexes with cleaved caspase 1 (Figure 4I, immunoprecipitated RIG-I), but the total levels of cleaved caspase 1 (Figure 4I, WCL) and secreted IL-1 β (Figure 4I, bottom) were lowest in these samples. These results demonstrate that a functional RIG-I receptor is required for caspase 1–dependent inflammasome activation in response to IAV infection of epithelial cells. Furthermore, optimal IL-1 β production in primary lung epithelial cells requires RIG-I–mediated TLR3 and NLRP3 upregulation.

Type I IFNs are positive regulators of the RIG-I–dependent IL-1 β response to IAV

During IAV infection, RIG-I is a critical regulator of type I IFNs in lung epithelial cells (Le Goffic et al., 2007; Pothlichet et al., 2008), and its expression is amplified by a positive feedback loop via type I IFNs (Le Goffic et al., 2007). In primary NHBE cells, knockdown of RIG-I, but not of TLR3 or NLRP3, almost completely abrogated the IFN- β response to IAV infection (Figure S6), thereby confirming the pivotal role of RIG-I in the type I IFN response to IAV in these cells (Figure S6). The NLRP3 promoter sequence contains predicted binding sites for IFN regulatory elements (data not shown), suggesting that type I IFNs regulate the expression of this receptor, as

1
2
3 reported for RIG-I and TLR3 in lung epithelial cells (Le Goffic et al., 2007; Liu et al., 2007;
4 Pothlichet et al., 2008). To address this possibility, we used specific siRNAs to knock down
5 expression of RIG-I, IFN- β , or the type I IFN receptor I alpha chain (IFNAR1) in NHBE cells.
6
7 These siRNA treatments successfully abrogated IFN- β and IFNAR1 transcript expression (Figure
8 5A); severely reduced transcript levels of RIG-I, TLR3, and NLRP3 (Figure 5B); and significantly
9 decreased RIG-I and IFN- β (Figures 5C–E) protein levels compared to cells transfected with
10 control siRNA. Concomitant with these changes, we observed increased NS1 protein levels (Figure
11 5C and F), indicating uncontrolled IAV replication, as expected in the absence of type I IFN
12 responses.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24
25 Importantly, inhibition of the type I IFN axis also resulted in a >95% reduction in IL-1 β
26 and cleaved caspase 1 secretion (Figure 5G and H). To confirm the role of type I IFN in
27 inflammasome activation, NHBE cells were pretreated with recombinant IFN- β before challenge
28 with TLR3 (poly(I:C), Figure 5I) or NLRP3 ligands (nigericin, Figure 5J). We observed that IFN- β
29 pretreatment enhanced the IL-1 β response to poly(I:C) and nigericin challenge (Figure 5I and J) in
30 a dose-dependent manner, indicating that RIG-I-dependent type I IFN induces inflammasome
31 activation by increasing RIG-I, TLR3, and NLRP3 expression in IAV-infected primary lung
32 epithelial cells.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **1918 NS1 inhibits type I IFN-dependent RIG-I upregulation and subsequently IL-1 β**
54 **secretion**
55
56
57
58
59
60

1
2
3 NS1 is the main IAV IFN antagonist (Gack et al., 2009; Meunier and von Messling, 2011;
4
5
6 Tscherne and Garcia-Sastre, 2011). In a previous study using reassortant USSR viruses bearing the
7
8 NS1 protein of either moderately virulent USSR (WT rUSSR), attenuated PR8 (rUSSR-NS PR8),
9
10 or highly virulent 1918 (rUSSR-NS1 1918) H1N1 strains, we observed that NS1-mediated
11
12 inhibition of IFN induction correlates with the virulence of the respective virus in ferrets (Meunier
13
14 and von Messling, 2011). To investigate if NS1 proteins from different strains vary in their
15
16 interference with the cell type-specific IL-1 β response observed in lung epithelial cells and
17
18 macrophages, we quantified IL-1 β secretion in NCI-H292, NHBE (from five different donors), and
19
20 THP-1 cells after infection with different multiplicities of infection (MOI) of the NS1 recombinant
21
22 and parental viruses. rUSSR-NS PR8 was used instead of rUSSR-NS1 PR8, since replication of the
23
24 latter virus was impaired *in vitro* in an earlier study (Meunier and von Messling, 2011). In NCI-
25
26 H292 and NHBE cells, rUSSR-NS1 1918 resulted in the lowest IL-1 β levels, while rUSSR-NS
27
28 PR8 and the parental PR8 strain induced the strongest secretion. WT rUSSR resulted in
29
30 intermediate IL-1 β levels in NCI-H292 cells, but did not inhibit IL-1 β secretion in NHBE cells
31
32 (Figure 6A). By contrast, infection with rUSSR-NS PR8 or PR8 induced low IL-1 β secretion in
33
34 THP-1 cells, while the other viruses resulted in high IL-1 β secretion levels (Figure 6A). The
35
36 similar results observed for rUSSR-NS PR8 and PR8 indicate that the differences in IL-1 β
37
38 responses after USSR or PR8 infection observed in lung epithelial and macrophages cell lines
39
40 (Figure 1A) can be fully ascribed to the NS segment (Figure 6A).
41
42
43
44
45
46
47

48 To further study the impact of NS1 on the IL-1 β response in lung epithelial cells, we
49
50 focused on rUSSR-NS1 1918 relative to WT rUSSR, because 1918 NS1 inhibited IL-1 β secretion
51
52 in the two lung epithelial cell models, but not in macrophages. This indicates that 1918 NS1 can
53
54 inhibit the lung epithelial cell-specific inflammasome regulation that we described above. The
55
56 extent of IL-1 β secretion did not correlate with viral growth, which was significantly higher for
57
58
59
60

1
2
3 rUSSR-NS1 1918 than for WT rUSSR in NHBE and NCI-H292 cells (Figures 6B and S7A and B).
4
5 The differential IL-1 β response was also independent of cell death, since a <11% difference in live
6
7 cells was observed in NHBE and NCI-H292 cells infected with WT rUSSR and rUSSR-NS1 1918
8
9 (Figures 6C and S7C). More importantly, as observed earlier, the amount of secreted IL-1 β
10
11 correlated with the significantly lower levels of type I IFN (Figure 6D) and RIG-I (transcript,
12
13 Figure 6E; protein, Figure 6F and G) expressed during infection with rUSSR-NS1 1918 compared
14
15 to rUSSR. Moreover, this correlation was also independent of viral replication and protein
16
17 expression at low MOI (MOI 0.1, Figure 6B and H). These results indicate that the IL-1 β response
18
19 to IAV infection in lung epithelial cells is regulated by NS1, probably through its inhibitory action
20
21 on the type I IFN positive feedback loop required for RIG-I upregulation, and they confirm the
22
23 potent inhibitory activity of 1918 NS1.
24
25
26
27
28
29
30

31 **NS1-mediated inhibition of IL-1 β response correlates with higher virulence in ferrets**

32
33 To examine the role of the association between NS1-mediated inhibition of type I IFN and IL-1 β
34
35 responses *in vivo*, we quantified IL-1 β and IFN- β transcript levels in nasal wash cells from ferrets
36
37 infected with the different viruses in the context of an earlier study. The most severe clinical signs
38
39 were observed for rUSSR-NS1 1918, followed by WT rUSSR, while rUSSR-NS PR8 caused the
40
41 mildest disease (Meunier and von Messling, 2011 and Figure 7A). We observed an increase in IL-
42
43 1 β expression, although with significant inter-virus differences, in which rUSSR-NS1 1918
44
45 induced the lowest IL-1 β response (Figure 7B). In this experiment, IL-1 β expression levels were
46
47 positively correlated with IFN- β expression (Meunier and von Messling, 2011 and Figure 7C), as
48
49 previously observed in NHBE cells (Figures 5 and 6). Thus, NS1 protein from the highly
50
51 pathogenic human pandemic virus 1918, which results in the strongest inhibition of IL-1 β and type
52
53 I IFN responses in NHBE cells and ferrets, also results in the highest virulence in ferrets.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 **DISCUSSION**
5
6
7

8 IL-1 β plays a beneficial role in the *in vivo* innate immune response to IAV infection (Allen et al.,
9 2009; Ichinohe et al., 2009; Thomas et al., 2009). Our findings reveal a novel regulation of the
10 inflammasome in lung epithelial cells, which are both the primary target of IAV infection *in vivo*
11 and major players in the outcome of infection (Le Goffic et al., 2007; Pothlichet et al., 2008;
12 Reynolds, 2002; Sanders et al., 2011). We observed that macrophages and lung epithelial cells
13 have cell type-specific PRR expression profiles associated with strain-dependent IL-1 β secretion
14 in response to IAV and differential use of PRRs. In IAV-infected macrophages, IL-1 β secretion is
15 NLRP3, ASC, and caspase 1 dependent, and it has been suggested to be RIG-I independent (Allen
16 et al., 2009; Ichinohe et al., 2010). By contrast, in primary human lung epithelial cells, RIG-I,
17 TLR3, and NLRP3 are partially redundant for IL-1 β activation through a caspase 1-dependent
18 mechanism. RIG-I drives the IL-1 β response by promoting type I IFN secretion, which in turn
19 enhances the transcription of the three PRRs in a positive feedback loop (Figure 8). From the virus
20 side, the virulence factor NS1 inhibits type I IFN and IL-1 β responses in lung epithelial cells and
21 in nasal wash cells from IAV-infected ferrets, supporting the relevance of this mechanism *in vivo*.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Several lines of evidence support our conclusion that RIG-I is a pivotal inflammasome
42 activator in IAV-infected human lung epithelial cells. First, although there was significant
43 inhibition in TLR3 and NLRP3 knockdown cells, knockdown of RIG-I had the most dramatic
44 effect on caspase 1 activation and IL-1 β secretion, independent of the donor and the viral strain
45 used. Second, inhibition of the RIG-I signalling partners MAVS, TRIM25, and Riplet also resulted
46 in significant inhibition of caspase 1 activation and IL-1 β secretion. Third, WT RIG-I interacted
47 with cleaved caspase 1 and resulted in a significant upregulation of IL-1 β secretion in response to
48 IAV infection in reconstituted inflammasome experiments. By contrast, the S183I loss-of-function
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 variant of RIG-I (Pothlichet et al., 2009) resulted in inhibition of IL-1 β secretion, probably due to
4
5 the strong interaction of RIG-I with cleaved caspase 1. Indeed, we previously described that the
6
7 S183I SNP stabilizes CARD-dependent RIG-I homodimer and RIG-I/MAVS complexes and
8
9 inhibits RIG-I-dependent antiviral and pro-inflammatory responses in human cells (Pothlichet et
10
11 al., 2009). Thus, RIG-I directly promotes caspase 1 inflammasome activation in IAV-infected
12
13 cells, as shown in the context of VSV (Poeck et al., 2010). Fourth, TLR3 and NLRP3 upregulation
14
15 in IAV-infected NHBE cells is RIG-I dependent. Thus, RIG-I operates upstream of TLR3- and
16
17 NLRP3-dependent inflammasome activation. Fifth, stimulation of RIG-I is the major source of
18
19 type I IFN responses in lung epithelial cells, as described here and previously (Le Goffic et al.,
20
21 2007; Pothlichet et al., 2008), and type I IFN precedes and induces the IL-1 β response and caspase
22
23 1 activation, as demonstrated by knockdown of IFN- β and IFNAR1 expression.
24
25
26
27
28

29
30 To further validate the cross-talk between RIG-I, type I IFN, and IL-1 β during IAV
31
32 infection, we investigated the impact of influenza NS1 variants with a known effect on virulence
33
34 and on the type I IFN response (Meunier and von Messling, 2011). It is of note that the virus
35
36 carrying NS1 from the highly pathogenic 1918 influenza strain significantly inhibited the IL-1 β
37
38 response in ferrets and in lung epithelial cells (primary NHBE and NCI-H292 cells) compared to
39
40 NS1 from a seasonal IAV associated with moderate virulence (Meunier and von Messling, 2011;
41
42 Svitek et al., 2008). At least in primary lung epithelial cells, the 1918 NS1 also inhibited both type
43
44 I IFN and RIG-I upregulation in response to IAV infection, suggesting that its effect on IFN
45
46 induction contributes to inhibition of the IL-1 β response. NS1 has been shown to inhibit type I IFN
47
48 secretion by interacting with TRIM25 (Gack et al., 2009), a ubiquitin ligase critical for RIG-I
49
50 function; as we show here, TRIM25 is essential for IL-1 β secretion. However, the mechanism
51
52 underlying the differences in inhibition observed for NS1 from the 1918 and USSR viral strains
53
54 remains unclear, since the previously identified TRIM25-inhibiting residues E96, E97, R38, and
55
56
57
58
59
60

1
2
3 K41 are conserved (Gack et al., 2009; Meunier and von Messling, 2011). Further studies are
4
5 necessary to determine whether the 1918 NS1 inhibits TRIM25-dependent RIG-I activation to
6
7 limit antiviral and inflammasome responses, and which amino acid residues are involved in this
8
9 function.
10
11

12 The influenza virus M2 protein triggers NLRP3-dependent, but likely RIG-I-independent,
13
14 inflammasome activation in macrophages (Ichinohe et al., 2010), whereas in lung epithelial cells,
15
16 NS1 inhibits RIG-I-dependent inflammasomes. These results underscore the complexity and
17
18 specificity of virus interactions with different types of cells during pathogenesis. This suggests that
19
20 the involvement of different PRRs in inflammasome activation in different cell types and their
21
22 partial redundancy may play an important role in counteracting viral immune interference, for
23
24 instance, through NS1 in lung epithelial cells. In line with this idea, 1918 NS1 strongly inhibited
25
26 IL-1 β secretion in lung epithelial cells, which is primarily RIG-I dependent, but did not affect the
27
28 IL-1 β response of macrophages, which is NLRP3 dependent. One could hypothesize that the RIG-
29
30 I-independent inflammasome response of macrophages confers resistance to viruses with NS1
31
32 similar to 1918 NS1, which inhibits the IL-1 β response in lung epithelial cells, but not in cells of
33
34 myeloid origin.
35
36
37
38
39
40

41 In the present study, we reported that RIG-I-dependent type I IFN had a positive effect on
42
43 the secretion of protective IL-1 β in lung epithelial cells. In myeloid cells and in a mouse model of
44
45 *Candida albicans* infection, the presence of type I IFNs inhibits the IL-1 β response regulated by
46
47 activation of the NLRP3 inflammasome and increases mouse susceptibility to *C. albicans* infection
48
49 (Guarda et al., 2011). Thus, the action of type I IFNs on IL-1 β may be dependent upon cell type
50
51 and pathogen. Further IAV infection experiments in different cell types, including peripheral blood
52
53 mononuclear cells and dendritic cells, will be important in determining whether the RIG-I-
54
55 mediated type I IFN production that we observed is part of the general host response to IAV, or
56
57
58
59
60

1
2
3 whether it is specific to lung epithelial cells. It is conceivable that the differential regulation of IL-
4 1β by type I IFNs in epithelial cells versus macrophages or dendritic cells reflects the different
5
6 functions of type I IFNs, which are primarily antiviral during the early infection of lung epithelial
7
8 cells. At this time-point, it is important both to control virus growth rapidly and to produce
9
10 sufficient IL- 1β to promote cell recruitment (Allen et al., 2009; Ichinohe et al., 2009; Thomas et
11
12 al., 2009). However, at the point at which the macrophages become infected, the
13
14 immunoregulatory role of type I IFNs may become predominant, to prevent potentially deleterious
15
16 overproduction of IL- 1β by macrophages or dendritic cells.
17
18
19
20
21

22 In knockout mice, IL- 1β plays a critical role in protection against IAV in a manner that is
23
24 dependent upon caspase 1, ASC, and IL-1 receptor, but either NLRP3 dependent (Allen et al.,
25
26 2009; Thomas et al., 2009) or independent (Ichinohe et al., 2009) according to experimental
27
28 conditions. This suggests that receptors other than NLRP3 may be involved in inflammasome
29
30 activation. Our results support a critical role for IL- 1β in the innate response to IAV and virulence
31
32 in ferrets; a model that closely reproduces the clinical signs and disease severity reported in
33
34 humans. As in primary lung epithelial cells, we observed in ferrets a parallel decrease in IL- 1β and
35
36 type I IFN expression levels, as well as a strain-specific NS1-mediated interference at day 1 or 2
37
38 post-infection, which was correlated with NS1-mediated virulence. These results suggest that the
39
40 early RIG-I- and type I IFN-dependent IL- 1β response could determine virulence for the host by
41
42 regulating both the innate and adaptive immune response against IAV, due to the critical function
43
44 of IL- 1β in cell recruitment (Allen et al., 2009; Ichinohe et al., 2009; Thomas et al., 2009).
45
46
47
48
49

50 Collectively, our comparative study in lung epithelial cells and macrophages illustrates
51
52 the pivotal function, specific to lung epithelial cells, of RIG-I-mediated type I IFN antiviral
53
54 responses and inflammasome activation. Furthermore, both responses are linked by the type I IFN
55
56 positive feedback loop, which is critical for RIG-I, as well as TLR3 and NLRP3 upregulation, in
57
58
59
60

1
2
3 these cells. This central role of RIG-I in inflammasome activation may explain why IFN is a
4 critical positive regulator of the inflammasome in lung epithelial cells. The ability of a virus strain
5 to interfere with the early host response likely contributes to its virulence. The 1918 NS1-mediated
6 strong inhibition of the RIG-I/IFN- β /IL-1 β response in primary NHBE cells and in ferrets, together
7 with the positive correlation of virulence with decreased type I IFN and IL-1 β levels *in vivo*,
8 further supports this proposed mechanism. Further studies of the cross-regulation of type I IFN and
9 inflammasome responses are required to determine the beneficial versus deleterious roles of type I
10 IFN in inflammasome activation for virus control and clearance from the host. The targeting of
11 RIG-I-like receptors (RLR) with specific agonists has been proposed as a prophylaxis and
12 treatment for IAV, as it may increase antiviral innate and adaptive immunity, leading to more rapid
13 elimination of the virus (Ireton and Gale, 2011; Luke et al., 2011). Our results suggest that these
14 therapeutic strategies will not only initiate a powerful antiviral response, but also trigger a potent
15 IL-1 β response via RIG-I. Further studies of the tissue specificity of the RIG-I-dependent
16 inflammasome may be useful to determine if other epithelial tissues share the same specificity that
17 we observed in respiratory epithelial cells. This will improve our understanding of whether RLR
18 agonists may be a useful addition to our viral eradication arsenal, as well as instrumental to the
19 next generation of vaccine adjuvants.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

IAV infection in ferrets

Male ferrets (*Mustela putorius furo*) were infected intranasally as described previously (Meunier and von Messling, 2011). Experimental protocols were in accordance with the institutional guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Viruses and primary NHBE cells.

H1N1 viruses PR8 and USSR were described previously (Svitek et al., 2008). NS PR8, NS1 1918, and WT recombinant USSR (rUSSR) viruses were generated from cloned cDNA as described previously (Meunier and von Messling, 2011). All viruses were propagated in MDCK cells (ATCC CCL-34) in F-12K medium with 2 µg/ml trypsin (TRTPCK Worthington). IAV titers were quantified by standard plaque assay on confluent monolayers of MDCK cells and expressed as pfu/ml.

Primary NHBE cells (CC-2541, Lonza) from five male donors (three of caucasian origin [111011, 75008, 4F1289J] and two with African-American ancestry [118008, 7F4120]; see Table S1 for details) were grown in complete Clonetics BEGM BulletKit (Lonza) according to the manufacturer's instructions.

IAV infection and reagent stimulation of primary and transformed human cells

Human NCI-H292 lung epithelial cells (ATCC CRL-1848) were seeded at 2×10^5 cells/well in 500 µl of F-12K medium (Multicell) supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum (Hyclone). Human monocytic THP-1 cells (ATCC TIB-202) seeded at 2×10^5 cells/well were differentiated into macrophages 24 h before infection by treatment with 0.5 µM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, SIGMA) for 3 h in RPMI 1640 medium (Multicell) containing 2 mM

1
2
3 L-glutamine and 50 μ M 2-mercaptoethanol (SIGMA) and supplemented as F12-K, followed by
4
5 two washes with fresh RPMI medium. NHBE cells were seeded at 8,750 cells/well 9 days before
6
7 infection. All cells were seeded in 24-well plates and washed twice with 200 μ l/well OptiMEM
8
9 medium (Invitrogen) before infection with IAV or stimulation with poly(I:C) (1 or 5 μ g/ml,
10
11 SIGMA), poly(A:U) (100 μ g/ml, InvivoGen), or nigericin (10 μ M, InvivoGen) diluted in
12
13 OptiMEM (200 μ l/well). In IFN- β pretreatment experiments, NHBE cells were pretreated with
14
15 human IFN- β (8–1,000 IU/ml, PBL InterferonSource) before challenge with poly(I:C) or nigericin.
16
17
18
19
20
21

22 *Caspase inhibitor treatments*

23
24 NCI-H292 cells were seeded at 2.5×10^5 cells/well. The next day, cells were treated for 1 h with
25
26 yVAD, zVAD, control peptide (FMK negative control) (10 μ M, all from BioVision), or vehicle
27
28 alone (DMSO equimolar to inhibitor treatment, SIGMA) in a final volume of 150 μ l. Cells were
29
30 then infected with 50 μ l/well IAV (MOI 1; 5×10^5 pfu/ml) for 18 h before sample collection.
31
32
33
34
35

36 *siRNA-mediated gene silencing*

37
38 NCI-H292 were seeded at 1.5×10^5 cells/well 24 h before transfection with siRNA (100 nM)
39
40 obtained from Dharmacon (product numbers and target sequences in Table S3) in 2.5 μ l/well
41
42 *TransIT-siQUEST* (Mirus Bio) according to the manufacturer's instructions. NHBE cells were
43
44 seeded as described above 7 days before transfection with siRNAs (10 nM) in 3 μ l/well HiPerfect
45
46 transfection reagent (Qiagen). Nontargeting siRNAs were used as controls in all experiments. NCI-
47
48 H292 and NHBE cells were mock treated or infected with IAV (MOI 1) 48 h after siRNA
49
50 transfection.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Quantitative RT-PCR, LDH assay, percentage of living cells, immunoblots, ELISA, protein-*
4 *protein interaction analysis, and IL-1 β reporter assay*
5
6

7
8 These procedures are detailed in the supplemental experimental procedures provided online.
9

10 *Statistical analysis*
11

12 Unless otherwise stated, data are presented as mean \pm SEM of triplicate or quadruplicate samples
13 from at least three independent experiments. Statistical differences were tested using one-way
14 ANOVA followed by Fisher's test, with a threshold of $p < 0.05$ in all Figures. Probability indicated
15 by asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. In experiments with siRNA-transfected cells,
16 mock-treated or IAV-infected cells transfected with specific siRNA were respectively compared to
17 control siRNA-transfected cells that were mock treated or infected with IAV.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **ACKNOWLEDGEMENTS**
4

5 This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (SMV and VvM),
6
7
8 Canada Research Chair in Host Response to Virus Infections (SMV), Armand-Frappier Foundation
9
10 and FRSQ scholarships (IM), and the National Institutes of Health (JPYT).
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FUNDING

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [MOP-89821 to S.M.V and PAN-83146 to V.v.M], and the National Institutes of Health [U19-AI067798, U19-AI077437 and U54-AI057157 to J.P.Y.T]. S.M.V. holds a Canada Research Chair.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest or financial interests.

1
2
3 **REFERENCES**
4
5
6
7

8 Allen, I.C., Moore, C.B., Schneider, M., *et al.* (2011). NLRX1 protein attenuates inflammatory
9 responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-kappaB signalling
10 pathways. *Immunity* 34, 854-865.
11
12

13
14
15 Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., *et al.* (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo
16 innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30, 556-565.
17
18

19 Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., *et al.* (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-
20 mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
21
22

23
24 Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., *et al.* (2009). Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin
25 ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 5,
26 439-449.
27
28

29
30
31 Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., *et al.* (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production
32 and inflammasome activation. *Immunity* 34, 213-223.
33
34

35
36 Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.
37
38 *Science* 314, 994-997.
39
40

41 Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., *et al.* (2009). Inflammasome recognition of influenza virus is
42 essential for adaptive immune responses. *J. Exp. Med.* 206, 79-87.
43
44

45
46 Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its
47 intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.* 11, 404-410.
48
49

50 Ireton, R.C., and Gale, M., Jr. (2011). RIG-I Like Receptors in Antiviral Immunity and Therapeutic
51 Applications. *Viruses* 3, 906-919.
52
53

54
55 Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., *et al.* (2006). Detrimental contribution of the Toll-like
56 receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* 2, e53.
57
58
59
60

1
2
3 Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., *et al.* (2007). Cutting Edge: Influenza A virus activates
4 TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial
5 cells. *J. Immunol.* *178*, 3368-3372.
6
7

8
9
10 Liu, P., Jamaluddin, M., Li, K., *et al.* (2007). Retinoic acid-inducible gene I mediates early
11 antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway
12 epithelial cells. *J. Virol.* *81*, 1401-1411.
13
14

15
16
17 Loo, Y.M., and Gale, M., Jr. (2011). Immune signalling by RIG-I-like receptors. *Immunity* *34*,
18 680-692.
19

20
21
22 Luke, J.M., Simon, G.G., Soderholm, J., *et al.* (2011). Coexpressed RIG-I agonist enhances
23 humoral immune response to influenza virus DNA vaccine. *J. Virol.* *85*, 1370-1383.
24

25
26
27 Meunier, I., and von Messling, V. (2011). NS1-mediated delay of type I interferon induction
28 contributes to influenza A virulence in ferrets. *J. Gen. Virol.* *92*, 1635-1644.
29

30
31
32 Oshiumi, H., Miyashita, M., Inoue, N., *et al.* (2010). The ubiquitin ligase Riplet is essential for
33 RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* *8*, 496-509.
34

35
36
37 Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., *et al.* (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-
38 stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997-1001.
39

40
41
42 Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., *et al.* (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in
43 activation of CARD9 and inflammasome signalling for interleukin 1 beta production. *Nat.*
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
60 Immunol. *11*, 63-69.

59
60 Pothlichet, J., Burtsey, A., Kubarenko, A.V., *et al.* (2009). Study of human RIG-I polymorphisms
identifies two variants with an opposite impact on the antiviral immune response. *PLoS One* *4*,
e7582.

1
2
3 Pothlichet, J., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2008). Cutting edge: innate immune response
4 triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-
5
6 I/IFNAR1-dependent pathway. *J. Immunol.* *180*, 2034-2038.
7

8
9
10 Reynolds, H.Y. (2002). Modulating airway defenses against microbes. *Curr. Opin. Pulm. Med.* *8*,
11
12 154-165.
13

14
15 Sanders, C.J., Doherty, P.C., and Thomas, P.G. (2011). Respiratory epithelial cells in innate
16
17 immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res.* *343*, 13-21.
18

19
20 Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., *et al.* (2005). Influenza A mutant viruses with altered NS1
21
22 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast
23
24 apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J. Gen. Virol.* *86*, 185-195.
25

26
27 Svitek, N., Rudd, P.A., Obojes, K., *et al.* (2008). Severe seasonal influenza in ferrets correlates
28
29 with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* *376*, 53-59.
30

31
32 Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu.*
33
34 *Rev. Pathol.* *3*, 499-522.
35

36
37 Thomas, P.G., Dash, P., Aldridge, J.R., Jr., *et al.* (2009). The intracellular sensor NLRP3 mediates
38
39 key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* *30*,
40
41 566-575.
42

43
44 Tscherne, D.M., and Garcia-Sastre, A. (2011). Virulence determinants of pandemic influenza
45
46 viruses. *J. Clin. Invest.* *121*, 6-13.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS**Figure 1. IL-1 β response to IAV infection is RIG-I and TLR3-dependent, but NLRP3 independent, in NCI-H292 lung epithelial cells.**

(A) Kinetics of IL-1 β production in cell-free supernatants from NCI-H292 cells and THP-1–derived macrophages infected with mock, USSR or PR8 (MOI 0.5) for various times (** p <0.001, compare USSR- and PR8-infected cells). (B) NCI-H292 cells pretreated with vehicle, control peptide, yVAD (caspase 1 specific inhibitor), or zVAD (caspase-family inhibitor) and infected with mock, USSR or PR8. IL-1 β (B) and active caspase 1 p20 product (C) quantified by ELISA in the same supernatants. (D) Kinetics of RIG-I, TLR3, and NLRP3 expression in NCI-H292 cells and THP-1–derived macrophages treated under same conditions as in (A). Data presented as fold-increase relative to unstimulated THP-1–derived macrophages (0 h) for RIG-I and TLR3 or NCI-H292 for NLRP3. (E) IL-1 β concentration determined by ELISA in cell-free supernatants 18 h post-infection with PR8 IAV of NCI-H292 cells transfected with nontargeting siRNA (control) or siRNA targeting RIG-I, TLR3, or NLRP3. * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

Figure 2. IAV infection triggers a RIG-I-, TLR3-, and NLRP3-dependent IL-1 β response in primary lung epithelial cells.

(A) RIG-I, TLR3, and NLRP3 mRNA expression in NCI-H292, NHBE (n =4 donors) and THP-1–derived macrophages 13 h post-USSR infection (+IAV, MOI 1). Data presented as fold-increase relative to mock-treated NHBE cells. (B) Dose response of IL-1 β production in mock-treated, USSR-, and PR8-infected NHBE cells (n =5 donors) with different MOI for 18 h. (C) RIG-I, TLR3, NLRP3, and Riplet mRNA expression in primary cells transfected with control or corresponding specific targeting siRNA before infection with mock or USSR for 13 h. Data expressed as fold-increase relative to control siRNA and mock-treated cells. (D) Immunoblot analysis of intracellular

1
2
3 RIG-I, MAVS, TRIM25, NS1, and β -actin proteins (cells) and cleaved IL-1 β (p17) and secreted
4 NS1 proteins in cell-free supernatants (Sn) of NHBE cells transfected with control or indicated
5 siRNA. Samples were collected 18 h post-infection with USSR (+) or mock (-). The same
6 membrane was probed with all specific antibodies. (E) IL-1 β response quantified by ELISA in cell-
7 free supernatants analyzed by immunoblot (Figure 3D). (D) immunoblot and (E) IL-1 β responses
8 represent one out of two and five experiments, respectively.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **Figure 3. IL-1 β response depends upon RIG-I, TLR3, and NLRP3 in primary NHBE cells**
21 **from different donors.**
22

23
24 (A) IL-1 β production in cell-free supernatants from NHBE cells isolated from five donors
25 transfected with control, RIG-I, TLR3, or NLRP3 siRNA 18 h post-infection with mock or USSR
26 (+IAV). (B) Percentage of IL-1 β response in IAV-infected cells transfected with control siRNA.
27 Data are mean \pm SEM of the five experiments presented in (A). * p <0.05, ** p <0.01, and
28 *** p <0.001.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Figure 4. RIG-I-dependent caspase 1 activation is critically involved in IL-1 β response to**
40 **IAV.**
41

42
43 (A) Intracellular IL-1 β , (B) secreted IL-1 β , and (C) cleaved caspase 1 p20 in cell-free supernatants
44 from siRNA transfected-NHBE 18 h after mock or USSR infection (+IAV). (D) Percentage of IL-
45 1 β secretion represents ratio of secreted IL-1 β normalized with respect to total IL-1 β production
46 (intracellular and secreted IL-1 β). (E) Immunoblots to analyze pro-caspase 1, cleaved caspase-3,
47 and β -actin protein expression in cells stimulated as in (A–D). (F) Percentage of living cells
48 determined by LDH assay. (G) RIG-I, TLR3, and NLRP3 mRNA expression in siRNA-transfected
49 NHBE cells ($n=4$ donors) 13 h after mock or USSR infection (+IAV). (A–G) Experiments were
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 performed on 3–5 NHBE donors, with the exception of (E), where one representative experiment
4 out of two on two different donors is presented. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (H and I) IL-
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
IL-1 β production assay in cell-free supernatants of HEK 293T cells transfected with empty vector
(control), FLAG-WT RIG-I, or FLAG-S183I RIG-I cotransfected with ASC, pro-IL-1 β expression
vectors together with pro-caspase 1 expression vector (+), or empty vector (-). Cells were infected
with mock, PR8 or USSR. (I) RIG-I interaction with cleaved caspase 1 was assessed in cells
transfected with pro-caspase 1 expression vector. RIG-I was immunoprecipitated (IP RIG-I) and
immunoblotted (RIG-I) with anti-FLAG antibody. Antibody against cleaved caspase 1 p20 was
used to study cleaved caspase 1 interactions with RIG-I (IP RIG-I). IL-1 β production in
supernatants of the same samples is presented in bottom panel. WCL, whole cell lysates. (H and I)
*** $p < 0.001$, compare +caspase 1 with -caspase 1; ### $p < 0.001$ WT or S183I RIG-I compared with
empty vector (control). §§§ $p < 0.001$ WT compared with S183I RIG-I.

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Figure 5. IL-1 β response to IAV depends upon type I IFN-mediated RIG-I signalling.

(A) NHBE cells were transfected with control or IFN- β -, IFNAR1-, or RIG-I-targeting siRNA
followed by mock or USSR (+IAV) infection for 18 h. IFN- β and IFNAR1 expression was
quantified by qRT-PCR. (B) RIG-I, TLR3, and NLRP3 expression in NHBE cells transfected with
control siRNA or siRNA targeting IFN- β or IFNAR1. Data are fold-increase relative to RIG-I
siRNA-transfected and IAV-infected cells (A) or control siRNA-transfected and mock-treated cells
(B). (C) Immunoblot of RIG-I, β -actin, and NS1 in NHBE cells stimulated as in (A). Ratio of IFN-
 β (D), RIG-I (E), and NS1 (F) protein signals on immunoblots normalized to β -actin signal. (G) IL-
1 β and (H) cleaved caspase 1 p20 production in cell-free supernatants of NHBE cells stimulated as
in (A). (A–H) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (I and J) NHBE cells were pretreated with
various amounts of recombinant human IFN- β for 24 h (I) or 6 h (J) before a 22 h challenge with

1
2
3 poly(I:C) (I) or nigericin (J). IL-1 β secretion was quantified by ELISA in cell-free supernatants.
4
5 * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 IFN- β pretreated compared with untreated cells for a given
6
7 stimulation condition.
8
9

10
11
12 **Figure 6. Pandemic virus 1918 NS1 inhibits IL-1 β response and downregulates type I IFN-**
13 **mediated RIG-I upregulation.**
14
15

16
17 (A) NHBE cells from five donors were infected with various MOI of mock, WT PR8, WT rUSSR,
18 rUSSR-NS1 1918, or rUSSR-NS PR8 for 18 h. NCI-H292 cells and THP-1-derived macrophages
19 were similarly stimulated for 24 h. IL-1 β production in cell-free supernatants was quantified by
20 ELISA. (B) Virus M2 RNA level normalized with respect to the β -actin level in NHBE infected as
21 in (A). (C) Percentage of living cells determined by LDH assay. (D) IFN- β and (E) RIG-I mRNA
22 levels normalized with respect to the β -actin level in NHBE cells 18 h post-IAV infection. (B, D,
23 and E) Data are mean \pm SEM of quadruplicates of qRT-PCR of two experiments on NHBE donor
24 111011. Results are expressed as fold-increase relative to WT rUSSR-infected cells with MOI 0.1
25 (B and D) and relative to unstimulated cells (E). (F) Immunoblot of RIG-I, NS1, and β -actin and
26 quantification of (H) RIG-I/ β -actin or (G) NS1/ β -actin protein signal ratio in NHBE cells either
27 infected with mock, or rUSSR WT or NS1 1918 for 18 h. One representative immunoblot out of
28 three is presented. (G and H) Results are mean \pm SEM of three immunoblots from independent
29 experiments. (A–H) * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 NS1 1918 compared with WT rUSSR
30 infected cells. # p <0.05, ## p <0.01, and ### p <0.001 NS PR8 compared with NS1 1918 rUSSR.
31 § p <0.05, §§ p <0.01, and §§§ p <0.001 NS PR8 compared with WT rUSSR.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **Figure 7. 1918 NS1 inhibits IL-1 β response and type I IFN response and results in higher**
57 **virulence *in vivo* in ferrets.**
58
59
60

1
2
3
4 (A) Schematic representation of pathogenesis upon infection with rUSSR-NS1 1918, rUSSR-NS
5
6 PR8, or WT rUSSR, as previously described (Meunier and von Messling, 2011). (B) Kinetics of
7
8 IL-1 β mRNA response to rUSSR-NS PR8 ($n=10$), WT rUSSR ($n=8$), and rUSSR-NS1 1918 ($n=8$)
9
10 in cells from nasal wash of infected ferret at days 1, 2, and 3 post-infection. (C) Kinetics of IFN- β
11
12 mRNA response to rUSSR-NS PR8, WT rUSSR, and rUSSR-NS1 1918 under the same
13
14 experimental conditions as (B). Data presented as log₁₀ of IL-1 β or IFN- β mRNA copy number
15
16 per nanogram of RNA with mean \pm SEM, and calculated from a standard curve generated from *in*
17
18 *vitro*-transcribed mRNA of known concentration. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$.
19
20
21
22
23
24

25 **Figure 8. Propose model of RIG-I as a pivotal regulator of the inflammasome response**
26 **against IAV in lung epithelial cells.**
27

28
29
30 Upon IAV infection, RIG-I senses viral genomic RNA and triggers a type I interferon response
31
32 through a MAVS/TRIM25/Riplet pathway. Type I interferon binding to type I interferon receptor 1
33
34 α chain (INFA1) initiates a positive feedback loop that stimulates RIG-I/TLR3/NLRP3
35
36 expression. This up-regulation is necessary for inflammasome assembly, cleavage of caspase 1 and
37
38 ultimately mature IL-1 β secretion. Thus, inhibition of RIG-I dependent type I interferon response
39
40 by NS1 from the highly virulent pandemic 1918 influenza strain results in decreased IL-1 β
41
42 secretion.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 1 Pothlichet et al.,

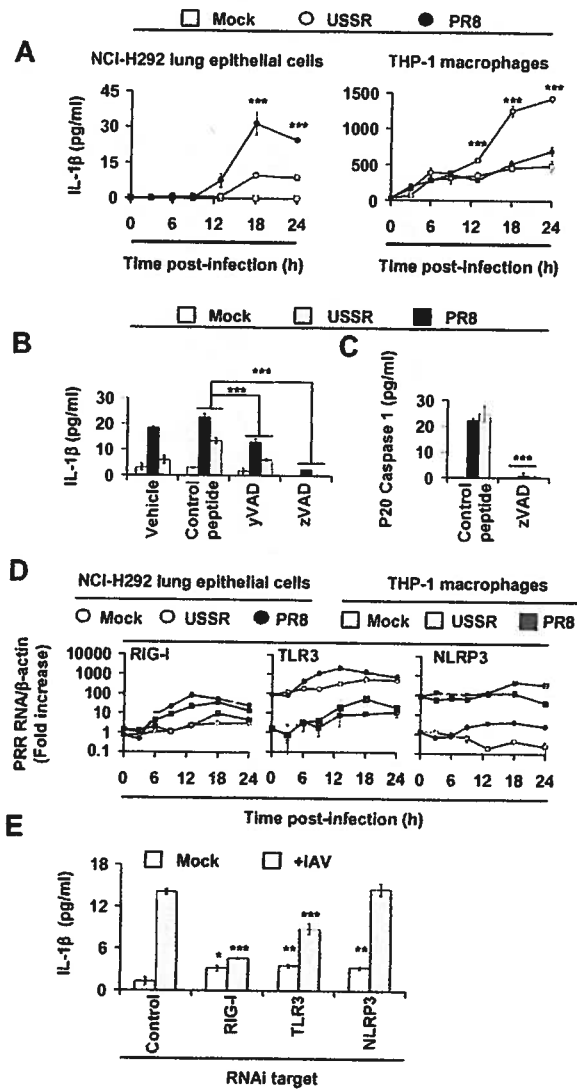


Fig. 2 Pothlichet et al.,

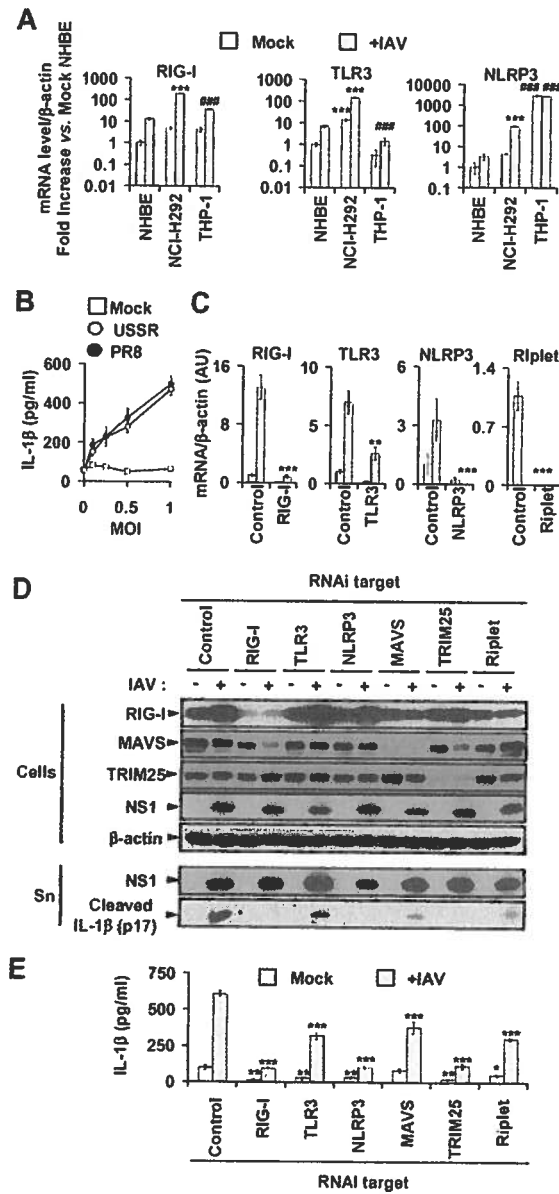
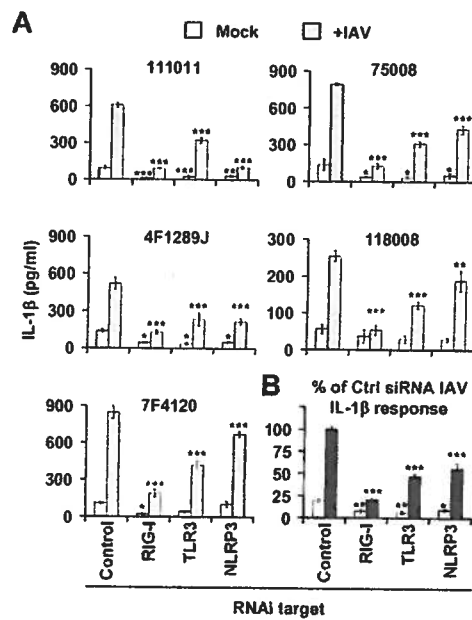


Fig. 3 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 4 Pothlichet et al.,

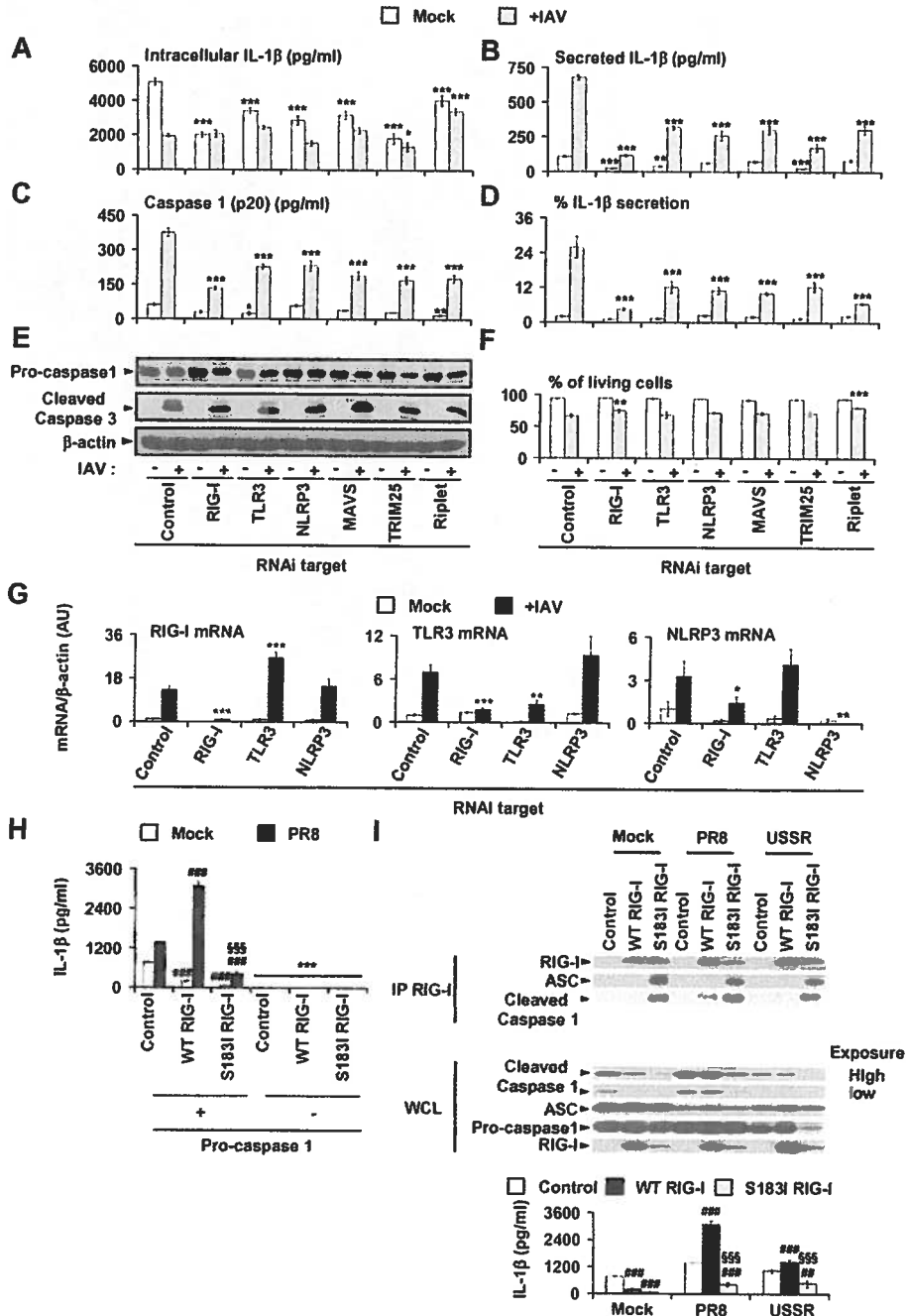


Fig. 5 Pothlichet et al.,

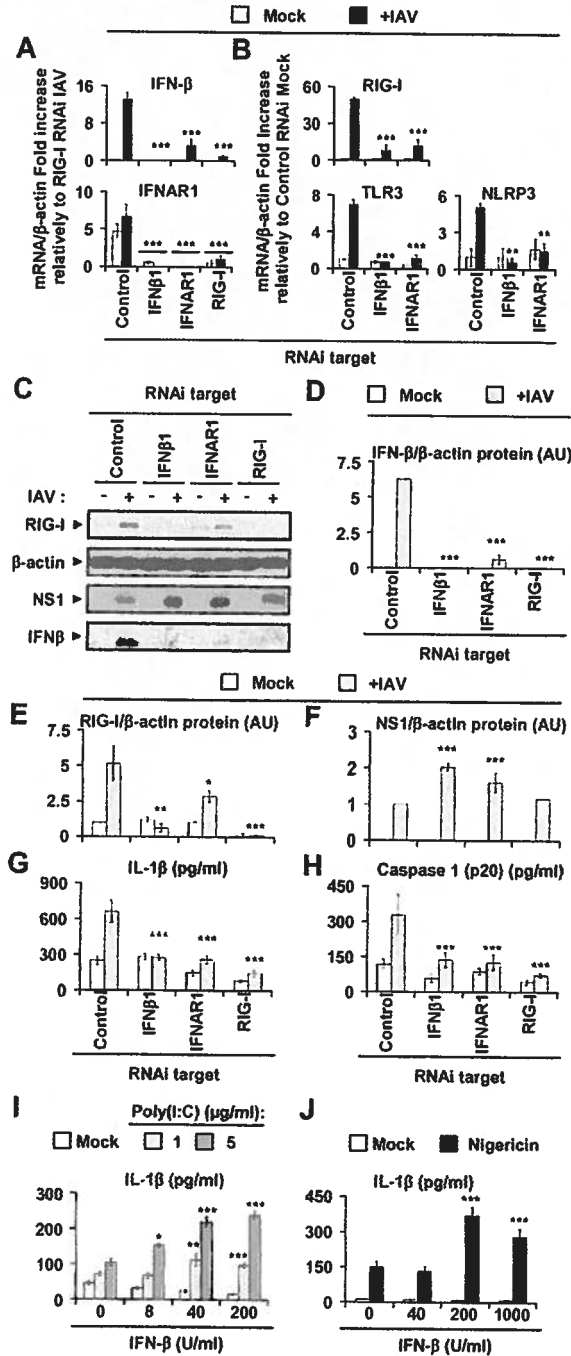
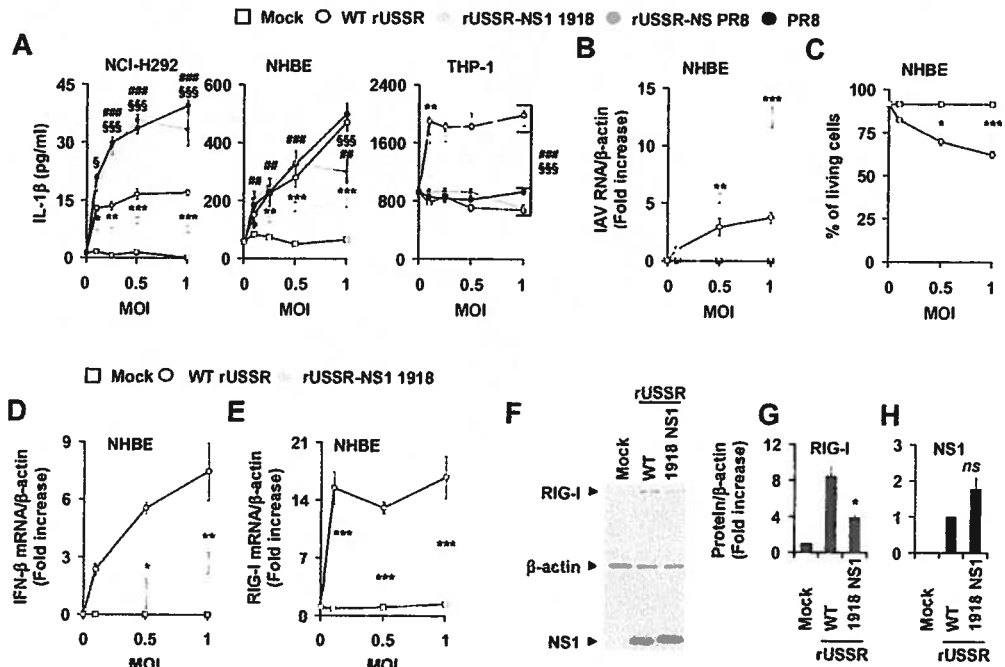


Fig. 6 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. 7 Pothlichet et al.,

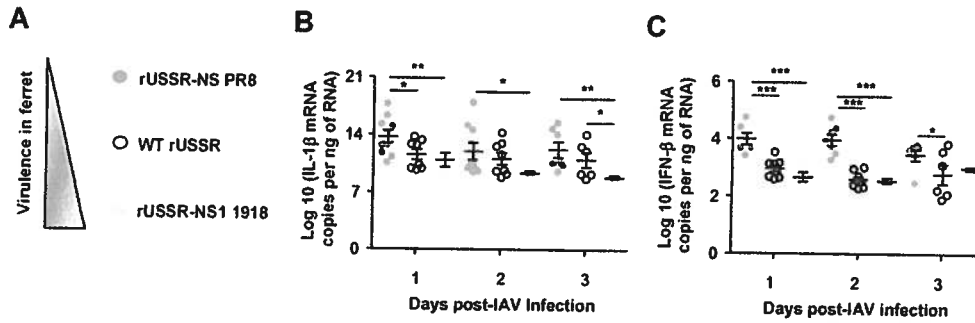
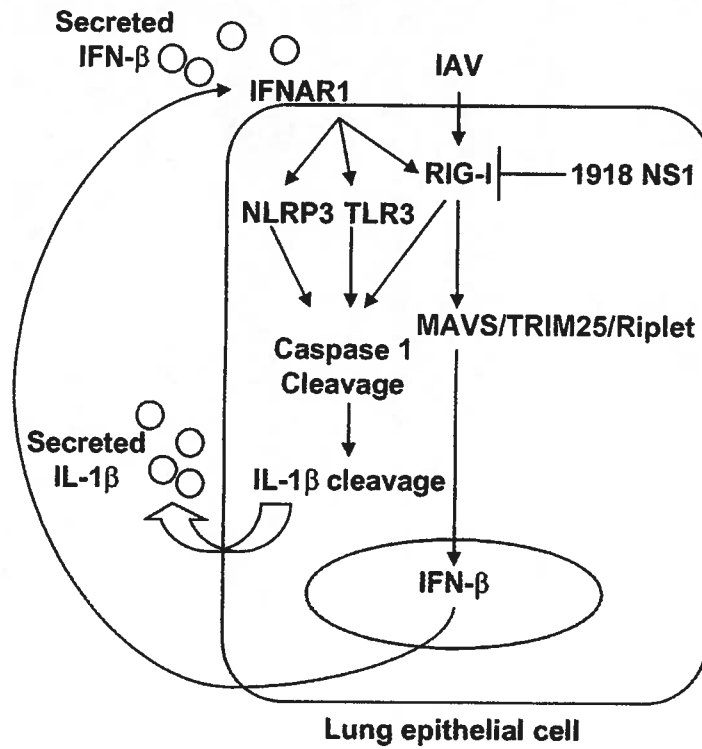


Fig. 8 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES
4
5
6
78 ***Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis***
9

10 cDNA were obtained from 1 µg of total RNA extracted using the RNeasy Kit (Qiagen), treated
11 with DNase I (Roche), and reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen)
12 according to the manufacturer's instructions. IAV M2 RNA and β-actin, RIG-1, TLR3, NLRP3,
13 Riptet, IFN-β, IFNAR1, and IL-1β mRNA levels were quantified using SYBR Green PCR
14 master mix according to the manufacturer's instructions. Primer sequences and procedure
15 details are provided in Table S2. Duplicate cycle threshold (CT) values were analyzed with the
16 comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method (Applied Biosystems). The relative amount of mRNA
17 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was obtained by normalizing to the endogenous β-actin reference in all experiments.

18 Ferret IL-1β and IFN-β expression in nasal washes was quantified by qRT-PCR with specific
19 primers for these genes (see sequences in Table S2), which were designed based on ferret
20 sequences (NCBI accession numbers: IFN-β, EF368208 and IL-1β, AB301555.1). RNA from
21 nasal wash cells was obtained from a previous study and qRT-PCR was performed as described
22 previously (Meunier and von Messling, 2011). Briefly, nasal washes were collected daily for
23 the first 3 days post-infection. To do so, 500 µl of PBS was instilled in one nostril and the
24 expectorate was collected in a 50 ml centrifuge tube. Immediately after collection, 140 µl of
25 nasal wash fluid was mixed with 560 µl of AVL buffer (QIAamp Viral RNA Mini kit; Qiagen).
26 The RNA was extracted following the manufacturer's instructions and qRT-PCR was
27 performed as described previously (Meunier and von Messling, 2011). The number of RNA
28 copies was determined according to the following formula: number of copies = amount of RNA
29 (ng) × 6.022 × 10²³/mRNA length (base) × 10⁹ × 340.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Lactate dehydrogenase (LDH) assay determination of percentage of living cells

The percentage of living cells was determined with the LDH assay kit (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, Roche) based on the quantification of the activity of LDH released from the cytosol of dying cells. Of cells stimulated in 200 μ l of medium, 100 μ l were collected to quantify LDH activity. Cells were then disrupted in the 100 μ l of remaining supernatant with 20 μ l of lysis buffer (Roche) to quantify total (intracellular plus extracellular) LDH activity. Percentage of living cells = 100 – LDH activity released in supernatants/total LDH activity.

Immunoblotting

To study gene silencing effects at the protein level, NCI-H292 or NHBE cells in 24-well plates were disrupted for 30 min at 4°C in 150 μ l of a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1% dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail. Cytosolic proteins were recovered from the supernatant after centrifugation at 15,000 \times g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were determined using BCA reagent (Pierce). Protein samples were treated as previously described (Pothlichet et al., 2008) and were electrotransferred to a nitrocellulose membrane and probed using an antibody specific for RIG-I (1:2,000, ALX-804-849; Enzo Life Science), TLR3 (1:500, IMG-315A; IMGENEX), MAVS (1:2,000, ALX-210-929; Enzo Life Science), TRIM25 (1:15,000, #610570; BD Transduction Laboratories), NS1 (1:200, sc-130563; Santa Cruz Biotechnology), β -actin (1:10,000, #A 2228; Sigma-Aldrich), cleaved (p17) IL-1 β (1:1,000, #2021; Cell Signaling Technology), pro-caspase 1 (1:1,000, #2225; Cell Signaling Technology), and cleaved caspase-3 (1:1,000, #9664; Cell Signaling Technology), or against the c-Myc epitope of c-Myc-ASC (1:500, C3956; Sigma-Aldrich). Bound antibodies were detected using the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

ELISA

Protein concentrations in cell-free supernatants were determined using the Quantikine ELISA kit for human cleaved p20 caspase 1 (R&D Systems) or Duoset ELISA kit (R&D Systems) for human cytokines IL-1 β (DY201). Percentage of control siRNA IAV IL-1 β response = IL-1 β response in knockdown cells/control siRNA IL-1 β response in IAV-infected cells \times 100. Total IL-1 β represents intracellular (in cell lysates) and secreted (in supernatants) IL-1 β cytokine in samples prepared to quantify total LDH activity as described above in the LDH assay procedure. Intracellular IL-1 β = total – secreted IL-1 β amount. Percentage of IL-1 β secretion = secreted IL-1 β /IL-1 β total in the same sample \times 100.

IL-1 β reporter assay and protein–protein interaction analysis

HEK 293T cells seeded into 6-well plates were transiently cotransfected using Fugene 6 (Roche) as described previously (Pothlichet et al., 2009) with 2 μ g of a control plasmid (pEFBOS(+)) or pEFBOS vectors encoding Flag-tagged (N-ter) WT RIG-I or S183I RIG-I, as described previously (Pothlichet et al., 2009), together with 250 ng of pCDNA3.1D-pro-hIL-1 β -Flag (Cter), 31.25 ng of pCDNA3.1D-pro-caspase 1-V5-His, 8 μ g of pCDNA3-MycASC and 100 ng of pRSV- β -gal (to check transfection efficiency). Cells were mock treated or infected with USSR or PR8 viruses (MOI 1) 24 h after transfection. Cell-free supernatants were collected 16 h post-infection for IL-1 β analysis and cells were directly disrupted into the well by adding 1% Triton X-100, 1% dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail. Samples were further processed as described previously (Pothlichet et al., 2009), and coimmunoprecipitation was performed in 600 μ l on 2,400 μ g of cell lysate with 50 μ l of protein G sepharose (BioVision) and 4 μ g of anti-Flag antibody (M2, SIGMA) and protein complexes were analyzed by immunoblotting with antibodies against Flag epitope, cleaved caspase 1.

For the IL-1 β reporter assay, the IL-1 β cytokine concentration was determined by ELISA, and β -galactosidase activity was measured by mixing 20 μ l of cell lysate with 50 μ l of buffer

1
2
3 containing 1.33 mg/ml ONPG substrate, 100 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂, and 200
4
5 mM Na₂HPO₄ (pH 7.3). Activity was quantified at 450 nm with a plate reader. IL-1 β responses
6
7
8 are presented after normalization with β -galactosidase activity.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table S1: NHBE donors.

Donor#	Donor Age	Donor Ethnic Background
75008	54 Y	Caucasian
111011	67 Y	Caucasian
4F1289J	24 Y	Caucasian
118008	19 Y	African American
7F4120	19 Y	African American

Table S2: qRT-PCR primer sequences.

Genes	Primer Sequence 5'-3'	T _m (°C)	SYBR Green Mix
IAV M2	F:AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA R:CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC	60	QuantiTect
h β -actin	F:AAGGAGAAGCTGTGCTAGGTTCGC R:AGACAGCACTGTGTTGGCGTACA	54	QuantiTect
hRIG-I	F:CTCTGCAGAAAGTGCAAAGC R:GGCTTGGGATGTGGTCTACT	60	Platinum
hTLR3	F:GGTCCAAGCCTTCAACGA R:GGTGAAGGAGAGCTATCCACATTT	60	Platinum
hNLRP3	F:AAAGAGATGAGCCGAAGTGGG R:TCAATGCTGTCTTCCTGGCA	60	Platinum
hRiplet	F:GTGGATCTTCCATGGCTTC R:AGTTCTCCCTGCATTTGTGC	60	QuantiTect
hIFN- β	F:CATTACCTGAAGGCCAAGGA R:CAATTGTCCAGTCCCAGAGG	60	Platinum
hIFNAR1	F:AGAAGTACATTTAGAAGCTG R:AGTGCTGCTTTAACTTT	48	QuantiTect
hIL-1 β	F:TCCAGGGACAGGATATGGAG R:TCTTTCAACACGCAGGACAG	60	Platinum
fIL-1 β	F:TTCTTTGAGGCTGATGGTCC R:ACACGAAATGGCTCAGACTC	58	QuantiTect
fIFN- β	F:ACACTGCACTGGCAGAAGGAACAT R:TATTGTCCAGGCACAGACGCTGAA	58	QuantiTect

h: human ; f :ferret

QuantiTect: QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen

Platinum: Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG, Invitrogen

Table S3: short interfering RNA (siRNA) sequences

Gene	Pool#	Target Sequence
hIFNARI	M-020209-00	AGAUAAAGGCAAUAGUGAUA GUCAGAAUAAUUACUAGUAC GAAUUUACCUUCUCCGCGU GCGAAAGUCUUCUUGAGAU
hIFN- β 1	M-019656-01	GCUAAUGUACUGCAUAUGA UGGC'UAAUGUCUAUCAUCA CAACAAGUGUCUCCUCCAA GGAAUGAGACUAUUGUUGA
hRIG-I	M-012511-01	CAACCGAUUAUCAUUUCUGA AGACAUGGGUAUAGAGUUA GCACAGAAGUGUAUAUUGG CAGAAGAUCUUGAGGAUAA
hTLR3	M-007745-00	GAAGCUAUGUUUGGAAUUA GAUCAUCGAUUUAGGAUUG GAAGAGGAAUGUUUAAUCU CAACAUAGCCAACAUAUAAU
hNLRP3	M-017367-00	GGAUCAAACUACUCUGUGA GCAAAGGGCCAUGGACUAU UGCAAGAUCUCUCAGCAA GAAGUGGGGUUCAGAUAAU
hRiplet	I.-007087-00	UAGAGAAGAGCAUCACAGA GGACCUGGCCGACAAGUAC UGGAACAUCUUGUAGACAU CAUCCAACCUUUAAUUAUGA
hTRIM25	I.-006585-00	CGGAACAGUUAGUGGAUUU CAACAAGAAUACACGGAAA GCGGAUGACUGCAAACAGA GGGAUGAGUUCGAGUUUCU
hMAVS	MAVS.1 MAVS.2	UAGUUGAUCUCGCGGACGA CCGUUUGCUGAAGACAAGA

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1. Changes in IL-1 β concentration, IAV viral load, IL-1 β mRNA levels, and cell death in response to USSR and PR8 infection of NCI-H292 and THP-1 macrophages.

(A) Cell-free supernatants were analyzed for dose-response production of IL-1 β in NCI-H292 lung epithelial cells and THP-1-derived macrophages either mock treated (Mock) or infected with various MOI of USSR or PR8 for 24 h. (B and C) Kinetics of viral RNA (B) and IL-1 β mRNA (C) expression in NCI-H292 cells and THP-1 macrophages. Total RNA was isolated from cells stimulated in Figure 1A, and IAV M2 RNA (B) and IL-1 β mRNA (C) expression was investigated by qRT-PCR. Gene expression was normalized to that of β -actin. Results are mean \pm SEM of quadruplicate qRT-PCR presented as fold-increase relative to USSR-infected cells 3 h post-infection. (D) Percentage of living cells according to LDH assay in stimulated cells in (A). (A–D) * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 USSR-infected compared with PR8-infected cells. (E) NCI-H292 cells were transfected with nontargeting siRNA (control) or siRNA targeting RIG-I, TLR3, or NLRP3 for 48 h before 18 h of infection with PR8 IAV (MOI 1). Gene expression normalized with respect to β -actin expression and presented as mean \pm SEM of fold-increase of targeted gene expression in control and experimental siRNA-transfected cells relative to mock-treated cells transfected with control siRNA. *** p <0.001 mock-treated or IAV-infected cells transfected with specific siRNA respectively compared with control siRNA-transfected cells mock treated or infected with IAV. (E) Immunoblot analysis of RIG-I, TLR3, and β -actin protein in NCI-H292 cells transfected with siRNA and infected with PR8 (+) or mock treated (-) for 24 h.

1
2
3 **Figure S2. qRT-PCR data from four independent donors presented as pools in Figure 2A.**

4 RIG-I, TLR3, and NLRP3 mRNA expression in NCI-H292 cells, primary NHBE cells from
5
6 four different donors ($n=4$ experiments), and THP-1–derived macrophages (THP-1) 13 h post-
7
8 USSR infection. Data are mean \pm SEM of fold-increase relative to mock-treated NHBE cells.
9
10

11
12
13
14
15 **Figure S3. Similar to the response to USSR, RIG-I–dependent caspase 1 activation is**
16
17 **pivotal for IL-1 β response to PR8 IAV.**

18
19 (A) IL-1 β production in cells, (B) active cleaved caspase 1 p20, and (C) secreted IL-1 β in cell-
20
21 free supernatants from siRNA-transfected NHBE cells ($n=3$ donors) 18 h post-PR8 infection
22
23 (MOI 1) or mock treatment (Mock). (D) Percentage of IL-1 β secretion represents normalization
24
25 of secreted IL-1 β with respect to total (intracellular and secreted) IL-1 β production. (E)
26
27 Percentage of IL-1 β response in control siRNA-transfected and IAV-infected cells. (A–E) Data
28
29 are mean \pm SEM of quadruplicates of stimulation. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ mock-
30
31 treated or IAV-infected cells transfected with specific siRNA respectively compared with
32
33 control siRNA-transfected cells mock treated or infected with IAV.
34
35
36
37
38
39
40

41 **Figure S4. TLR3 and NLRP3 ligands are sufficient to induce IL-1 β response in primary**
42
43 **NHBE cells and THP-1 macrophages, but NCI-H292 cells are uniquely responsive to**
44
45 **TLR3 stimulation.**

46
47 (A) NCI-H292 lung epithelial cells, (B) primary lung epithelial NHBE cells, and (C) THP-1–
48
49 derived macrophages were stimulated for 22 h with mock treatment, TLR3 ligands poly(I:C) (5
50
51 $\mu\text{g/ml}$) or poly(AU) (100 $\mu\text{g/ml}$), or NLRP3 ligand nigericin (10 μM) for 22 h. IL-1 β
52
53 production in cell-free supernatants was quantified by ELISA. Data representative of three
54
55 independent experiments and presented as mean \pm SEM of triplicates of stimulation of NCI-
56
57 H292, THP-1, and pooled of three experiments on NHBE cells from three donors (75008,
58
59
60

1
2
3 118008, and 4F1289J). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ stimulated cells compared with
4
5 mock-treated cells.
6

7
8 **Figure S5. Differential IL-1 β secretion is not due to significant pro-caspase 1 protein**
9 **downregulation or inhibition of cell growth in targeted knockdowns.**
10

11 (A) Immunoblotting of pro-caspase 1 and β -actin protein in knockdown cells from two different
12 NHBE donors (111011 and 4F1289J). (B) Total LDH activity in knockdown cell lysates and
13 supernatants. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ mock-treated or IAV-infected cells
14 transfected with specific siRNA respectively compared with control siRNA-transfected cells
15 mock treated or infected with IAV.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Figure S6. IFN- β expression in primary NHBE cells is RIG-I dependent but TLR3 and**
28 **NLRP3 independent.**
29

30
31 IFN- β expression in siRNA-transfected NHBE cells 13 h post-USSR infection (+IAV) or mock
32 treatment (Mock). Data are mean \pm SEM of eight qRT-PCR from four independent experiments
33 with cells from four donors normalized with respect to the β -actin level. Results are expressed
34 as fold-increase relative to mock-treated cells. * $p < 0.05$ IAV-infected cells transfected with
35 specific siRNA compared with control siRNA-transfected cells infected with IAV.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Figure S7: NS1 1918 inhibits IL-1 β response to USSR virus infection in NCI-H292 cells in**
47 **a cell death-independent manner.**
48

49
50 (A) Total RNA was isolated from cells stimulated in Figure S1A, and IAV M2 RNA expression
51 was examined by qRT-PCR. Gene expression was normalized to that of β -actin. Results are
52 mean \pm SEM of quadruplicate qRT-PCR presented as fold-increase relative to WT USSR (MOI
53 0.1). (B) Kinetics of NS1 1918 and WT USSR M2 RNA expression in NCI-H292 cells. Results
54 are mean \pm SEM of quadruplicate qRT-PCR presented as fold-increase relative to WT USSR 3
55 h post-infection. (C) Percentage of living cells according to LDH assay in cells stimulated in
56
57
58
59
60

1
2
3 Figure 6A. Results are mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 NS1 1918-infected
4 compared with WT USSR-infected cells.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

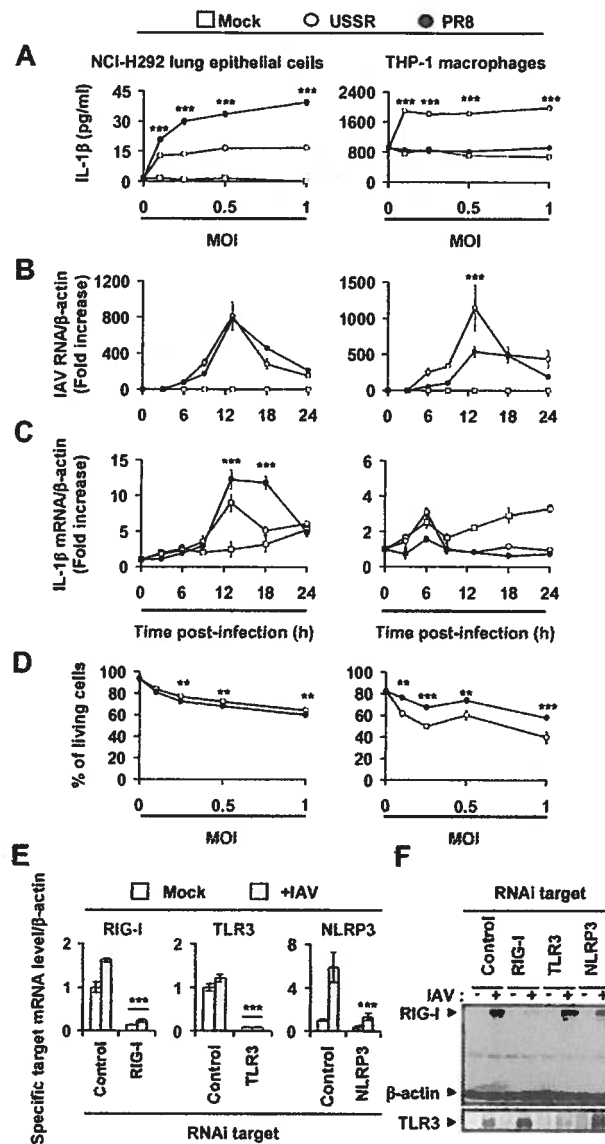
SUPPLEMENTAL DATA REFERENCES

Meunier, I., and von Messling, V. (2011). NS1-mediated delay of type I interferon induction contributes to influenza A virulence in ferrets. *J. Gen. Virol.* *92*, 1635-1644.

Pothlichet, J., Burtey, A., Kubarenko, A.V., *et al.* (2009). Study of human RIG-I polymorphisms identifies two variants with an opposite impact on the antiviral immune response. *PLoS One* *4*, e7582.

Pothlichet, J., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2008). Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. *J. Immunol.* *180*, 2034-2038.

Fig. S1 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. S2 Pothlichet et al.,

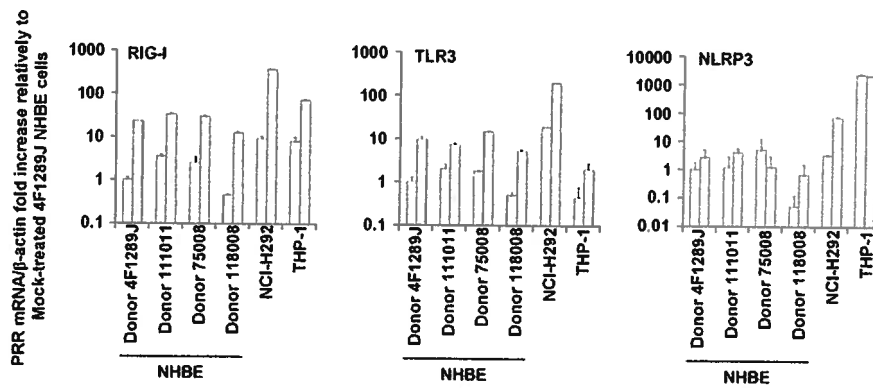
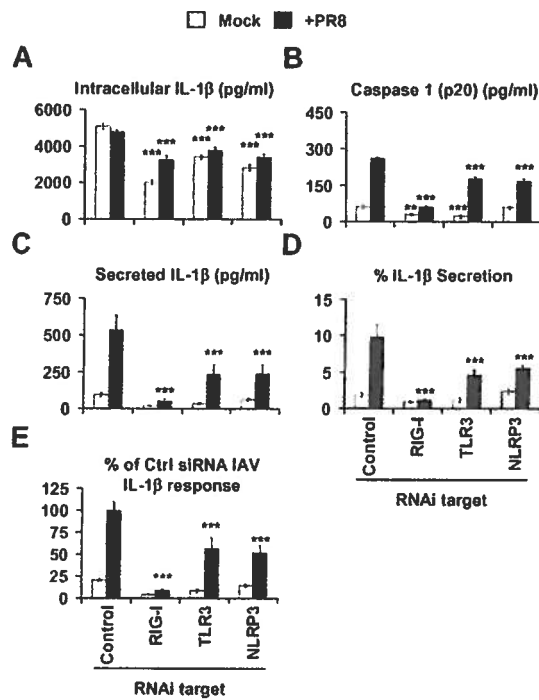
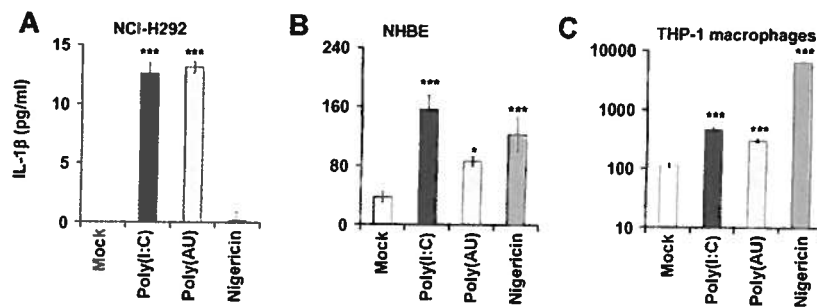


Fig. S3 Pothlichet et al.,



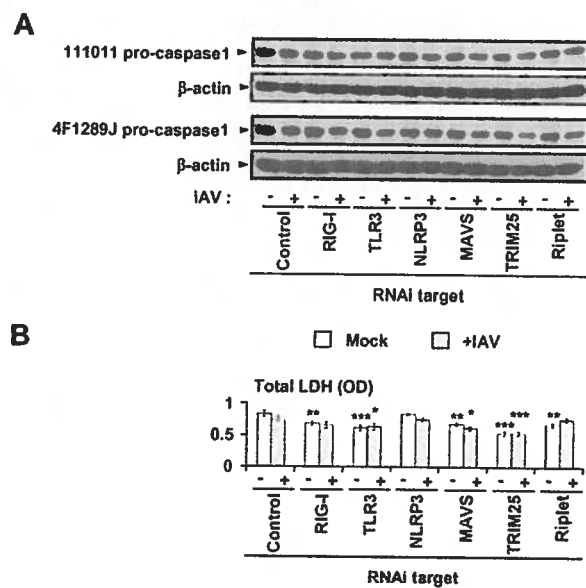
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. S4 Pothlichet et al.,



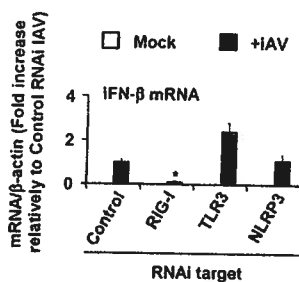
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. S5 Pothlichet et al.,



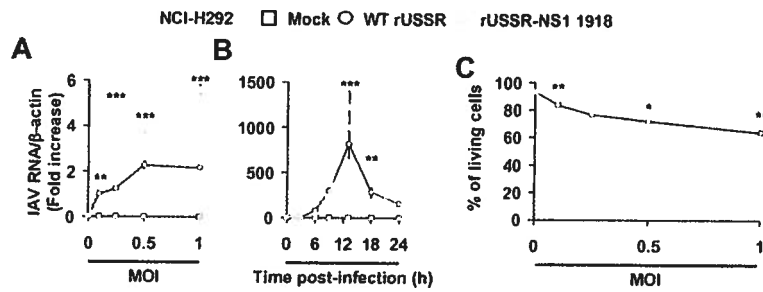
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. S6 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig. S7 Pothlichet et al.,



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Une réponse cellulaire en présence d'un niveau protecteur d'anticorps confère une protection contre le virus de la grippe de 1918 chez les furets

Stéphane Pillet, Darwyn Kobasa, Isabelle Meunier, Michael Gray, Dominick Laddy, David B. Weiner, Veronika von Messling, Gary P. Kobinger.

Vaccine (2011) 29: 6793-801.

Dans cet article, j'ai contribué à la figure 4 en aidant à isoler les PBMC du sang des furets en participant à l'ELISPOT. J'ai aussi généré la figure 7 en analysant par RT-PCR quantitatif les cytokines présentes dans les lavages nasaux des furets vaccinés et infectés.

Pillet S, Kobasa D, Meunier I, Gray M, Laddy D, Weiner DB, von Messling V, Kobinger GP. Cellular immune response in the presence of protective antibody levels correlates with protection against 1918 influenza in ferrets. Vaccine. 2011 Sep 9;29(39):6793-801. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.059. Epub 2011 Jan 4. PubMed PMID: 21211587.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Résumé

L'identification des facteurs immunitaires clés permettant une protection contre les virus hautement pathogènes est essentielle pour le développement de vaccins. À cet effet, des furets ont reçu soit une dose d'un vaccin conventionnel, deux doses d'un plasmide exprimant la protéine HA ou une dose du plasmide exprimant HA suivit de l'injection d'un vecteur adénoviral exprimant HA. En plus de la réponse humorale, des tests ELISPOT et des analyses en cytométrie en flux pour les furets ont été développés afin d'évaluer la réponse cellulaire. Les animaux ayant reçu le vaccin conventionnel ont développé une réponse humorale, tandis que le vaccin à ADN a aussi induit l'induction de lymphocytes T sécrétant l'IFN- γ . Suite au défi avec le virus hautement pathogène A/South Carolina/1/1918, les animaux ayant reçu le vaccin conventionnel ont développé une maladie avec des signes cliniques variant de modérés à sévères tandis que ceux ayant reçu le vaccin à ADN ont développé une maladie moins sévère. En conclusion, en présence d'une réponse humorale protectrice, le niveau de la réponse cellulaire est en corrélation avec une morbidité réduite chez les furets vaccinés.

Évaluation des vaccins commercialement disponibles et à l'étude contre le virus de la grippe pandémique de 2009

Gary P. Kobinger, Isabelle Meunier, Ami Patel, Stéphane Pillet, Jason Gren, Shane Stebner, Anders Leung, James L. Neufeld, Darwyn Kobasa, Veronika von Messling.

Journal of Infectious Diseases (2010) 20: 1000-6.

Pour cet article, j'ai immunisé les furets avec les différents vaccins. J'ai aussi participé à la réalisation de la figure 1C en aidant à l'isolation des PBMC du sang des furets. Finalement, j'ai réalisé la figure 5. Pour ce faire, j'ai quantifié l'expression des différentes cytokines présentes dans les lavages nasaux par RT-PCR quantitatif.

Kobinger GP, Meunier I, Patel A, Pillet S, Gren J, Stebner S, Leung A, Neufeld JL, Kobasa D, von Messling V. Assessment of the efficacy of commercially available and candidate vaccines against a pandemic H1N1 2009 virus. J Infect Dis. 2010 Apr 1;201(7):1000-6. doi: 10.1086/651171. PubMed PMID: 20170374.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Résumé

Introduction. L'émergence et la dissémination rapide du virus de la grippe pandémique H1N1 de 2009 a soulevé plusieurs questions concernant l'effet protecteur des vaccins saisonniers déjà commercialement disponibles et l'efficacité des nouveaux vaccins spécifiques au virus.

Procédure expérimentale. Des furets ont été immunisés avec les vaccins saisonniers 2008-2009 composés soit de virus atténués (FiuMist, MedImmune) ou de virus inactivés et fragmentés (FiuViral, GlaxoSmithKline), le vaccin commercial utilisé pour les porcs (FiuSure, Pfizer) ou le vaccin spécifique au virus pandémique, inactivé et produit en laboratoire. La réponse immunitaire adaptative a été évaluée et 5 semaines plus tard, les animaux ont été infectés avec le virus A/Mexico/lnDRE4487/2009.

Résultats. Seulement les animaux ayant reçu le vaccin pour les porcs ou le vaccin spécifique au virus pandémique ont produit une quantité détectable d'anticorps inhibant l'hémagglutination, tandis qu'une réponse cellulaire n'a été détectée que chez les animaux ayant reçu le FluMist. Suite à l'infection, le virus était détectable à de forts titres dans tous les groupes. Par contre, la présence d'anticorps spécifiques au virus pandémique était associée à une diminution des signes cliniques et un meilleur taux de survie. De façon surprenante, les animaux vaccinés avec le FluMist avaient un taux de mortalité légèrement plus élevé et plus de pathologie aux poumons, ce qui était en corrélation avec une induction plus rapide de l'interleukine-10.

Conclusions. Cette étude démontre qu'une seule dose d'un vaccin inactivé spécifique au virus pandémique confère une protection partielle, suggérant qu'une dose plus forte ou un rappel pourrait être nécessaire afin de protéger de façon plus efficace. Les conséquences de l'induction d'une réponse immunitaire non-spécifique au virus de la grippe nécessitent plus d'investigation.

Pathogenèse du virus de la grippe : leçons apprises des études animales avec les virus H5N1, le virus de la grippe espagnole et le virus pandémique de 2009

Isabelle Meunier, Stéphane Pillet, Neil Simonsen, Veronika von Messling.

Critical Care Medicine (2010). 38: e21-9.

Dans cet article, j'ai écrit la partie sur les drogues anti-virales approuvées et à l'essai et la partie sur l'immunothérapie. J'ai aussi contribué à la section sur le développement de vaccins.

Meunier I, Pillet S, Simonsen JN, von Messling V. Influenza pathogenesis: lessons learned from animal studies with H5N1, H1N1 Spanish, and pandemic H1N1 2009 influenza. Crit Care Med. 2010 Apr;38(4 Suppl):e21-9. doi:10.1097/CCM.0b013e3181c8b4d5. PubMed PMID: 19935414.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Résumé

Puisque les cas d'infections avec des virus de la grippe hautement pathogènes sont rares, aucune étude clinique systématique comparant les différentes approches thérapeutiques n'a été réalisée. Pour cette raison, les recommandations pour les traitements visent surtout à alléger les symptômes, restaurer les fonctions respiratoires ainsi qu'à inhiber la réplication virale, en assumant que le virus est responsable des signes cliniques. Les études animales avec les virus hautement pathogènes réalisées chez les primates non-humains ainsi que chez les furets reproduisent la maladie observée chez l'humain. L'étude de la cinétique de la réponse immunitaire de l'hôte révèle une activation retardée mais plus importante des gènes impliqués dans les réponses immunitaires innée et adaptative (la réponse immunitaire innée est responsable de la réponse inflammatoire). Cette réponse continue après que le virus soit éliminé et peut contribuer de façon importante aux signes cliniques observés. De plus, l'expérimentation dans les différents modèles animaux a permis de révéler une contribution importante de la dérégulation de la réponse immunitaire dans la pathogenèse des virus hautement pathogènes. Finalement, l'utilisation des modèles animaux dans le développement et la validation d'approches thérapeutiques en est encore à ses débuts. Néanmoins, des études démontrent que les drogues antivirales doivent être administrées rapidement suite à l'infection et démontrent aussi le potentiel et les limitations des traitements ciblant la réponse immunitaire de l'hôte.