

**ÉCOLE DOCTORALE**  
**SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**  
INEM UMR 7355 Equipe « Relation Hôte-Pathogène »

**THÈSE** présentée par :

**Noria SEGUENI**

soutenue le : **04 Décembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire, spécialité Immunologie

**Etude des relations hôte-pathogène lors de  
l'infection par *Mycobacterium tuberculosis***

**Implication des voies de signalisation IL-36, TNF  
et IL-17/IL-22**

**THÈSE dirigée par :**

**Valérie QUESNIAUX**  
**Bernhard RYFFEL**

Directrice de recherche, UMR 7355, CNRS Orléans  
Directeur de recherche, CNRS Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Laurent KREMER**  
**Marie-Christophe BOISSIER**

Directeur de recherche, Montpellier  
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,  
Paris XIII, INSERM 1125

---

**JURY :**

**Chantal PICHON**  
**Olivier NEYROLLES**  
**Laurent KREMER**  
**Marie-Christophe BOISSIER**

Professeur, Université d'Orléans, Présidente  
Directeur de recherche, Toulouse  
Directeur de recherche, Montpellier  
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,  
Paris XIII, INSERM 1125

**Valérie QUESNIAUX**  
**Bernhard RYFFEL**

Directrice de recherche, UMR 7355, CNRS Orléans  
Directeur de recherche, CNRS Orléans

# Table des matières

Remerciements .....	
Liste des abréviations .....	
Tables des illustrations .....	

## INTRODUCTION..... 1

### I. La tuberculose ..... 1

- A. Un peu d'histoire..... 1
- B. Un problème malheureusement toujours actuel..... 3
- C. *Mycobacterium tuberculosis*, agent étiologique de la tuberculose ..... 5

### II. La réponse de l'hôte à *Mycobacterium tuberculosis* ..... 7

- A. La réponse immunitaire innée..... 9
  - 1. Motifs mycobactériens et récepteurs de l'immunité..... 9
    - a) Les lectines de type C..... 10
    - b) Les récepteurs Toll-like..... 13
    - c) Nouveau senseur de l'immunité : cGAS/STING ..... 15
    - d) Polymorphismes chez l'homme ..... 16
  - 2. Cellules impliquées dans la réponse innée et formation du granulome..... 16
    - a) Les macrophages ..... 17
    - b) Les neutrophiles ..... 18
    - c) Les cellules dendritiques ..... 19
    - d) Initiation du granulome ..... 20
- B. Immunité adaptative et maintien actif des granulomes..... 21
- C. Les médiateurs de l'immunité..... 23
  - 1. La famille de l'IL-12 et l'IFN $\gamma$ ..... 23
    - a) L'IL-12 et l'IFN $\gamma$  ..... 23

b) L'IL-23.....	25
2. La famille de l'IL-1 .....	26
a) L'IL-1 $\alpha$ et l'IL-1 $\beta$ .....	27
b) L'IL-36.....	28
3. Le TNF.....	30
4. L'IL-17 et l'IL-22 .....	34
5. Polymorphismes associés chez l'homme.....	35
<b>III. Exploitation du système immunitaire de l'hôte par <i>M. tuberculosis</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>IV. Problématiques et objectifs .....</b>	<b>40</b>

## **RESULTATS .....** 41

<b>I. Implication de la voie de signalisation IL-36 dans les infections mycobactériennes .....</b>	<b>42</b>
<u>Article 1.</u> Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection .....	45
<b>II. Rôle de la voie TNF/TNFR1 dans la réponse de l'hôte à la tuberculose.....</b>	<b>66</b>
A. Etude du TNFR1 myéloïde, lymphoïde et stromal après infection par <i>M. tuberculosis</i> ...	66
<u>Article 2.</u> Innate myeloid cell TNFR1 mediated response as a first line defense against primary <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection .....	69
B. Etablissement d'un modèle murin pour l'étude des traitements anti-TNF humains.....	108
<u>Article 3.</u> Control of mycobacterial infections in mice expressing human Tumor Necrosis Factor but not mouse TNF .....	111
<b>III. Contribution des voies IL-17 et IL-22 dans le contrôle de l'infection.....</b>	<b>142</b>
<u>Article 4.</u> IL-17 blockade has no effect on host response and gene expression upon <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection in mice, unlike TNF $\alpha$ blockade .....	145

**DISCUSSION..... 185**

**I. Relevance du modèle murin pour l'étude de la réponse immunitaire à la tuberculose 185**

**II. L'IL-36 n'est pas essentielle au contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*..... 188**

**III. La voie TNF/TNFR1 au centre de l'immunité antituberculeuse..... 192**

A. La réponse immunitaire à *M. tuberculosis* nécessite une signalisation fonctionnelle du TNFR1 sur les cellules myéloïdes..... 192

B. Exploiter le modèle murin pour l'étude de nouveaux traitements anti-TNF ..... 199

**IV. L'IL-17 et l'IL-22 ont un rôle limité dans la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis*..... 203**

**V. Les relations hôte-pathogène et les stratégies thérapeutiques d'avenir..... 207**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 211**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 213**

**ANNEXE ..... 235**

Article 5. Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to *M. tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG ..... 236



# ~ Remerciements ~



C'est en jetant un regard en arrière qu'on s'aperçoit du chemin parcouru... Ces trois ans de thèse ont été riches autant sur le plan professionnel, personnel, qu'humain. J'aimerais consacrer ces quelques pages aux remerciements des (très !) nombreuses personnes sans qui ce travail n'aurait certainement pas été le même...

J'adresse en premier lieu mes remerciements aux membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail. Merci au Professeur Marie-Christophe Boissier et au Dr Laurent Kremer pour avoir pris le temps d'être rapporteur de ce manuscrit, merci au Dr Olivier Neyrolles qui a gentiment accepté d'être examinateur, et enfin je remercie le Professeur Chantal Pichon de participer elle-aussi à la fin de mon aventure de doctorante.

Parce que, oui, c'est bien une aventure, qui a été rendue possible grâce aux Dr Valérie Quesniaux et Bernhard Ryffel, et c'est à eux que j'adresse maintenant mes plus sincères remerciements. Bernhard m'a « recueillie » presque au berceau de la recherche, pour mon stage de M1, et j'ai ensuite persisté pour un contrat l'été sous la direction de Valérie cette fois, qui m'a recrutée pour un stage de M2, puis encore un contrat estival avant d'entamer ma thèse... Merci de m'avoir fait confiance à toutes ces occasions, j'ai énormément évolué au cours de ce cursus et j'ai beaucoup appris en particulier pendant les nombreuses heures, vissée sur un tabouret, dans le bureau de Valérie ! Merci pour votre patience et votre pédagogie vis-à-vis d'une étudiante en première année qui a (encore !!) oublié d'écrire l'unité d'un axe sur un graphique, ou qui n'a pas assez précisé son plan de plaque ELISA... ! J'ai appris la rigueur et le souci du détail, et j'ai développé ma passion de la recherche. J'espère qu'elle durera encore de nombreuses années !

J'adresse maintenant mes remerciements à l'élément central, le pilier et la mémoire de l'équipe TB, un binôme infatigable et plein d'humour : Steph, qu'est-ce que j'aurai fait sans toi ?? Sans doute pas la moitié de ce qui a été accompli pendant ces 3 ans de thèse... Pour travailler en isolateur, il faut être au minimum 2, et je suis très heureuse d'avoir fait équipe avec toi ! Tu as toujours été à l'écoute et présente pour moi, aussi bien dans les manips que dans d'autres situations. Rien ne t'arrête et tu trouves toujours une solution aux problèmes qui se posent souvent lorsqu'on dépend de l'espace restreint d'un isolateur. Tu m'as appris la débrouillardise, les réflexes à avoir dans tout un tas de situations, et je n'oublierai jamais Ô grand jamais nos heures de fous rires en zone 6 pendant nos très nombreuses manips ! Oui, c'est vrai que travailler en zone 6, ça attaque un peu le

cerveau... Je pense en particulier à ce fameux jour, témoin d'une embuscade sournoise suivie d'une formidable « contre-attaque de croquettes » !! J'en profite pour adresser un clin d'œil à nos supers animaliers, Alex et Jérôme, qui ont toujours été là en cas de besoin, et qui ont largement contribué à rendre nos longues heures de manips en zone 6 un peu plus légères (j'attends notre revanche à la pétanque !!). Merci pour tous ces moments partagés, et tous ces souvenirs précieux.

Je ne peux pas parler de Steph sans parler de Dieudo, que je remercie chaleureusement. Du fin fond de ton bureau (dans ton antre de « sauvage » !), tu as été là tout au long de ma thèse, un peu comme un soutien invisible qui me redonnait un coup de pied à chaque fois que je flanchais pour me remettre dans le droit chemin. Tu as eu les mots qu'il fallait, aux moments où il le fallait, pour me booster et me permettre de tracer mon chemin tranquillement. Steph et toi m'avez été d'une grande aide parfois sans le chercher, juste en étant là et en étant vous. Merci beaucoup !

Je remercie maintenant Manoussa, Mémèze et Rafiou... Notre G4 survivra à l'INEM, j'en suis certaine ! Toutes ces journées qui m'avaient épuisée, tous ces moments où j'avais envie de souffler, vous avez été là pour un resto (allons manger de la VIANDE !!), un bar (Orangina pour les gars, bières pour les filles !), ou tout simplement aller chez les uns et les autres, pour parler de tout et de rien, et faire des blagues à Manoussa ! L'organisation de la première édition du BBQ INEM a été toute une épopée magique que je suis ravie d'avoir entreprise avec vous 3. Merci Mémèze, mon compagnon de M2, pour tes blagues « à la con », merci Manoussa d'être aussi crédule, et merci Rafiou d'être juste toi au naturel ! G4 en force !

Et pour décompresser dans ce monde de brutes, ça fait aussi du bien un peu de douceur... et je tiens pour ça à remercier mes copines de Nail-Art Léa, Manoussa (encore !), Pauline et Tiffany pour nos nombreuses soirées vernis, enfin plutôt nos soirées bouffe avec éventuellement une manucure à la fin pour celles qui avaient encore les yeux ouverts. Bah oui parce que ce n'est pas facile de rester en forme jusqu'à 23h pour certaines... ! Vous êtes géniales les filles, merci pour tout !

J'aimerais également consacrer quelques lignes aux anciennes de l'INEM : Léa, Bebe et Raphaëlle, merci pour nos soirées/journées/week-ends de filles, et pour tous ces magnifiques voyages à l'étranger ! C'est une très bonne habitude, à garder donc, et j'attends avec impatience le prochain en Février, direction le Sri Lanka ! J'ai une pensée particulière pour Fanfan, partie s'épanouir à Lille, que je remercie pour tous nos délires et pour son coaching de fin de thèse, Noëlline, avec qui j'ai passé de supers moments, et aussi pour nos étudiants étrangers de passage à l'INEM, Zhongming, Qianghui, Changwei, Jimmy et Alexandre ; échanger avec vous a été très enrichissant et m'a encore plus donné envie d'aller parcourir le monde ! Je pense aussi à deux formidables stagiaires que j'ai eu la chance de former, « mes deux Amandines », alias 118 et 218, avec qui j'ai passé des moments

mémorables (coupure de courant en zone 6, selfies surprises en fond d'écran, petits dessins sur les agendas...). Merci à vous deux les filles, et également aux autres stagiaires que j'ai encadrés et qui ont, eux aussi, participé à ma formation : Samantha, Delphine, Flora, Steven, et bien sûr Sulayman qui va reprendre les rênes du projet BK, et à qui je souhaite du courage et de la réussite, tout comme à Quentin qui commence également sa thèse parmi nous cette année : courage les gars pour votre aventure doctorale ! Enfin, je remercie l'ensemble de l'INEM et d'Artimmune, qui constituent un laboratoire formidable et formateur sur de très nombreux plans, et qui a été mon second foyer pendant presque 5 ans. Merci donc à Louis (pour son soutien aux amandes !), Nathalie, Corinne, les Aurélie, Jessica, Julie, Flora, Florence, les Neuros Anthony, Arnaud<sup>2</sup>, Stéphane, Olivier<sup>2</sup>, Jacques, Maryvonne et Céline, Catherine, François, Marc, Isabelle et Isaz, et les secrétaires qui furent (Bernadette, Nadège et Anne) et qui sont (Caroline).

Je vais conclure ces remerciements en adressant quelques mots à mes amis et à ma famille. Mes ami(e)s de lycée (Angie, Marielle), de fac (Anou, Jeff, Adoum) et d'après (Coraline, Amandine), merci de répondre toujours présent ! Je remercie enfin ma mère pour son soutien et ces encouragements, mes petits frères qui ont des étoiles dans les yeux quand je leur explique ce que je fais, ma grand-mère qui se gonfle de fierté en parlant du doctorat qui est « le plus haut grade décerné par l'Université », et merci à Youssef, toujours présent pour essayer de me remonter le moral et pour écouter « mes histoires de labo ».

*Merci à tous pour cette belle aventure !*





## ~ Liste des abréviations ~

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>BCG</b>	Bacille de Calmette et Guérin
<b>BMDC</b>	Bone-Marrow derived Dendritic Cells
<b>CFP-10</b>	10 kDa Culture Filtrate antigen
<b>CG</b>	Cathepsine G
<b>cGAS</b>	cGAMP synthase
<b>CLR</b>	C-type Lectins Receptors
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellules Présentatrices d'Antigènes
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
<b>DD</b>	Death Domain
<b>EBI3</b>	Epstein Barr Virus induced protein 3
<b>EEA1</b>	Early Endosome Autoantigen 1
<b>ESAT-6</b>	6kD-Early Secreted Antigenic Target
<b>FcRn</b>	Récepteur neonatal Fc
<b>huTNF KI</b>	human TNF Knock-In
<b>ICAM-1</b>	InterCellular Adhesion Molecule 1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron $\gamma$
<b>IGRA</b>	Interferon Gamma Release Assay
<b>IL-1</b>	Interleukine 1
<b>IL-1R1</b>	Interleukine 1 Receptor 1
<b>IL-1RAcP</b>	IL-1 Receptor Accessory Protein
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase
<b>IRAK4</b>	IL-1 Receptor Associated Kinase 4
<b>IRFs</b>	Interferon Regulatory Factors
<b>IRIS</b>	Syndrôme Inflammatoire de Reconstitution Immune
<b>LAM</b>	LipoArabinoMannan
<b>LBA</b>	Liquides Broncho-Alvéolaires
<b>LM</b>	LipoMannan
<b>LRR</b>	Leucine Rich Repeats
<b>LT</b>	Leucotriènes
<b>LTB4</b>	Leucotriènes B4
<b>mAGP</b>	complexe mycolyl Arabino Galactan Peptidoglycan
<b>ManLAM</b>	Mannose-capped LipoArabinoMannan
<b>MAP</b>	Mitogen-Activated Proteins
<b><i>M. bovis</i></b>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein 1
<b>MDR</b>	Multi-Drug Resistant
<b>miR</b>	microRNA
<b>MGC</b>	Cellules Géantes Multinucléées

<b>MMP9</b>	Matrix Metalloprotease 9
<b>MR</b>	Mannose Receptor
<b>MSMD</b>	Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation response protein 88
<b>NE</b>	Neutrophil Elastase
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>PAMPs</b>	Pathogen-Associated Molecular Patterns
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDIM</b>	Phthiocerol DIMycoceroserate
<b>PG</b>	Prostaglandines
<b>PGL</b>	Phenolic GlycoLipid
<b>PGN</b>	PeptidoGlycaN
<b>PIM</b>	Phosphatidyl Inositol Mannoside
<b>PknG</b>	Protéine kinase G
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$
<b>PR3</b>	Protéinase 3
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SIGNR</b>	SIGN-Related
<b>SNPs</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>TBK1</b>	TANK-Binding Kinase 1
<b>TIR</b>	Toll/IL-1 Receptor
<b>TACE</b>	TNF-Alpha Converting Enzyme
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>VDR</b>	Vitamin-D Receptor
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>XDR</b>	eXtremely-Drug Resistant

# ~ Table des illustrations ~

---

<b>Figure 01.</b> Gestion et traitement des cas de tuberculose MDR et XDR.....	4
<b>Figure 02.</b> Schéma de la paroi mycobactérienne .....	6
<b>Figure 03.</b> Cycle infectieux de <i>M. tuberculosis</i> .....	7
<b>Figure 04.</b> Epidémiologie de la tuberculose.....	8
<b>Figure 05.</b> Les différents types de granulomes retrouvés chez l'homme.....	9
<b>Figure 06.</b> Les différents PRRs impliqués dans la reconnaissance de <i>M. tuberculosis</i> .....	10
<b>Figure 07.</b> La famille TLR .....	13
<b>Figure 08.</b> Coopération macrophages/neutrophiles.....	20
<b>Figure 09.</b> Membres de la famille IL-1 .....	27
<b>Figure 10.</b> Sources cellulaires et effets biologiques des cytokines de la famille de l'IL-1 .....	28
<b>Figure 11.</b> Rôle potentiel de l'IL-36 dans les poumons .....	30
<b>Figure 12.</b> Les voies de signalisation mises en place par le TNF .....	32
<b>Figure 13.</b> Les différentes fonctions du TNF dans la réponse immunitaire aux mycobactéries .....	33
<b>Figure 14.</b> Comparaison des granulomes observés chez différentes espèces .....	188
<b>Figure 15.</b> Comparaison des voies IL-1 et IL-36 .....	192
<b>Figure 16.</b> Retard de la réponse immunitaire adaptative après l'infection par <i>M. tuberculosis</i> .....	195
<b>Figure 17.</b> Schéma hypothétique des rôles du TNF sur les différentes populations cellulaires au cours de l'infection par <i>M. tuberculosis</i> .....	199



# ~ Introduction ~

---

## I. La tuberculose

### A. Un peu d'histoire...

La tuberculose est une maladie que l'on sait très ancienne. Au moins plusieurs siècles, dirait-on. C'est pourtant en millier d'années que peut se compter l'âge de cette infection mortelle, depuis l'ère égyptienne. Même s'il est connu depuis longtemps que la tuberculose sévissait déjà en Egypte ancienne, ce n'est qu'en 1997 que Nerlich et ses collaborateurs mettent enfin en évidence la présence du bacille en amplifiant par PCR de l'ADN mycobactérien extrait du tissu pulmonaire d'une momie vieille d'environ 3000 ans. Le séquençage qui a suivi a permis de confirmer l'appartenance de cet ADN au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Nerlich *et al.*, 1997). D'autres études ont suivi, et notamment celle d'Albert Zink (Zink *et al.*, 2003) qui montre que sur 85 prélèvements d'os issus de momies égyptiennes (datées entre 2060 et 500 avant J.C.), près d'un tiers étaient porteurs du bacille tuberculeux. La tuberculose a donc probablement ravagé la vallée du Nil pendant plusieurs millénaires et participé à la faible espérance de vie (environ 35 ans).

Cependant, la piste de la tuberculose peut être remontée bien plus loin. Ainsi, notamment grâce au très faible taux de mutation de l'agent étiologique de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), Gutierrez et son équipe (Gutierrez *et al.*, 2005) ont pu établir l'origine du complexe *Mycobacterium tuberculosis* il y a environ 3 millions d'années : les auteurs suggèrent par ailleurs que, de manière similaire aux premiers hommes, les bacilles tuberculeux auraient émergé en Afrique pour ensuite se diversifier, et profiter des vagues de migrations humaines pour se répandre à travers le monde. *M. tuberculosis* aurait ainsi co-évolué avec son hôte humain pendant plusieurs millions d'années.

La tuberculose a donc toujours été dans l'ombre de l'Homme, ponctuant son Histoire par de grandes épidémies. La fin du XIX<sup>ème</sup> siècle a vu l'émergence de structures destinées à soigner les patients tuberculeux, appelées les sanatoriums. Du latin « *sanatorius* » signifiant « propre à guérir », ces établissements avaient pour vocation non seulement d'isoler les patients contagieux du reste de la population, mais également de leur fournir une meilleure hygiène de vie qui, pensait-on, étaient indispensables pour guérir (Daniel, 2006). L'air frais, le soleil et une alimentation adéquate étaient suppléés dans certains cas de procédures chirurgicales comme la collapsothérapie et la thoracoplastie pour enrayer la croissance bactérienne et ainsi tenter de stériliser les expectorations des patients.

Même si Théophile Laennec identifia la maladie parmi les autres affections pulmonaires en 1819 (Laennec, 1962), et même si Robert Koch isola le bacille *Mycobacterium tuberculosis* en 1882 (Koch, 1932), ce n'est qu'en 1921 que la maladie va connaître un net recul, avec le Bacille de Calmette et Guérin (BCG), vaccin mis au point par Albert Calmette et Camille Guérin (Calmette, 1931).

Le BCG est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), obtenu par environ 230 repiquages successifs, ce qui aura pris 13 ans aux deux chercheurs. Ce vaccin a été révolutionnaire dans la lutte antituberculeuse : Calmette et Guérin ont ainsi été capables de sauver un grand nombre d'enfants en administrant le BCG dans les premiers jours de vie, période qu'ils ont reportée comme critique pour être sûr de vacciner avant une primo-infection. Avant la vaccination par le BCG, au moins 25% (jusqu'à 70-82% en Suède) des nourrissons mouraient de la tuberculose dans leur première année de vie, et ce pourcentage a chuté à 1% après utilisation du BCG (Calmette, 1927). Ce vaccin a tout naturellement été rendu obligatoire par l'OMS dans les années 1950s (Luca and Mihaescu, 2013). Le BCG n'est que très peu efficace chez l'adulte, il ne protège pas de la primo-infection, ni de la réactivation d'une tuberculose latente, et malgré de nombreux programmes de recherche sur de nouveaux vaccins (Ottenhoff and Kaufmann, 2012), le BCG reste néanmoins le seul vaccin sur le marché encore aujourd'hui, protégeant contre les formes les plus graves de la maladie (Trunz *et al.*, 2006) et participant ainsi à faire chuter l'incidence et la prévalence de la tuberculose dans le monde.

## B. *Un problème malheureusement toujours actuel*

A partir de 1986, la tuberculose a connu une résurgence inquiétante, coïncidant avec le début de l'épidémie par le VIH. En effet, ce virus induit une immunodéficience propice au développement de *M. tuberculosis* et le taux de co-infection tuberculose/VIH dépassait les 30% en Afrique. L'OMS déclare dans son rapport 2014 que sur les 9 millions de cas de tuberculose active en 2013, environ 1,1 million étaient co-infectés par le VIH. De plus, parmi ces cas de co-infection, 4 personnes sur 5 en moyenne succombent à la tuberculose. *M. tuberculosis* est donc dévastateur en tant que germe opportuniste au sein des personnes VIH-positives (WHO, 2014).

Avec la découverte de l'isoniazide et de la rifampicine en tant que drogues mycobactéricides, le traitement de la tuberculose a connu un tout nouveau tournant, entraînant la fermeture des sanatoriums. Cependant, dans son dernier rapport, l'OMS met l'accent sur l'apparition de souches de tuberculose multi-résistantes (Multi-Drug Resistant ou MDR) aux antibiotiques qui ont été utilisés comme traitement depuis les années 1950s (notamment l'isoniazide en 1952 et la rifampicine en 1957). Une tuberculose classique se traite en général en 6 mois avec une combinaison de 4 antibiotiques les 2 premiers mois (l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et la pyrazinamide) suivie d'une phase de continuation de 4 mois avec administration d'isoniazide et de rifampicine. Cependant, l'OMS estime à ½ million le nombre de nouveaux cas de tuberculose MDR chaque année (WHO, 2014).

Dans le cas d'une tuberculose MDR, le traitement est beaucoup plus lourd ([Figure 01](#)) et des cas de résistances ont déjà été rapportés : on parle alors de tuberculoses ultra-résistantes (eXtremely-Drug Resistant ou XDR), dont l'incidence augmente chaque année (9% des cas de tuberculose MDR en 2013). Par ailleurs, le traitement des tuberculoses résistantes est également beaucoup plus cher : ainsi, en Afrique du Sud, bien qu'elles ne représentent que 2,2% des cas, les tuberculoses résistantes consomment 44% du budget national consacré au diagnostic et au traitement de la tuberculose (Pooran *et al.*, 2013). Enfin, l'OMS a estimé que sur les 500 000 cas de tuberculoses MDR (qui ont tous été mis sous traitement), seulement 48% ont été traités avec succès : en effet, l'issue des traitements dépend énormément de la localisation géographique, du type de traitement choisi et de sa durée (Orenstein *et al.*, 2009).



**Table 2.** Principles of management of drug-resistant TB.

Principles of medical management of MDR-TB

- A regimen is based, when possible, on proven or likely susceptibility to at least four drugs
- A regimen is generally based on a backbone of a later generation fluoroquinolone (moxifloxacin or levofloxacin), and injectable agent (usually an aminoglycoside, i.e., either amikacin or kanamycin), any first line drug to which the isolate is susceptible (see Table 1), and addition of group 4 drugs such as cycloserine/terizidone and ethionamide, and others, such that at least four drugs to which the isolate is likely to be susceptible are being used
- The injectable drugs are used for 6-8 months, and longer in certain cases, and the total duration of treatment is suggested to be 24 months
- If the patient has previously been on treatment with a specific drug for three or more months, then this drug is generally avoided
- Addressing psychological factors to ensure compliance is critical
- Patients should be monitored for adverse drug reactions, which are common
- A single drug should not be added to a failing regimen

Principles of medical management of XDR-TB

- Regimens should be constructed based on prevailing DST patterns
- Given the high background rates of TB and MDR-TB in several countries, and lack of availability of newer agents like linezolid and bedaquiline, regimens are often constructed around a backbone of capreomycin and PAS
- Any drug that the isolate is susceptible to from category 1, and any remaining available drugs from category 3 or 4, are added to the regimen
- Patients should be carefully monitored for adverse drug reactions, particularly capreomycin (renal failure, hypokalemia and hypomagnesaemia), which are common
- Patients on capreomycin should have weekly urea and electrolytes monitored for the first eight weeks and then monthly thereafter. Attention should be paid to correcting risk factors for renal failure (dehydration, nausea, vomiting and diarrhea, avoidance of other nephrotoxic drugs (cotrimoxazole and nevirapine), and early identification of underlying renal disease (diabetes and HIV-associated nephropathy)

**Figure 01.** Gestion et traitement des cas de tuberculose MDR et XDR. DST = Drug-Susceptibility-Test ; PAS = Para-AminoSalicylic acid (Calligaro *et al.*, 2014).

Les efforts internationaux se concentrent sur un dépistage et un diagnostic efficaces des tuberculoses résistantes pour permettre l'établissement de traitements adéquats, mais les moyens financiers sont très insuffisants, et il reste un fossé conséquent entre le nombre de cas qui sont diagnostiqués et le nombre de patients effectivement pris en charge. En outre, avec l'augmentation de l'incidence de tuberculoses MDR et XDR, le coût total de prise en charge des patients ne cesse de croître, et les alternatives sont limitées en cas d'échec du traitement : les patients encore contagieux se voient alors contraints de quitter les établissements de soin et de retourner dans leur communauté où ils vont entrer en contact avec une population saine. L'idée de remettre en place des sanatoriums a ainsi déjà été suggérée (Dheda and Migliori, 2012).

La réémergence de la tuberculose a aussi été observée suite au développement de traitements à base d'anticorps anti-TNF (Tumor Necrosis Factor) il y a quelques années. Révolutionnaires dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn, des études ont établi un lien clair de cause à effet entre l'administration d'anti-TNF et la réactivation de tuberculose latente chez certains patients traités (Brassard *et al.*, 2006; Keane *et al.*, 2001; Thavarajah *et al.*, 2009). Des tests de détection

de tuberculose latente ont donc été rendu obligatoires chez ces patients avant toute administration d'anti-TNF (AFSSAPS, 2005). Généralement, le test de réaction cutanée à la tuberculine est utilisé, mais sa spécificité et sa sensibilité ont été remises en cause dans de nombreuses études comparatives et il est maintenant combiné au test IGRA (Interferon Gamma Release-Assay) (Khawcharoenporn *et al.*, 2015; Mariette *et al.*, 2012; Sellam *et al.*, 2007). Des études sont toujours menées pour trouver d'autres biomarqueurs spécifiques permettant de discriminer les cas de tuberculose latente et d'établir un meilleur diagnostic ; certaines enzymes lipolytiques de *M. tuberculosis* pourraient ainsi constituer des biomarqueurs efficaces (Brust *et al.*, 2011).

Ainsi, la tuberculose n'est pas un fléau d'un autre temps, mais demeure au contraire très préoccupante aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays développés : avec 1/3 de la population mondiale infectée et 1,5 millions de décès en 2013, elle reste la maladie infectieuse la plus meurtrière au monde derrière le VIH (WHO, 2014). Même en France, la tuberculose n'est pas totalement maîtrisée : l'année 2013 comptait encore 4939 cas, et l'incidence chez les moins de 5 ans avait augmenté entre 2000 et 2012 (Antoine *et al.*, 2014; WHO, 2014). D'autre part, parmi les cas de tuberculose pulmonaires notifiés en France en 2013, 4258 cas ont été testés pour la tuberculose MDR et 83 cas ont été confirmés en laboratoire, ce qui est 4 fois plus important qu'en 2005. Il est ainsi essentiel de continuer d'informer et d'encourager la vaccination par le BCG jusqu'à la mise au point d'un traitement peut-être plus efficace. Malgré les efforts mondiaux de lutte contre cette pathologie, l'éradication est encore lointaine, et il reste primordial de mieux comprendre les interactions hôte-pathogène pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

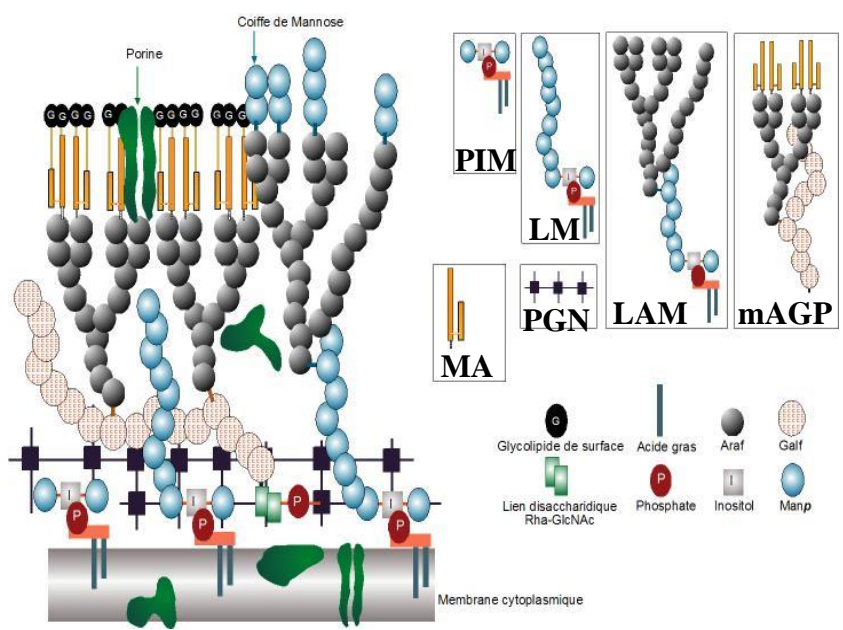
### *C. Mycobacterium tuberculosis, agent étiologique de la tuberculose*

La tuberculose détient le triste record de mortalité due à un agent pathogène unique, le bacille *Mycobacterium tuberculosis*. Cette bactérie appartient au complexe du même nom, comprenant plusieurs espèces :

- *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium tuberculosis* infectant l'homme
- *Mycobacterium bovis* infectant l'homme et d'autres mammifères comme les bovins
- *Mycobacterium microti* infectant le campagnol.

Les bacilles *M. tuberculosis* sont non capsulés, non sporulés et immobiles. Entièrement séquencé en 1998, le génome de *M. tuberculosis* contient environ 4000 gènes, codant pour la plupart pour des enzymes impliquées dans la lipogenèse mais aussi pour plus de 140 régulateurs de transcription (Cole *et al.*, 1998). Beaucoup de ces régulateurs répondent à des stress environnementaux comme les changements de température, la carence en fer ou le stress oxydatif. Ainsi, *M. tuberculosis* s'est adapté pour survivre à des conditions environnementales difficiles retrouvées à l'intérieur des phagocytes (Manganelli *et al.*, 2001). Ce bacille possède également une capacité à former des complexes acides stables à partir de certains cristaux colorés arylmethane, et qui ne sont pas décolorés par un bain d'alcool-acide (Barksdale and Kim, 1977). *M. tuberculosis* est donc une bactérie acido-alcoolo résistante et c'est sur cette propriété qu'est basée la coloration de Ziehl-Neelson permettant de mettre en évidence les mycobactéries dans les tissus.

La propriété d'acido-alcoolo résistance de *M. tuberculosis* est due à la forte proportion (60%) de lipides et acides mycoliques contenus dans sa paroi (Figure 02).

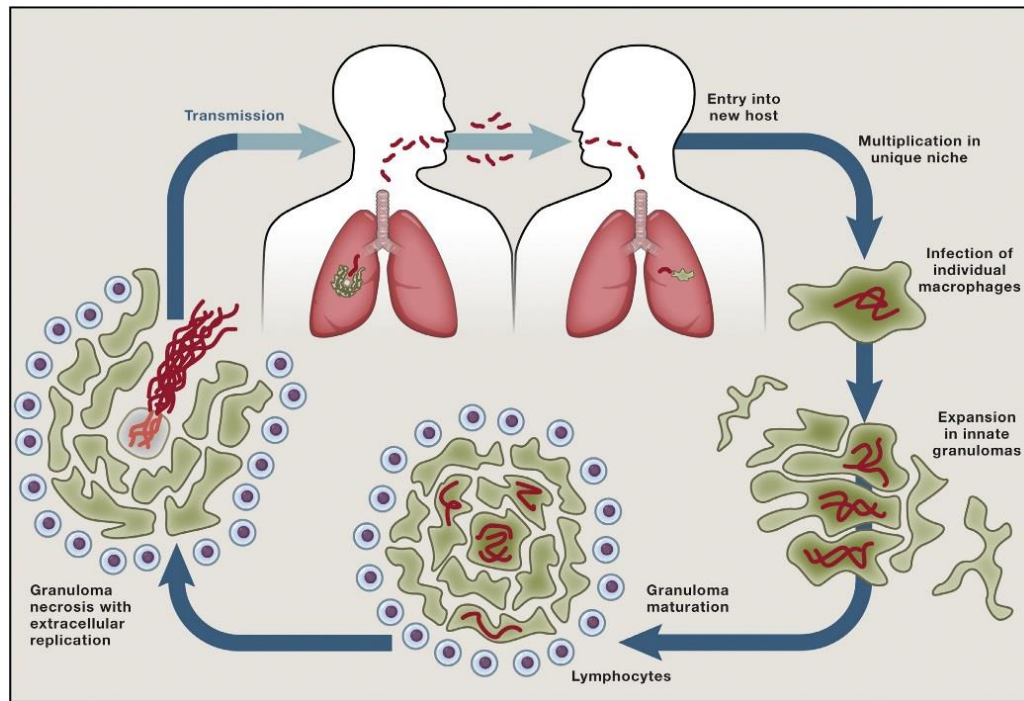


**Figure 02. Schéma de la paroi mycobactérienne.**

PIM = Phosphatidyl Inositol Mannoside  
 LM = LipoMannan  
 LAM = LipoArabinoMannan  
 mAGP = complexe mycolyl Arabino Galactan-Peptidoglycan  
 PGN = Peptidoglycan  
 MA = Mycolic Acid  
 Araf = Arabinose  
 Galf = Galactose  
 ManP = Mannose  
 (Adapté de Chatterjee, 1997)

La mycobactérie est virulente essentiellement grâce à la structure complexe de sa paroi (Chatterjee, 1997; Pawelczyk and Kremer, 2014) : ainsi, le gène *LpsA* codant pour une enzyme du métabolisme des lipopeptides, est central pour la virulence de *M. tuberculosis* (Sander *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que la phosphorylation de KasB, une enzyme de *M. tuberculosis* essentielle dans la biosynthèse des acides mycoliques de la paroi, est cruciale pour la virulence de la bactérie (Vilcheze *et al.*, 2014). L'enveloppe mycobactérienne constitue une excellente protection contre les molécules toxiques sécrétées par l'hôte et certains de ses composants comme

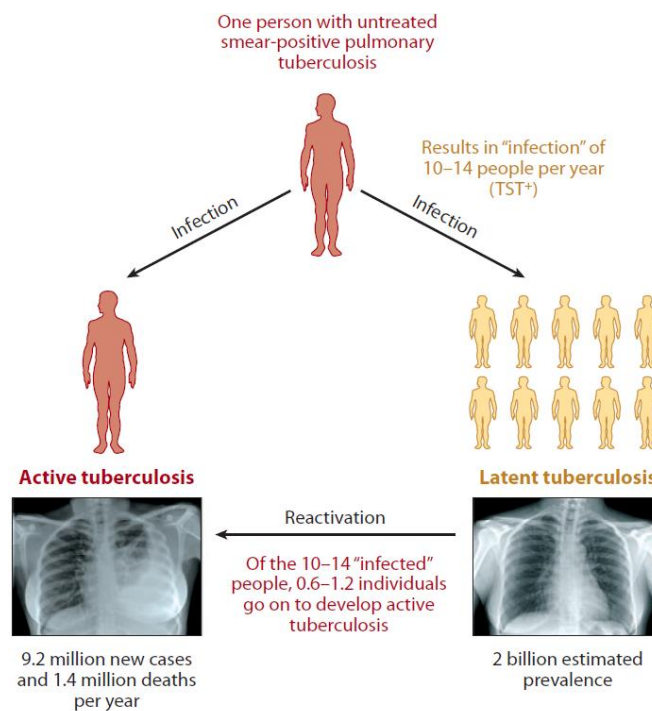
les LM, LAM et les PIM sont reconnus par les récepteurs de l'immunité innée (Neyrolles and Guilhot, 2011; Quesniaux *et al.*, 2004b). Cette reconnaissance est essentielle pour l'initiation de la réponse immunitaire, mais *M. tuberculosis* est aussi capable de moduler cette réponse pour favoriser sa survie et ainsi perpétuer son cycle infectieux ([Figure 03](#)).



**Figure 03.** Cycle infectieux de *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* infecte son hôte par aérosol provenant de la toux d'un individu présentant une tuberculose active. La bactérie induit ensuite le recrutement de macrophages qui vont la phagocytter et lui permettre d'atteindre les voies aériennes inférieures. Les granulomes se forment ensuite pour confiner les mycobactéries et contrôler leur croissance. Cependant, les granulomes peuvent se rompre et libérer les bactéries qui vont pouvoir infecter un nouvel hôte (Cambier *et al.*, 2014a).

## II. La réponse de l'hôte à *Mycobacterium tuberculosis*

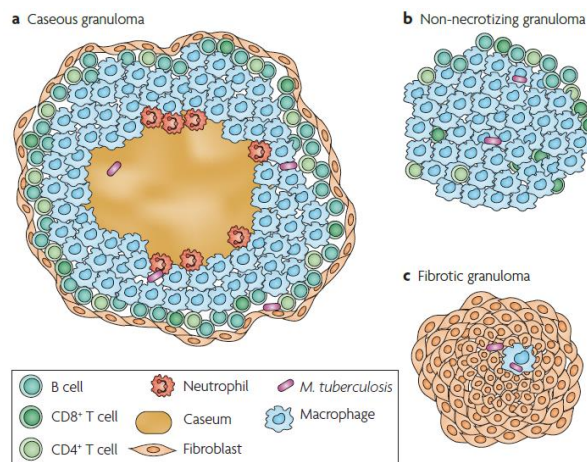
Bien qu'1/3 de la population mondiale soit infecté par *M. tuberculosis*, 90% des personnes développent une réponse immunitaire efficace permettant de contrôler l'infection, et le pathogène est maintenu au niveau du site de primo-infection. La maladie est asymptomatique et est qualifiée de tuberculose latente. Parmi les cas de tuberculose latente, seule une faible proportion (5-10%) de patients va développer une tuberculose évolutive : la bactérie est ainsi capable de persister dans l'hôte sans créer de pathologie et de se réactiver lors d'un déficit immunitaire induit par une infection ou par un traitement ([Figure 04](#)).



**Figure 04. Épidémiologie de la tuberculose.** Environ 1/3 de la population mondiale est infecté (soit une prévalence de 2 milliards). Après infection par aérosols, la maladie active provoque fièvre, perte de poids importante, destruction tissulaire localisée au site d'infection avec la présence de bacilles dans les expectorations et concerne en moyenne 9,2 million de nouveaux cas par an. Néanmoins, elle est asymptomatique dans 90% des cas : on parle de tuberculose latente, et 10% de ces cas en moyenne vont réactiver la maladie. (O'Garra *et al.*, 2013)

Cet état de latence est induit par la mycobactérie en détournant le système immunitaire pour lui permettre de persister dans l'organisme pendant parfois des dizaines d'années (Chao and Rubin, 2010). Ainsi, la primo-infection va engendrer une réponse coordonnée de plusieurs types cellulaires pour favoriser les communications entre système immunitaire inné et système immunitaire adaptatif : cette plateforme d'interactions cellulaires privilégiée est une structure caractéristique de la tuberculose appelée le granulome. Il est généralement composé de macrophages alvéolaires infectés entourés d'une couronne lymphocytaire, mais une coiffe fibrotique et un centre caséique peuvent être retrouvés selon l'avancée de la pathologie ([Figure 05](#)). Les bacilles, maintenus à l'intérieur des granulomes dans des conditions hypoxiques, ne se disséminent pas. Néanmoins, ils sont également « protégés » du système immunitaire et peuvent persister dans cet environnement hypoxique. Si un épisode d'immunodéficience intervient au cours de la vie de l'individu, les structures granulomateuses ne sont plus maintenues et les bacilles viables sont alors libérés dans l'organisme. Le patient développe une tuberculose active et devient contagieux. Cependant, il est impossible de distinguer cliniquement la réactivation d'une tuberculose latente d'une réinfection ; des études montrent que la réactivation de la tuberculose est plus susceptible de se produire dans les 10-15 années après la primo-infection, et suggèrent que la

réinfection soit un processus bien plus fréquent que la réactivation (Borgdorff *et al.*, 2011; Cohen and Murray, 2005; Salgame *et al.*, 2015).

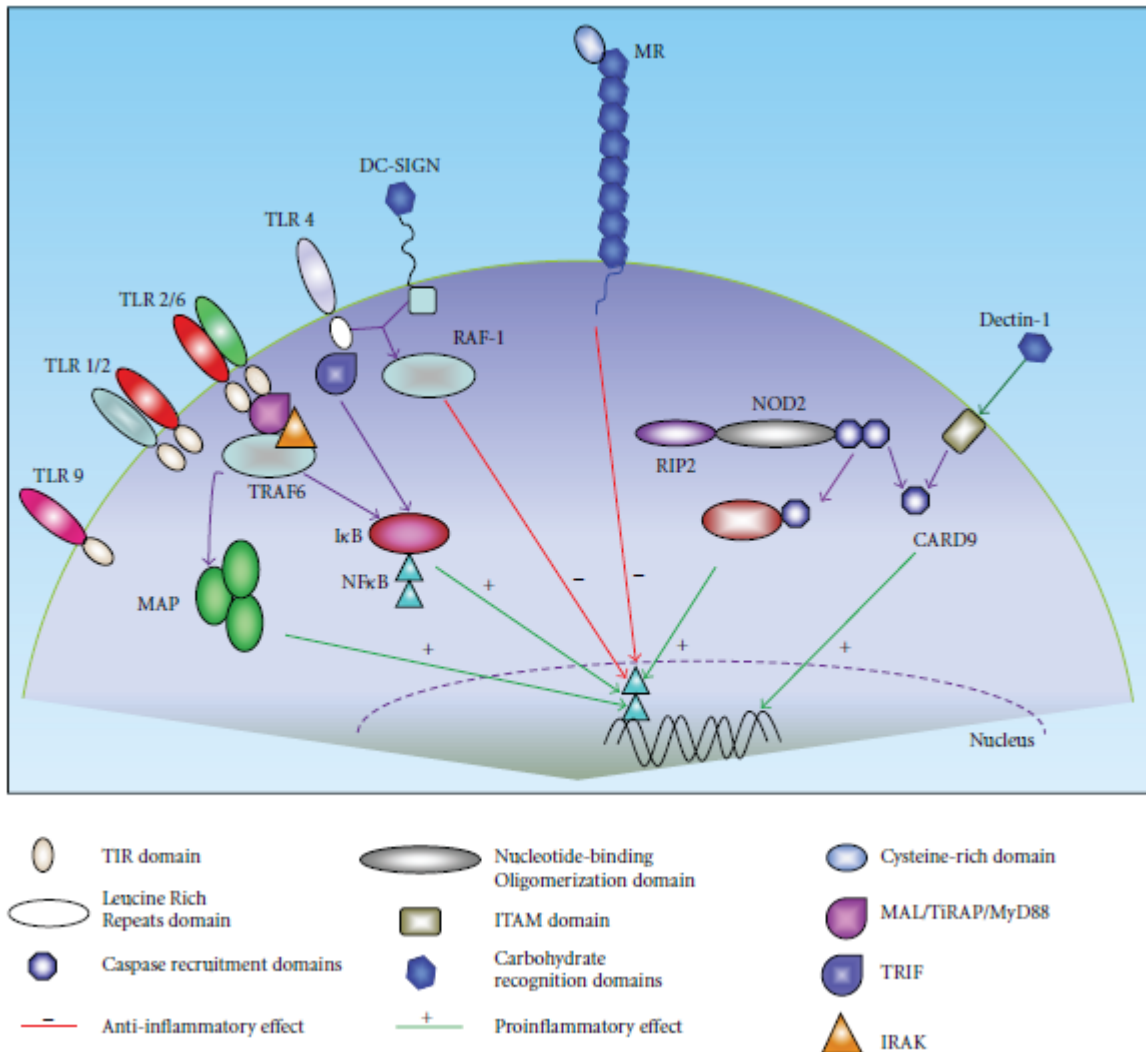


**Figure 05. Les différents types de granulomes retrouvés chez l'homme.** a) Granulome classique, trouvé dans les cas de maladies actives et latentes, composé de macrophages, neutrophiles, lymphocytes B et T ainsi qu'une couche de fibroblastes en périphérie. Le centre caséique est nécrotique et hypoxique. b) Granulome non nécrotique, retrouvé dans les tuberculoses actives, constitué de macrophages et de lymphocytes. Les bacilles sont intracellulaires. c) Les lésions fibrotiques sont plus souvent retrouvées dans les tuberculoses latentes, elles sont composées presque exclusivement de fibroblastes, ainsi que de quelques macrophages. La localisation des bactéries n'est pas certaine dans ce type de lésion (Barry *et al.*, 2009).

## A. La réponse immunitaire innée

### 1. Motifs mycobactériens et récepteurs de l'immunité

La tuberculose est une maladie pulmonaire dont la transmission se fait par inhalation d'aérosols contenant les bacilles. Les mycobactéries se déposent alors dans les poumons où elles vont être reconnues et phagocytées par les macrophages alvéolaires, qui constituent la première ligne de défense de l'organisme. Cette étape de reconnaissance est primordiale pour la mise en place des granulomes et est médiée par différents types de récepteurs de l'immunité appelés les Pattern Recognition Receptors (PRRs) (**Figure 06**). Les paragraphes suivants constituent une liste non exhaustive des principaux PRRs impliqués dans la reconnaissance et la réponse immunitaire à *M. tuberculosis*.



**Figure 06. Les différents PRRs impliqués dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*.** Selon le motif moléculaire, différents récepteurs membranaires ou intracellulaires sont mis en jeu pour mener à l'activation du facteur de transcription Nuclear Factor Kappa B (NFκB) et à l'expression de cytokines et de chimiokines (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011).

#### a) Les lectines de type C

Les lectines de type C ou C-type Lectins Receptors (CLRs) sont une famille de protéines membranaires possédant un ou plusieurs domaine(s) particulier(s) appelés C-type lectin domain, reconnaissant les carbohydrates (Robinson *et al.*, 2006). Chez les vertébrés, il existe 17 groupes de CLRs mais seulement quelques-uns jouent le rôle de PRRs, dont le Mannose Receptor (MR), le Dendritic Cell specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN), dont les homologues chez la souris sont les SIGN-related (SIGNR) et Dectin-1.

Le MR est majoritairement exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques et reconnaît les résidus mannose, fucose et maltose à la surface de certains pathogènes pour induire l'internalisation via différentes voies (Engering *et al.*, 1997).

Chez *M. tuberculosis*, ce sont le Mannose-capped LipoArabinoMannan (ManLAM) et le PIM qui sont reconnus par le MR puis internalisé (Schlesinger *et al.*, 1994). Une étude a montré que l'incubation de macrophages avec le ManLAM ou avec *M. tuberculosis* induit une production d'IL-8 et de prostaglandine E2 via l'expression du Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) et ce, de manière indépendante de NF $\kappa$ B. Ce phénomène n'était pas observé dans le cas d'une incubation des cellules avec du BCG, ce qui suggère que l'expression de PPAR $\gamma$  induite par le MR et la signalisation en aval est spécifique des souches virulentes de *Mycobacterium* (Rajaram *et al.*, 2010). Cependant, l'absence de MR lors de l'infection dans un modèle murin n'induit pas de différence au niveau de la réponse immunitaire ou de la charge bactérienne par rapport à des souris de type sauvage ; et même si des souris double déficientes en MR et SIGNR1 présentent plus de recrutement cellulaire et de bactéries dans les poumons, elles sont capables de survivre à l'infection (Court *et al.*, 2010).

Le MR est également capable d'induire la phagocytose de la bactérie ; néanmoins, il semble que cette internalisation ne s'ensuive pas d'une fusion avec les lysosomes, ce qui constituerait donc une porte d'entrée sûre pour *M. tuberculosis* (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999). L'étude de Kang *et al.*, en 2005 montre d'ailleurs que *M. tuberculosis* exploite très bien le MR de manière à atteindre une niche dans laquelle il peut croître en toute sécurité (Kang *et al.*, 2005).

DC-SIGN est quant à lui une protéine transmembranaire de type II exprimée surtout par les cellules dendritiques immatures et matures qui, comme son nom n'indique, est impliqué dans l'adhésion et la migration des cellules dendritiques (Geijtenbeek *et al.*, 2000a) mais également dans la présentation antigénique aux cellules T (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Tout comme le MR, DC-SIGN est capable de reconnaître le ManLAM des mycobactéries, ce qui aboutit à une réponse anti-inflammatoire avec sécrétion d'IL-10 via l'activation de la protéine Raf-1 (Gringhuis *et al.*, 2007), modulant alors la réponse immunitaire de l'hôte. D'autre part, il a été montré que DC-SIGN constituerait la porte d'entrée privilégiée de *M. tuberculosis* dans les cellules dendritiques, contribuant ainsi à la persistance de la bactérie dans les poumons (Tailleux *et al.*, 2003).

Les SIGNR sont les homologues de DC-SIGN chez la souris : il en existe 8, mais seuls SIGNR1 et SIGNR3 ont de fortes similarités structurales et fonctionnelles avec DC-SIGN et ont donc été particulièrement étudiés. Il a ainsi été montré que SIGNR1 n'est pas fortement impliqué dans la réponse de l'hôte puisque son absence ne perturbe pas dramatiquement le contrôle de l'infection par les souris (Court *et al.*, 2010; Tanne *et al.*, 2009), tandis que SIGNR3 semblerait impliqué dans l'établissement de cette réponse à l'infection par *M. tuberculosis* sans pour autant que son absence ne compromette la survie des souris à long terme (Tanne and Neyrolles, 2010).



Chez l'homme, l'étude de Tailleux *et al.*, ont mis en évidence que les macrophages alvéolaires de patients atteints de tuberculose présentaient une forte expression de DC-SIGN à leur surface (Tailleux *et al.*, 2005). Sachant que DC-SIGN est surtout impliqué dans l'un des mécanismes d'échappement de la bactérie (Geijtenbeek and van Kooyk, 2003), cette surexpression chez les patients pourrait suggérer qu'il s'agit d'un moyen pour le bacille de s'isoler du système immunitaire en pénétrant dans les macrophages sans induire sa destruction.

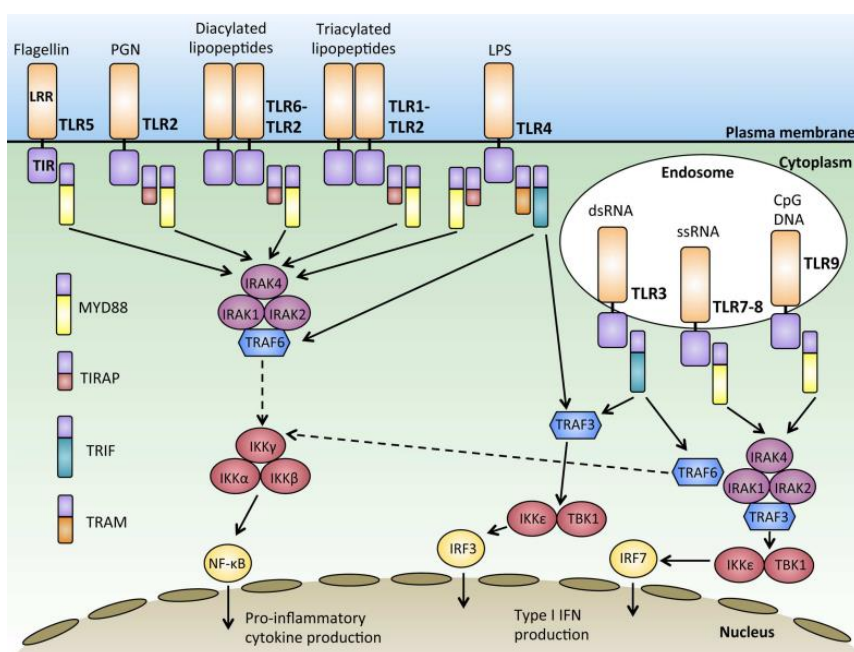
Enfin, Dectin-1, tout comme les autres CLR, lie les carbohydrates, dont le  $\beta$ -glucane essentiellement, mais reconnaît également *M. tuberculosis* et ce malgré l'absence de  $\beta$ -glucanes à sa surface, pour induire la production d'IL-12p40 (Rothfuchs *et al.*, 2007) en fonctionnant de concert avec le Toll Like Receptor 2 (TLR2) (Yadav and Schorey, 2006). De plus, Lee *et al.*, ont démontré que *M. tuberculosis* H37Rv est capable d'induire l'expression de Dectin-1 de manière dépendante de TLR2 (Lee *et al.*, 2009). La voie de signalisation associée à Dectin 1 (mais aussi à Dectin 2 et Mincle) contient la molécule Card9, et il a été montré que les souris déficientes pour ce composant intracellulaire étaient très susceptibles à l'infection avec une inflammation pulmonaire importante associée à un fort recrutement de neutrophiles (Dorhoi *et al.*, 2010). Pourtant, des souris déficientes pour Dectin-1 ne semblent pas différentes de souris de type sauvage après infection par *M. tuberculosis* (Marakalala *et al.*, 2011). De même, Mincle et Dectin 2 n'ont pas été clairement mis en exergue durant l'infection par *M. tuberculosis* (Behler *et al.*, 2012; Yonekawa *et al.*, 2014).

Bien qu'il ait été plus ou moins établi une redondance entre les différents CLR au niveau de l'immunité anti-mycobactérienne *in vivo*, une étude récente montre clairement l'implication d'un CLR unique qui pourrait expliquer le phénotype observé chez des souris déficientes pour Card9 (Wilson *et al.*, 2015). Les lectines sont donc des récepteurs relativement importants dans la reconnaissance des bacilles tuberculeux, et sont non seulement impliqués dans la réponse immune mais également mis à profit par le pathogène pour l'échappement vis-à-vis du système immunitaire, et pourraient être utilisés comme nouveau biomarqueur, comme le montre une étude récente. En effet, CL-LK, un récepteur de type lectine soluble reconnaissant le ManLAM des mycobactéries, a été récemment mis en évidence et bien que l'absence de ce récepteur chez la souris n'a pas d'incidence sur le contrôle de l'infection, CL-KL est significativement réduit dans le sang des patients atteints de tuberculose active. (Troegeler *et al.*, 2015).

## b) Les récepteurs Toll-like

Les TLRs sont une famille de 10 (chez l'homme) à 12 récepteurs (chez la souris), (Kawai and Akira, 2010) qui furent les premiers PRRs à être identifiés chez la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997), et les mieux caractérisés à ce jour. Ils sont exprimés par la plupart des cellules immunitaires, mais sont également retrouvés dans les cellules épithéliales et les fibroblastes. Ce sont des récepteurs membranaires situés non seulement à la surface des cellules, mais aussi pour certains au niveau de compartiments intracellulaires comme les endosomes. Les TLRs sont composés d'un ectodomaine très conservé « en fer à cheval » Leucine-Rich Repeats (LRR) pour la reconnaissance des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine Toll/IL-1 Receptor (TIR) pour la signalisation intracellulaire (Botos *et al.*, 2011). En effet, l'interaction de *M. tuberculosis* avec les TLRs ne va pas conduire immédiatement à la phagocytose de la bactérie.

L'activation des TLRs conduit à une homodimérisation, excepté pour TLR2 qui va former des hétérodimères avec TLR1 (reconnaissance des lipopeptides triacylés) et avec TLR6 (reconnaissance des lipopeptides diacylés). La plupart des TLRs vont fixer la molécule adaptatrice Myeloid Differentiation response protein 88 (MyD88) via leur domaine TIR qui va à son tour recruter la protéine IL-1 Receptor Associated Kinase 4 (IRAK4). IRAK4 se complexe ensuite avec IRAK1 et IRAK2, formant une structure appelée le « Myddosome » (Lin *et al.*, 2010b). Le signal conduit finalement à l'activation des Mitogen-Activated Proteins (MAP) kinases, ou bien des facteurs de transcription NFκB et Interferon Regulatory Factors (IRFs), qui vont induire l'expression de cytokines et chimiokines, et initier la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 07).



**Figure 07. La famille TLR.** Ces récepteurs, membranaires ou endosomaux, reconnaissent une large variété de PAMPs bactériens et viraux, ce qui conduit à la dimérisation et à l'activation de voies de signalisation pour aboutir à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Wang *et al.*, 2014).

Dans le contexte d'une infection par *M. tuberculosis*, Underhill *et al.*, ont montré en 1999 que les interactions des protéines de la paroi mycobactérienne avec le TLR2 étaient essentielles pour l'induction de réponses pro-inflammatoires par les macrophages (Underhill *et al.*, 1999). Ainsi, les LAM constituent les agonistes de l'hétérodimère TLR1/2, permettant l'activation de NFκB (Tapping and Tobias, 2003), mais le TLR2 est également capable de reconnaître d'autres protéines de la membrane mycobactérienne comme les LM ou les PIM. De plus, ce récepteur est impliqué dans la production d'IL-1β après infection par *M. tuberculosis* (Kleinnijenhuis *et al.*, 2009). Ces études suggèrent donc que TLR2 est important pour le développement d'une réponse immunitaire efficace lors de l'infection par *M. tuberculosis*.

Bien que le TLR4 soit capable d'induire une activation cellulaire suite à la reconnaissance de composés mycobactériens (Means *et al.*, 2001; Means *et al.*, 1999; Quesniaux *et al.*, 2004a), son implication dans l'infection semble moins évidente. En effet, alors que Reiling *et al.*, montrent que le TLR4 ne semble pas nécessaire au contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* (Reiling *et al.*, 2002), l'équipe d'Abel publie la même année une étude suggérant clairement un rôle de TLR4 dans la réponse aux mycobactéries : ainsi, les souris déficientes pour TLR4 présentent une réponse inflammatoire altérée et sont plus sensibles à l'infection, contrairement aux souris contrôles (Abel *et al.*, 2002).

L'engouement pour les TLRs dans l'infection par les mycobactéries a connu un second souffle quelques années plus tard : en effet, il a été montré dans un modèle murin que la protéine MyD88 est cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire compétente après infection par *M. tuberculosis*. Des souris déficientes pour MyD88 sont ainsi très susceptibles et succombent en quelques semaines, alors que des souris de type sauvage contrôlent l'infection et survivent plusieurs mois (Feng *et al.*, 2003; Fremond *et al.*, 2004; Scanga *et al.*, 2004). L'intérêt a donc été de trouver le ou les récepteur(s) correspondant(s) à ce phénotype drastique.

En 2005, Bafica *et al.*, communiquent une étude portant sur le rôle de TLR9 lors de l'infection par *M. tuberculosis*. Après infection, les souris TLR2<sup>-/-</sup> et TLR9<sup>-/-</sup> sont légèrement plus sensibles que les souris de type sauvage, alors que les animaux TLR2/9<sup>-/-</sup> présentent une susceptibilité accrue à *M. tuberculosis*, sans pour autant être comparables aux souris MyD88<sup>-/-</sup>. Les récepteurs TLR2 et 9 sont donc redondants pour établir une réponse immunitaire compétente, et il existe une autre voie de signalisation MyD88-dépendante mise en œuvre pour pouvoir contrôler efficacement l'infection (Bafica *et al.*, 2005). De plus, des souris triple-déficientes pour TLR2, 4 et 9 sont capables de contrôler l'infection par *M. tuberculosis*, dans des conditions où les souris MyD88<sup>-/-</sup> ne survivent pas (Holscher *et al.*, 2008), soutenant l'hypothèse de redondance des récepteurs TLRs dans le contrôle de l'infection. Plus tard, le phénotype des souris MyD88<sup>-/-</sup> a été

imputé au récepteur de l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-1R1, qui partage l'utilisation de MyD88 pour sa signalisation avec la famille des TLRs (Fremond *et al.*, 2007).

Il ressort de toutes ces études que les différents TLRs contribuent à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace contre les mycobactéries, mais l'étude d'Hölscher montre également que ces récepteurs ne sont pas essentiels, ce qui suggère une redondance avec d'autres récepteurs de l'immunité innée pour permettre la reconnaissance du pathogène en l'absence du signal TLR (Trinchieri and Sher, 2007).

### c) *Nouveau senseur de l'immunité : cGAS/STING*

Le système immunitaire dispose également de récepteurs cytoplasmiques spécialisés dans la reconnaissance de l'ADN, outre les TLRs endosomaux (TLR3, 7-8 et 9). La protéine adaptatrice STING fait partie de cette catégorie. En effet, STING a été montré comme essentiel dans la réponse IFN $\beta$  induite par l'ADN viral et des souris déficientes pour STING deviennent plus sensibles aux infections virales et bactériennes (Ishikawa *et al.*, 2009). D'autre part, STING est capable de reconnaître les dinucléotides cycliques comme le c-di-GMP (second messenger bactérien) (Burdette *et al.*, 2011) et le cGAMP (second messenger mammifère) et d'induire une réponse IFN de type I.

En tant qu'adaptateur, STING est impliqué dans la signalisation via plusieurs récepteurs, mais en 2013, l'équipe de Zhijian Chen a mis en évidence l'enzyme cGAMP synthase (cGAS), capable de lier l'ADN via le squelette phosphate (donc de manière complètement indépendante de la séquence) et de catalyser la production de cGAMP comme second messenger, lequel va se lier à STING pour conduire à l'activation du facteur de transcription IRF3 via l'activation de TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) (Sun *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). Le rôle de cGAS a été confirmé *in vivo* par l'utilisation de souris génétiquement invalidées pour cette enzyme, qui se sont révélées plus susceptibles à des infections virales que des souris de type sauvage (Li *et al.*, 2013; Schoggins *et al.*, 2014). De plus, il est intéressant de noter que le cGAMP est capable de diffuser à travers les jonctions serrées des cellules voisines, transférant ainsi le signal de danger et menant à l'activation de STING et de la réponse IFN type I dans des cellules non-infectées (Ablasser *et al.*, 2013).

La question du rôle de la voie cGAS/STING dans l'infection par *M. tuberculosis* a été récemment adressée. Dans son étude de 2012, Watson *et al.*, mettent en évidence le lien entre reconnaissance de l'ADN et l'autophagie (Watson *et al.*, 2012). Ainsi, après internalisation, la membrane du phagosome est perméabilisée, exposant l'ADN mycobactérien à STING. La liaison

de STING avec l'ADN est nécessaire pour permettre d'ubiquitinyler les bactéries afin d'initier le processus d'autophagie. Cette perméabilisation est limitée et est médiée par le système de sécrétion de *M. tuberculosis*, ESX-1. Outre le processus d'autophagie, la voie STING/TBK1/IRF3 est activée et l'IFN $\beta$  est produit. Ceci suggère que cette reconnaissance cytosolique de *M. tuberculosis* se fait au détriment de l'hôte et est probablement corrélée avec les taux élevés d'IFN de type I associés à la sévérité de la pathologie (Manca *et al.*, 2001; Manzanillo *et al.*, 2012).

#### d) Polymorphismes chez l'homme

De manière intéressante, des polymorphismes dans certains gènes codant pour les récepteurs de l'immunité innée ont été associés avec une susceptibilité à la tuberculose chez l'homme : ainsi, les Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) Arg753Gln et Arg677Trp situés sur le gène codant pour le TLR2 ont été associés avec une susceptibilité à la tuberculose dans une cohorte turque et tunisienne, respectivement (Ben-Ali *et al.*, 2004; Ogus *et al.*, 2004). Il est également intéressant de noter que les polymorphismes de TLR2 semblent être liés à un génotype particulier de *M. tuberculosis* : le terme de coévolution prend tout son sens après les études de Caws et Van Crevel, qui ont montré une association directe entre le génotype des patients d'une part et la souche de *M. tuberculosis* d'autre part (Caws *et al.*, 2008; van Crevel *et al.*, 2009).

La pression de sélection existant entre les souches de mycobactéries et le système immunitaire de son hôte humain concerne également des récepteurs de l'immunité autre que les TLRs. Des variations dans les gènes codant pour le MR, DC-SIGN et d'autres molécules ont ainsi été identifiées et associées à la tuberculose chez l'homme, démontrant l'implication et la coopération de tous ces PRRs dans l'établissement d'une réponse immunitaire idéale non seulement dans le modèle murin mais également chez les patients (Azad *et al.*, 2012).

## 2. Cellules impliquées dans la réponse innée et formation du granulome

L'étape de reconnaissance et d'internalisation de la bactérie par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) est donc médiée par beaucoup d'acteurs moléculaires à la surface des macrophages alvéolaires et des cellules dendritiques. Ce premier contact avec le pathogène est crucial pour établir une réponse immunitaire coordonnée entre les différents types cellulaires impliqués qui aboutira à la formation et la structuration du granulome tuberculeux.

### a) Les macrophages

Les macrophages sont plus spécialisés dans l'élimination de la menace et ont ainsi à leur disposition un répertoire assez varié pour la destruction du pathogène. En effet, ils sont capables de produire de l'oxyde nitrique (NO pour Nitric Oxide) suite à l'expression de l'enzyme inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), mais aussi des peptides antimicrobiens et beaucoup de médiateurs de type interleukines et chimiokines pour recruter et activer d'autres cellules. L'autophagie est également un mécanisme mis en œuvre par les macrophages pour tuer *M. tuberculosis* (Liu and Modlin, 2008). Ce processus d'autophagie est médié par l'Interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et conduit à l'activation de la GTPase LRG47 (ou IRGM chez l'homme) ; des peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse de l'ubiquitine seraient ensuite produits dans le compartiment lysosomal par la cathepsine D et délivrés dans les phagosomes par autophagie pour conduire à l'élimination des pathogènes (Alonso *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2004).

L'internalisation de pathogènes dans les phagosomes est généralement suivie de la fusion avec les lysosomes avec acidification du milieu. Cette fusion peut être inhibée par *M. tuberculosis* (Mwandumba *et al.*, 2004), mais même en pH acide, les bacilles sont capables de survivre. Plus précisément, l'acidification des phagolysosomes diminue le métabolisme des mycobactéries, ce qui les rend très dépendantes de sources de carbone comme le pyruvate ou le cholestérol. Sans ces composés, la croissance bactérienne est stoppée (Baker *et al.*, 2014). Or, les phagosomes mycobactériens sont capables d'interagir avec les *lipid bodies* de la cellule pendant la dormance ce qui permet aux bactéries d'utiliser les lipides stockés dans ces organelles comme sources de carbone et ainsi survivre à l'intérieur du macrophage (Peyron *et al.*, 2008).

Les macrophages murins sont activés par les actions combinées de l'IFN $\gamma$ , du TNF et des signaux provenant des PRRs, mais les macrophages humains nécessitent en plus la vitamine D2, en tant que cofacteur d'activation, qui se fixe sur son récepteur Vitamin-D Receptor (VDR) pour conduire à l'expression de certains peptides antimicrobiens comme la cathelicidine (ou LL-37) (Martineau *et al.*, 2007). Ce composé a donc un rôle tout à fait inattendu dans le contrôle de l'infection mycobactérienne. Ainsi, il a été rapporté en 2014 que les macrophages issus de patients diabétiques et carencés en vitamine D2 sont incapables de contrôler l'infection par *M. tuberculosis* *ex vivo*, et qu'un ajout de vitamine D2 permettait de contrebalancer ce phénotype (Lopez-Lopez *et al.*, 2014). D'autre part, en inhibant le PPAR $\gamma$ , la vitamine D2 est capable de diminuer l'accumulation des *lipid bodies* essentiels à la multiplication de *M. tuberculosis* au sein de la cellule (Salamon *et al.*, 2014).

Les macrophages sont donc bien armés mais *M. tuberculosis* a développé de nombreuses stratégies pour échapper à sa destruction, et l'assistance des autres cellules du système immunitaire est nécessaire pour l'établissement d'une réponse immune efficace.

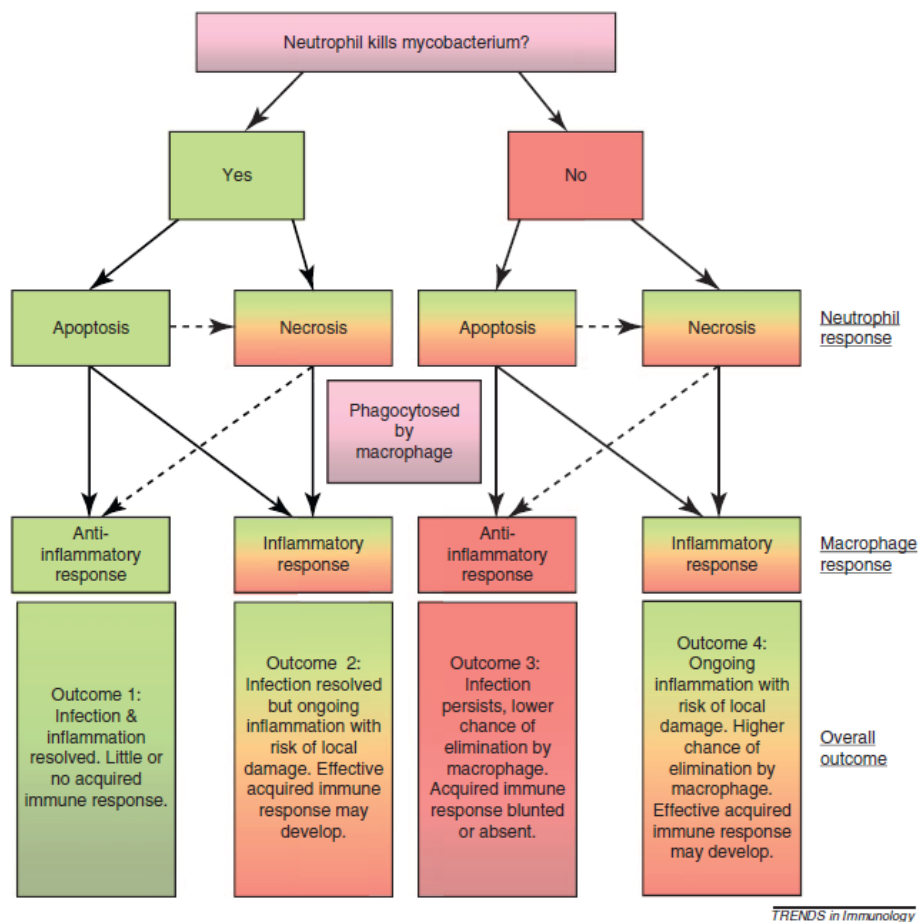
#### *b) Les neutrophiles*

Les polynucléaires neutrophiles sont recrutés très rapidement après l'infection suite à la sécrétion de chimiokines comme CXCL1/KC (ou IL-8 chez l'homme), de prostaglandines (PGs) et de leucotriènes (LTs) et sont nécessaires au contrôle de la charge bactérienne après infection (Pedrosa *et al.*, 2000). En effet, les neutrophiles présentent plus de bacilles internalisés que les autres populations de phagocytes chez l'homme (Eum *et al.*, 2010) et leur présence précoce dans les poumons a été associée avec une réduction de la charge bactérienne (Barrios-Payan *et al.*, 2006; Sugawara *et al.*, 2004). En revanche, une déplétion des neutrophiles en phase chronique d'infection a plutôt l'effet inverse, augmentant l'inflammation et diminuant la charge bactérienne pulmonaire, ce qui suggère que les neutrophiles auraient aussi un rôle d'immunomodulation de la réponse (Zhang *et al.*, 2009).

Une fois recrutés sur le site d'infection, les neutrophiles sont capables de reconnaître les mycobactéries soit directement probablement via les récepteurs TLR2 et TLR4 (Aleman *et al.*, 2004; Godaly and Young, 2005; Neufert *et al.*, 2001) soit par opsonisation (Majeed *et al.*, 1998) mais leur capacité à tuer les bactéries et l'impact sur la réponse immunitaire est encore très controversée. En effet, l'étude de Kisich en 2002 montre qu'après inoculation de différents organismes et en présence de TNF, les neutrophiles sont capables d'éliminer entre 50 et 95% des pathogènes, ce qui est extrêmement variable (Kisich *et al.*, 2002). La capacité à tuer des neutrophiles doit donc sûrement reposer sur de nombreux facteurs de l'hôte et du pathogène, car en théorie, si les neutrophiles pouvaient tuer à coup sûr, les mycobactéries seraient éradiquées très tôt après infection. En revanche, si cette capacité est bridée par des facteurs/mécanismes encore inconnus, le neutrophile deviendrait un véritable « Cheval de Troie » pour l'organisme en hébergeant la bactérie jusqu'à atteindre d'autres sites d'infection potentiels.

Même si l'élimination du pathogène est très discutée, il ne fait aucun doute que les neutrophiles s'accumulent au niveau du site d'infection, et sont capables d'internaliser les bactéries. Il s'agit ensuite de bien coopérer avec les macrophages pour trouver l'issue idéale à cette internalisation. En effet, après phagocytose des mycobactéries, les neutrophiles vont procéder à leur élimination ou non, puis enclencher un processus de mort cellulaire. La clairance de ces cellules apoptotiques est assurée par les macrophages : en général, l'apoptose induit plutôt

une réponse de type anti-inflammatoire, mais une issue pro-inflammatoire associée à la nécrose est également possible (Krysko *et al.*, 2006). Lowe *et al.*, ont proposé un mécanisme de coopération illustré en **Figure 08**.



**Figure 08. Coopération macrophages/neutrophiles.** Après internalisation de *M. tuberculosis* par les neutrophiles et son élimination éventuelle, ces cellules entrent en mort cellulaire et sont ingérées par les macrophages. Les auteurs proposent différentes issues : si la bactérie à l’intérieur du neutrophile a été tuée, le plus favorable pour l’hôte est d’enclencher une clairance de type anti-inflammatoire (« outcome 1 »), mais si la bactérie est encore vivante, il est préférable d’induire une réponse inflammatoire (« outcome 4 »). Pour le pathogène en revanche, induire une réponse anti-inflammatoire après avoir survécu à la phagocytose neutrophilique lui permet une dissémination maximale (« outcome 3 ») (Lowe *et al.*, 2012).

Les neutrophiles sont donc capables d’induire un phénotype pro- ou anti-inflammatoire chez les macrophages via la sécrétion de différents facteurs mais également via leur type de mort cellulaire, et sont donc déterminants dans l’issue de l’infection par *M. tuberculosis*.

### c) Les cellules dendritiques

Charnières de l’immunité, les cellules dendritiques sont au cœur des interactions nécessaires à l’orchestration d’une réponse immunitaire efficace contre *M. tuberculosis*.



Alors que l'internalisation par les macrophages conduit généralement à l'élimination du pathogène, les cellules dendritiques vont plutôt sécréter de l'IL-12 et surexprimer les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), CD40 et InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), autant de facteurs pour faciliter la présentation aux lymphocytes T et ainsi l'activation de l'immunité adaptative (Bodnar *et al.*, 2001; Gonzalez-Juarrero and Orme, 2001). Ainsi, les cellules dendritiques pourraient constituer un réservoir non négligeable qui alimenterait les ganglions (Tailleux *et al.*, 2003).

L'interaction des cellules dendritiques avec les macrophages et neutrophiles apoptotiques permettrait d'accélérer l'internalisation des pathogènes, une migration plus précoce vers les ganglions ainsi qu'une activation plus rapide des lymphocytes T (Blomgran and Ernst, 2011; Divangahi *et al.*, 2010). La migration vers les ganglions lymphatiques prend entre 8 et 12 jours et est dépendante des chimiokines CCL19 et CCL21 (Wolf *et al.*, 2007). Cependant, les cellules dendritiques fortement infectées par *M. tuberculosis* ne vont pas induire le plus efficacement l'activation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1, malgré une expression équivalente de CMH de classe II et de molécules de costimulation (Wolf *et al.*, 2007). D'autre part, la déplétion des cellules CD11c<sup>+</sup> via l'injection de toxine diphtérique induit un retard de développement des cellules T CD4<sup>+</sup> et une infection non contrôlée (Tian *et al.*, 2005).

Ainsi, les cellules dendritiques sont essentielles par leur rôle de CPA pour initier la réponse adaptative et indirectement l'activation des macrophages et des neutrophiles via la production d'IFN $\gamma$  par les cellules T. Toutes ces populations cellulaires participent à la constitution du granulome en réponse à l'infection par *M. tuberculosis*.

#### d) *Initiation du granulome*

Le rôle du granulome n'est pas toujours très clair, entre sa fonction de confinement de la mycobactérie et son implication dans la pathologie tissulaire. Est-il bénéfique pour l'hôte ou pour la bactérie ? Probablement les deux à la fois suivant le stade de la maladie (Barry *et al.*, 2009).

La structure caractéristique de la tuberculose est, au départ, principalement formée de macrophages ([Figure 05](#), (Davis *et al.*, 2002)), lesquels représentent à eux seuls une population très hétérogène. En effet, on distingue les macrophages matures, les macrophages spumeux riches en gouttelettes lipidiques, et les cellules géantes multinucléées (MGC). Le rôle de la mycobactérie dans ces différents phénotypes a été mis en évidence. En effet, les acides mycoliques présents dans l'enveloppe de *M. tuberculosis* sont responsables de la différenciation des macrophages en macrophages spumeux qui constitueraient un réservoir nutritif pour la bactérie en dormance

(Peyron *et al.*, 2008). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que *M. tuberculosis* est capable de survivre au sein des adipocytes (Neyrolles *et al.*, 2006). Par ailleurs, les MGC sont issues de la fusion de plusieurs macrophages suite à la stimulation par des composés de l'enveloppe mycobactérienne comme le LAM et le LM (Puissegur *et al.*, 2007).

Le recrutement précoce de macrophages après infection constitue la première étape de la formation du granulome. Il a été montré que la protéine de virulence 6kD-Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6) était responsable de la production de Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) par les cellules épithéliales pulmonaires, ce qui va augmenter le recrutement de macrophages sains au niveau du site d'infection : ceci fournit de nouvelles cibles à *M. tuberculosis* et ce phénomène est directement relié à la croissance bactérienne (Volkman *et al.*, 2010).

Les cellules dendritiques sont également retrouvées au niveau des granulomes, et vont pouvoir interagir de façon privilégiée avec les lymphocytes recrutés ou migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire adaptative. L'accumulation des cellules immunitaires innées est ainsi peu à peu entourée de lymphocytes B et T et de fibroblastes pour constituer le granulome caractéristique décrit en **Figure 05** (partie II) (Peters and Ernst, 2003).

### *B. Immunité adaptative et maintien actif des granulomes*

Initiée par les cellules dendritiques, la réponse adaptative liée à *M. tuberculosis* est très majoritairement de type Th1, avec des productions d'IFN $\gamma$  et d'IL-12 très importantes. Une étude chez l'homme a montré que des structures lymphoïdes se forment en périphérie des granulomes dans les poumons, et que ces follicules sont constitués de lymphocytes B, T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (Ulrichs *et al.*, 2004). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont tout d'abord été mis en cause dans le contrôle de la charge bactérienne : des souris déficientes pour cette population cellulaire, ou bien pour le CMH de classe II, sont extrêmement susceptibles à l'infection, et la lymphopénie T CD4<sup>+</sup> induite par le VIH est également responsable d'une susceptibilité accrue à la tuberculose chez l'homme (Cooper, 2009; Markowitz *et al.*, 1997; Moguez *et al.*, 2001). Malgré tout, les lymphocytes B et T CD8<sup>+</sup> sont également recrutés au niveau du site d'infection (Tsai *et al.*, 2006). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> participent à la défense immunitaire par leur sécrétion d'IFN $\gamma$ , nécessaire à l'activation des mécanismes bactéricides des macrophages, mais également d'autres molécules capables de tuer directement le pathogène comme la granulysine (Gansert *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2015; Stenger *et*

*al.*, 1998) néanmoins, ces cellules sont incapables de compenser l'absence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Mogues *et al.*, 2001; North and Jung, 2004).

Les lymphocytes B sont eux aussi présents sur le site d'infection et pourraient jouer un rôle plus important que ce que la communauté scientifique ne pensait jusqu'alors (Maglione and Chan, 2009). Dans cette revue, les auteurs montrent que les cellules B seraient capables d'organiser l'immunomodulation de la réponse. Une déficience en lymphocytes B n'a pas de fort impact sur le contrôle de l'infection mais provoque une réponse immune retardée et une altération du développement des granulomes (Bosio *et al.*, 2000); en revanche, une infection avec une forte dose entraîne une susceptibilité des souris déficientes en cellules B (Maglione *et al.*, 2007). Cette immunomodulation dépendante des lymphocytes B seraient orchestrée via les Fcγ-récepteurs ce qui conduirait à une augmentation de l'IL-10 et une diminution de l'IL-12, entraînant une réduction de la réponse Th1 (Maglione *et al.*, 2008). En conséquence, la réponse humorale jouerait un rôle protecteur non négligeable à différents stades de l'infection par *M. tuberculosis* (Achkar *et al.*, 2015). D'autre part, la vaccination BCG permet d'améliorer la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, leur production d'IFNγ ainsi que la dégranulation des T CD8<sup>+</sup>. De plus, les anticorps induits par la vaccination BCG chez l'homme sont capables d'augmenter le pouvoir phagocytaire des macrophages de même que la capacité bactéricide des neutrophiles (de Valliere *et al.*, 2005).

Même si la réponse immunitaire adaptative liée à *M. tuberculosis* est clairement de type Th1, plusieurs populations de lymphocytes différentes sont impliquées. Ainsi, les lymphocytes Th17, producteurs d'IL-17 et d'IL-22, sont également induits par l'IL-23 produite par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques (Cooper, 2009). L'IL-23 et l'IL-12 étant toutes deux sécrétées par les cellules dendritiques infectées, il existe un véritable équilibre Th1/Th17 (Torrado and Cooper, 2010). Les effets et le rôle de l'IL-17 produite par ce type cellulaire dans la réponse immunitaire à *M. tuberculosis* seront discutés dans la partie II, C, 4.

Les cellules de l'immunité innée et acquise sont ainsi coordonnées pour la formation du granulome et le stade de latence observé dans la majorité des cas de tuberculose est caractérisé par la présence de ces structures hiérarchisées au niveau des poumons. Cependant, sans un contrôle et un maintien actif, les mycobactéries contenues en son sein peuvent être libérées dans tout l'organisme. D'autre part, la vascularisation des granulomes diminue fortement à un stade avancé, notamment avec la formation de la coiffe fibrotique tout autour de la structure, rendant inefficace les traitements, et les mycobactéries, en induisant une nécrose cellulaire, contribuent à la formation d'un centre caséique propice à leur survie dans le milieu extracellulaire (Russell *et al.*, 2009). Véritables bombes à retardement, les granulomes peuvent se rompre suite à une faiblesse

du système immunitaire. En particulier, la neutralisation du TNF pendant cette phase de latence peut aboutir à la désagrégation des granulomes et induire la réactivation de tuberculose latente (Xie *et al.*, 2014).

En conclusion, les différents acteurs cellulaires recrutés sur le site d'infection agissent de concert et communiquent via la sécrétion de nombreuses molécules pour permettre de contenir les bacilles de manière active au sein des granulomes, à défaut de pouvoir l'éliminer. Ces médiateurs moléculaires sont cruciaux pour établir une bonne défense de l'hôte contre *M. tuberculosis*.

### C. Les médiateurs de l'immunité

Les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules du système immunitaires sont autant de messages qui permettent d'obtenir une réponse coordonnée ; un défaut ou une surexpression d'une de ces molécules, qu'elle soit pro ou anti-inflammatoire, entraîne un déséquilibre la plupart du temps délétère pour l'hôte, et profitable à la mycobactérie. Certains de ces médiateurs clés sont brièvement présentés ici et leur rôle dans la réponse à *M. tuberculosis* sera discuté.

#### 1. La famille de l'IL-12 et l'IFN $\gamma$

La famille de l'IL-12 regroupe l'IL-12, l'IL-23, l'IL-27 et l'IL-35 qui constituent des facteurs essentiels dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Toutes ces cytokines sont des hétérodimères composés des sous-unités p19, p35, p40, Epstein Barr Virus induced protein 3 (EBI3) ou p28. Plus particulièrement, l'IL-12 correspond à l'association des chaînes p35 et p40, tandis que l'IL-23 est formée des sous-unités p19 et p40 (Vignali and Kuchroo, 2012). L'IL-12 et l'IL-23 sont des cytokines proinflammatoires produites majoritairement par les cellules myéloïdes (monocytes/macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles) en réponse à l'infection (Gonzalez-Juarrero and Orme, 2001), et ces deux cytokines ont déjà été incriminées dans la réponse de l'hôte à *M. tuberculosis*.

##### a) L'IL-12 et l'IFN $\gamma$

Chez l'homme, il a été reconnu dès 1996 que des mutations dans les voies de l'IFN $\gamma$  ou de la réponse à l'IL-12 entraînent une susceptibilité accrue aux mycobactéries (Jouanguy *et al.*, 1997). Ce syndrome est relativement rare et est appelé MSMD (Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease). Le MSMD est caractérisé par une plus grande sensibilité à l'infection par des mycobactéries faiblement virulentes comme le BCG, qui ne provoquent normalement pas de symptômes chez les individus. Depuis 1996, 9 gènes ont été incriminés dans ce syndrome, dont les

gènes codant pour le récepteur de l'IFN $\gamma$ , mais également les gènes *IL12B* et *IL12RB1* codant respectivement pour l'IL-12p40 et son récepteur (Bustamante *et al.*, 2014; Filipe-Santos *et al.*, 2006). Ces deux voies de signalisation sont donc essentielles à la réponse immunitaire à la tuberculose.

En effet, après phagocytose de *M. tuberculosis*, les macrophages et les cellules dendritiques sont capables de sécréter de l'IL-12 qui est nécessaire non seulement pour la migration de ces dernières vers les ganglions drainants (Khader *et al.*, 2006), mais aussi pour l'induction de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> potentialisées en cellules Th1 (Cooper *et al.*, 1997), processus crucial pour l'hôte. En effet, en absence d'IFN $\gamma$ , les souris sont incapables de survivre à l'infection par *M. tuberculosis* : la production de Reactive Oxygen Species (ROS) est réduite et les animaux subissent une destruction tissulaire importante et des charges bactériennes extrêmement élevées (Cooper *et al.*, 1995; Flynn *et al.*, 1993). L'IL-12 est de surcroît indispensable au maintien de l'immunité pendant l'infection chronique : un défaut de production de cette cytokine, engendrant une diminution d'IFN $\gamma$ , conduit ainsi à une mortalité des animaux infectés (Feng *et al.*, 2005). Il est donc évident que l'IL-12 joue un rôle central dans l'immunité anti-mycobactérienne, et des études se sont par la suite attachées à la contribution relative des sous-unités p35 et p40. Il en ressort que des souris déficientes pour la chaîne p40 sont plus susceptibles à l'infection que des souris déficientes pour la chaîne p35, suggérant un rôle prépondérant de la sous-unité p40 (Cooper *et al.*, 2002). Par ailleurs, un article de 2005 détaille un polymorphisme fonctionnel touchant le promoteur du gène *CCL2*, codant pour MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). Les individus présentant ce phénotype possèdent des taux élevés de MCP-1 ainsi qu'une diminution d'IL-12p40 au niveau sérique ; ceci entraîne un risque 5 fois plus élevé de développer une tuberculose par rapport à des personnes n'ayant pas ce polymorphisme (Flores-Villanueva *et al.*, 2005). La sous-unité p40 semble donc tout particulièrement importante pour se défendre efficacement contre *M. tuberculosis* puisque des variations de production sont associées à une plus grande susceptibilité à la pathologie.

Il a été rapidement évident que l'IFN $\gamma$  était essentiel à la réponse de l'hôte aux mycobactéries. Les effets biologiques de l'IFN $\gamma$  sont relativement connus, et sont très étendus puisqu'ils concernent la régulation de plus de 200 gènes (Boehm *et al.*, 1997). Malgré tout, les mécanismes en aval de la signalisation par l'IFN $\gamma$  dans le cadre d'une infection par *M. tuberculosis* restent peu clairs. L'expression de l'enzyme iNOS, nécessaire pour la production de ROS et donc pour la défense de l'hôte au cours de l'infection (Scanga *et al.*, 2001), fait partie des voies dépendantes de la voie IFN $\gamma$ , mais le rôle d'autres molécules dépendantes de l'expression d'IFN $\gamma$  a également été mis en évidence dans la réponse immune à l'infection. Les travaux de

recherche se poursuivent encore afin d'établir clairement les voies de signalisation IFN $\gamma$ -dépendantes qui sont essentielles.

Comme discuté précédemment, la production d'IFN $\gamma$  est critique pour établir une réponse immunitaire correcte. Pourtant, de très forts taux d'IFN $\gamma$  sont retrouvés dans les Liquides Broncho-Alvéolaires (LBA) et le plasma des patients atteints de tuberculose et sont corrélés avec la sévérité de la pathologie. D'autre part, ces taux sont diminués chez les personnes suivant une chimiothérapie anti-tuberculose (Tsao *et al.*, 2002; Verbon *et al.*, 1999). Ces variations sont d'ailleurs utilisées comme marqueur pour diagnostiquer une tuberculose latente, en complément du test à la tuberculine. Le test IGRA, regroupant les tests Quantiferon Gold in Tube® et T-spot Tb®, est basé sur la mesure d'IFN $\gamma$  relargué par les cellules T circulantes suite à la stimulation avec des antigènes de *M. tuberculosis* soit par dosage ELISA (Quantiferon GiT®) ou par technique ELISPOT (T-spot Tb®). Contrairement au test à la tuberculine, le test IGRA n'est pas affecté par la vaccination BCG, et même si de nombreux facteurs peuvent jouer sur la reproductibilité des résultats (Pai *et al.*, 2014), il est largement utilisé chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques avant l'administration d'anti-TNF $\alpha$  par exemple (Mariette *et al.*, 2012; Saidenberg-Kermanac'h *et al.*, 2012).

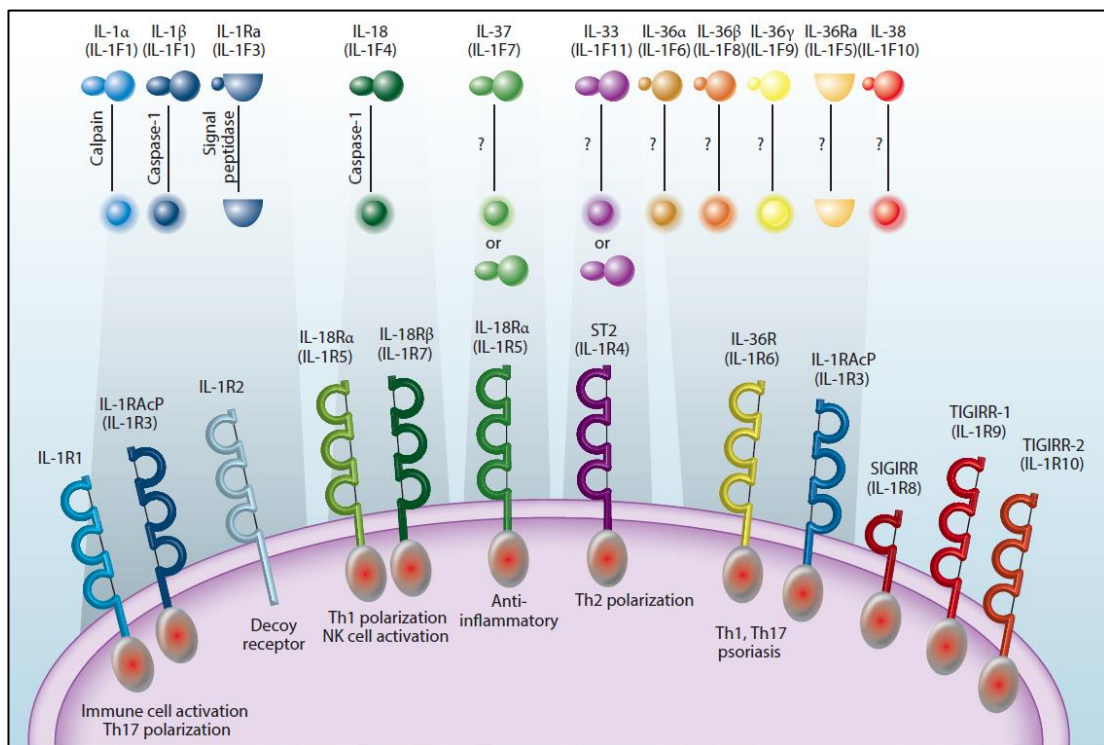
#### *b) L'IL-23*

Sécrétée avec l'IL-12 par les cellules dendritiques, l'IL-23 est essentielle pour la génération de cellules Th17 (Khader *et al.*, 2005). Néanmoins, des souris déficientes pour l'IL-23p19 contrôlent l'infection aussi bien que des souris de type sauvage, bien qu'elles présentent une réduction drastique du nombre de cellules productrices d'IL-17, ainsi que de la production d'IL-17 (Khader *et al.*, 2005). L'IL-23 est tout de même capable de compenser partiellement l'absence du signal IL-12, puisque chez des souris déficientes pour la chaîne p35, il a été observé la présence de cellules Th1 sécrétant l'IFN $\gamma$  (Khader *et al.*, 2005). De plus, l'IL-23 pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'inflammation pulmonaire en phase chronique : en effet, l'absence d'IFN $\gamma$  chez des souris conduit à une augmentation du nombre de cellules Th17, associée à une accumulation de neutrophiles dans les granulomes et une forte croissance bactérienne (Cruz *et al.*, 2006) et il a été montré que l'IFN $\gamma$  est capable de significativement réduire la survie des neutrophiles dans les poumons et d'inhiber la production d'IL-17 par les cellules Th17 (Nandi and Behar, 2011). En parallèle, des taux élevés d'IFN $\gamma$  sont eux aussi associés à la sévérité de la pathologie. La balance Th1 vs Th17, ou IL-12/IFN $\gamma$  vs IL-23/IL-17, semble donc être centrale pour l'intégrité tissulaire et le maintien du contrôle de l'infection (Khader and Cooper, 2008).

## 2. La famille de l'IL-1

Les membres de la famille de IL-1 sont au nombre de 11, répertoriés dans la **Figure 09**. Les cytokines de la famille de l'IL-1 ont été associées à des pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques et sont essentielles dans la réponse de l'hôte aux infections. Exception faite de l'IL-1Ra, ces protéines ne possèdent pas de signal peptide, et sont produites sous une pro-forme précurseur généralement inactive qui est ensuite clivée par des enzymes spécifiques pour donner la cytokine active qui sera sécrétée. Il est possible de subdiviser cette famille en trois sous-groupes selon la taille de la protéine précurseur et la longueur de la partie clivée :

- La sous-famille IL-1, comprenant l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1Ra et l'IL-33. Ces cytokines ont la plus longue pro-forme, et deux d'entre elles (l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-33) sont biologiquement actives même avant clivage notamment au niveau nucléaire.
- La sous-famille IL-18, dont font partie l'IL-18 et l'IL-37.
- La sous-famille IL-36 qui compte l'IL-36Ra, l'IL-36 $\alpha$ , l'IL-36 $\beta$ , l'IL-36 $\gamma$  et l'IL-38, avec les pro-formes les plus courtes (Garlanda *et al.*, 2013).



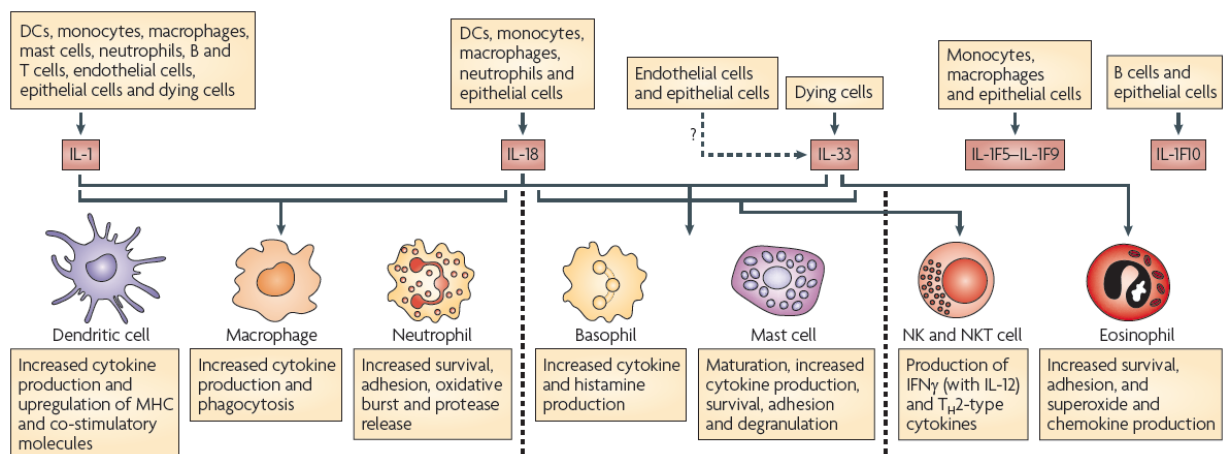
**Figure 09. Membres de la famille IL-1.** Les ligands et leurs récepteurs respectifs sont représentés, et certains principaux rôles biologiques sont indiqués (Netea *et al.*, 2015).

Les membres de la famille de l'IL-1 sont activés par différentes enzymes, parmi lesquelles la caspase 1, qui clive l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, mais aussi l'IL-33 bien que le clivage de l'IL-33 par la caspase 1 résulte en une forme biologiquement inactive (Cayrol and Girard, 2009). La calpaïne est

capable de cliver l'IL-1 $\alpha$  (Miller *et al.*, 1994; Yazdi and Drexler, 2013), et les protéases contenues dans les granules des neutrophiles comptent elles aussi des cytokines de la famille de l'IL-1 parmi leurs substrats : ainsi, la Neutrophil Elastase (NE) et la Cathepsine G (CG) clivent l'IL-33 (en une forme active) et la protéinase 3 (PR3) est capable de processor l'IL-18. L'IL-1 $\beta$  possède des sites de clivage pour ces trois protéases neutrophiliques, parmi d'autres (Coeshott *et al.*, 1999; Dinarello, 1996; Sugawara *et al.*, 2001). En revanche, l'enzyme responsable du clivage de la pro-IL-36 reste encore indéterminée (Towne *et al.*, 2011).

### a) L'IL-1 $\alpha$ et l'IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\alpha$  peut se fixer à son récepteur IL-1R1 aussi bien sous forme clivée que sous forme longue, tandis que l'IL-1 $\beta$  ne fixe l'IL-1R1 qu'après maturation post-traductionnelle. Cette fixation induit l'activation de NF $\kappa$ B via le recrutement de la molécule MyD88. Exprimée par de nombreux types cellulaires, il a été proposé que l'IL-1 $\alpha$  joue un rôle dans l'inflammation stérile et soit relarguée après nécrose, constituant ainsi un signal de danger pour les cellules voisines (Cohen *et al.*, 2010). L'IL-1 $\beta$  est une cytokine fortement pro-inflammatoire et par conséquent extrêmement régulée ; produite sous forme longue et inactive par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques suite à un premier signal type TLR, ce n'est qu'après clivage qu'elle est active, et sécrétée. Cette maturation est majoritairement assurée par la caspase 1 après activation d'un complexe protéique appelé l'inflammasome suite à un second signal (Agostini *et al.*, 2004).



**Figure 10.** Sources cellulaires et effets biologiques des cytokines de la famille de l'IL-1 (Sims and Smith, 2010).

Les IL-1s ont un très large spectre d'action sur les cellules de l'immunité ([Figure 10](#)) et nécessite donc une régulation très forte. Cette régulation se fait à plusieurs niveaux. En effet, l'IL-1Ra est l'antagoniste naturel de l'IL-1R1 : la fixation de l'IL-1Ra sur son récepteur n'entraîne aucune signalisation, prévient le recrutement de la chaîne IL-1RAcP (IL-1 Receptor Accessory Protein) et empêche donc l'activité biologique des IL-1s (Greenfeder *et al.*, 1995). D'autre part, il



existe un récepteur leurre, l'IL-1R2, dont le domaine extracellulaire est identique à celui de l'IL-1R1, mais dont la partie cytoplasmique est non fonctionnelle.

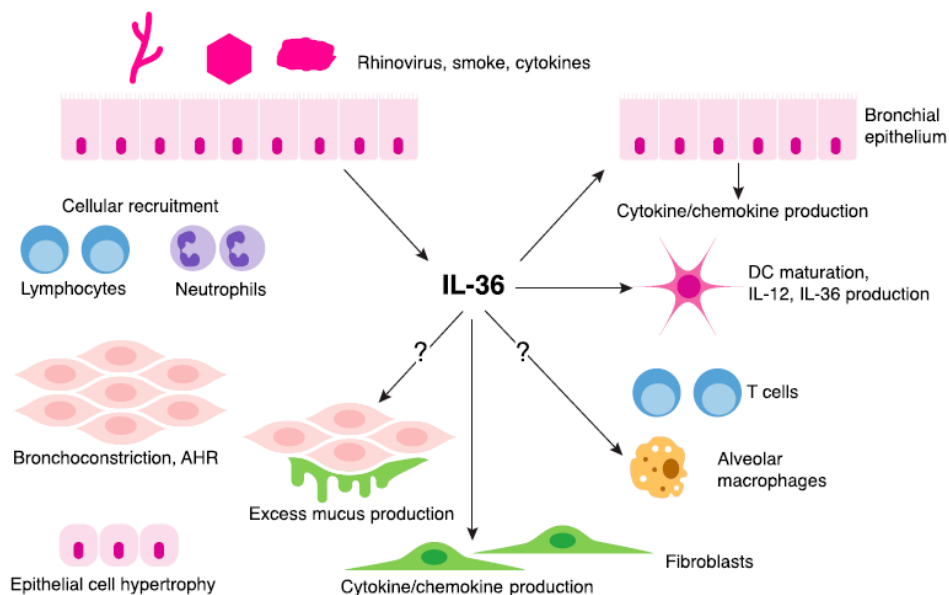
Très fortement pro-inflammatoires, les IL-1s sont impliquées dans plusieurs pathologies en cas de dérégulation, comme la goutte par exemple, et des traitements visant à bloquer ces cytokines ont été mis au point pour les patients arthritiques. Le plus connu, l'Anakinra, est une IL-1Ra recombinante humaine largement utilisée pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde entre autres. Cependant, lors de l'infection par *M. tuberculosis* virulent, les IL-1s ont un rôle central : des souris déficientes pour MyD88 ou pour IL-1R1 sont extrêmement sensibles et succombent en 4-5 semaines (Fremond *et al.*, 2007; Fremond *et al.*, 2004). De plus, l'IL-1 $\beta$  serait produite de manière indépendante de la caspase 1 au cours de l'infection par *M. tuberculosis* et aurait un rôle crucial dans le contrôle de l'infection (Mayer-Barber *et al.*, 2010) ; une seconde étude a montré que les deux ligands de l'IL-1R1 semblent importants dans la réponse immunitaire à *M. tuberculosis* (Mayer-Barber *et al.*, 2011), bien que la virulence de la souche utilisée puisse influencer leur implication (Bourigault *et al.*, 2013a). Le rôle des IL-1s a été récemment mis en relation avec les IFN de type I : ainsi, les IL-1s inhiberaient la production d'IFN de type I via l'action de la prostaglandine E2, tandis que les IFN de type I régulent négativement les niveaux d'IL-1 directement mais aussi via l'induction d'IL-10 et d'IL-1Ra (Mayer-Barber *et al.*, 2014). L'absence de la voie de signalisation de l'IL-1 provoque donc une augmentation des IFN de type I qui cause une croissance bactérienne accrue dans les poumons.

### *b) L'IL-36*

Les IL-36s partagent de nombreuses similitudes avec les IL-1s. Au nombre de 3 agonistes (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  et IL-36 $\gamma$ ) et un antagoniste (IL-36Ra), ce dernier possède une très forte homologie avec l'IL-1Ra. Malgré cela, l'IL-36Ra est incapable de se lier à l'IL-1R1 et se fixe préférentiellement à l'IL-1Rp2 ou IL-36R, pour bloquer la signalisation des 3 ligands. La voie de signalisation de l'IL-36R fait intervenir, tout comme pour l'IL-1R1, la protéine accessoire IL-1RAcP qui est recrutée après fixation du ligand pour conduire à l'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Towne *et al.*, 2004). D'autre part, l'IL-36 $\alpha$ , l'IL-36 $\beta$  et l'IL-36 $\gamma$  sont peu actives sous leur forme précurseur, et nécessitent une maturation de leur partie N-terminale pour une fixation optimale sur leur récepteur (Towne *et al.*, 2011). Cependant, ce clivage n'a pas encore été documenté dans des conditions pathologiques, et des recherches sont toujours activement menées pour comprendre à quel moment et par quelle enzyme cette maturation est effectuée.

Les IL-36s sont des cytokines pro-inflammatoires exprimées dans plusieurs tissus dont la peau, les poumons et les intestins mais aussi dans des cellules du système immunitaire comme les monocytes, macrophages et les lymphocytes T (Vigne *et al.*, 2011). Les IL-36s sont ainsi capables de stimuler la production de TNF, IL-1, IL-12 et IL-23 par les cellules dendritiques et de promouvoir leur maturation via l'augmentation de l'expression du CMH II. Ces cytokines sont donc impliquées dans la polarisation Th1 et peuvent avoir un rôle non négligeable dans les pathologies Th1-dépendantes.

Au niveau des poumons, l'IL-36 $\gamma$  est la plus fortement exprimée parmi les IL-36s et a déjà été incriminée dans des modèles murins d'asthme allergique (Ramadas *et al.*, 2011) notamment en induisant l'expression de chimiokines telles que CXCL3 (attractrice des neutrophiles) ou CCL20 (attractrice des cellules Th17). Les cellules épithéliales bronchiques constitueraient la source cellulaire principale de l'IL-36 $\gamma$  (Chustz *et al.*, 2011). D'autre part, il a été montré que les macrophages alvéolaires expriment l'IL-36R, bien que l'action directe de l'IL-36 sur ces cellules n'ait pas encore été établie (Ramadas *et al.*, 2012). L'IL-36 serait donc produite par les cellules épithéliales bronchiques et pourrait agir non seulement de façon autocrine mais également sur les fibroblastes et les macrophages alvéolaires présents sur le site, pour induire l'expression de cytokines et de chimiokines. Ceci conduirait à un recrutement massif de cellules immunitaires et à une réponse inflammatoire non contrôlée ([Figure 11](#)).



**Figure 11. Rôle potentiel de l'IL-36 dans les poumons.** (Gabay and Towne, 2015).

Son potentiel rôle d'activateur de la réponse Th1, son action sur le recrutement neutrophilique et ses nombreuses similitudes avec les IL-1s peuvent nous suggérer que l'IL-36 pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire à certains pathogènes, notamment *M. tuberculosis*. Dans cette optique, une étude a montré que des splénocytes issus de souris invalidées

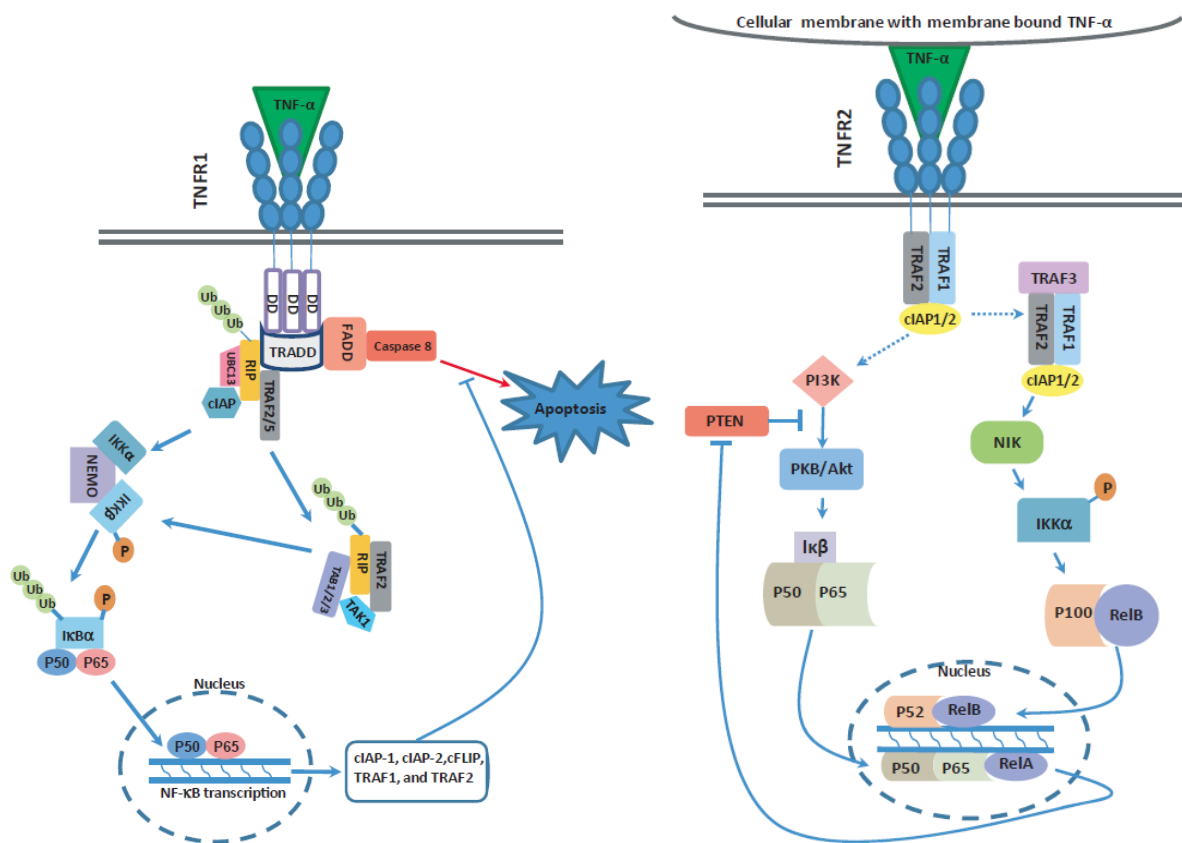
pour le gène de l'IL-36R présentait une réponse inflammatoire réduite en réponse à une infection par *M. bovis* BCG, avec notamment une diminution des taux de TNF, IFN $\gamma$ , IL-6 et NO (Vigne *et al.*, 2012). Cependant, le rôle de cette voie de signalisation dans la réponse à l'infection par *M. tuberculosis* n'avait pas encore été étudié (voir Résultats partie I).

### 3. Le TNF

La superfamille du TNF compte de plus de 20 ligands différents, chacun avec un ou plusieurs récepteurs, mais seul le TNF $\alpha$  sera décrit ici.

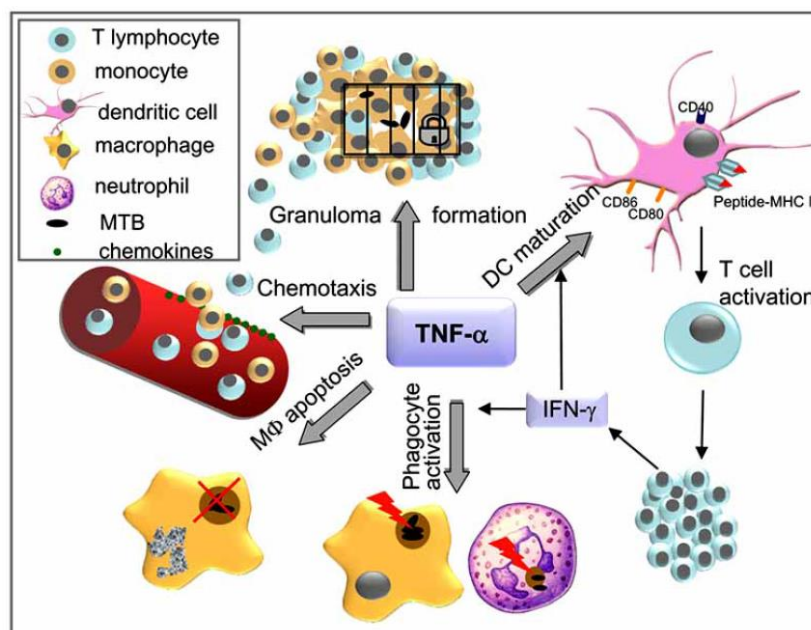
Le TNF $\alpha$  (TNF) est la cytokine pro-inflammatoire par excellence. Sécrété, entre autres, en réponse au LPS ou à des antigènes mycobactériens, son rôle est central dans le choc septique ainsi que dans certaines maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn. Alors que les cellules lymphoïdes innées constitueraient une source cellulaire de TNF non négligeable dans l'arthrite rhumatoïde (Bekiaris *et al.*, 2013), au cours de l'infection par *M. tuberculosis*, il est en revanche majoritairement produit par les cellules du compartiment hématopoïétique incluant les monocytes/macrophages (Giacomini *et al.*, 2001), les lymphocytes (Barnes *et al.*, 1993), et les cellules dendritiques (Bodnar *et al.*, 2001). De fait, le TNF issu des cellules hématopoïétiques est plus important pour le contrôle de la tuberculose que celui issu des cellules stromales (Jacobs *et al.*, 2000c).

Initialement transmembranaire sous forme homotrimérique stable (Tang *et al.*, 1996), le TNF est également retrouvé sous forme soluble suite à l'action d'une métalloprotéase appelée la TNF-Alpha Converting Enzyme (TACE) (Black *et al.*, 1997). Les deux formes du TNF sont biologiquement actives et peuvent se lier aux récepteurs TNFR1 et TNFR2. Le TNFR1 a une expression ubiquitaire et fixe préférentiellement le TNF soluble, tandis que le TNFR2, exprimé par les cellules du système immunitaire, va privilégier la forme membranaire du TNF pour interagir (Grell *et al.*, 1995). La fixation au TNFR1 va conduire à l'apoptose ou bien à l'activation de la voie de signalisation NF $\kappa$ B selon l'environnement cytokinique ; l'activation de TNFR2 ne va quant à elle pas impliquer l'apoptose cellulaire puisque le récepteur ne possède pas de Death Domain (DD) dans sa partie cytoplasmique ([Figure 12](#)).



**Figure 12.** Les voies de signalisation mises en place par le TNF. La forme soluble du TNF se lie au récepteur 1, ce qui va conduire à l'activation de l'apoptose ou bien du facteur de transcription NFκB. La forme membranaire, en interagissant avec le TNFR2, ne va pas induire de mort cellulaire (Naude *et al.*, 2011).

Comme suggéré dans les paragraphes précédents, la cytokine TNF est au centre de l'immunité antituberculeuse : des souris déficientes pour le TNF ou le TNFR1 sont extrêmement susceptibles à l'infection par *M. tuberculosis* (Ehlers *et al.*, 2000; Flynn *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2000b). De la même manière, des animaux traités par des anti-TNF au cours de l'infection présentent une inflammation pulmonaire accrue et ne contrôlent plus la charge bactérienne (Flynn *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2007). Le TNF est donc une cytokine critique et non-redondante pour le contrôle de l'infection, et sa neutralisation conduit à des réactivations de tuberculose chez l'homme (Keane *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2014). Par conséquent, les réponses immunitaires en phase aiguë et en phase chronique sont toutes les deux gérées par les effets biologiques du TNF, et il peut intervenir à plusieurs niveaux (**Figure 13**).



**Figure 13. Les différentes fonctions du TNF dans la réponse immunitaire aux mycobactéries.** Retrouvé sur le site d'infection, le TNF organise aussi bien la réponse innée (apoptose des macrophages infectés, activation des mécanismes bactéricides des macrophages et des neutrophiles...) que la réponse adaptative (maturation des cellules dendritiques et activation des cellules T) et est essentiel au contrôle actif de la croissance bactérienne (Mootoo *et al.*, 2009).

Produit par de nombreuses cellules, le TNF est retrouvé au niveau du site d'infection chez les patients (Barnes *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1996). De plus, il est depuis longtemps connu pour augmenter la phagocytose et la destruction des bacilles par les macrophages (Bermudez and Young, 1988). La formation et le maintien des granulomes sont également dépendants du TNF (Algood *et al.*, 2005; Bean *et al.*, 1999; Chakravarty *et al.*, 2008) ; même si des granulomes peuvent être observés en absence de TNF, leur formation est retardée, la structure est moins bien délimitée et ils présentent des zones de nécrose importantes ainsi qu'une charge bactérienne élevée (Flynn *et al.*, 1995). D'autre part, le TNF est capable de réguler le recrutement cellulaire sur le site d'infection via l'action de chimiokines (Algood *et al.*, 2005).

Par son fort potentiel pro-inflammatoire et son importance dans la réponse immunitaire, le TNF nécessite une régulation fine. En premier lieu, les récepteurs TNFR1 et TNFR2 sont tous les deux clivables et retrouvés sous forme soluble ; ils jouent ainsi le rôle de leurre pour diminuer la quantité de TNF bio-disponible. Ainsi, il a été démontré que le TNFR2 serait plutôt régulateur dans la réponse à *M. tuberculosis*, aussi bien *in vitro* et *in vivo*, tandis que le TNFR1, via sa voie de signalisation, serait responsable des nombreuses fonctions du TNF dans cette même réponse (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 2000a; Keeton *et al.*, 2014; Olleros *et al.*, 2012). La sécrétion du TNF par les cellules myéloïdes est également modulée par d'autres facteurs.

Ainsi, le granzyme A est capable d'induire la production de TNF par les macrophages (Spencer *et al.*, 2013), tout comme les leucotriènes B4 (LTB4), alors que la lipoxine A4 va limiter la sécrétion de TNF (Tobin *et al.*, 2012). De manière remarquable, il a été observé que les mycobactéries non pathogènes induisent bien plus de TNF que les souches virulentes (Beltan *et al.*, 2000). Il a ensuite été montré que les LM des mycobactéries virulentes sont capables d'interagir avec le TLR2 pour induire la production du microRNA (miR) 125b qui va limiter la traduction du transcrit TNF (Rajaram *et al.*, 2011).

Les deux formes du TNF étant biologiquement actives, leur rôle respectif au cours de l'infection par *M. tuberculosis* a été étudié. Il apparaît que la forme membranaire du TNF est suffisante pour le contrôle de la phase aiguë, alors que le TNF soluble est requis pour le maintien de ce contrôle en phase chronique d'infection (Allie *et al.*, 2008; Fremond *et al.*, 2005; Olleros *et al.*, 2002; Olleros *et al.*, 2005) et la protection du TNF membranaire passerait par sa fixation au TNFR2 (Allie *et al.*, 2008).

Une autre étude s'est penchée sur les différentes sources cellulaires de TNF au cours de l'infection. En utilisant des lignées murines déplétées pour le TNF uniquement au sein de certaines populations cellulaires, Allie *et al.*, ont pu démontrer que le TNF sécrété par les cellules myéloïdes (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques principalement) était essentiel au contrôle de l'infection en phase précoce, mais n'est pas suffisant pour maintenir le contrôle en phase chronique ; le TNF produit par les lymphocytes T est ainsi requis à un stade plus tardif de l'infection (Allie *et al.*, 2013). Les souris déficientes pour le TNF à la fois dans les cellules myéloïdes et les lymphocytes T développaient une pathologie similaire à celle des souris TNF KO complet, suggérant donc un rôle mineur des cellules stromales dans la production de TNF (Allie *et al.*, 2013).

En conclusion, le TNF est une cytokine critique et non-redondante pour la mise en place de la réponse à l'infection par *M. tuberculosis*. En phase précoce, il semblerait que les cellules myéloïdes produisent le TNF majoritairement sous forme membranaire, nécessaire pour l'initiation de la réponse via le TNFR2. D'un autre côté, en phase chronique, ce sont les lymphocytes T qui sont importants pour produire le TNF notamment sous forme soluble, qui sera capable d'orchestrer le maintien actif du contrôle de la pathologie. Cependant, la question des cellules importantes pour la réponse au TNF dans le cadre d'une infection par *M. tuberculosis* n'avait pas encore été investiguée (voir Résultats partie II).

#### 4. L'IL-17 et l'IL-22

L'IL-17 est elle-aussi une cytokine pro-inflammatoire, impliquée dans la pathogenèse de maladies auto-immunes telles que le psoriasis. La famille de cytokines IL-17 regroupe 6 membres, de A à F (l'IL-17E étant aussi appelée IL-25). Les IL-17A et F sont très proches structuralement, et sont capables de lier toutes les deux le même récepteur, composé des chaînes IL-17RA et IL-17RC. La fixation de l'IL-17 à son récepteur conduit à un recrutement de neutrophiles et une réponse inflammatoire, et une surproduction de cette cytokine peut induire des dommages tissulaires via l'induction de métalloprotéases et l'activation des fibroblastes et des cellules épithéliales (Song and Qian, 2013; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2014). Il a notamment été observé une activité pro-inflammatoire en synergie avec le TNF et l'IL-1, en stabilisant les transcrits des gènes induits par le TNF entre autres (Miossec and Kolls, 2012; Song and Qian, 2013). La voie de signalisation de l'IL-17 peut également promouvoir une réponse Th2, contribuant ainsi à la pathologie allergique comme l'asthme, mais également à la défense de l'hôte contre les parasites. En plus des lymphocytes Th17, les cellules  $T\gamma\delta$  sont également capables de produire l'IL-17 (Jin and Dong, 2013).

L'IL-22 quant à elle appartient à la famille de l'IL-10, produite essentiellement par les lymphocytes Th17, Th22 (présents principalement dans les tissus) et les cellules Natural Killer (NK) (Pan *et al.*, 2014). Plusieurs cytokines sont capables d'induire la sécrétion d'IL-22 : ainsi, le TNF et l'IL-6 vont agir sur les cellules Th22 (Zhang *et al.*, 2011), tandis que les cellules NK vont répondre à l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23 (Guo and Topham, 2010). Les fonctions de l'IL-22 semblent plutôt régulatrices : elle participe ainsi au maintien de l'intégrité tissulaire des barrières physiologiques et à la prévention des dommages causés par des pathogènes ou par la réponse inflammatoire de l'hôte (Sonnenberg *et al.*, 2011; Witte *et al.*, 2010). Néanmoins, l'IL-22 a aussi été impliquée, tout comme l'IL-17, dans le développement de maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (Ikeuchi *et al.*, 2005) ou le psoriasis (Wolk *et al.*, 2009).

Comme vu précédemment, les souris déficientes pour l'IFN $\gamma$  présentaient un nombre élevé de cellules Th17 après infection par *M. tuberculosis* (Cruz *et al.*, 2006), montrant d'une part qu'à la fois les lymphocytes Th1 et Th17 sont induits pendant l'infection, et d'autre part que l'IFN $\gamma$  semble agir comme inhibiteur de la réponse Th17. Ces dernières années, le rôle des cellules Th17 et par extension de l'IL17 et l'IL-22 dans le contrôle de l'infection à *M. tuberculosis* ont largement été adressées, notamment en raison des traitements anti-IL-17 ou IL-22 émergents, et risquant de réactiver des tuberculoses latentes. Ainsi, des souris déficientes pour l'IL-17A infectées à forte dose présentent une charge bactérienne plus élevée (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010), mais ces animaux sont capables de contrôler une infection à faible dose (Gopal *et al.*, 2014). De même, des

souris IL-17RA-déficientes sont susceptibles à une infection à forte dose en phase chronique (Freches *et al.*, 2013) mais contrôlent une infection aiguë à faible dose (Aujla *et al.*, 2007). Enfin, une infection avec la souche hypervirulente de *M. tuberculosis* HN878 conduit à une forte susceptibilité des souris déficientes pour la voie de signalisation IL-17 (Gopal *et al.*, 2014). Cependant, le fait que la déficience en IL-23, cytokine essentielle à la différenciation des cellules T naïves en Th17, n'entraîne aucune sensibilité à l'infection questionne quant à l'importance de la voie IL-17 dans la pathologie. Un élément de réponse pourrait se trouver dans les autres sources cellulaires d'IL-17, principalement les cellules T $\gamma\delta$  mais également des cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les neutrophiles ou encore les cellules NK (Busman-Sahay *et al.*, 2015; Shabgah *et al.*, 2014). D'autre part, il a été suggéré que les effets de l'IL-17 soient compensés par l'IL-22, produite en synergie avec l'IL-17 par les mêmes types cellulaires (Busman-Sahay *et al.*, 2015). Bien que le rôle de l'IL-22 semble négligeable dans le contrôle de l'infection (Behrends *et al.*, 2013), la possible compensation entre ces deux cytokines dans la réponse à *M. tuberculosis* n'avait pas encore été appréciée (voir Résultats partie III).

## 5. Polymorphismes associés chez l'homme

Par son rôle clé dans la défense de l'hôte aux infections mycobactériennes, les SNPs affectant le gène *IL12B* ou le gène *IL12RB1* peuvent être très fortement corrélés à des susceptibilités à la tuberculose, ce qui a été montré par certaines études (Altare *et al.*, 1998; Jouanguy *et al.*, 1997; Kusuhara *et al.*, 2007; Morahan *et al.*, 2007; Tso *et al.*, 2004), alors que certains polymorphismes n'ont pas été identifiés comme constituant un facteur de risque (Ma *et al.*, 2003; Prabhu Anand *et al.*, 2007).

Deux polymorphismes, identifiés dans le gène *IL1B* au niveau du promoteur (-511) et d'un exon (+3953), ont été associés avec la susceptibilité à la tuberculose chez l'Homme (Awomoyi *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude a démontré qu'un polymorphisme naturel situé au niveau du promoteur du gène *IL1B* conduit à une altération de l'association des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et PU.1 et donc à des productions d'IL-1 $\beta$  différentes : le génotype associé à de fortes productions d'IL-1 $\beta$  est ainsi associé au développement d'une tuberculose active sévère et corrèle avec une accumulation de neutrophiles dans les poumons (Zhang *et al.*, 2014).

Le gène codant pour le TNF présente deux SNPs qui ont été très étudiés (238G/A et 308G/A) au niveau de son promoteur, mais l'association avec la tuberculose est variable (Azad *et al.*, 2012). En revanche, plusieurs polymorphismes touchant le TNFR1 ont pu être clairement



reliés à la tuberculose (Moller *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2007). De manière très intéressante, il semblerait qu'il existe une pression de sélection qui affecterait l'expression du gène TNF plutôt que la conformation/structure de la protéine. Ce fait est observable également pour d'autres gènes de susceptibilité à la tuberculose : jouer sur le taux d'expression de médiateurs cruciaux pourrait ainsi représenter un mécanisme d'évolution de l'hôte pour lutter contre le pathogène (Aguillon *et al.*, 2006; Wiens and Glenney, 2011).

Les polymorphismes touchant les gènes liés à l'IL-17 n'ont été adressés que très récemment dans le cadre des infections mycobactériennes, et les études sont contradictoires. En effet, les polymorphismes rs2275913 et rs763780, touchant respectivement l'IL-17A et l'IL-17F, semblent très clairement associés à une susceptibilité à l'infection dans une cohorte chinoise (Du *et al.*, 2015; Ocejo-Vinyals *et al.*, 2013a; Ocejo-Vinyals *et al.*, 2013b; Peng *et al.*, 2013) mais sont en revanche indépendants de la tuberculose dans une population croate (Bulat-Kardum *et al.*, 2015).

Ces différences de susceptibilité aux infections mycobactériennes associées à ces différents polymorphismes peuvent s'expliquer par le phénomène de coévolution décrit en première partie. De fait, le génome de chaque population d'hôtes semble avoir évolué en fonction des souches de bactéries auxquelles il était soumis, et vice-versa. On peut donc penser que les polymorphismes apparus pour « protéger » certaines populations contre une certaine souche de mycobactéries sont en revanche délétères pour une autre population, associée à une autre souche bactérienne.

### III. Exploitation du système immunitaire de l'hôte par *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* a co-évolué avec l'homme depuis des milliers d'années (Gutierrez *et al.*, 2005) et les recherches ont mis en évidence de nombreux stratagèmes de détournement de la réponse immunitaire au profit de la survie du bacille.

Récemment, Cambier *et al.*, ont dévoilé une partie de la stratégie d'infection de *M. tuberculosis*. Ainsi, les auteurs démontrent que la mycobactérie utilise le Phthiocerol DIMycoceroserate (PDIM), un lipide présent dans sa paroi, pour masquer ses PAMPs afin d'éviter le recrutement de macrophages microbicides, producteurs de NO. En parallèle, *M. tuberculosis* est capable d'induire le recrutement de macrophages permissifs qui vont phagocyter les bacilles sans induire leur destruction via un autre lipide de sa paroi, le Phenolic GlycoLipid (PGL). Cette stratégie, associée au mode de transmission par aérosol qui lui permet d'atteindre plus facilement les voies aériennes inférieures, serait essentielle à l'accès à la niche de réplication et donc à la virulence de *M. tuberculosis* (Cambier *et al.*, 2014b). En effet, PDIM est exprimé uniquement par les mycobactéries virulentes et sa présence est requise pour la virulence des isolats cliniques de *M. tuberculosis* (Onwueme *et al.*, 2005).

Mais la survie de *M. tuberculosis* implique également que la bactérie soit capable d'échapper à sa destruction à l'intérieur des macrophages, et de se multiplier. En effet, la phagocytose est généralement suivie d'une fusion avec les lysosomes conduisant à une acidification de la vésicule et à la destruction de pathogènes éventuels. *M. tuberculosis* sécrète ainsi la phosphatase SapM, qui hydrolyse un lipide essentiel à la fusion phagosome-endosome tardif ; SapM contribue donc à l'inhibition de la maturation des phagosomes et est associée à la survie des mycobactéries au sein des macrophages (Vergne *et al.*, 2005). Par ailleurs, les mycobactéries virulentes produisent également la protéine kinase G (PknG) qui va inhiber la protéine kinase C  $\alpha$  de l'hôte et ainsi bloquer le processus de phagocytose (Chaurasiya and Srivastava, 2009; Houben *et al.*, 2009; Walburger *et al.*, 2004). Les lipides de la paroi de *M. tuberculosis* ne sont pas étrangers à l'arrêt de la maturation de la phagosome : le ManLAM va inhiber le recrutement de la molécule EEA1 (Early Endosome Autoantigen 1) qui est cruciale pour la maturation des phagosomes et les PIM sont capables de stimuler la fusion du phagosome avec les endosomes précoces (Fratti *et al.*, 2001; Vergne *et al.*, 2004) pour permettre la survie de la bactérie. D'autre part, après internalisation, *M. tuberculosis* produit également la lyase isocitrate

(ICL) qui augmente sa survie en inhibant l'entrée en apoptose de la cellule phagocytaire (McKinney *et al.*, 2000).

En outre, le système de sécrétion ESX-1, fortement associé à la virulence de *M. tuberculosis* (Lewis *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2002) et dont les effecteurs sont les protéines ESAT-6 et CFP-10, participe activement à la survie mycobactérienne à l'intérieur des macrophages. Ainsi, ESAT-6 et CFP-10 sont capables d'induire la perforation de la membrane du phagosome conduisant à l'exposition de l'ADN mycobactérien au système de surveillance cytosolique cGas/STING (Manzanillo *et al.*, 2012) ; ceci aboutit à la rupture complète du phagosome et à la présence des mycobactéries dans le cytosol qui corrèle avec la mort de la cellule hôte (Simeone *et al.*, 2012). *M. tuberculosis* est également connu pour réduire l'expression du CMH II sur les cellules présentatrices d'antigènes (Hmama *et al.*, 1998).

Enfin, la déstructuration du granulome et la formation d'un centre caséique sont essentiels à l'échappement de *M. tuberculosis*, et le TNF semble jouer un rôle central dans ce phénomène. En effet, le TNF est requis pour l'activité microbicide des macrophages et la perte du TNF provoque une augmentation de la charge bactérienne et une nécrose importante des macrophages infectés (Clay *et al.*, 2008). Mais un excès de TNF conduit les macrophages à entrer en nécroptose via l'activation des kinases RIP1 et RIP3 et l'induction de ROS (Roca and Ramakrishnan, 2013). La dérégulation des taux de TNF présents pourrait impliquer les LTB4 et la lipoxine A4 (Tobin *et al.*, 2012).

Ainsi, tous les mécanismes mis en œuvre par *M. tuberculosis* pour survivre à son hôte sont intimement corrélés aux manœuvres du système immunitaire visant à l'éradication de son pathogène. La compréhension toujours croissante de ces relations Hôte-Pathogène permettra l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques de plus en plus efficaces.



## IV. Problématiques et objectifs

La tuberculose est encore très présente dans le monde moderne et la lutte antituberculeuse, bien qu'incessante ces dernières années, rencontre de nouveaux obstacles avec l'émergence des formes multi et extrêmement résistantes aux traitements. Il est donc toujours vital de poursuivre les recherches pour mieux appréhender les relations entre l'hôte et son pathogène mycobactérien. Comprendre les interactions cellulaires et les voies de signalisation cruciales pour l'établissement d'une réponse immunitaire efficace nous permettrait non seulement de trouver de nouveaux marqueurs permettant de dépister les patients encore non-traités, mais aussi de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques qui, en association avec les antibiotiques, résulteraient en la stérilisation et l'élimination totale du pathogène.

Les travaux précédents de l'équipe s'intéressaient à la voie de l'IL-1, et notamment au rôle respectif de ses deux ligands l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Bien que la voie IL-1R1 soit essentielle à l'établissement d'une bonne réponse immunitaire, le rôle des IL-1s semble plutôt dépendre de la virulence de la souche de mycobactéries utilisée (Bourigault *et al.*, 2013a; Mayer-Barber *et al.*, 2011). Appartenant à la même famille de cytokines, l'IL-36 est pro-inflammatoire et a été clairement impliquée dans la pathogenèse du psoriasis (Tortola *et al.*, 2012). Ainsi, elle pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle pour ces patients. Cependant, son rôle dans le cadre d'une infection par *M. tuberculosis* n'a pas encore été évalué. L'expression privilégiée d'IL-36 $\gamma$  dans les poumons et ses nombreuses similitudes avec les IL-1s nous ont amenés à nous interroger sur une potentielle réactivation de tuberculoses latentes en cas d'utilisation de traitements anti-IL-36. Ainsi, une partie de mes travaux de thèse se sont portés sur cet aspect : en utilisant des souris déficientes pour l'IL-36R, nous avons pu étudier l'implication de cette voie de signalisation dans le contrôle de l'infection.

Par ailleurs, notre équipe et d'autres ont largement démontré l'implication du TNF et de son récepteur dans le contrôle de l'infection aux mycobactéries. La compréhension du rôle de cette voie de signalisation est cruciale étant donné les nombreuses fonctions du TNF au cours de l'infection. Nous avons notamment déterminé les sources cellulaires de TNF importantes pour les phases précoces et tardives de l'infection à *M. tuberculosis*, ainsi que le rôle des différentes formes biologiquement actives du TNF. C'est tout naturellement que nous nous sommes interrogés sur le type de population cellulaire répondant au TNF au cours de ces différentes phases d'infection. J'ai ainsi disposé au cours de ma thèse d'outils génétiques pour investiguer la voie TNF/TNFR1 *in*

*vivo* au sein de populations cellulaires spécifiques afin d'étudier la contribution des cellules myéloïdes et des lymphocytes T. Disséquer ainsi la voie TNF/TNFR1 permettra de mieux comprendre l'importance de cette cytokine et ainsi de peut-être pouvoir jouer sur les taux de TNF biodisponible afin de booster la réponse immunitaire des patients sans engendrer de dommages tissulaires irréversibles. En parallèle, nous avons caractérisé un nouveau modèle murin exprimant le TNF humain pour l'étude de nouveaux traitements anti-TNF. Nous avons ainsi montré que des souris exprimant un TNF humain à la place du TNF murin sont capables de contrôler l'infection à *M. tuberculosis*, et nous avons par la suite évalué si l'administration d'anti-TNF humain utilisé aujourd'hui induisait une susceptibilité à *M. tuberculosis* chez ces animaux.

Enfin, nous avons également étudié le rôle des voies IL-17 et IL-22 au cours de l'infection. En effet, nous avons notamment pu observer que des souris déficientes pour le TNF présentaient une surexpression d'IL-17A au niveau transcriptomique. De plus, des études ont déjà démontré une implication de l'IL-17 mais celle-ci semble dépendante de la dose et de la souche de mycobactéries utilisée, et la compensation possible de l'IL-22 n'a encore jamais été étudiée. Ainsi, nous avons évalué la compensation possible entre l'IL-17 et l'IL-22 en utilisant des animaux double déficients pour l'IL-17RA et l'IL-22. D'autre part, de nombreux anticorps anti-IL-17A et F sont en essais cliniques pour le traitement de certaines maladies auto-immunes, et le fait que la littérature ne soit pas très claire sur le rôle de l'IL-17 invite à se demander si de tels traitements n'auraient pas un effet négatif sur la tuberculose. Pour répondre à ces différentes questions, une dernière partie de ma thèse s'est penchée sur les effets d'anticorps neutralisants l'IL-17A ou l'IL-17F, en faisant une comparaison directe avec des anti-TNF, sur l'infection par *M. tuberculosis*, mais également l'effet de la neutralisation de l'IL-17 dans un modèle de réactivation de la tuberculose. Cet aspect de recherche translationnelle conclura la partie Résultats de ce manuscrit.

# ~ Résultats ~

## I. Implication de la voie de signalisation IL-36 dans les infections mycobactériennes

### Article 1: Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection

**Noria Segueni**, Solenne Vigne, Gaby Palmer, Marie-Laure Bourigault, Maria L. Olleros, Dominique Vesin, Irène Garcia, Bernhard Ryffel, Valérie F.J. Quesniaux, Cem Gabay.

2015, PLoS ONE 10(5): e0126058. doi:10.1371/journal.pone.0126058

La réponse à l'infection par *M. tuberculosis* fait intervenir de nombreuses voies de signalisation au sein des cellules de l'immunité. Parmi elles, la voie de l'IL-1/IL-1R1 est primordiale pour permettre de contrôler la charge bactérienne. Nous et d'autres équipes avons mis en évidence le rôle essentiel de l'IL-1R1 dans la mise en place de la réponse de l'hôte en phase précoce d'infection par *M. tuberculosis* (Fremond *et al.*, 2007; Juffermans *et al.*, 2000). Des souris déficientes pour ce récepteur sont incapables de contrôler une infection à forte dose par *M. tuberculosis* et succombent en 4-5 semaines. Par la suite, les travaux de notre équipe se sont portés sur la voie de l'IL-1 et plus précisément les rôles respectifs des IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  au cours de l'infection (Bourigault *et al.*, 2013a). Nous avons montré que les deux ligands de l'IL-1R1 sont redondants pour la signalisation IL-1R1 : ainsi, des animaux déficients pour l'IL-1 $\alpha$  ou pour l'IL-1 $\beta$  survivent à l'infection chronique dans des conditions où des souris IL-1R1 KO ne contrôlent pas l'infection. Une autre étude a néanmoins montré que les deux ligands de l'IL-1R1 sont essentiels à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre *M. tuberculosis*, et l'absence de la voie IL-1 a été associée avec des taux élevés d'IFN de type I bénéfiques pour la croissance des mycobactéries (Mayer-Barber *et al.*, 2011). Ces résultats contradictoires ont été attribués à la différence de virulence qui peut exister entre les souches de *M. tuberculosis* utilisées.

L'IL-36 est un membre de la famille de l'IL-1 et partage avec cette dernière de nombreuses similitudes (Gabay and Towne, 2015). Les cellules dendritiques humaines et murines expriment

l'IL-36R et l'IL-36 est capable de stimuler la production de cytokines telles que le TNF ou l'IL-1 et est capable de stimuler la réponse Th1 *in vitro* (Vigne *et al.*, 2011) mais également *in vivo* (Vigne *et al.*, 2012) dans un modèle murin d'infection par *M. bovis* BCG.

Nous avons donc cherché à déterminer le rôle de la voie IL-36/IL-36R dans le contrôle de l'infection par des mycobactéries, en faisant un parallèle avec la voie IL-1/IL-1R1 que nous avons précédemment étudiée. Ainsi, nous avons tout d'abord mis en évidence une augmentation de l'expression d'IL-36 $\gamma$  dans les poumons suite à une inflammation au LPS. Cette augmentation est visible à 2 semaines post-infection avec *M. bovis* BCG, mais pas à 4 semaines. Cette régulation de l'IL-36 $\gamma$  dans les poumons après infection par *M. bovis* BCG corrèle avec une augmentation de l'IL-1 et du TNF, bien que les niveaux d'IL-1 et de TNF demeurent élevés même 4 semaines post-infection. De plus, l'IL-36 $\gamma$  est présente dans les structures granulomateuses après infection. La voie IL-36 semblait donc impliquée dans la réponse de l'hôte à l'infection par *M. bovis* BCG.

Pour déterminer le rôle de la voie IL-36/IL-36R après infection systémique avec *M. bovis* BCG, nous avons donc utilisé des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-36, en comparaison avec des souris de type sauvage. Les analyses de survie, d'inflammation pulmonaire, d'infiltration cellulaire et de charge bactérienne n'ont révélé aucune différence entre les souris IL-36R<sup>-/-</sup> et les souris de type sauvage, bien que les analyses histologiques aient révélé une inflammation pulmonaire plus importante chez les souris IL-36R<sup>-/-</sup>. Cependant, nous avons démontré précédemment que la virulence de la souche mycobactérienne était un facteur important dans la susceptibilité des souris déficientes pour la voie de l'IL-1 (Bourigault *et al.*, 2013a). Ainsi, bien que sensibles à l'infection par *M. tuberculosis*, des souris IL-1R1<sup>-/-</sup> ou IL-1 $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> sont capables de contrôler une infection par *M. bovis* BCG, de manière comparable ici aux souris IL-36R<sup>-/-</sup>.

Nous avons donc évalué la contribution de la voie IL-36R lors d'une infection par *M. tuberculosis* en comparant avec des animaux déficients pour la voie IL-1R1 ou TNF. Les souris IL-36R<sup>-/-</sup> ont une réponse immunitaire à *M. tuberculosis* comparable aux souris contrôle en termes de survie, d'inflammation pulmonaire et de charge bactérienne, dans des conditions où les souris IL-1R1<sup>-/-</sup> et TNF<sup>-/-</sup> présentaient un phénotype très sensibles à l'infection. Par ailleurs, les taux d'IFN $\gamma$  et de CXCL1/KC, très élevés chez les souris susceptibles comme les TNF<sup>-/-</sup> et les IL-1R1<sup>-/-</sup>, sont similaires entre les souris IL-36R<sup>-/-</sup> et les souris de type sauvage.

Nous démontrons donc que la voie de signalisation IL-36/IL-36R a une contribution limitée dans la réponse aux infections mycobactériennes, malgré son rôle dans la stimulation de la réponse Th1 (Vigne *et al.*, 2011).

L'article présenté ci-dessous a été publié dans PloS ONE en Mai 2015.





# Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection

Noria Segueni<sup>1,2</sup>, Solenne Vigne<sup>3,4</sup>, Gaby Palmer<sup>3,4</sup>, Marie-Laure Bourigault<sup>1,2</sup>, Maria L. Olleros<sup>4</sup>, Dominique Vesin<sup>4</sup>, Irene Garcia<sup>4</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1,2,5</sup>, Valérie F. J. Quesniaux<sup>1,2‡</sup>, Cem Gabay<sup>3,4†\*</sup>

**OPEN ACCESS**

Citation: Segueni N, Vigne S, Palmer G, Bourigault M-L, Olleros ML, Vesin D, *et al.* (2015) Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection. PLoS ONE 10(5): e0126058. doi:10.1371/journal.pone.0126058

Academic Editor: Ludovic Tailleux, Institut Pasteur, FRANCE

Received: January 25, 2015

Accepted: March 28, 2015

Published: May 7, 2015

Copyright: © 2015 Segueni *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All the data are included in the main manuscript and figures.

Funding: This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation (310030\_152638 to CG, 310030\_134691 to GP, 310030\_46833 to IG), LPG to IG, the Rheumasearch Foundation, the Institute of Arthritis Research, the CNRS International Associated Laboratory "TB IMMUNITY" (LIA N°236), and the Region Centre (No 2013-00085470) (France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

RESEARCH ARTICLE

1 CNRS, UMR7355, Orleans, France, 2 University of Orleans, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Orleans, France, 3 Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine Specialties, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland, 4 Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland, 5 Division of Immunology, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Health Sciences Faculty, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

☯ These authors contributed equally to this work.  
 ‡ These authors also contributed equally to this work. \*  
[cem.gabay@hcuge.ch](mailto:cem.gabay@hcuge.ch)

## Abstract

IL-36 cytokines are members of the IL-1 family of cytokines that stimulate dendritic cells and T cells leading to enhanced T helper 1 responses in vitro and in vivo; however, their role in host defense has not been fully addressed thus far. The objective of this study was to examine the role of IL-36R signaling in the control of mycobacterial infection, using models of systemic attenuated *M. bovis* BCG infection and virulent aerogenic *M. tuberculosis* infection. IL-36 $\gamma$  expression was increased in the lung of *M. bovis* BCG infected mice. However, IL36R deficient mice infected with *M. bovis* BCG showed similar survival and control of the infection as compared to wild-type mice, although their lung pathology and CXCL1 response were transiently different. While highly susceptible TNF- $\alpha$  deficient mice succumbed with overwhelming *M. tuberculosis* infection, and IL-1RI deficient mice showed intermediate susceptibility, IL-36R-deficient mice controlled the infection, with bacterial burden, lung inflammation and pathology, similar to wild-type controls. Therefore, IL-36R signaling has only limited influence in the control of mycobacterial infection.

## Introduction

IL-36 cytokines belong to the IL-1 family of cytokines and include three agonists IL-36 $\alpha$ , IL36 $\beta$ , and IL-36 $\gamma$  that bind to IL-36R leading to the recruitment of IL-1RAcP, the common coreceptor for IL-1 and IL-33, and to activation of similar intracellular pathways as other IL-1 cytokine family members [1]. IL-36 receptor antagonist (IL-36Ra) binds also to IL-36R but does not induce any signaling and acts as a natural IL-36 inhibitor, thus sharing similar to IL-1Ra for IL-1. We and others have recently shown that IL-36R is expressed by human and mouse

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

dendritic cells (DC) and that IL-36 stimulates the production of several cytokines by DC, including TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, and IL-23, as well as the maturation of DC with enhanced expression of MHC class 2 and co-stimulatory molecules [2], [3], [4]. Human T cells do not express IL-36R and fail to respond directly to IL-36 [4], [3]. However, IL-36 stimulation of human monocyte-derived DC is able to induce the production of IFN- $\gamma$  in T cell/monocyte DC allogeneic co-cultures, thus suggesting that IL-36 can promote Th1 responses in human cells [3]. In contrast, IL-36R is expressed by mouse CD4<sup>+</sup> T cells, and more specifically by naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Accordingly, IL-36, but not other IL-1 family cytokines, is able to stimulate the proliferation and IL-2 release by naïve CD4<sup>+</sup> T cells. In combination with IL-12, IL-36 markedly stimulated the polarization of naïve T cells into Th1 cells in vitro [5], and intradermal injection of IL-36 in an immunization protocol was able to induce Th1 responses in vivo [2]. Taken together, these findings suggest that IL-36 could play a critical role in host defense against pathogens, particularly against intracellular microorganisms controlled by Th1 responses. Consistent with this hypothesis, we recently observed that production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and nitric oxide (NO) was decreased in ex vivo stimulated splenocytes of IL-36R deficient mice infected by *M. bovis* BCG as compared to wild-type mice [5].

It is generally accepted that less than 10% of individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* will develop an active disease, suggesting that the host immune system is usually efficient in the control of mycobacteria, although the infection is not cleared and can remain in a latent form for many years [6], [7]. Immunodepression of the host can favor a reactivation of latent tuberculosis infection. Indeed, coordinated innate and adaptive immune responses are required for efficient control of *M. tuberculosis* infection, including T cells, macrophages, and the expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, NO, reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates [8], [9], [10], [11], [12]. One of the most compelling example regarding the role of the immune system in controlling *M. tuberculosis* infection is the reactivation of latent tuberculosis, as well as increased susceptibility to primary tuberculosis infection in patients treated for inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease with TNF- $\alpha$  antagonists [13], [14], [15], [16]. In mice, the IL-1R1 pathway seems essential for the control of acute *M. tuberculosis* infection, and both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  have been implicated [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24]. We therefore addressed the contribution of IL-36 cytokines and of the IL-36R signaling pathway in the control of mycobacterial infection by using IL-36R gene deficient mice in two models, namely *M. bovis* BCG systemic infection and *M. tuberculosis* aerogenic infection. This question has potential clinical implication in the context of future drugs targeting IL-36R signaling. Indeed, several lines of evidence indicate that IL-36 signaling is involved in the pathogenesis of psoriasis (reviewed in [25]), thus leading to consider the development of therapies blocking IL-36 for this indication.

The results described herein show that while both TNF- $\alpha$  and IL-1R1 pathways were required to control *M. tuberculosis* infection, absence of functional IL-36R did not compromise survival and bacterial clearance in *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* infections.

## Materials and Methods

### Mice

WT C57BL/6 and mice deficient for IL-36R [26], IL-1R1 [27], and TNF- $\alpha$  [28] were housed in the Transgenose Institute animal facility (CNRS UPS44, Orleans). WT C57BL/6 and mice deficient for IL-36R were also housed in the animal facility of the Centre Medical Universitaire, University of Geneva. The generation of IL-36R KO mice was previously described [26]. These mice were crossed for at least 9 generations with C57BL/6 mice. The backcross into the C57BL/6 background was performed by using a marker-assisted selection protocol (MASP) approach, also termed "speed congenics" [29]. The other KO mice were backcrossed at least 7–10 times on C57BL/6 genetic background. For infection with *Mycobacterium bovis* BCG, adult mice (8–12 week old) were kept in a conventional animal

facility (Geneva). For *Mycobacterium tuberculosis* infection, adult (8–12 week old) animals were kept in isolators in a biohazard animal unit (Orleans). The infected mice were monitored regularly for clinical status and weighed twice weekly. Water and food were provided ad libitum. All animal experiments on *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* were approved by the Geneva cantonal authority for animal experimentation (authorization N° 31.1.1005/3202/2) and by the Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans" (CCO; N° CLE CCO 2012–1001), respectively.

### Intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS)

200 µg LPS (*Escherichia coli* serotype O55:B5) dissolved in 50 µl sterile 0.9% NaCl was instilled intratracheally using a canula into anesthetized mice. Control mice were instilled intratracheally with 50 µl LPS-free sterile 0.9% NaCl. The mice were euthanized 6 h after instillation and lungs collected for total RNA preparation.

### Bacteria and infection

*M. bovis* BCG infection. Adult WT and IL-36R KO mice were infected intravenously (i.v) with  $5 \times 10^6$  CFU living *M. bovis* BCG Pasteur strain 1173 P2 as previously described [30]. Humane endpoints were used during the *M. bovis* BCG infection survival study. Mice were observed daily and weighed twice a week. To minimize animal distress, mice presenting signs of distress or bodyweight loss were examined twice a day, and mice showing prostration or body weight loss 20% were euthanized by isoflurane anesthesia, exsanguination, and cervical dislocation. Mice were sacrificed 28 or 180 days post-infection. Lung bacterial load was evaluated by plating lung homogenates on 7H11 agar plates and counting the number of colonies.

*M. tuberculosis* infection. *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) aliquots kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  were thawed, diluted in sterile saline containing 0.05% Tween 20 and clumping was disrupted by 30 repeated aspirations through a 26 gauge needle (Omnican, Braun, Germany). Pulmonary infection with *M. tuberculosis* H37Rv was performed by instillation of 1000–3000 CFU/lung into the nasal cavities (20µl each) under xylazine-ketamine anaesthesia (100mg/kg ketamine, 10mg/kg xylazine, i.p.), and the inoculum size was verified 24 h after infection by determining bacterial load in the lungs. Humane endpoints were used during the *M. tuberculosis* infection survival studies. Mice were observed daily and weighed twice a week. To minimize animal distress, mice presenting signs of distress or bodyweight loss were examined twice a day, and mice showing prostration or bodyweight loss >20% were euthanized by cervical dislocation. There was no incident or unexpected mortality in the infected animals.

*M. tuberculosis* bacterial loads in the lung of infected mice were evaluated at different time points after infection with *M. tuberculosis* H37Rv as described [31]. Organs were weighed and defined aliquots were homogenized in PBS in a Dispomix homogenizer (Medic Tools, Axonlab, Baden-Daettwil, Switzerland). Tenfold serial dilutions of organ homogenates in 0.05% Tween 20 containing 0.9% NaCl were plated in duplicates onto Middlebrook 7H11 (Difco) agar plates containing 10% OADC and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . Colonies were enumerated at 3 weeks and results are expressed as  $\log_{10}$  CFU per organ.

### Cytokine determination

Lung homogenates were centrifuged (3 min at 14,500 rpm), the supernatants sterilized by centrifugation through 0.22 µm filter (3 min at 14,500 rpm; Costar-Corning, Badhoevedorp, The Netherlands), immediately frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of CXCL1 and IFN $\gamma$  levels by ELISA (Duoset R&D Systems, Abingdon, UK).

### RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from lungs of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* infected mice, as well as after LPS challenge using TRIzol reagent, according to manufacturer's instructions, and further purified on RNeasy columns (Qiagen AG, Hombrechtikon, Switzerland). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using SuperScript II Reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). The mRNA levels for genes of interest were examined by quantitative RT-PCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Values obtained with the SDS 2.2 (Applied Biosystems, Zug, Switzerland) were imported into Microsoft Excel for analyses and gene expression was calculated using the comparative method ( $2^{-\Delta Ct}$ ) for relative quantification by normalization to Gapdh or L32 gene expression. The primer sequences used for real-time quantitative RT-PCR are described in Table 1.

### Histopathological analysis

For histological analysis lungs from *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* infected mice were fixed in 4% phosphate buffered formalin, paraffin-embedded, and 4 µm sections (for *M. bovis* BCG) and 3 µm sections (for *M. tuberculosis*) stained with haematoxylin and eosin and a modified Ziehl-Neelsen method. The latter involved staining in a prewarmed (60°C) carbolfuchsin solution for 10 min followed by destaining in 20% sulphuric acid and 90% ethanol before counterstaining with methylene blue. Histopathological analyses were done by quantification of lung tissue and lung free of lesions on tissue sections comprising a lung surface of  $45 \pm 20$  mm<sup>2</sup> corresponding to one or two lobe sections per animal. Percentage of free alveolar space corresponds to % lung lesion free /lung tissue. Scorings were determined by a pathologist using digital microscopic images acquired by Mirax Digital Slide Scanner and Mirax Viewer (Carl Zeiss).

### In situ hybridization study

In situ hybridization was performed at the Histo-Pathology / in situ Hybridisation Core Facility (Faculty of Medicine, Geneva University). A DNA template for riboprobe synthesis was

Primer sequences for RTqPCR

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for RT-

cDNA	forward primer	reverse primer
Gapdh	5'-acggccgcatcttctgtgca-3'	5'-aatggcagccctggtagcca-3'
L32	5'-gaaactggcggaaacca-3'	5'-ggatctggcccttgaaacctt-3'
Il36α	5'tagtgggtgtagttctgtagtgtc-3'	5'gttcgtctcaagagtgtccagatat-3'
Il36β	5'-acaaaaagccttctgttctatcat-3'	5'-ccatgttgatttacttctcagact-3'
Il36γ	5'-agagtaaccccagtcagcgtg-3'	5'-agggtgggtgacaaatcaa-3'
Il36r	5'-aacacctagcaaaagcccag-3'	5'-agactcccgattttctctatg-3'
Tnfα	5'-agttctatggcccagacctt-3'	5'-gtctttgagatccatgccgt-3'
Il1β	5'-tgtgaaatgccacttttga-3'	5'-gtgctcatgtcctcatcttg-3'
Ifny	5'-agacaatcaggccatcagca-3'	5'-tggacctgtgggtgttgac-3'
Cxcl1	5'-actcaagaatggtcgagg-3'	5'-gtccatcagagcagctgt-3'
Cxcl2	5'-aggcggtaaaaagtttgc-3'	5'-cgaggcacatcaggtacgat-3'
Il6	5'-tgaacaacgatgatgacttcaga-3'	5'-tctgtatctctgaaggactctggct-3'

doi:10.1371/journal.pone.0126058.t001

generated from a plasmid containing the cDNA for murine Il36g. This template was obtained by PCR using the forward primer mmu-IL36G\_SP6 (5'CCGATTAGGTGACACTATAGA AACAGGAATGGCTTCATTGG 3') and the reverse primer mmu-IL36G\_T7 (5'CCGTAA TACGACTACTATAGGGCGAGAGAGCTGGGCTATTTG 3'). In vitro transcription was carried out in a cocktail of 1mM rATP, rCTP, rGTP, 0.65mM rUTP, and 0.35mM digoxigeninUTP (RNA kit labeling from Roche), 1 ml of ribonuclease inhibitor (40 U/ml MBI Promega), 0.5 mg of DNA template, 0.5 ml of SP6 RNA polymerase (SP6: 20 U/l, New England Biolabs), in a final volume of 20 ml. The reaction mix was incubated at 37°C for 2.5 hours followed by a 15 mn incubation with a DNase I/MgCl<sub>2</sub> mix to remove the DNA template (1.6ml of 300 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 ml of DNase I [10 U/l, Roche], 16.4 l of DEPC water). RNA was ethanol precipitated and dissolved in DEPC water to 150 ng/ml. 4µm thick sections from paraffine-embedded murine tissues fixed previously in formol were applied on Superfrost slides and loaded onto the Discovery automated slide-processing system (Ventana Medical Systems, Inc). Baking and deparaffinization steps were performed as programmed in the protocol for the RiboMap in situ hybridization reagent system (Ventana Medical Systems, Inc) on the instrument. In situ hybridization protocol was designed based on the standard protocol described in the manufacture's RiboMap application note. The first fixation step was performed using formalin-based RiboPrep reagent for 36 minutes at 37°C. Then, the sections were acid-treated using hydrochloride-based RiboClear reagent for 12 minutes at 37°C. Slides were then processed for protease digestion using Protease 1 reagent (0.5U/ml) for 4 minutes at 37°C and incubated with the IL36g antisense riboprobes (100 ng/slide) in RiboHybe hybridization buffer (Ventana Medical Systems, Inc) for 6 hours at 65°C. After 3 stringency washes using 0.1× RiboWash (Ventana Medical Systems) for 8 minutes each at 75°C, the second fixation step was performed using RiboFix reagent for 32 minutes at 37°C followed by incubation of Alkaline Phosphatase-labeled antidigoxigenin antibody (Roche, dilution 1/500) for 32 minutes at 37°C. The signal was detected automatically using the BlueMap NBT/BCIP substrate detection kit (Ventana Medical Systems, Inc.) for 6 hours at 37°C. Finally, the sections were counterstained with a nuclear fast red equivalent reagent ISH Red (Ventana Medical Systems, Inc) for 4 minutes before coverslipping.

### FACS analysis of infiltrating cells in infected lungs

After perfusion with 0.02% EDTA-PBS and removal, lung tissue was sliced into 1 to 2 mm<sup>3</sup> pieces and was incubated in RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing antibiotics (Penicilline 100 U/ml-Streptomycine 100 µg/ml), 10 mM Hepes (Gibco) and collagenase (150U/ml), DNase (50U/ml; Sigma, St Louis, MO). After 45min of incubation at 37°C, singlecell suspension was obtained by vigorous pipetting and filtering through 100µm and 20µm. Cells were washed three times in RPMI 1640 containing 5% BSA and were then stained according to antibody manufacturer protocols. Rat anti-mouse CD11b-FITC (clone M1/70), Gr1-PECy7 (clone RB6-8C5), were from BD Pharmingen (San Diego, CA). Stained cells were washed twice, fixed with 1% paraformaldehyde (FACS Lysing solution, BD) and analyzed by flow cytometry on a CANTO II analyser (Becton Dickinson). Data were processed with FlowJo software (version 7.6.5 for Windows, FlowJo LLC, Ashland, Oregon).

### Statistical analysis

Statistical significance was determined with Graph Pad Prism (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences between multiple in vivo groups were analyzed by one-way non-parametric test (Kruskal-Wallis), before comparing individual groups using a Mann-Whitney test. Survival curve were compared using Log-rank (Mantel-Cox) test.

Evolution of body weight was compared by using two-way ANOVA for repeated measures, followed by Sidak's multiple comparison test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

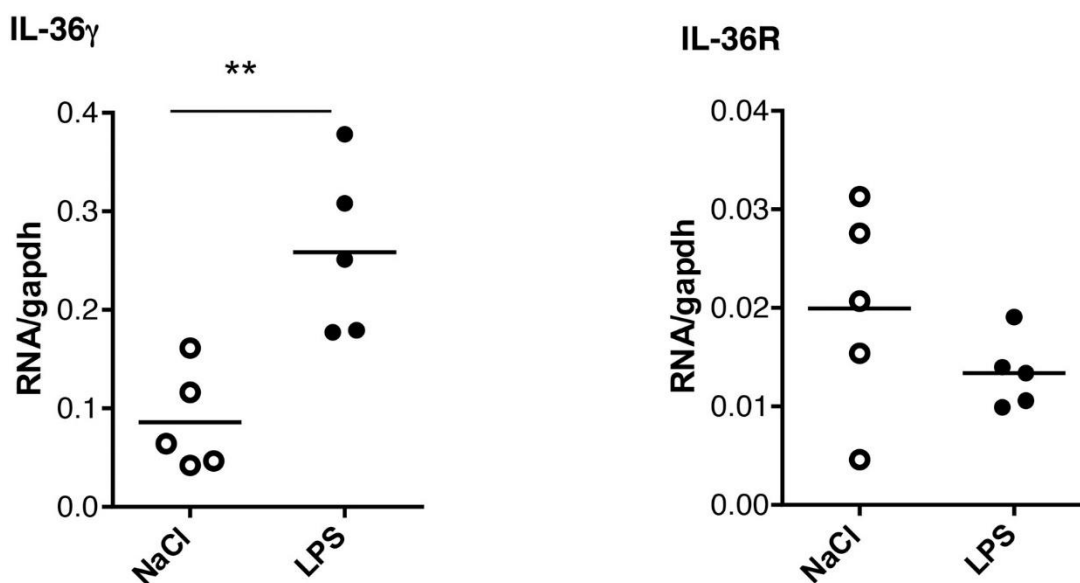
## Results

### IL-36 $\gamma$ expression is enhanced in response to lung inflammation

To determine how IL-36 cytokines are regulated during lung inflammation, mRNA expression of IL-36 cytokines and IL-36R was first measured 6 h after intratracheal instillation of LPS. There was a significant increase in pulmonary levels of IL-36 $\gamma$  mRNA that remained elevated at 24 hours in LPS-treated mice as compared to controls instilled with saline (Fig 1). In contrast, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36R expression was either unchanged or remained undetectable after LPS exposure (data not shown). IL-36 cytokine and IL-36R mRNA expression was next determined after intravenous inoculation of *M. bovis* BCG infection ( $5 \times 10^6$  CFU living *M. bovis* BCG Pasteur strain 1173 P2). IL-36 $\gamma$  mRNA levels were transiently increased 2 weeks after infection ( $P = 0.057$ ), and IL-36 $\gamma$  mRNA was present in lung granulomatous lesions after *M. bovis* BCG infection, as shown by in situ hybridization (Fig 2A and 2B). Of note, *M. bovis* BCG infection barely affected pulmonary IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36R mRNA levels, although IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression was increased (Fig 2A). Thus, lung inflammation was associated with an upregulation of inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 that included IL-36 $\gamma$ .

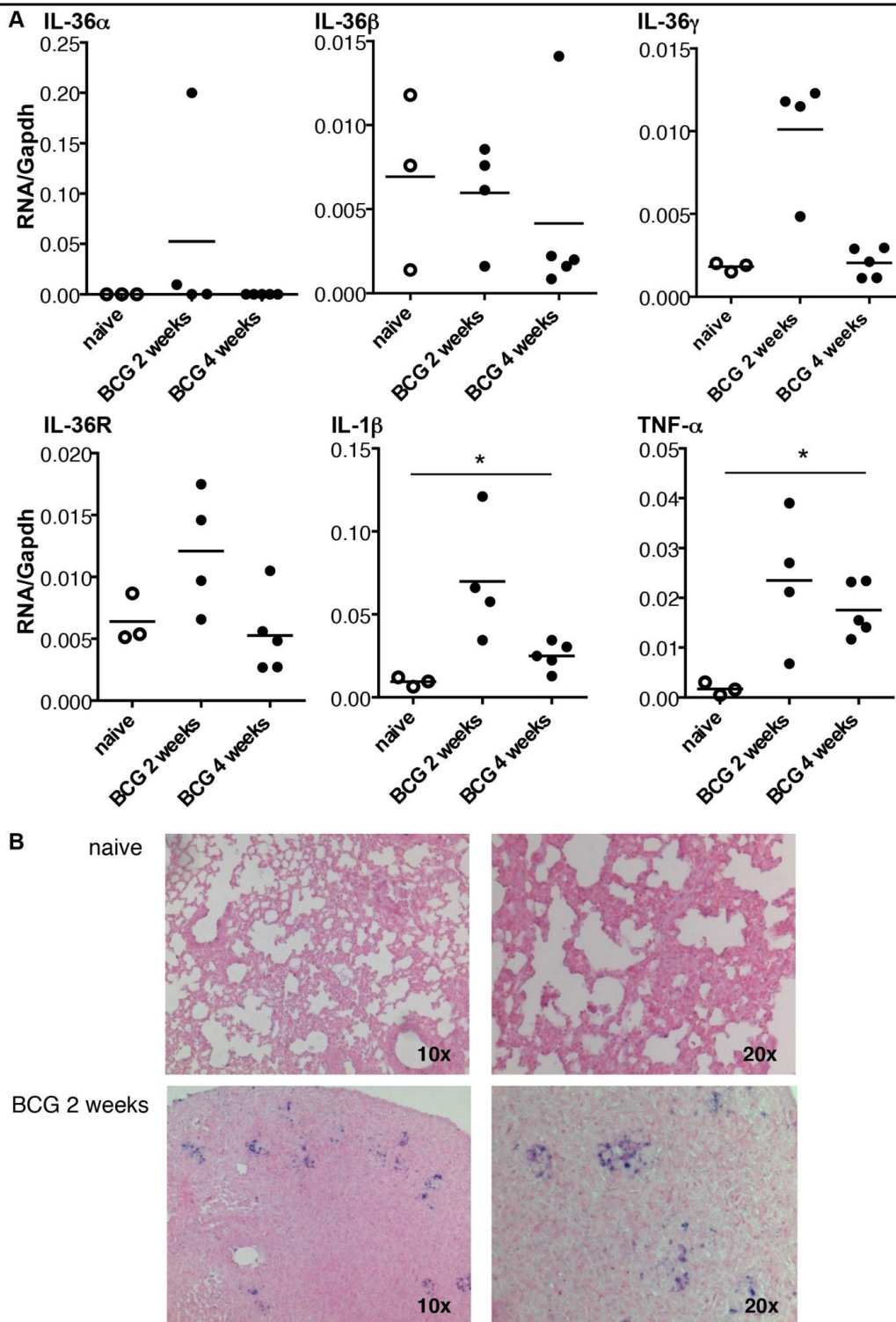
### IL-36R is dispensable for the control of *M. bovis* BCG infection

Previous results showed that IL-36R signaling is involved in Th1 responses following *M. bovis* BCG infection [5]. Since IL-36 $\gamma$  expression is transiently upregulated and IL-36 $\gamma$  is present in lung granulomas associated with *M. bovis* BCG infection, we thus examined whether IL-36R signaling is involved in host responses against *M. bovis* BCG infection. IL-36R KO and WT mice were inoculated with *M. bovis* BCG ( $5 \times 10^6$  CFU per mouse, i.v.). Survival and body weight were not significantly different in WT and IL-36R deficient mice up to 6 months post



**Fig 1. Elevated lung IL-36 $\gamma$  mRNA levels following LPS instillation.** Lung total RNA was extracted 4 h after intra-tracheal instillation of LPS ( $n = 5$  mice) or saline ( $n = 5$  mice). The results represent the levels of IL36 $\gamma$  or IL36 $\gamma$  mRNA determined by RT-qPCR normalized to Gapdh mRNA. \*\* $P < 0.01$ , as assessed by Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g001



**Fig 2. Kinetic of IL-36 cytokines, IL-36R, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression after *M. bovis* BCG infection.** mRNA levels of Il36a, Il36b, Il36g, Il36r, Il1b, and Tnfa measured by RT-qPCR and normalized to Gapdh mRNA levels from the lungs of C57BL/6 wild-type mice 2 weeks (n = 4) and 4 weeks (n = 5) after *M. bovis* BCG infection. Three naïve mice were included as controls (A). In situ hybridization was performed using a digoxigenin-labeled riboprobe complementary to Il36g mRNA (B). The micrographs are representative of lungs from one naïve mice (upper panel) and one infected mice 2 weeks after *M. bovis* BCG inoculation (lower panel). \*P<0.05, as assessed by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g002

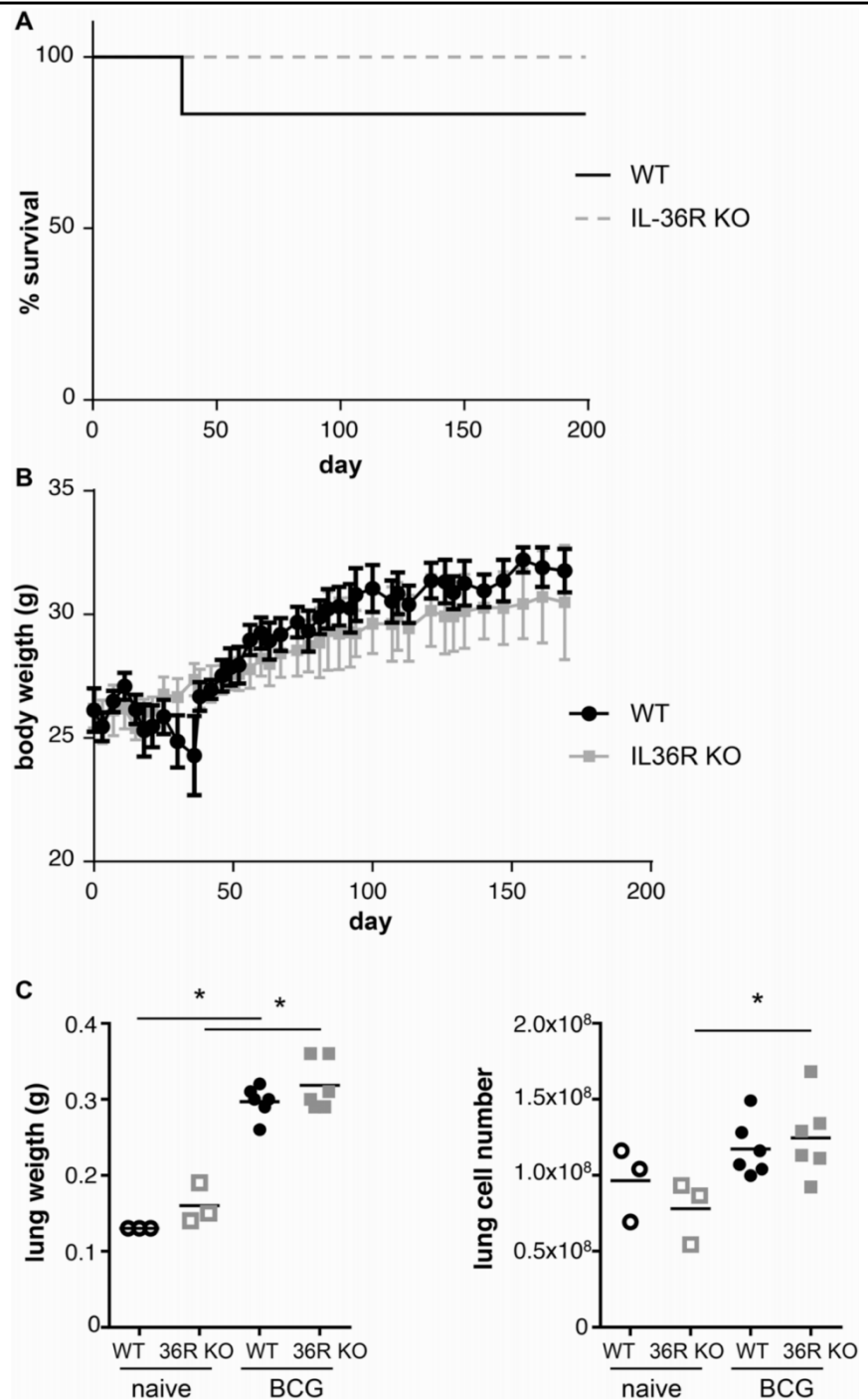
infection (Fig 3A and 3B). Lung inflammatory responses and bacterial clearance were examined at day 28 post *M. bovis* BCG injection. Lung weight was increased in *M. bovis* BCG infected mice as compared to naïve mice, but there was no difference between WT and IL-36R deficient mice (Fig 3C). Total lung infiltrating inflammatory cell numbers were also enhanced after *M. bovis* BCG infection, the difference with naïve mice reaching statistical significance in IL-36R KO mice (Fig 3C). Absolute numbers of lung infiltrating CD11b<sup>+</sup> myeloid cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were also enhanced following *M. bovis* BCG infection (Fig 4), but there was no significant difference between WT and IL-36R deficient mice. B220 cell numbers were decreased with the same magnitude in the two mouse strains in response to *M. bovis* BCG infection. There was a significant decrease in free alveolar space in the lungs of IL-36R deficient mice as compared to WT mice (Fig 5A and 5B), as previously observed [5], suggesting the presence of enhanced inflammatory responses in the lungs of IL-36R KO mice. However, the pulmonary bacterial burdens were not significantly different in IL-36R KO and WT mice (Fig 5C). Furthermore, at 6 months post-infection, the histological findings were no longer different in IL-36R deficient and WT mice and the presence of *M. bovis* BCG was undetectable by CFU and Ziehl-Neelsen staining in both mouse strains (data not shown). Transcript levels of TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, CXCL1, CXCL2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, G-CSF, iNOS, T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t were measured in the lungs at day 28 post *M. bovis* BCG infection. The mRNA levels were not different between IL-36R deficient and WT mice, with the exception of CXCL1, CXCL2, and IL-6 that were lower in IL-36R KO than in WT mice (Fig 6A). The serum levels of CXCL1 that peaked 2 weeks post-*M. bovis* BCG infection were significantly lower in IL-36R KO than in WT mice at this time-point (Fig 6B). Thus, the transiently increased lung inflammation in *M. bovis* BCG infected IL-36R deficient mice did not translate in an increase in inflammatory cytokine expression, and was associated with a decrease in CXCL1 expression.

### Limited contribution of IL-36R, compared to IL-1RI and TNF- $\alpha$ pathways in the control of *M. tuberculosis* infection

The expression levels of IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  mRNA were next determined in the lungs of WT and TNF- $\alpha$  deficient mice at different time-points following aerogenic infection with *M. tuberculosis*. IL-36 $\gamma$  and IL-36R mRNA levels remained unchanged up to 27 days after *M. tuberculosis* infection in WT mice. In contrast, the transcript levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were significantly increased at day 14 and were further upregulated at day 21 and 28 (Fig 7). In the highly susceptible, *M. tuberculosis* infected TNF- $\alpha$  deficient mice, the mRNA levels of IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  were even higher than in WT mice. Furthermore, there was a significant increase of IL-36 $\gamma$  mRNA levels in TNF- $\alpha$  deficient mice infected with *M. tuberculosis*.

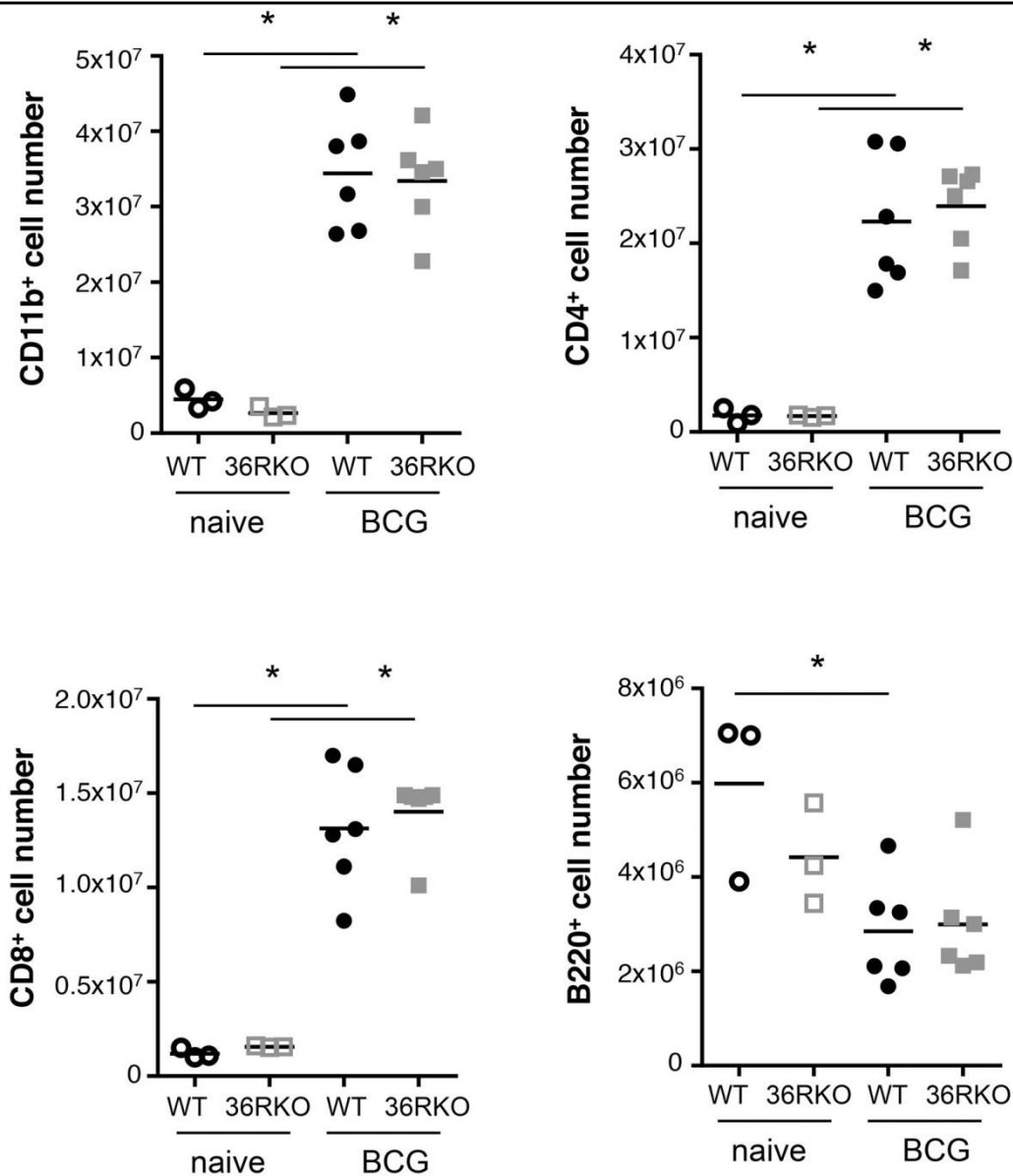
To assess the contribution of the IL-36 pathway to host responses against *M. tuberculosis* infection, WT and IL-36R deficient mice were infected by intra-nasal instillation of *M. tuberculosis*. Mice deficient for IL-1RI and TNF- $\alpha$  were included as controls since both mouse strains have previously been reported to exhibit a reduced control of acute *M. tuberculosis* infection associated with enhanced lethality. IL-36R deficient mice had a similar evolution of body weight and survival as compared to WT mice up to 4 months after *M. tuberculosis* infection. In contrast, 100% of TNF- $\alpha$  mice died or had to be sacrificed within one month post infection and IL-1RI deficient mice exhibited an intermediate susceptibility with a 50% survival during the 4 months follow-up period ( $P = 0.0455$ ) (Fig 8A and 8B). Consistent with these findings, lung weights and bacterial loads were significantly increased in TNF- $\alpha$  deficient mice as compared to WT mice ( $P < 0.0001$ ) (Fig 8C). In addition, macroscopic and histological examination showed that the lungs of TNF- $\alpha$  mice exhibited massive inflammatory responses after one month of infection with reduced free alveolar space (Fig 9) and enhanced bacterial load as





**Fig 3. Role of IL-36R signaling in *M. bovis* BCG infection.** Wild-type and IL-36R deficient mice were inoculated intravenously with *M. bovis* BCG ( $n = 12$  per group). Six mice from each genotype were sacrificed at 28 days and the other mice were followed for up to 180 days. The percentage of survival (A) and evolution of body weight (B) for WT and IL-36R deficient mice are depicted. (C) Total lung weight and absolute lung cell numbers at 28 days after infection are represented in left and right panels, respectively. No significant differences were observed between WT and IL-36R KO mice, as assessed by log-rank (Mantel-Cox) test (A) or two-way ANOVA for repeated measures, followed by Sidak's multiple comparison test (B). \* $P < 0.05$ , as assessed by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney test (C). Black and grey symbols represent WT and IL-36R deficient mice, respectively.

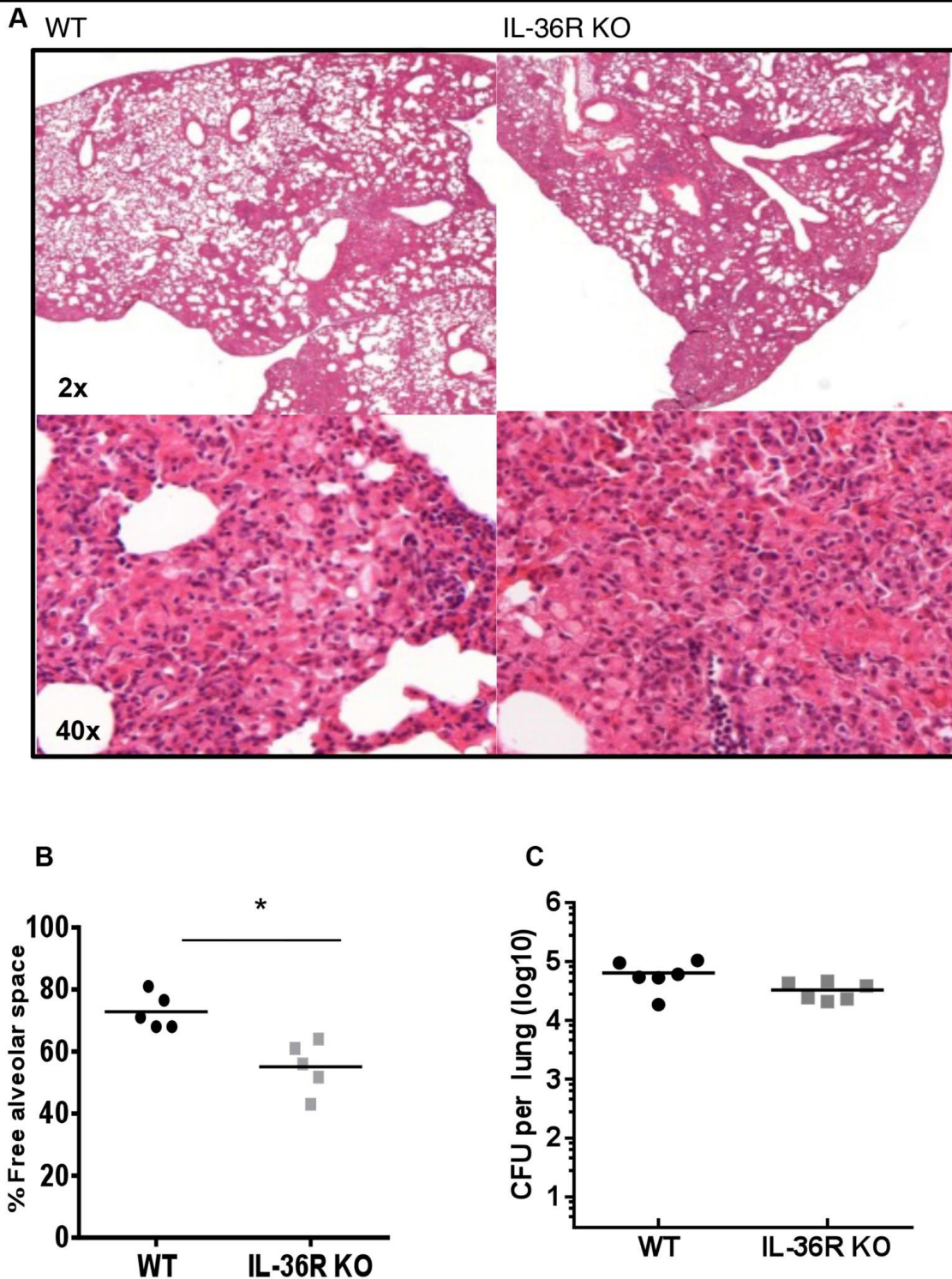
doi:10.1371/journal.pone.0126058.g003



**Fig 4. Changes in lung cell populations following *M. bovis* BCG inoculation.** Lung cells were isolated from 3 naive WT and IL-36R deficient mice, and from 6 WT and 6 IL-36R deficient mice 4 weeks after intravenous *M. bovis* BCG inoculation. The results represent CD11b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and B220<sup>+</sup> cell numbers as assessed by flow cytometric analysis. \*P<0.05, as assessed by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney test.

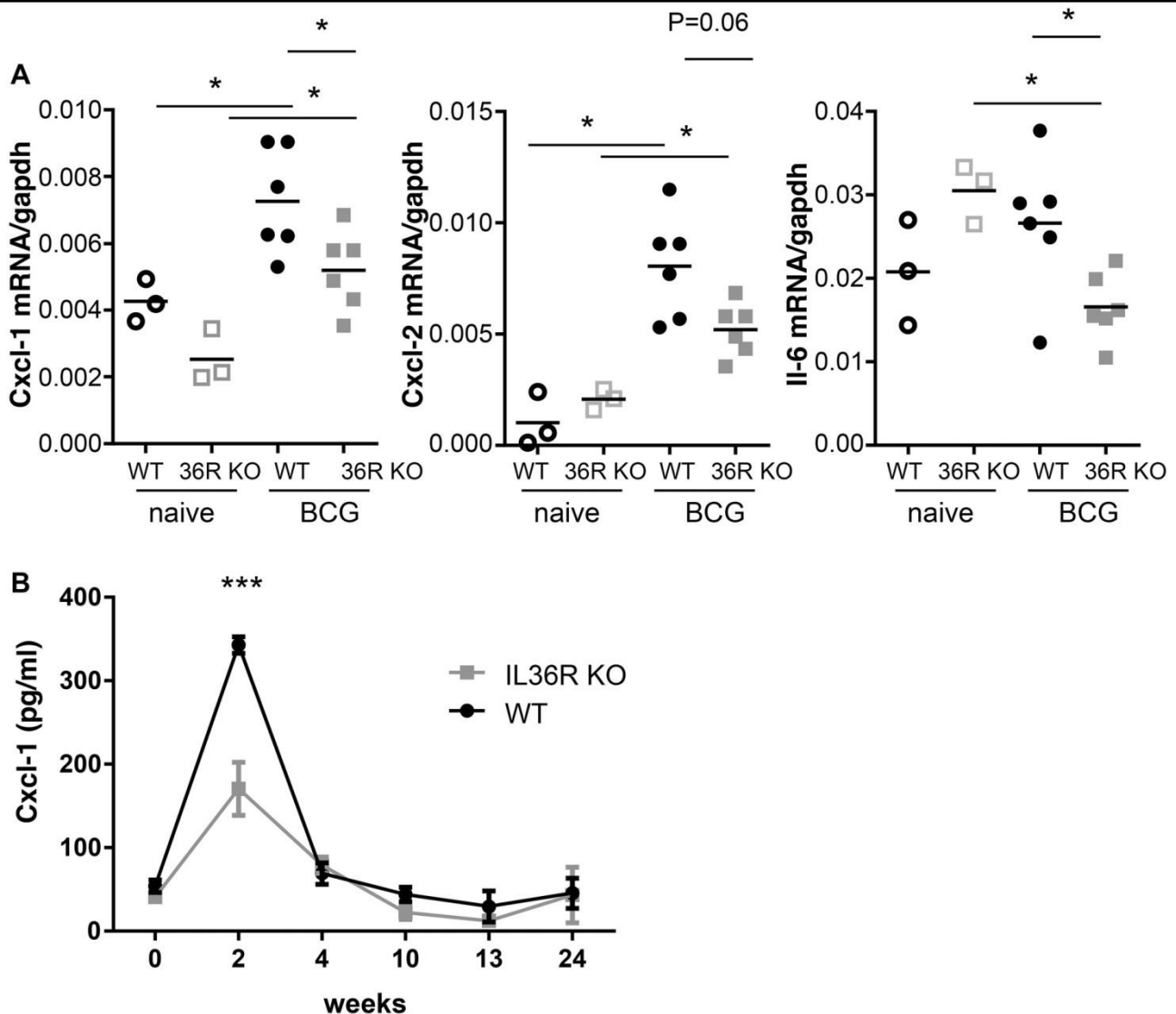
doi:10.1371/journal.pone.0126058.g004

assessed by Ziehl-Neelsen staining (Fig 9). Bacterial burden was significantly increased in IL-1R1 deficient mice as compared to WT mice at 1 month (P = 0.0091) and 4 months (P = 0.0193) post-infection (Fig 8C and 8D). There was no difference regarding lung weight, bacterial load or histopathological findings between IL-36 KO and WT mice at 1 or 4 months post-infection (Figs 8 and 9). Lung inflammatory response was further analyzed by assessing the level of the typical pro-inflammatory, Th1 cytokine IFN- $\gamma$  and of the chemokine CXCL1 (Fig 10). In line with their increased lung inflammation, lung IFN- $\gamma$  levels of were significantly increased in TNF- $\alpha$  deficient mice at 1 month post infection as compared to WT mice, as well as in IL-1RI deficient as compared to WT mice at 4 months, while IL-36R deficient mice



**Fig 5. Histopathology and bacterial loads in wild-type and IL-36R deficient mice.** Hematoxylin eosin staining of lung sections 4 weeks after *M. bovis* BCG infection of WT (left panels) and IL-36R deficient (right panels) mice (original magnifications X2, upper panel, and X40, lower panel) (A). Determination of free alveolar space on lung sections. Data are represented as the mean  $\pm$  SD of percentage of lung lesion free/total lung tissue in 5 mice per group with 1 or 2 lobes analyzed per mouse (B). Lung bacterial loads at 4 weeks post-infection are represented as CFU per lung (n = 6 mice per group) (C). \*\*P<0.01 as assessed by Mann Whitney test.

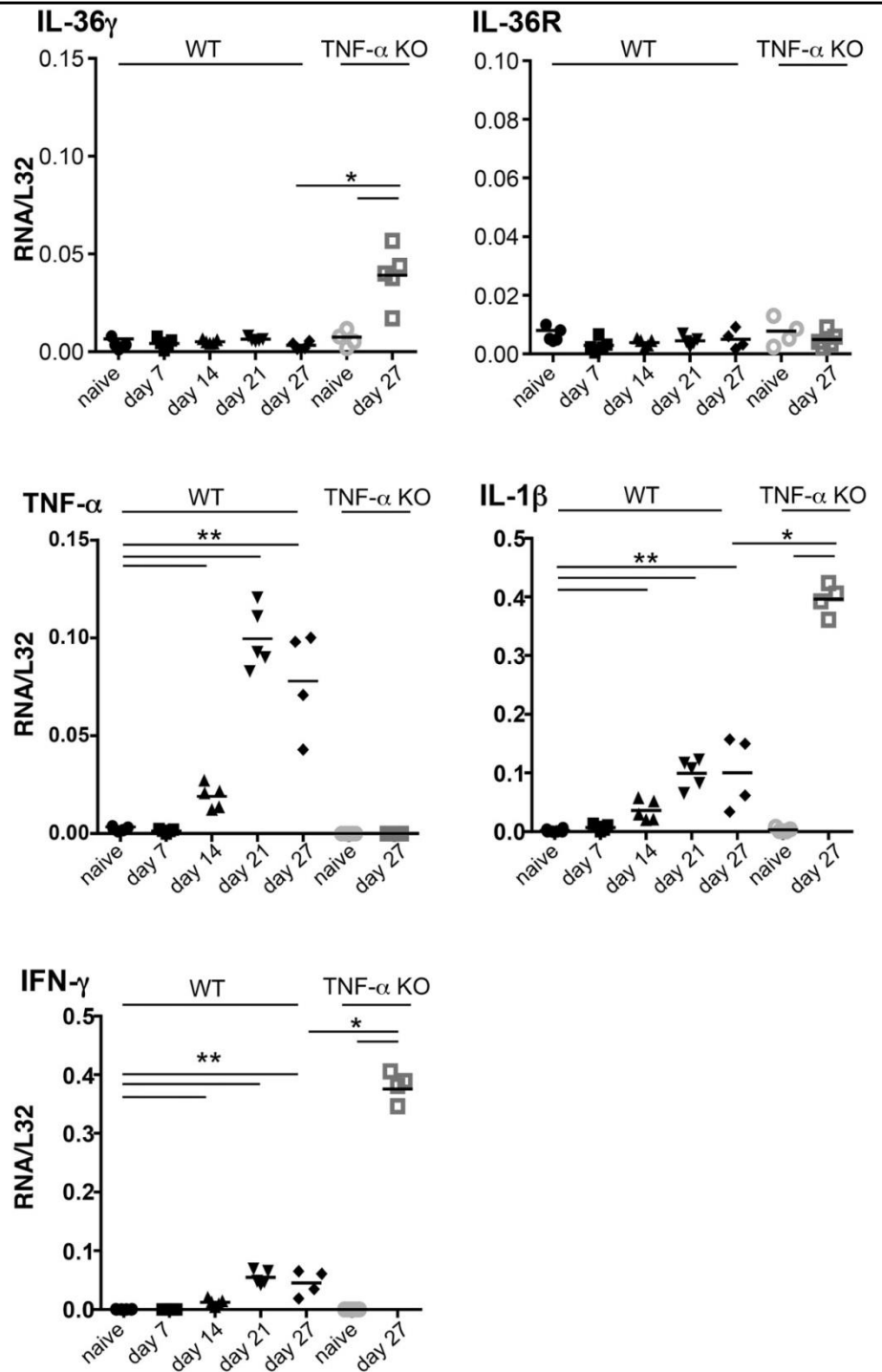
doi:10.1371/journal.pone.0126058.g005



**Fig 6. CXCL1 expression in response to *M. bovis* infection in IL-36R deficient and wild-type mice.** A. Total RNA was prepared from the lungs of naïve (open symbols) and *M. bovis* BCG infected (closed symbols) WT (black circles) and IL-36R deficient (grey squares) mice. The results represent Cxcl1, Cxcl2, and Il6 mRNA levels determined by RT-qPCR normalized to Gapdh mRNA levels in individual mice. \* $P < 0.05$ , as assessed by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney test. B. Serum levels of Cxcl1 were measured by ELISA in WT (black symbols) and IL-36R deficient (grey symbols) mice. The results represent means  $\pm$  SEM of 6 mice per group. Two-way ANOVA for repeated measures, followed by Sidak's multiple comparison test was used to compare IL-36R deficient and WT mice. \*\*\* $P < 0.001$  only at week 2.

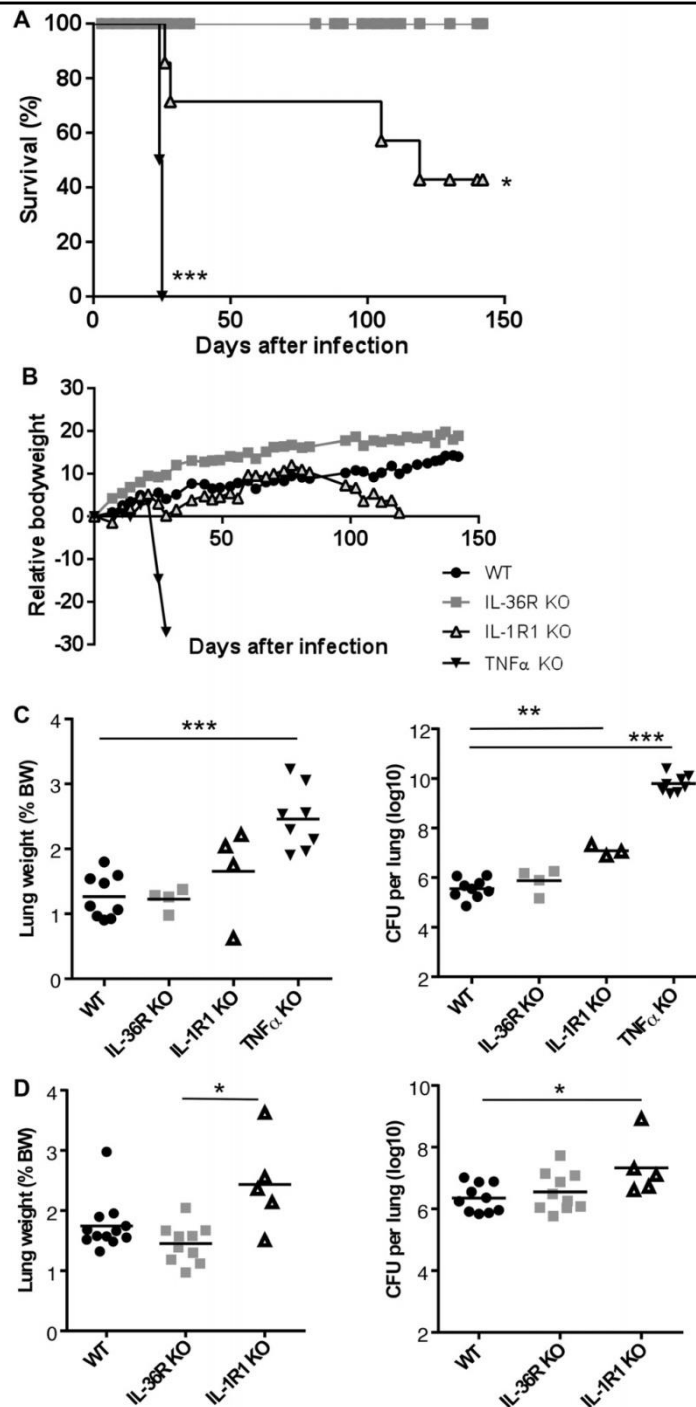
doi:10.1371/journal.pone.0126058.g006

exhibited IFN- $\gamma$  levels similar to WT controls. The levels of CXCL1 were increased in TNF- $\alpha$  deficient mice, although this did not reach significance, but were significantly decreased in IL1RI deficient mice at 1 and 4 months post infection. There was no difference in the lung levels of CXCL1 in IL-36R deficient and WT mice at 1 and 4 months post-infection. Finally, flow cytometric analysis of lung infiltrating cells showed similar numbers of granulocytic and monocytic CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>-</sup> cells in IL-36R deficient and WT mice, as well as similar numbers of CD3<sup>+</sup> T cells at 1 month after infection (Fig 11). Therefore, IL-36R deficiency did not impair the control of *M. tuberculosis* infection as did the absence of TNF- $\alpha$  or IL-1R1 signalling.



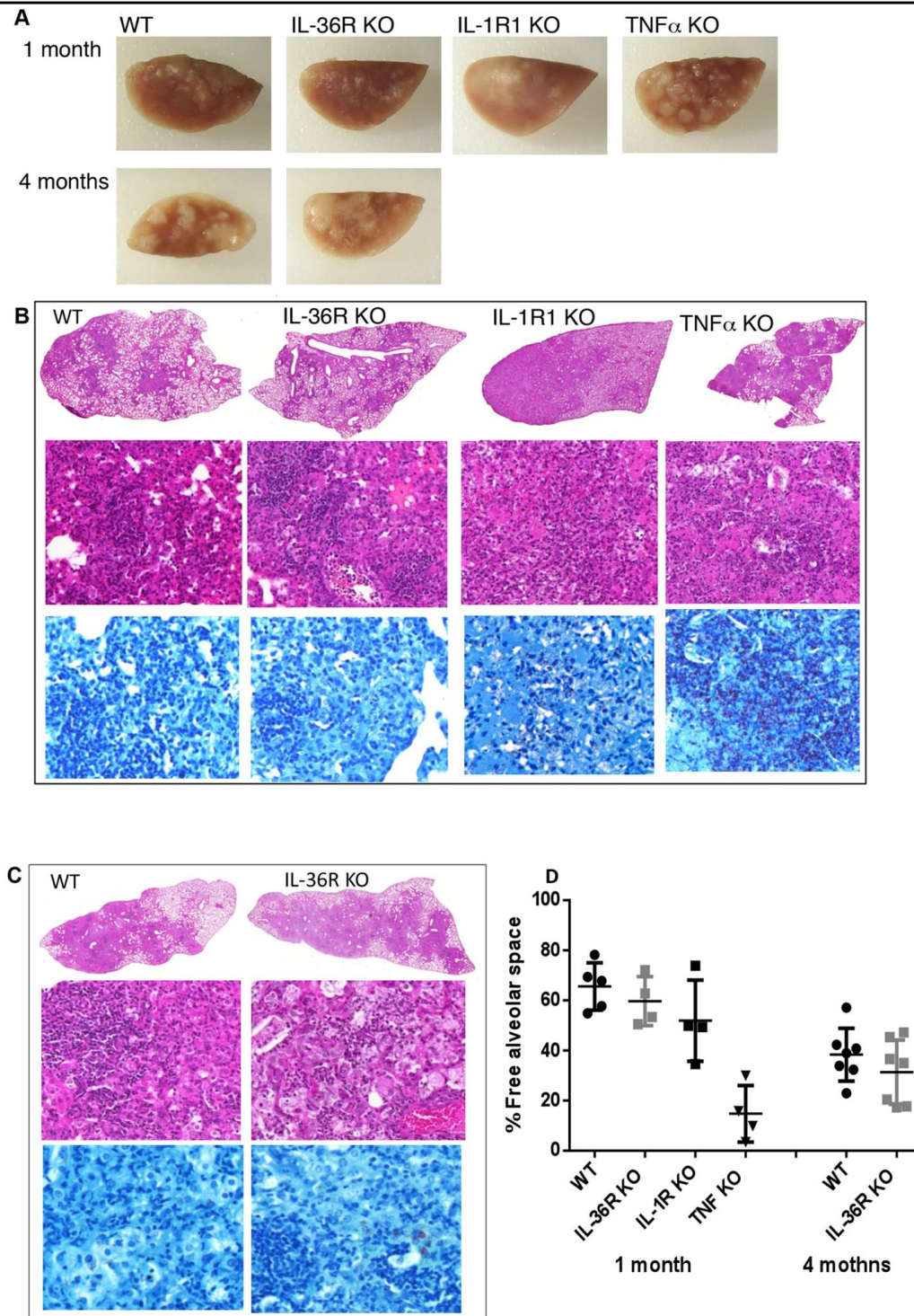
**Fig 7. Kinetics of pulmonary cytokine expression after *M. tuberculosis* infection.** Total RNA was prepared from the lungs of naïve WT (black symbols) and TNF- $\alpha$  deficient mice (grey symbols) and at days 7, 14, 21 and 27 after *M. tuberculosis* infection in WT (black symbols) and at day 27 in TNF- $\alpha$  deficient mice (grey symbols). The results represent the levels of Il36g, Il36r, Tnfa, Il1b, and Ifng mRNA determined by RTqPCR normalized to L32 mRNA (n = 5 per group). \*P<0.05, \*\*P<0.01, as assessed by Kruskal-Wallis, followed by Mann-Whitney test (C).

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g007



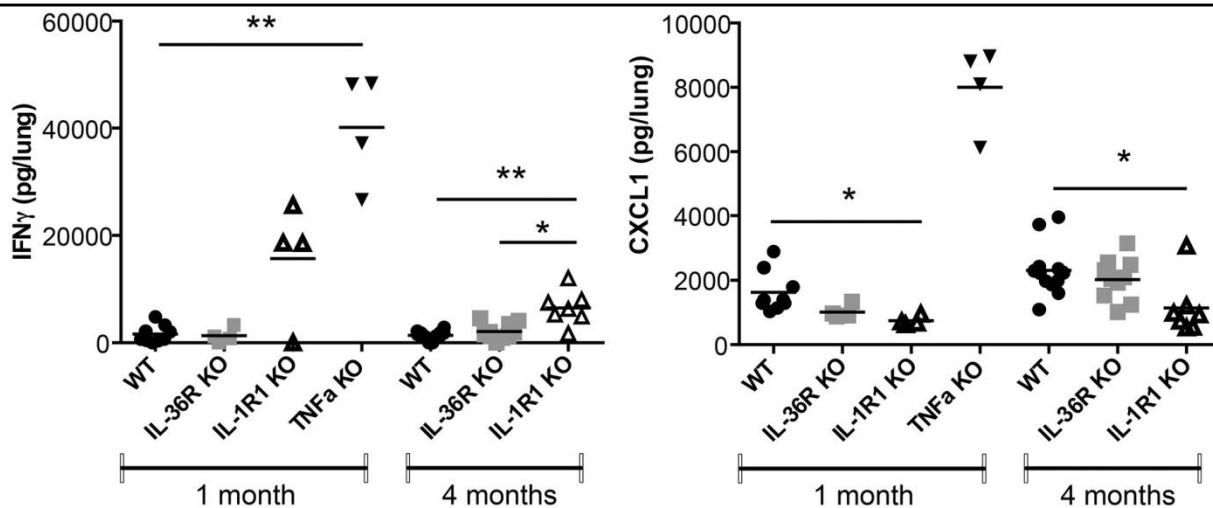
**Fig 8. IL-36R is dispensable to control acute *M. tuberculosis* infection.** Mice deficient for IL-36R, IL-1R1 or TNF- $\alpha$ , and WT mice were exposed to an aerogenic dose of *M. tuberculosis* H37Rv and monitored for survival (A) and body weight. The results represent mean body weight  $\pm$  SEM values of 8–14 mice per group, pooled from 2 independent experiments. Lung weight (left panels) and bacterial loads (right panels) were determined in TNF- $\alpha$  deficient, IL-36R deficient, IL-1R1 deficient, and WT mice at 1 month (C) and 4 months (D) post infection. Results are expressed as individual values and mean (n = 4–9 for lung weight, n = 3–9 for CFU) from 1 experiment at 1 month and (n = 5–12 for lung weight, n = 5–10 for CFU) from 2 experiments at 4 months. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 as compared to the wild-type controls (assessed by KruskalWallis, followed by Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g008



**Fig 9. Controlled lung pathology after *M. tuberculosis* infection in the absence of IL-36R pathway.** Macroscopic lung lesions of IL-36R deficient, IL1R1 deficient, TNF- $\alpha$  deficient, and WT mice at 1 month, and of IL-36R deficient and WT mice at 4 months post *M. tuberculosis* infection (A). Histological studies were performed at 1 month in IL-36R deficient, IL-1R1 deficient, TNF- $\alpha$  deficient, and WT mice (B), and at 4 months in IL-36R deficient and WT mice (C). Representative lung H&E (1x and 40x magnifications) and Ziehl-Neelsen (60x magnification) staining at 1 and 4 months post *M. tuberculosis* infection. Free alveolar space quantification is represented as the mean  $\pm$  SD of percentage lung lesion free/total lung tissue in 4–7 mice per group with 1–2 lobes analyzed per mouse (D). Statistical analysis was one-way ANOVA, no statistically significant differences were observed between animal groups.

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g009



**Fig 10. Lung IFN- $\gamma$  and Cxcl-1 levels in *M. tuberculosis* infection.** The levels of IFN- $\gamma$  and Cxcl-1 protein were determined in lung homogenates 1 month post aerogenic *M. tuberculosis* infection in TNF- $\alpha$  deficient, IL-36R deficient, IL-1R1 deficient, and wild-type mice, and 4 months post-infection in IL-36R deficient and WT mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 3-9$  from 1 experiment at 1 month,  $n = 5-10$  from 2 experiments at 4 months.  $P < 0.05$  \*;  $P < 0.01$  \*\* as compared to the WT mice.

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g010

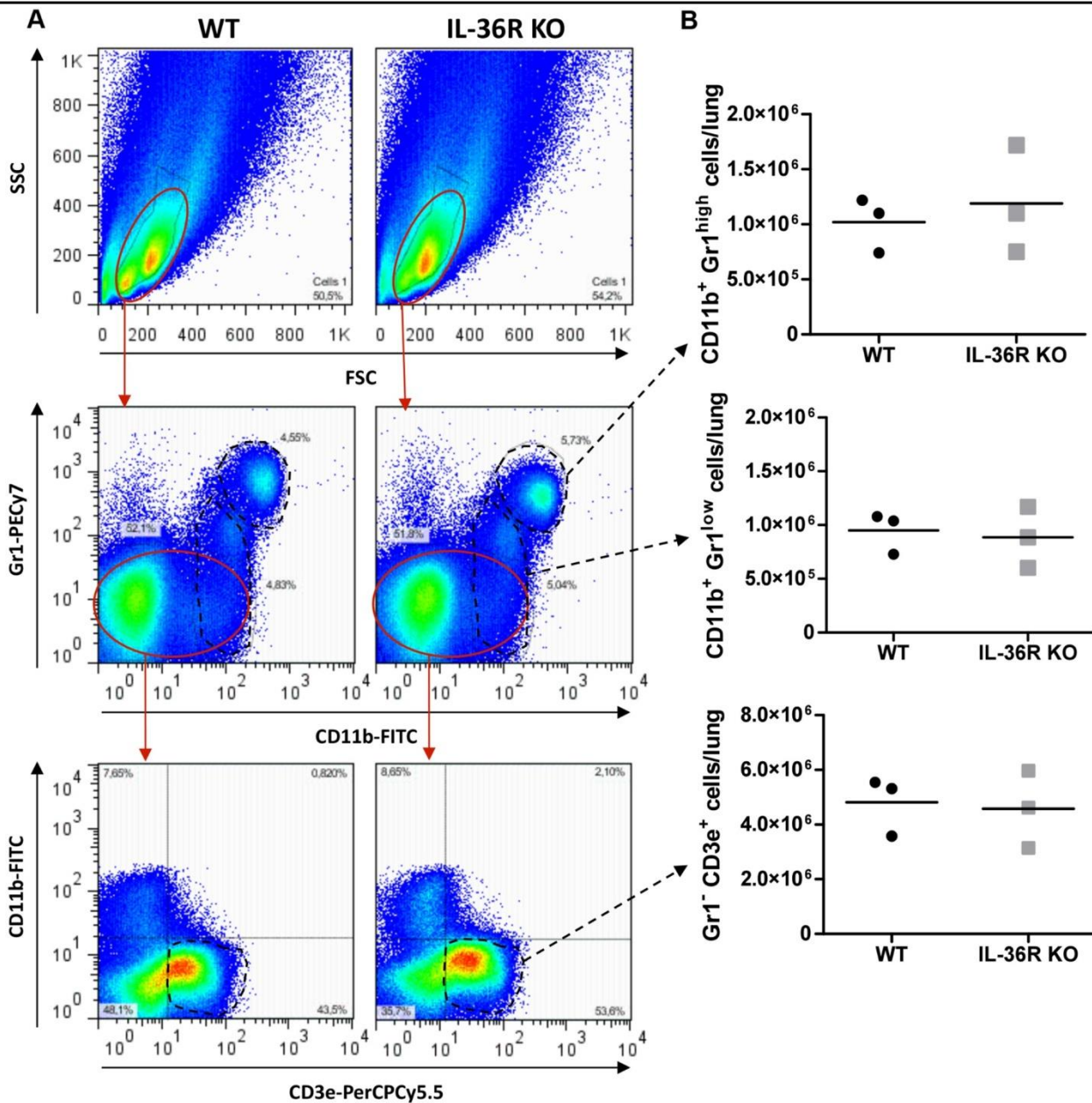
## Discussion

We show here that IL-36 $\gamma$  mRNA expression is enhanced during acute lung inflammation induced by intratracheal LPS instillation or *M. bovis* BCG systemic infection in WT mice and after aerogenic *M. tuberculosis* infection of highly susceptible, TNF- $\alpha$  deficient mice. To understand whether IL-36 $\gamma$  expression represents a host defense mechanism essential to fight the infection, or is rather a consequence of the enhanced inflammatory response induced by the uncontrolled infection, we addressed the relevance of IL-36 pathway in controlling lung inflammation and infection by mycobacteria. IL-36R deficient mice had transiently increased lung pathology and reduced lung chemokine CXCL1 production following *M. bovis* BCG infection, but without long term consequences on bacterial control. Indeed, while TNF- $\alpha$  KO mice succumbed after acute *M. tuberculosis* infection with high bacterial loads and severe inflammatory responses and IL-1R1 KO mice exhibited an intermediate phenotype, the survival, bacterial clearance, and inflammatory responses were similar in IL-36R deficient and WT mice. Taken together, these results indicate that IL-36R signaling has limited contribution on host responses to mycobacterial infections.

Like other IL-1 family members, IL-36 is produced by stimulated innate immune cells, including macrophages and DC, and may thus contribute to host defense against pathogens. Human peripheral blood mononuclear cells produce IL-36 $\gamma$  and IL-36Ra in response to *Aspergillus fumigatus* infection, and the addition of IL-36Ra inhibits the production of IL-17 and IFN- $\gamma$ , suggesting that IL-36 is involved in the production of these cytokines by PBMC in response to *Aspergillus fumigatus* infection [32]. Human monocyte-derived DC (MDC) and polarized M1 macrophages produce IL-36 $\gamma$  in response to IL-1, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , an expression dependent on t-bet, the transcription factor T-box expressed in T cells [33]. Mouse bone marrow-derived DC (BMDC) express IL-36 $\gamma$  and IL-36 $\alpha$  either constitutively or in response to various stimulations [2]. Consistent with these in vitro findings we show here the presence of IL36 $\gamma$  in granulomatous lung lesions from *M. bovis* BCG infected mice.

IL-36R is expressed by BMDC and IL-36 stimulates the production of several cytokines and chemokines, as well as the expression of MHC class 2 molecules and co-stimulatory receptors





**Fig 11. Unaffected lung inflammatory cell infiltration in the absence of IL-36R pathway after *M. tuberculosis* infection.** Infiltrating cells in the lungs of IL-36R deficient (right panels) and wild-type mice (left panels) were isolated on day 28 after *M. tuberculosis* H37Rv infection, and analyzed by flow cytometry for the expression of CD11b, Gr1 (Ly6G/6C) and CD3. Gating strategy and representative dot blots are shown (A). Results expressed as the absolute number of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> and Gr1<sup>low</sup>CD3e<sup>+</sup> cells per lung are from 3 individual mice with mean values as horizontal bars (B).

doi:10.1371/journal.pone.0126058.g011

[2]. Similarly, IL-36 stimulates the expression of cytokines and induces MDC maturation with enhanced MHC class 2, CD83 and CD86 expression [3], [4]. IL-36R is also expressed by CD4<sup>+</sup> T cells, in particular naïve CD4<sup>+</sup> T cells, and IL-36 induces Th1 responses in vitro and in vivo [5]. The stimulatory effects of IL-36 on Th1 polarization are dependent on the release of IL-12 by DC and the production of IL-2 by CD4<sup>+</sup> T cells, which in turn induces IL-12Rβ2 expression [5]. These findings suggested that IL-36 could play an important role in host defense against mycobacterial infections. However, we show here that host responses involved in *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* infection containment and survival were largely independent of IL-36R signaling. Consistent with these results, IL-36R signaling is also dispensable for the control of footpad infection with *Leishmania guyanensis*, another infectious model in which Th1 responses play a critical role for parasitic clearance (Lamacchia, Gabay et al, unpublished data).

Recent data indicate that various inflammatory stimulants also induce IL-36 production by bronchial epithelial cells, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17, as well as cigarette smoke condensate [34], [35]. Production of IL-36 $\gamma$  by bronchial epithelial cells is also markedly stimulated by infectious agents, including *Pseudomonas aeruginosa* [36] and rhinovirus, with higher rhinovirus-induced IL-36 $\gamma$  in epithelial cells from asthmatic patients [37]. In *M. bovis* BCG infected mice the levels of CXCL1, CXCL2, and IL-6 were transiently lower in IL-36R KO as compared to WT mice, with no consequence on the severity of lung infection and survival. Similarly, there was no difference in lung inflammatory responses following aerogenic *M. tuberculosis* infection in IL-36R KO and WT mice. Furthermore, although IL-36 $\gamma$  production was enhanced in response to intratracheal LPS instillation, the severity of inflammatory responses, as assessed by cellular composition and cytokine levels in bronchoalveolar lavages, was unaffected by IL36R deficiency (Woldt, Gabay et al, unpublished results).

Regarding other IL-1 family cytokine pathways, mice deficient in IL-1 $\alpha/\beta$  and IL-1R1 signaling exhibit enhanced bacterial loads and reduced survival in response to *M. tuberculosis* infection, although adaptive responses are essentially unaltered [38], [20], [23], [24]. A mechanism through which IL-1 may control *M. tuberculosis* infection has recently been proposed, namely IL-1 induced release of prostaglandin E2, which exerts an inhibitory effect on type I IFN production, leading to better bacterial containment [39]. In our study, the phenotype of IL-1R1 KO mice was less severe than in TNF- $\alpha$  deficient mice. This finding is in accordance with the predominant role of TNF- $\alpha$  in the control of latent and primary tuberculosis infection in humans [13], [14], [15], [16], and mice [24].

Several data obtained in mice and humans indicate that IL-36R signaling is involved in the pathogenesis of psoriasis. Transgenic mice overexpressing IL-36 $\alpha$  exhibited transient skin changes reminiscent of psoriasis. This phenotype was abrogated when transgenic mice were crossed with IL-36R or IL-1RAcP deficient mice, but strongly exacerbated when IL-36 $\alpha$  transgenic mice were crossed with IL-36Ra deficient mice [26]. Treatment of SCID mice engrafted with human psoriasis skin with a monoclonal anti-human IL-36R neutralizing antibody led to substantial normalization of engrafted skin pathology [40]. Imiquimod, a TLR7 agonist, can induce psoriasis-like lesions in human and mice. This effect is almost completely dependent upon IL-36R signaling [41]. Finally one of the most compelling evidence regarding a role of IL36R signaling in psoriasis is the presence of a variety of IL36RN gene mutations leading to non-functional IL-36Ra in some patients with generalized pustular psoriasis (reviewed in [25]).

In the search of new therapeutic strategies limiting the risk of tuberculosis reactivation, our previous studies showed that targeting selectively soluble TNF but sparing membrane TNF by Dominant Negative-TNF inhibitor molecules did not compromise immune responses to both *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* infections in contrast to other TNF neutralizing molecules [42], while efficiently protecting mice against acute inflammatory reactions [30]. Here we show that the host response to *M. tuberculosis* was preserved in the complete absence of IL-36R signaling. Our data suggest that targeting IL-36R signaling, for example in the context of generalized pustular psoriasis or other forms of psoriasis [43] may be considered as a new, safe therapeutic strategy unlikely to compromise host immunity to mycobacteria, thereby reducing the risk of tuberculosis reactivation that is associated with TNF antagonists.

In conclusion, despite in vitro and in vivo findings indicating that IL-36R signaling stimulates Th1 responses, and that IL-36 $\gamma$  is over-expressed in the inflamed lung, our results show that the IL-36 pathway is dispensable for the control of mycobacterial infection. This suggests that neutralizing IL-36 may allow therapeutic interventions for severe inflammatory indications while sparing host control of tuberculosis.

## Acknowledgments

We would like to thank Nathalie Lin-Marq and Céline Lamacchia for ISH.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NS SV M-LB MO IG BR VQ CG. Performed the experiments: NS SV M-LB MO DV IG. Analyzed the data: NS SV GP M-LB MO IG BR VQ CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: NS SV GP M-LB MO IG BR VQ CG. Wrote the paper: NS SV GP M-LB MO IG BR VQ CG.

## References

1. Towne JE, Renshaw BR, Douangpanya J, Lipsky BP, Shen M, *et al.* Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36alpha, IL-36beta, and IL-36gamma) or antagonist (IL-36Ra) activity. *J Biol Chem.* 2011; 286: 42594–42602. doi: [10.1074/jbc.M111.267922](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.267922) PMID: [21965679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21965679/)
2. Vigne S, Palmer G, Lamacchia C, Martin P, Talabot-Ayer D, *et al.* IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood.* 2011; 118: 5813–5823. doi: [10.1182/blood-2011-05-356873](https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-356873) PMID: [21860022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21860022/)
3. Mutamba S, Allison A, Mahida Y, Barrow P, Foster N. Expression of IL-1Rrp2 by human myelomonocytic cells is unique to DCs and facilitates DC maturation by IL-1F8 and IL-1F9. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 607–617. doi: [10.1002/eji.201142035](https://doi.org/10.1002/eji.201142035) PMID: [22144259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22144259/)
4. Foster AM, Baliwag J, Chen CS, Guzman AM, Stoll SW, *et al.* IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin. *J Immunol.* 2014; 192: 6053–6061. doi: [10.4049/jimmunol.1301481](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301481) PMID: [24829417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24829417/)
5. Vigne S, Palmer G, Martin P, Lamacchia C, Strebler D, *et al.* IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells. *Blood.* 2012; 120: 3478–3487. doi: [10.1182/blood-2012-06-439026](https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439026) PMID: [22968459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22968459/)
6. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglion MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA.* 2005; 293: 2767–2775. PMID: [15941807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15941807/)
7. Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science.* 2010; 328: 856–861. doi: [10.1126/science.1185449](https://doi.org/10.1126/science.1185449) PMID: [20466923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20466923/)
8. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93–129. PMID: [11244032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11244032/)
9. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb).* 2004; 84: 93–101. PMID: [14670350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14670350/)
10. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 599–623. PMID: [15032590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032590/)
11. Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* 2008; 10: 995–1004. doi: [10.1016/j.micinf.2008.07.039](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.039) PMID: [18762264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18762264/)
12. Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, *et al.* Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat Immunol.* 2013; 14: 52–60. doi: [10.1038/ni.2474](https://doi.org/10.1038/ni.2474) PMID: [23160153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23160153/)
13. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, *et al.* Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1098–1104. PMID: [11596589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11596589/)
14. Keane J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford).* 2005; 44: 714–720. PMID: [15741198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15741198/)
15. Mohan AK, Cote TR, Siegel JN, Braun MM. Infectious complications of biologic treatments of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15: 179–184. PMID: [12707568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12707568/)
16. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, *et al.* Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 2001; 69: 1847–1855. PMID: [11179363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11179363/)
17. Sugawara I, Yamada H, Hua S, Mizuno S. Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection. *Microbiol Immunol.* 2001; 45: 743–750. PMID: [11791667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11791667/)
18. Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, *et al.* Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000; 182: 902–908. PMID: [10950787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10950787/)

19. Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest*. 2000; 80: 759–767. PMID: [10830786](#)
20. Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, *et al*. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2007; 179: 1178–1189. PMID: [17617611](#)
21. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe*. 2008; 3: 224–232. doi: [10.1016/j.chom.2008.03.003](#) PMID: [18407066](#)
22. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, *et al*. Caspase-1 independent IL1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol*. 2010; 184: 3326–3330. doi: [10.4049/jimmunol.0904189](#) PMID: [20200276](#)
23. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, *et al*. Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity*. 2011; 35: 1023–1034. doi: [10.1016/j.immuni.2011.12.002](#) PMID: [22195750](#)
24. Bourigault ML, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, *et al*. Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG. *Immunity, Inflammat & Disease*. 2013; 1: 47–62.
25. Gabay C, Towne J. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *J Leukoc Biol*. 2015; 97: 645–652. PMID: [25673295](#)
26. Blumberg H, Dinh H, Trueblood ES, Pretorius J, Kugler D, *et al*. Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *J Exp Med*. 2007; 204: 2603–2614. PMID: [17908936](#)
27. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, *et al*. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol*. 1997; 159: 2452–2461. PMID: [9278338](#)
28. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, *et al*. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 8093–8098. PMID: [9223320](#)
29. Lamacchia C, Palmer G, Gabay C. Discrimination of C57BL/6J Rj and 129S2/SvPasCrl inbred mouse strains by use of simple sequence length polymorphisms. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007; 46: 21–24. PMID: [17994669](#)
30. Olleros ML, Vesin D, Fotio AL, Santiago-Raber ML, Tauzin S, *et al*. Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis. *J Hepatol*. 2010; 53: 1059–1068. doi: [10.1016/j.jhep.2010.05.029](#) PMID: [20813418](#)
31. Jacobs M, Brown N, Allie N, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-LT-alpha-deficient mice. *Clin Immunol*. 2000; 94: 192–199. PMID: [10692238](#)
32. Gresnigt MS, Rosler B, Jacobs CW, Becker KL, Joosten LA, *et al*. The IL-36 receptor pathway regulates *Aspergillus fumigatus*-induced Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol*. 2013; 43: 416–426. doi: [10.1002/eji.201242711](#) PMID: [23147407](#)
33. Bachmann M, Scheiermann P, Hardle L, Pfeilschifter J, Muhl H. IL-36gamma/IL-1F9, an innate T-bet target in myeloid cells. *J Biol Chem*. 2012; 287: 41684–41696. doi: [10.1074/jbc.M112.385443](#) PMID: [23095752](#)
34. Chustz RT, Nagarkar DR, Poposki JA, Favoreto S Jr, Avila PC, *et al*. Regulation and function of the IL1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45: 145–153. doi: [10.1165/rcmb.2010-0075OC](#) PMID: [20870894](#)
35. Parsanejad R, Fields WR, Steichen TJ, Bombick BR, Doolittle DJ. Distinct regulatory profiles of interleukins and chemokines in response to cigarette smoke condensate in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2008; 28: 703–712. doi: [10.1089/jir.2008.0139](#) PMID: [18937544](#)
36. Vos JB, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS, *et al*. Transcriptional response of bronchial epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*: identification of early mediators of host defense. *Physiol Genomics*. 2005; 21: 324–336. PMID: [15701729](#)
37. Bochkov YA, Hanson KM, Keles S, Brockman-Schneider RA, Jarjour NN, *et al*. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma. *Mucosal Immunol*. 2010; 3: 69–80. doi: [10.1038/mi.2009.109](#) PMID: [19710636](#)
38. Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, *et al*. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest*. 2004; 114: 1790–1799. PMID: [15599404](#)
39. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, *et al*. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014; 511: 99–103. doi: [10.1038/nature13489](#) PMID: [24990750](#)

40. Blumberg H, Dinh H, Dean C Jr, Trueblood ES, Bailey K, *et al.* IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J Immunol.* 2010; 185: 4354–4362. doi: [10.4049/jimmunol.1000313](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000313) PMID: [20833839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833839/)
41. Tortola L, Rosenwald E, Abel B, Blumberg H, Schafer M, *et al.* Psoriasiform dermatitis is driven by IL36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J Clin Invest.* 2012; 122: 3965–3976. doi: [10.1172/JCI63451](https://doi.org/10.1172/JCI63451) PMID: [23064362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23064362/)
42. Olleros ML, Vesin D, Lambou AF, Janssens JP, Ryffel B, *et al.* Dominant-negative tumor necrosis factor protects from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG) and endotoxin-induced liver injury without compromising host immunity to BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1053–1063. doi: [10.1086/597204](https://doi.org/10.1086/597204) PMID: [19222369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19222369/)
43. Dietrich D, Gabay C. Inflammation: IL-36 has proinflammatory effects in skin but not in joints. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10: 639–640. doi: [10.1038/nrrheum.2014.156](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.156) PMID: [25201385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25201385/)



## II. Rôle de la voie TNF/TNFR1 dans la réponse de l'hôte à la tuberculose

### A. Etude du TNFR1 myéloïde, lymphoïde et stromal après infection par *M. tuberculosis*

#### **Article 2: Innate myeloid cell TNFR1 mediated response as a first line defense against primary *Mycobacterium tuberculosis* infection**

**Noria Segueni**, Stéphanie Rose, Sulayman Benmerzoug, Amandine Gautier, Marie-Laure Bourigault, François Erard, Marc Le Bert, Hélène Bouscayrol, Thierry Wachter, Irène Garcia, George Kollias, Muazzam Jacobs, Bernhard Ryffel and Valerie F.J. Quesniaux.

Un système immunitaire compétent est efficace pour contrôler une infection par *M. tuberculosis* malgré une clairance bactérienne généralement non totale. Ceci aboutit à un état de latence de la pathologie qui peut durer plusieurs années (Dye and Williams, 2010), et qui est maintenu par un contrôle actif des cellules de l'immunité innée et adaptative. De nombreux cas de réactivation de tuberculose latente ont été rapportés suite à une immunodépression survenue au cours de la vie de patients. Les causes de cette immunodépression peuvent être variables, notamment l'utilisation de traitements anti-inflammatoires, ciblant typiquement le TNF (Keane, 2005; Keane *et al.*, 2001; Mohan *et al.*, 2004). Il est donc essentiel de mieux comprendre les différentes voies de signalisation centrales dans l'établissement et le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* afin de non seulement identifier les traitements potentiellement dangereux dans le cas de tuberculoses latentes, mais aussi de peut-être mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

La voie TNF/TNFR1 a été largement étudiée depuis plusieurs dizaines d'années dans la réponse de l'hôte à la tuberculose en utilisant des souris invalidées pour le TNF ou pour son récepteur. L'infection par *M. tuberculosis* n'est pas contrôlée par des souris déficientes en TNF ou TNFR1, et conduit à une inflammation excessive, une destruction tissulaire et une charge bactérienne très élevée (Flynn *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2000c). Les perturbations moléculaires suite à la déplétion de TNF avant ou au cours d'une infection par *M. tuberculosis* sont extrêmement nombreuses et il est difficile de démêler quelles sont les causes et les conséquences.

Dans le but de mieux comprendre dans quelle mesure le TNF est crucial pour la réponse de l'hôte, nous avons utilisé dans une précédente étude des animaux déficients pour le TNF uniquement dans des populations cellulaires spécifiques (Allie *et al.*, 2013). Ceci nous a permis de déterminer que le TNF issu par les cellules myéloïdes est important pour contrôler la charge bactérienne en phase précoce d'infection. En revanche, il est indispensable d'avoir du TNF produit par les lymphocytes T pour pouvoir contrôler l'infection en phase chronique.

Dans ce présent travail, nous avons évalué quel type de population cellulaire est important pour la réponse au TNF et donc pour l'orchestration de toute la réponse immunitaire de l'hôte. Nous avons pour cela utilisé des chimères possédant le TNFR1 uniquement au niveau des cellules hématopoïétiques ou au niveau des cellules radio-résistantes/stromales, qui nous ont permis de mettre en évidence que ce sont les cellules hématopoïétiques qui sont essentielles à la réponse au TNF pour un bon contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*.

Pour affiner cette étude, nous avons créé des animaux déficients pour le TNFR1 uniquement au sein des cellules myéloïdes ou des cellules lymphoïdes. Ainsi, nous mettons en évidence dans cette étude que la réponse au TNF des cellules myéloïdes est cruciale pour le contrôle de l'infection, alors que la déficience en TNFR1 des lymphocytes T n'induit aucune susceptibilité à *M. tuberculosis* jusqu'à 200 jours après infection. De manière intéressante, l'absence du TNFR1 sur les cellules myéloïdes suffit pour récapituler le phénotype observé chez les souris TNFR1<sup>-/-</sup> avec une forte inflammation pulmonaire et une charge bactérienne importante, conduisant à une mortalité en 4-5 semaines après infection. D'autre part, les souris déplétées pour le TNFR1 sur les cellules myéloïdes présentent une infiltration neutrophilique importante source de taux élevés d'IL-12 dans les poumons. Cette surproduction d'IL-12 n'est cependant pas suffisante pour contrôler l'infection de manière efficace.

Cette étude démontre donc l'importance de la voie TNF/TNFR1 au sein des cellules myéloïdes et donc de l'immunité innée dans la réponse de l'hôte à la tuberculose. De plus, ces travaux suggèrent que la réactivation de la tuberculose latente suite à la neutralisation de TNF chez des patients est due à l'absence de signalisation du TNF sur les cellules myéloïdes, et non à un défaut de la réponse immunitaire adaptative. Nos travaux apportent donc de nouveaux éléments dans la compréhension de l'organisation de la réponse immunitaire à la tuberculose, notamment au niveau de la voie cruciale qu'est la signalisation TNF.

L'article présenté ici est en cours de soumission.



# **Innate myeloid cell TNFR1 mediated response as a first line defence against primary *Mycobacterium tuberculosis* infection.**

Noria Segueni<sup>1,2</sup>, Stéphanie Rose<sup>1,2</sup>, Sulayman Benmerzoug<sup>1,2</sup>, Amandine Gautier<sup>1,2</sup>, Marie-Laure Bourigault<sup>1,2</sup>, François Erard<sup>1,2</sup>, Marc Le Bert<sup>1,2</sup>, Hélène Bouscayrol<sup>3</sup>, Thierry Wachter<sup>3</sup>, Irène Garcia<sup>4</sup>, George Kollias<sup>5</sup>, Muazzam Jacobs<sup>6,7</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1,2</sup> and Valerie F.J. Quesniaux<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR7355, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Orleans, France

<sup>2</sup> University of Orleans-Tours, France

<sup>3</sup> Oncology–radiotherapy Department, Regional Hospital, Orleans, France

<sup>4</sup> Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland

<sup>5</sup> Institute for Immunology, Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming”, Vari, Greece

<sup>6</sup> Division of Immunology, Department of Pathology and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Health Sciences Faculty, University of Cape Town, South Africa

<sup>7</sup> National Health Laboratory Service, South Africa

Running title: TNFR1 from myeloid cells in mycobacterial infections

\*Corresponding author:

Valerie Quesniaux

Tel : +33 2 38 25 54 39 Fax : +33 2 38 25 79 79

e-mail: [quesniaux@cnrs-orleans.fr](mailto:quesniaux@cnrs-orleans.fr)

Conflict of interest statement:

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## Abstract

TNF is crucial for controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection and understanding its modes of action may allow immunomodulation of the host response. TNFR1 conveys essential signals for this control. Here we assessed the role of TNFR1 from innate myeloid versus T-cell origin in the control of *M. tuberculosis*. A prominent role of TNFR1 pathway in haematopoietic cells, versus radioresistant parenchymal cells, for controlling *M. tuberculosis* infection was first established in TNFR1 KO chimera mice. Using cell-specific deficient mice we show that absence of TNFR1 specifically on myeloid cells (M-TNFR1 KO) recapitulates the uncontrolled *M. tuberculosis* infection seen in fully TNFR1 deficient mice, with increased bacterial burden, exacerbated lung inflammation, and rapid death. Pulmonary IL-12p40 over-expression in infected M-TNFR1 KO mice was attributed to a prominent CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>high</sup> cell population in their lung. By contrast, absence of TNFR1 on T-cells (T-TNFR1 KO) did not compromise the control of *M. tuberculosis* infection over 6-months, with restrained bacterial burden and lung inflammation, in conditions where M-TNFR1, TNFR1 or TNF KO mice succumbed rapidly.

Thus, the protective TNF/TNFR1 pathway essential for controlling acute *M. tuberculosis* infection depends on innate macrophage and neutrophil myeloid cells, while TNFR1 pathway in T cells is dispensable at that stage.

## Introduction

Tumor necrosis factor alpha (TNF) is recognized as a major player in the host response to *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB). TB is still a major health problem, reemerging in developed countries, with new resistant strains increasing the threat (1). From the estimated one-third of the global population considered to be infected, 5% to 10% will develop an active disease, indicating that a robust host immune system can efficiently control the infection, although mycobacteria remain present in a latent form for years (2, 3). In that respect, immunomodulating the endogenous host defences may represent an interesting avenue to increase the arsenal against increasingly drug resistant *M. tuberculosis* infection. Coordinated innate and adaptive immune responses including T cells, macrophages, and the expression of mediators such as IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1, IL-12p40, nitric oxide, reactive oxygen and nitrogen intermediates, are required to efficiently control *M. tuberculosis* infection (4-9).

Immunodepression of the host such as CD4 T cell depletion during HIV co-infection can favour TB reactivation, and neutralization of TNF for the treatment of severe inflammatory diseases has been associated with reactivation of latent TB and increased susceptibility to primary TB infection (10-14). Although poor health status and immune defences are recognized risk factors, the relative contribution of host innate versus adaptive immune responses for protection against primary tuberculosis infection remains poorly defined. The pivotal role of TNF, which is expressed and signals in both innate and adaptive immune cells, in these responses, deserves further attention.

TNF derived from hematopoietic cells rather than from stromal origin is essential for a normal host response to *M. bovis* BCG (15) and we showed recently that myeloid and T-cells are the primary sources of TNF for host control of *M. tuberculosis*, TNF from myeloid cells being implicated in the early immune response while T-cell derived TNF was essential to sustain protection during chronic infection (16).

TNF homotrimers, in membrane-bound or soluble forms, signal through TNF receptors TNFRp55 (TNFR1) and TNFRp75 (TNFR2), membrane bound TNF preferentially signalling through TNFR2, and soluble TNF through TNFR1 (17, 18). In addition, homotrimeric lymphotoxin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) also signals through TNFR1 and TNFR2. LT $\alpha$  was found to be dispensable for host control of acute *M. tuberculosis* infection using “neo-free” LT $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice with unperturbed TNF expression, although LT $\alpha$  might contribute to control chronic infection (19). Membrane expressed TNF allowed cell-cell signalling and control of acute *M. tuberculosis* infection although long-term infection control additionally required soluble TNF (20). The partial protection conferred by membrane TNF was attributed to signalling through TNFR2 (21).

TNFR1 was long recognized as essential for mounting the host response to *M. tuberculosis* (22), while TNFR2 down-modulates protective immune function, through shedding and neutralisation of bioactive TNF (23). TNFR1 expression is ubiquitous, allowing for some autocrine effects on macrophages or T cells for instance, or paradoxical anti-inflammatory effects on IL-12p40 expression in macrophages and dendritic cells (24). Here, we asked whether TNFR1 mediated response in innate myeloid cells, versus lymphoid or parenchymal, non-hematopoietic radioresistant cells is critical for the host control of *M. tuberculosis* infection.

To address the relative contribution of TNFR1 from different cell origins in the dramatic impairment of host response to acute *M. tuberculosis* infection seen in the absence of TNFR1, we investigated side by side mice deficient for TNFR1 expression in different cell populations and compared them to the highly susceptible TNF deficient mice in an acute model of aerogenic *M. tuberculosis* infection.

## Results

### *TNFR1 expressed on hematopoietic cells confers resistance to M. tuberculosis infection*

TNFR1 deficient mice are extremely sensitive to virulent *M. tuberculosis* H37Rv infection (22, 23), similar to TNF deficient mice (25, 26), and we showed recently that TNF from myeloid cells origin is important for the early control of mycobacteria while TNF from T cell origin is essential for the long-term control of *M. tuberculosis* infection (16). To assess the relative contribution of TNFR1 from hematopoietic versus stromal cell origins for the host control of *M. tuberculosis* infection, we first created chimeric mice deficient for TNFR1 on different cell compartments. TNFR1 deficient and WT mice were lethally irradiated and reconstituted with bone-marrow cells (BM) from either TNFR1 KO or WT mice. After 8 weeks to allow for hematopoietic reconstitution, mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv (1000±200 CFU, i.n.). TNFR1 KO mice reconstituted with TNFR1 KO BM cells (TNFR1 KO BM =>TNFR1 KO) were extremely susceptible to infection, they lost weight rapidly and had to be terminated at day 30 post-infection (Figure 1A). Interestingly, TNFR1 KO BM cells transferred the sensitive phenotype to WT mice (TNFR1 KO BM =>WT). Conversely, the sensitive phenotype of TNFR1 deficient mice was significantly corrected after reconstitution with WT BM (WT BM =>TNFR1 KO). Indeed, lung bacterial load and lung weight as indicator of pulmonary inflammation were significantly increased in mice reconstituted with TNFR1 KO BM, as compared to WT BM, irrespective of the genotype of the recipient (Figure 1B, C), while transfer of WT BM to TNFR1 KO mice restored the phenotype with no significant difference as compared to WT BM=>WT control mice. Free alveolar space, lung cell infiltration, necrosis and oedema were assessed histologically. Absence of TNFR1 on hematopoietic cells resulted in a reduced alveolar space associated with an increased infiltration of inflammatory cells in the lungs, large necrotic areas within granulomatous structures and oedema in the lung tissue (Figure 1D, E). On the contrary, TNFR1 KO mice reconstituted

with WT BM showed no significant difference in lung pathophysiology as compared to WT BM=>WT controls.

Thus, TNFR1 expressed on hematopoietic cells, and not on radio-resistant, parenchymal cells is central for the control of *M. tuberculosis* infection.

### ***Response to mycobacteria in myeloid cells deficient for TNFR1 expression***

We next assessed the relative contribution of the different hematopoietic cell populations to the TNFR1 mediated immune response to *M. tuberculosis* infection. To investigate the cell-specific requirement of p55 TNFR1 in TNF-mediated response to mycobacteria we first intercrossed *Tnfrsf1α* conditional knockout mice (*Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup>*), generated as described (27), to *LysM-Cre* mice, leading to p55 TNFR1 inactivation in myeloid cells (*Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>cre/wt</sup>*, M-TNFR1 KO). The lack of TNFR1 expression on bone marrow-derived macrophages from these mice was verified by flow cytometry. As expected, CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> macrophages from C57BL/6 or from control *Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>wt/wt</sup>* mice expressed TNFR1 on their surface while TNFR1 expression was absent in macrophages from M-TNFR1 KO (*Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>cre/wt</sup>*) or full TNFR1 KO mice (Figure S1A). The absence of TNFR1 expression on granulocytic CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> cells and monocytic CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells (Figure S1B, C), as compared to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure S1D), was also verified ex vivo in splenic cells from systemically infected M-TNFR1 deficient mice that exhibited increased sensitivity to *M. bovis* BCG infection (data not shown).

Bone marrow derived macrophages from mice fully deficient for TNFR1, or for TNFR1 only on myeloid cells were stimulated with *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* BCG in vitro and their ability to secrete inflammatory cytokines determined. IL-12 p40, TNF, as well as CXCL1/KC release induced by LPS or mycobacteria was independent of the presence of TNFR1 (Figure S1E). Therefore, the absence of TNFR1 did not compromise the macrophages inflammatory response in terms of IL-12p40, TNF or KC release.

As a functional assay for TNFR1 activity we next looked at NO release by macrophages in response to TNF. As expected, NO release in response to LPS was strongly reduced in the absence of TNFR1 in macrophages from M-TNFR1 KO or complete TNFR1 KO mice, or in the absence of TNF itself in TNF KO macrophages, which could be restored by supplementation with TNF in the latter cultures (Figure S1F).

Thus, the absence of TNFR1 signalling did not compromise macrophage inflammatory responses to mycobacteria in terms of IL-12 p40, TNF, as well as KC release, although it impaired NO release, a known mycobactericidal effector.

### ***Lethal M. tuberculosis infection in the absence of TNFR1 on myeloid cells***

To determine the role of myeloid TNFR1 on host control of tuberculosis *in vivo*, we next infected TNF-, TNFR1- or M-TNFR1 KO mice with *M. tuberculosis* and compared outcomes with WT control mice. Mice deficient for TNFR1 on myeloid cells rapidly lost weight and succumbed by day 35 after infection with *M. tuberculosis* H37Rv, similar to fully deficient TNFR1 KO mice, while wild-type controls survived the acute phase of infection, and fully TNF deficient mice succumbed even earlier by day 28 (Figure 2A,B). Impairment in TNF or the TNFR1 pathway led to increased bacterial loads in these animals. Mice fully deficient for TNFR1 or myeloid cell specific M-TNFR1 KO mice exhibited significant increase in pulmonary bacterial loads already on day 21, similar to TNF deficient mice (Figure 2C), with high bacterial burdens (over 2 log<sub>10</sub> increase) on day 28 or 35 (Figure 2D, E). Although complete absence of TNF seemed most drastic on day 28, shortly before the mice succumbed, absence of TNFR1 restricted to myeloid cells in M-TNFR1 KO mice yielded a similar defective bacterial control as the complete absence of TNFR1. TNF and TNFR1 deficient mice exhibited strongly increased lung weights, an indicator of lung inflammation, 4 to 5 weeks post-infection (Figure 2F-H). TNFR1 deficiency restricted to myeloid cells mice recapitulated the increased lung inflammation in M-TNFR1 KO at this stage and was already detectable at 3 weeks post-infection (Figure 2F).

Therefore, mice deficient for TNFR1 on myeloid cells are unable to control *M. tuberculosis* infection and develop a rapid, exacerbated lung inflammation, similar to complete TNFR1 deficient mice.

***Absence of TNFR1 on myeloid cells recapitulates the exacerbated lung pathology seen after M. tuberculosis infection in complete absence of the TNFR1 pathway***

Granuloma formation is the result of a structured cell mediated immune response and is associated with efficient containment of *M. tuberculosis* growth. The increased lung inflammation in mice lacking the TNF or TNFR1 pathway prompted us to address the contribution of TNFR1 of myeloid origin in granuloma formation upon *M. tuberculosis* infection. The lungs of TNF deficient mice showed many large confluent nodules at day 28 post infection, which were more discrete in M-TNFR1 KO or in mice fully deficient for TNFR1 and even less in wild-type controls (Figure 3A). Microscopically, the phenotype of M-TNFR1 KO lungs was visible already at day 21 and developed similarly to that of complete TNFR1 deficient mice, displaying a distinct inflammation with partial reduction of ventilated alveolar spaces, mononuclear cell and neutrophil infiltrations and larger granuloma-type structures than wild-type controls at 28 days post *M. tuberculosis* infection (Figure 3B, C). TNF deficient mice revealed with large granulomatous/inflammatory formations already on day 21, and developed extensive confluent necrosis and oedema by day 28, in the absence of proper granuloma formation. Mycobacteria were visible in the lung of in TNFR1 and M-TNFR1 KO mice at that stage, which were more pronounced than in wild-type mice but less than in those seen within macrophages and in the necrotic area in TNF KO mice (Figure 3D).

M-TNFR1 KO and TNFR1 KO mice displayed 55-57% free alveolar space at 4 weeks and reached 33-41% at 5 weeks post-infection, while WT mice remained above 76% free alveolar space at these time points (Figure 3E). TNF KO mice were down to 40% free alveolar space at 4 weeks post-infection, when they had to be terminated. Cell infiltration, necrosis and oedema were



strongly elevated in M-TNFR1 KO and TNFR1 KO mice at 21-35 days after infection, with a slightly stronger phenotype in M-TNFR1 KO on day 21, similar to TNF KO mice, which however progressed to further inflammation by day 28, while WT controlled inflammatory cell infiltration (Figure 3F).

Thus, the lung lesions observed in the absence of TNFR1 in myeloid cells were similar to those seen in mice completely deficient for TNFR1, suggesting that the contribution of other cells beside myeloid cells to these TNF-induced response is limited, but also that inflammatory myeloid cells do not need to respond to TNF to contribute to lung inflammation.

***Regulation of pulmonary cytokine expression in the absence of myeloid cell TNFR1 pathway after M. tuberculosis infection.***

As bacilli growth and pulmonary inflammation in myeloid cell-TNFR1 deficient mice was accompanied by increased inflammatory cell infiltration, we next assessed the expression of cytokines involved in innate and adaptive immune responses in these mice. Lung IFN $\gamma$  levels were increased in M-TNFR1 KO mice already at 3 weeks post infection, and further elevated in mice deficient for TNFR1 completely or only on myeloid cells at 4 to 5 weeks after *M. tuberculosis* infection susceptible, as well as in TNF deficient mice at 4 weeks when they succumb to the infection (Figure 4A). IL-12p40 levels were increased in M-TNFR1 KO mice already at 3 and 4 weeks post infection and remained elevated at 5 weeks, a time point when complete TNFR1 KO also exhibited slightly elevated IL-12p40 (Figure 4B), while they were essentially normal in TNF deficient mice at 3-4 weeks. IL-23 p19 pulmonary levels were reduced at 5 weeks in TNFR1 KO and M-TNFR1 KO, as compared to wild-type controls (Figure 4C), reminiscent of TNF-deficient mice at 4 weeks of *M. tuberculosis* infection (28). IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  pulmonary levels were elevated in TNF-deficient mice at 4 weeks of *M. tuberculosis* infection, and were also elevated in M-TNFR1 KO and TNFR1 KO mice as compared to wild-type control, already at 4 weeks for IL-1 $\beta$ , and at 5 weeks post infection for IL-1 $\alpha$  (Figure 4D, E). TNF pulmonary levels were rather

modest, as shown previously (26) and were not affected by the absence of TNFR1 (data not shown). KC levels were increased in M-TNFR1 KO already at 3-5 weeks post infection, while this was most prominent at 4 weeks for TNFR1 KO and TNF deficient mice (Figure 4F). Interestingly, KC and IL-1 $\beta$  levels were elevated in M-TNFR1 KO mice already at 3 weeks post infection, like IFN $\gamma$  and IL-12p40, indicative of an earlier onset of lung inflammation in these mice.

Therefore, absence of TNFR1 on myeloid cells recapitulates what is seen in complete absence of TNFR1, contributing to the increased pulmonary levels of IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and KC but decreased IL-23 p19 expression during uncontrolled *M. tuberculosis* infection in the absence of TNF. However, myeloid TNFR1 expression seems to contribute to regulate lung IL-12p40 expression after *M. tuberculosis* infection and deletion of TNFR1 in myeloid cells led to earlier inflammation not only histopathologically but also at the molecular level, most notably by higher IL-12p40 pulmonary levels.

#### ***TNFR1-dependent control of granulocytes, the major cellular source of IL-12p40 in the lung after M. tuberculosis infection***

We next characterized TNFR1-dependent recruitment of inflammatory cells in the lung after *M. tuberculosis* infection. Lung cells from TNF-, TNFR1-, or M-TNFR1-deficient mice and wild-type controls were analysed by flow cytometry 28 days after infection, at a time when they display inflamed lung (Figure 2G). M-TNFR1 KO mice showed a higher proportion of pulmonary CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>high</sup> cells as compared to WT mice while they were essentially absent in TNF KO mice (Figure 5A, B). CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells were Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>, indicating that this population is mostly composed of granulocytes (data not shown). CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>low</sup> cell population was increased (Figure 5B) and CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> T cells slightly reduced in TNF KO mice (Figure 5C, D), while the proportion of these cells were unaffected by the absence of TNFR1. The increased granulocyte population in the lung of M-TNFR1 KO mice was accompanied by an early over-

expression of CXCL1 (Figure 4F) and of its receptor CXCR2 at day 21 (Figure 5E), that culminated at 4 weeks in TNFR1 KO mice (not shown).

M-TNFR1 KO mice displayed significantly higher levels of IL-12p40 in the lungs after infection (Figure 4B) and we next characterised IL-12p40 cellular sources. Chimeric, bone marrow reconstituted TNFR1 KO mice revealed that IL-12p40 producing cells are of hematopoietic donor origin (Figure S2A, B). Further, we show that IL-12p40 expression was highest in CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells as compared to CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> or CD3<sup>+</sup> cells (Figure 6A, B). However IL-12p40 MFI was reduced in CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells from M-TNFR1 KO and TNFR1 KO mice as compared to WT type mice (Figure 6C), indicating that lung IL-12p40 overexpression resulted from an increased number of IL-12 producing cells, rather than from a higher IL-12p40 expression per cell. Indeed, primary neutrophils release IL-12p40 in response to inflammatory stimulation in vitro (Figure S3A). After systemic *M. bovis* BCG infection, granulocytic CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>Gr1<sup>+</sup> cells were the major splenic population internalizing BCG-GFP (Figure S3B, C) and were also the major cellular source of IL-12p40 (Figure S4A, B, C).

Thus, cell-specific deletion of TNFR1 leads to an increase in pulmonary granulocyte population, the major cellular source of IL-12p40 after mycobacterial infection; IL-12p40 expression being partially dependent on the TNFR1 pathway, the high IL-12p40 levels can be attributed to the increased neutrophil population in the lung of M-TNFR1 KO mice.

### ***T-cell TNFR1 pathway is dispensable for the control of M. tuberculosis infection***

TNF from T cell origin is essential for the long-term control of *M. tuberculosis* infection while TNF from myeloid origin is important for the early control of mycobacteria burden (16), in line with the role of adaptive CD4<sup>+</sup> T cell response in controlling chronic infection. We next assessed the contribution of TNFR1 pathway in T cells during *M. tuberculosis* infection. Mice deficient for TNFR1 on T cells were obtained by intercrossing *Tnfrsf1α* conditional knockout mice (*Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup>*) (27) to CD4-Cre transgenic mice, leading to p55 TNFR1 inactivation in all T cells

(*Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>cre</sup>*, T-TNFR1 KO). Mice deficient for TNFR1 on T cells survived *M. tuberculosis* infection for up to 200 days, the duration of the experiment, while M-TNFR1 KO and complete TNFR1 KO mice rapidly lost weight and succumbed by day 35 after infection (Figure 7A, B). Indeed, T-TNFR1 KO mice displayed a similar bacterial load as compared to WT mice 5 weeks post-infection while myeloid cell specific M-TNFR1 deficient and fully TNFR1KO mice exhibited 2-3log<sub>10</sub> increased pulmonary bacterial loads (Figure 7C). Lung bacterial load in T-TNFR1 KO was similar to that of wild-type mice at 200 days post-infection (Figure 7D). Absence of TNFR1 on T cells was verified *ex vivo* in the lung of *M.tuberculosis* infected T-TNFR1 KO mice (Figure S5A, B). Lung inflammation was not augmented in T-TNFR1 KO as compared to wild-type mice, while M-TNFR1 KO and complete TNFR1 KO mice exhibited strongly increased lung weights 5 weeks post-infection (Figure 7E). Lung inflammation in T-TNFR1 KO remained similar to that of wild-type controls at 200 days post infection (Figure 7F). T-TNFR1 KO and WT mice displayed a controlled cell infiltration and limited tissue damages 35 days after *M.tuberculosis* infection (Figure 8A) while large necrosis area and granuloma structures were present in M-TNFR1 KO and TNFR1 KO mice, as expected. Indeed, T-TNFR1 KO mice were similar to WT mice with about 70% of free alveolar space, limited cell infiltration and almost no necrosis and oedema (Figure 8B) while M-TNFR1- and TNFR1 deficient mice exhibited strongly decreased free alveolar space, with higher cell infiltration, necrosis and oedema. We next addressed pulmonary inflammation at the molecular level. IFN $\gamma$  levels were similar in T-TNFR1 KO and WT mice, although they were highly elevated in the lungs of M-TNFR1 KO mice, 5 weeks after infection (Figure 8C). Lung IFN $\gamma$  expression was associated with TCR $\alpha\beta$ CD4<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> cells and was clearly increased in M-TNFR1 KO, TNFR1 KO and TNF KO at day 28, when inflammation is maximal (Figure S6A, B, D). The proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NK cells were not significantly modified in deficient mice (Figure S6C). Interestingly, IFN $\gamma$  expression was not affected in T-TNFR1 deficient mice, indicating that IFN $\gamma$  release was

independent of TNF/TNFR1 response in T cells (Figure S6B, D). IL-12p40, IL-1 $\beta$  and KC pulmonary levels were not increased in T-TNFR1 KO mice (Figure 8D, E, F).

Therefore, mice deficient for TNFR1 on T cells control *M. tuberculosis* infection, in contrast to mice deficient for TNFR1 on myeloid cells or complete TNFR1 deficient mice that succumb rapidly with highly inflamed lungs, indicating that TNFR1 signalling in T cells is dispensable to mount an effective control of primary *M. tuberculosis* infection.

## Discussion

TNF is central to control tuberculosis and it is of utmost importance to understand how this occurs (29, 30). Indeed, at a time when new drug-resistant TB spreads (1) developing adjunct host-directed therapies modulating the immune response of the host represents an interesting avenue to fight increasingly drug resistant *M. tuberculosis* infection (31). Treating severe inflammatory diseases with anti TNF antibodies may compromise host control of TB in patients (10-13), as they do in mice (22). The role of TNF in granuloma formation and maintenance stimulated experimental host directed adjunctive therapies, and TNF neutralization combined with chemotherapy was shown to enhance *M. tuberculosis* bacterial clearance (32, 33). Deeper understanding of the multiple facets of TNF mediated TB control may lead to novel approaches of host-directed therapies. Beyond TNF neutralisation, antibody-mediated cell lysis contributes to the mode of action of anti TNF antibodies like Infliximab (34, 35). Complete TNF genetic deletion recapitulates the sensitivity to *M. tuberculosis* infection but does not allow to separate the role of TNF in early events of innate immunity versus downstream adaptive responses or contribution from different cell populations. Inducible TNF deletion during established *M. tuberculosis* infection compromised the control of established *M. tuberculosis* infection (VQ, BR, SR unpublished data). Further, huTNF KI mice expressing human TNF in place of murine TNF control *M. tuberculosis* infection (36), pointing to the role of TNFR1 in this response (22). The main sources of TNF involved in host control of *M. tuberculosis* are of hematopoietic origin, TNF from myeloid cells being involved in the early control of acute infection while T-cell derived TNF contributes to long-term protection during chronic infection (16). Since TNFR1 may have autocrine effects, in macrophages or T cells for instance, we addressed the role of TNFR1 from myeloid cells, versus lymphoid cells or parenchyma, non-hematopoietic cells for the host control of *M. tuberculosis* infection. Mice deficient in TNFR1 on myeloid cells recapitulated the dramatic impairment of host response to acute *M. tuberculosis* infection seen in the complete absence of TNFR1, whereas absence of TNFR1 on T-cells or on radio-resistant, parenchymal cells did not

affect the outcome of the infection. Thus, using cell-specific deficient mice we demonstrate here for the first time that absence of TNFR1 on macrophages and neutrophils is responsible for the uncontrolled infection seen in complete TNFR1 deficient mice. This suggests a crucial role of innate myeloid cells in terms of both secretion (16) and response to TNF in the early steps of infection, while T-cells are less involved in the early TNFR1 mediated response to TNF after *M. tuberculosis* infection.

TNFR1 expression is ubiquitous, except for erythrocytes, while TNFR2 expression is restricted to hematopoietic and endothelial cells. Both TNFR1 and TNFR2 are expressed as membrane receptors but also as shed, soluble molecules able to neutralize TNF (37) or to stabilize it at low concentrations (38). We showed recently that sTNFR2, through TNF neutralization, down-modulates IL-12p40 expression after *M.tuberculosis* infection, both in vivo and in vitro in dendritic cells (23). The expression of both sTNFR1 and sTNFR2 has been documented in serum after *M. bovis* BCG infection (39) and in the lung of *M. tuberculosis* infected mice (23). In TNFR1 or TNFR2 deficient mice, beyond the absence of TNF/TNFR mediated signalling pathway, the neutralization of TNF by the corresponding shed, soluble TNFR is also missing. Here, M-TNFR1 KO mice still have a functional TNFR1 pathway in lymphoid, endothelial and epithelial cells with associated release of sTNFR1. Indeed, the levels of pulmonary sTNFR1 were barely affected in M-TNFR1 KO mice and there was no impact of the absence of TNF or TNFR1 on pulmonary sTNFR2 levels (data not shown), indicating that the bioavailability of TNF should be preserved in these mice.

Interestingly, the pulmonary inflammation manifested earlier and stronger in M-TNFR1 KO mice as compared with complete TNFR1 KO. The levels of IFN $\gamma$ , IL-12/IL-23 p40, IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC as well as the expression of CXCR2 were increased in the lung of M-TNFR1 KO as compared with TNFR1 KO 3 weeks post-infection, and further increased in both groups at 4-5 weeks. In

particular, there was an early and persistent IL-12p40 over-expression in M-TNFR1 KO mice after *M. tuberculosis* infection, both at the mRNA (not shown) and protein levels. Exacerbations of autoimmune diseases under anti TNF therapy was attributed to anti-inflammatory effects of TNF linked to the inhibition of IL-12p40 and IL-23 via TNFR1 on macrophages and dendritic cells (24). We also report an increased expression of IL-12p40 in CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> cells from TNF deficient mice, in line with the inhibition of IL-12p40 by TNF in macrophages (40). Here, we hypothesized that neutrophils were the source of IL-12p40 seen in M-TNFR1 KO. Indeed, IL-12p40 over-expression was associated with an increased population of granulocytic cells, the majority of IL-12 producing cells being F4/80<sup>-</sup>Gr1<sup>+</sup>. Neutrophils are recruited already 1 week post-infection and are most potent to phagocytose mycobacteria, as seen here by BCG-GFP internalisation after systemic infection. Ly6G<sup>+</sup> granulocytic cells produced more IL-12p40 than F4/80<sup>+</sup> macrophages, CD8<sup>+</sup> T cells or B cells, with 5-10-fold higher MFI. IL-12p40 production by Gr1<sup>high</sup> granulocytic cells was largely dependent on the expression of TNFR1 in these cells, but the increased neutrophil compartment in *M. tuberculosis* infected M-TNFR1 KO mice compensated for the decreased IL-12p40 secretion per cell. The roles of neutrophils in tuberculosis are multifold and potentially conflicting, from mycobacteria killing to bacilli dissemination and adaptive response trigger (41). The increased inflammation seen in M-TNFR1 KO mice 3 weeks after infection coincides with activation and arrival of T-cells in the lungs (42). Triggering of TNFR1 pathway can lead to either NFκB activation or cell death such as apoptosis or necroptosis (43). Thus, in the absence of TNFR1 on myeloid cells, macrophages and neutrophils should not undergo TNFR1-mediated cell death, leading to an increased number of neutrophils in the lungs and an earlier lung inflammation, as seen here in M-TNFR1 KO mice. Uptake of *M. tuberculosis* infected apoptotic neutrophils by dendritic cells has been reported to contribute to their efficient migration to the local lymph nodes and to the activation of Ag-specific CD4 T cells (42). Conversely, inhibition of neutrophil apoptosis may contribute to the virulence of *M. tuberculosis*, delaying CD4 T cell activation (44). We therefore propose that TNF, through the TNFR1 pathway



in innate myeloid cells, keeps the neutrophil population under control by inducing apoptosis of infected neutrophils that indirectly trigger dendritic cells and adaptive T-cell response. Crosstalks between neutrophils and T cells continue to be unravelled, as shown by the recent report of migrating neutrophils leaving behind fragments of their elongated uropods enriched in CXCL12, a potent T-cell chemoattractant (45). The fact that neutrophils are the major cellular source of IL-12p40 in the lungs could also contribute to their facilitation of CD4<sup>+</sup> T cells activation by dendritic cells during *M. tuberculosis* infection (46). Indeed, the TNF/TNFR1 pathway contributed to trigger IL-12p40 expression by granulocytes. Nevertheless, the higher levels of IL-12p40 associated to the expanded neutrophil population in the lungs of M-TNFR1 KO were not sufficient to control the infection and were not correlated with higher numbers of pulmonary Th1 cells as compared to complete TNFR1 KO mice 4 weeks post-infection (Figure S4). The increased expression of arginase 1 in the lungs of *M. tuberculosis* infected TNFR1 KO or M-TNFR1 KO (data not shown) may contribute to restrain T cell proliferation (47). Thus innate cells are critically involved in the response to *M. tuberculosis* in the acute phase, and Th1 cells are not sufficient to control the infection in absence of myeloid TNFR1 signalling. Indeed, absence of TNFR1 on T-cells did not compromise the control of *M. tuberculosis* infection over 6 months, and did not lead to exacerbation of lung inflammation, cytokine or chemokine release. Thus, absence of TNFR1 on macrophages and neutrophils, and not on T-cells, is responsible for the uncontrolled infection seen in complete TNFR1 deficient mice. A detrimental role of neutrophils in tuberculosis has been proposed (48) and our data demonstrate the critical role of TNFR1 pathway in keeping the neutrophil population under control, neutrophil apoptosis being central to mount an efficient adaptive T cell response to *M. tuberculosis*.

In conclusion, the protective TNF/TNFR1 pathway essential for controlling acute primary *M. tuberculosis* infection depends on innate myeloid cells such as macrophages and neutrophils, while the TNFR1 pathway in T cells is dispensable at that stage. This suggests a crucial role of

innate myeloid cells in terms of both secretion and response to TNF in the early steps of infection, while T-cells are less involved in the early TNFR1 mediated response to TNF after *M. tuberculosis* infection.

In autoimmune diseases responding to TNF neutralisation, sparing TNF/TNFR1 pathway on myeloid cells, through anti TNF T-cell targeted bi-specific antibodies for instance, might be beneficial to neutralise TNF without compromising host response to TB infection. Conversely, adjunct therapies to optimize host defence to TB through host-directed immunomodulation strategies should not be restricted to the adaptive response, and targeting the early myeloid innate immune response might represent an interesting option to boost the first steps of host response to *M. tuberculosis*.

## Materials and Methods

### *Mice*

Tnfrsf1 $\alpha$  conditional knockout mice (*Tnfrsf1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>*; see Ref (27) for generation and initial characterization) were crossed to *LysM-Cre* or *CD4-Cre* strains to obtain p55 TNFR1 inactivation in myeloid cells (M-TNFR1 KO, *Tnfrsf1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> LysM<sup>cre/wt</sup>*), or T lymphocytes (T-TNFR1 KO, *Tnfrsf1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> CD4<sup>cre</sup>*) respectively. All mice, including also mice fully deficient for TNFR1 (49) or TNF (50) were backcrossed at least 8-10 times on C57BL/6 genetic background and were bred in the Transgenose Institute animal facility (CNRS UPS44, Orleans). C57BL/6 or *Tnfrsf1 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> LysM<sup>wt/wt</sup>* mice were used as wild-type controls with similar results. For experiments, adult (8-12 week old) animals were kept in isolators in a biohazard animal unit. The infected mice were monitored every day for clinical status and weighed twice weekly.

### *Infection*

Aliquots of *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) kept frozen at -80°C were thawed, diluted in sterile saline containing 0.05% Tween 20 and clumping was disrupted by 30 repeated aspirations through a 26 gauge needle (Omnican, Braun, Germany). Pulmonary infection with *M. tuberculosis* H37Rv was performed by delivering 1000 $\pm$ 200 CFU/lung into the nasal cavities under xylazine-ketamine anaesthesia, and the inoculum size was verified by determining bacterial load in the lungs on day 1 post infection. GFP-expressing *M. bovis* BCG (gift from Dr. V. Snewin, Wellcome Trust London, U.K.) grown to mid-log phase in Middlebrook 7H9 liquid medium (Difco Laboratories, Detroit, Mi.) supplemented with 10% oleic acid/albumin/dextrose/catalase (OADC, Difco Laboratories) and 0.05% Hygromycin (Invivogen) at 37°C, was stored at -80°C in 10% glycerol (Sigma), thawed, diluted in sterile saline and injected intravenously at 2.10<sup>6</sup> CFU/mouse.

### *Bone-marrow reconstitution*

CD45.2<sup>+</sup> TNFR1 deficient mice lethally irradiated at a dose of 9 Gy received 3.10<sup>6</sup> bone-marrow cells (i.v.) from either TNFR1 KO or CD45.1<sup>+</sup> Ly5.1 WT mice on C57Bl/6 background and their hematopoietic reconstitution followed for 8 weeks before infection with *M. tuberculosis* H37Rv as described above. Conversely, CD45.1<sup>+</sup> Ly5.1 WT control mice were irradiated and reconstituted with BM cells from either TNFR1 KO or CD45.2<sup>+</sup> B6 mice and infected as above.

### *Bacterial counts*

Bacterial loads in tissues were evaluated as described (51). Organs were weighed and defined aliquots homogenized in PBS in a Dispomix homogenizer (Medic Tools, Axonlab, Baden-Daettwil, Switzerland). Tenfold serial dilutions of organ homogenates in 0.05% Tween 20 containing 0.9% NaCl were plated in duplicates onto Middlebrook 7H11 (Difco) agar plates containing 10% OADC and incubated at 37°C. Colonies were enumerated at 3 weeks and results are expressed as log<sub>10</sub> CFU per organ.

### *Pulmonary cytokine determination*

Lung homogenates were centrifuged (3 min at 14,500 rpm), the supernatants sterilized by centrifugation through 0.22 µm filter (3 min at 14,500 rpm; Costar-Corning, Badhoevedorp, The Netherlands), immediately frozen on dry ice and stored at -80°C until determination of IL-12/IL-23p40, IL-23p19, IFN $\gamma$ , IL-10, KC, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF levels by ELISA (Duoset R&D Systems, Abingdon, UK).

### *mRNA expression*

Total RNA was isolated from lung using TRI-Reagent (Sigma). Reverse transcription was performed in with SuperScript®III Kit (Invitrogen) and cDNA was subjected to quantitative real-time PCR using primers for *Cxcr2* (Qiagen) and GoTaq® qPCR-Master Mix (Promega). *Actinb* and *Hprt1* expression was used for normalization. Raw data were analyzed using the comparative analysis of relative expression, using  $\Delta\Delta C_t$  methods (52).

### *Flow cytometry analysis*

After perfusion with 0.02% EDTA-PBS, harvested lung tissue was sliced into 1 to 2 mm<sup>3</sup> pieces and incubated in RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing antibiotics (Penicilline 100 U/ml-Streptomycine 100 µg/ml), 10 mM Hepes (Gibco), liberase (62.5µg/ml), and DNase (50U/ml; Sigma, St Louis, MO). After 45min of incubation at 37°C, single-cell suspension was obtained by vigorous pipetting and filtering through 100µm. Red blood cells were removed using a lysis buffer (BD PharmLyse®) before filtering through 20µm. Cells were washed three times in RPMI 1640 containing 5% SVF and were then stained according to antibody manufacturer protocols. Rat anti-mouse CD11b-FITC (clone M1/70), Gr1-PECy7 (clone RB6-8C5), F4/80-V450 (clone BM8), IL-12-PE (clone C15.6), CD4-APC (clone RMA-5), CD8 $\alpha$ -APC-Cy7 (clone

53-6.7) and B220-FITC (clone RA3-6B2), mouse anti-mouse NK1.1-FITC (clone PK136) and hamster anti-mouse CD3ε-PerCP-Cy5.5 (clone 145-2C11), CD11c-APC (clone HL3) and TCRβ-V450 (clone H57-597) were from BD Pharmingen (San Diego, CA). BCG-GFP fluorescence was amplified by a staining with a rabbit IgG anti-GFP A488-conjugated (Life technologies). IFN $\gamma$  was assessed in lung cells from *M.tuberculosis* infected mice using a mouse IFN- $\gamma$  Secretion Assay (MACS Miltenyi Biotec). Stained cells were washed twice, fixed with 1% paraformaldehyde (FACS Lysing solution, BD) and analyzed by flow cytometry on a CANTO II analyser (Becton Dickinson). Data were processed with FlowJo software (version 7.6.5 for Windows, FlowJo LLC, Ashland, Oregon).

### *Histopathological analysis*

Pulmonary left lobe from *M. tuberculosis* infected mice were fixed in 4% phosphate buffered formalin, paraffin-embedded, and 2-3- $\mu$ m sections stained with haematoxylin and eosin or Ziehl-Neelsen method. The latter involved staining in a prewarmed (60°C) carbol-fuchsin solution for 10 min followed by destaining in 20% sulphuric acid and 90% ethanol before counterstaining with methylene blue. Free alveolar space, lung cellular infiltration, oedema and necrosis were quantified using a semi-quantitative score with increasing severity of changes (0-5) by two independent observers including a trained pathologist (BR).

### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined with Graph Pad Prism (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences between multiple in vivo groups were analysed by means of one-way non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test) and values of  $p \leq 0.05$  were considered significant. Two-tailed, non parametric Mann-Whitney test was used for analysing in vitro results.

### *Study approval*

All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the "Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans" (CCO) under number CLE CCO 2012-1001.

**Author contributions:**

Designed research study: NS, VQ, BR, MJ, IG, FE

Conducted experiments: NS, SR, AG, SB, TW, HB, M-LB

Acquiring data: NS, SR, AG, SB, M-LB

Analysed data: NS, VQ, AG, SB, FE, MJ, BR

Provided reagents: GK, MLB, TW, HB

Writing manuscript: NS, VQ, BR

**Foot notes:**

<sup>1</sup>Correspondence address:

Valerie Quesniaux, INEM UMR7355, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orleans, France;

Tel : +33 2 38 25 54 39; Fax : +33 2 38 25 79 79;

e-mail: [quesniaux@cnrs-orleans.fr](mailto:quesniaux@cnrs-orleans.fr)

<sup>2</sup>Grant support: The authors acknowledge the support from CNRS through International Associated Laboratory «TB IMMUNITY» (LIA N°236), from the Region Centre projects IMOPA (N°00078827) and Inflammation and Infection (N° 2013-00085470), and from the European contract TB REACT (N°028190).

## References

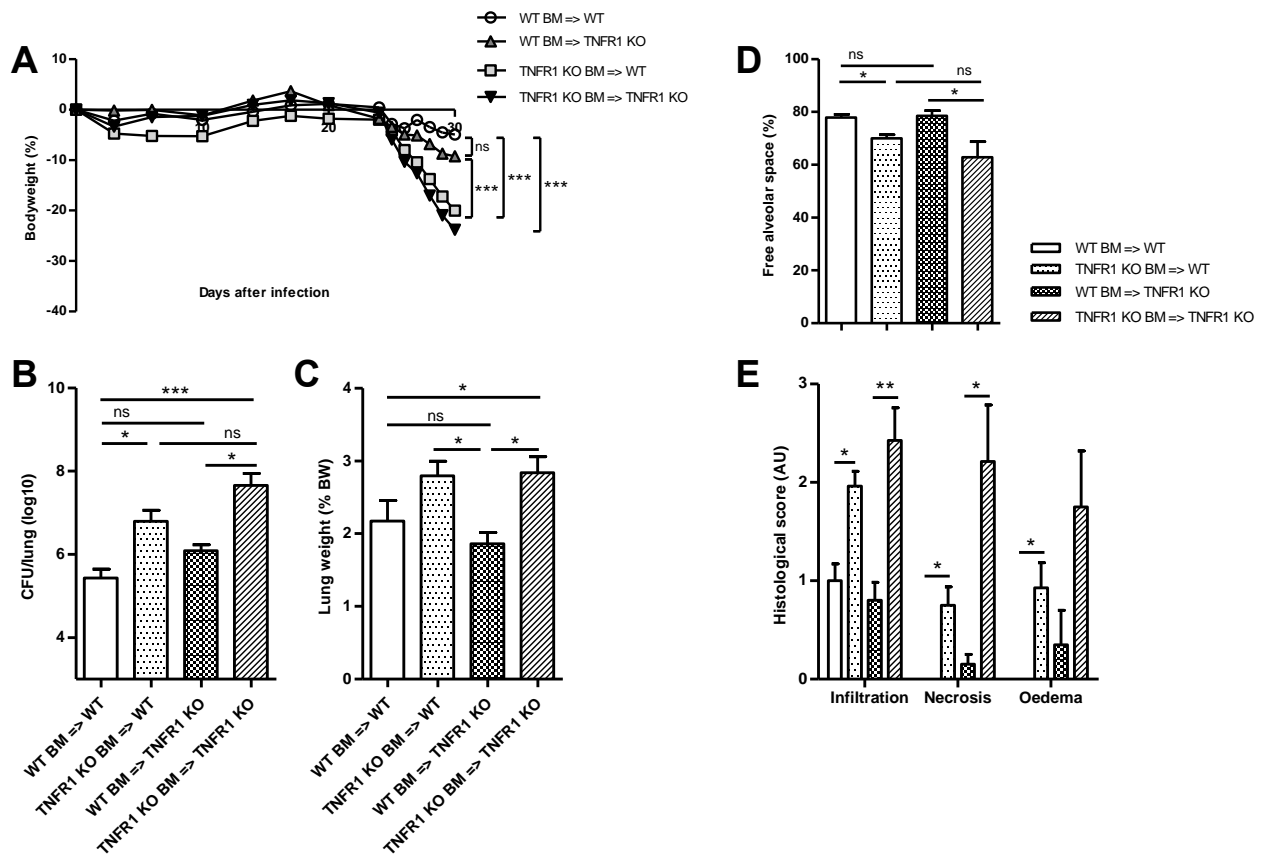
1. Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Migliori GB, and Warren R. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *The Lancet Respiratory medicine*. 2014;2(4):321-38.
2. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, and Raviglione MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *Jama*. 2005;293(22):2767-75.
3. Dye C, and Williams BG. Slow elimination of multidrug-resistant tuberculosis. *Sci Transl Med*. 2009;1(3):3ra8.
4. Flynn JL, and Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2001;19(93-129).
5. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(1-2):93-101.
6. North RJ, and Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2004;22(599-623).
7. Korb DS, Schneider BE, and Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008;10(9):995-1004.
8. Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, and Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat Immunol*. 2013;14(1):52-60.
9. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, and Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2013;31(475-527).
10. Keane J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)*. 2005.
11. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, and Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*. 2001;345(15):1098-104.
12. Mohan AK, Cote TR, Siegel JN, and Braun MM. Infectious complications of biologic treatments of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2003;15(3):179-84.
13. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, and Chan J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001;69(3):1847-55.
14. Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M, Pallot-Prades B, Pouplin S, Sacchi A, Chichemanian RM, et al. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(7):1884-94.
15. Jacobs M, Marino MW, Brown N, Abel B, Bekker LG, Quesniaux VJ, Fick L, and Ryffel B. Correction of defective host response to Mycobacterium bovis BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest*. 2000;80(6):901-14.
16. Allie N, Grivennikov SI, Keeton R, Hsu NJ, Bourigault ML, Court N, Fremont C, Yermeev V, Shebzukhov Y, Ryffel B, et al. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci Rep*. 2013;3(1809).
17. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83(5):793-802.

18. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-56.
19. Allie N, Keeton R, Court N, Abel B, Fick L, Vasseur V, Vacher R, Olleros ML, Drutskaya MS, Guler R, et al. Limited role for lymphotoxin alpha in the host immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 2010;185(7):4292-301.
20. Fremond C, Allie N, Dambuza I, Grivennikov SI, Yeremeev V, Quesniaux VF, Jacobs M, and Ryffel B. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir Res.* 2005;6(1):136.
21. Allie N, Alexopoulou L, Quesniaux VJ, Fick L, Kranidioti K, Kollias G, Ryffel B, and Jacobs M. Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection. *Immunology.* 2008;125(4):522-34.
22. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, and Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-72.
23. Keeton R, Allie N, Dambuza I, Abel B, Hsu NJ, Sebesho B, Randall P, Burger P, Fick E, Quesniaux VF, et al. Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1537-51.
24. Zakharova M, and Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 2005;175(8):5024-33.
25. Fremond CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, Jacobs M, Ryffel B, and Quesniaux VF. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.* 2007;179(2):1178-89.
26. Fremond CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, and Ryffel B. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1790-9.
27. Van Hauwermeiren F, Armaka M, Karagianni N, Kranidioti K, Vandenbroucke RE, Loges S, Van Roy M, Staelens J, Puimege L, Palagani A, et al. Safe TNF-based antitumor therapy following p55TNFR reduction in intestinal epithelium. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2590-603.
28. Bourigault ML, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, Vasseur V, Erard F, Le Bert M, Garcia I, Iwakura Y, et al. Relative contribution of IL-1alpha, IL-1beta and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immunity, inflammation and disease.* 2013;1(1):47-62.
29. Quesniaux VF, Jacobs M, Allie N, Grivennikov S, Nedospasov SA, Garcia I, Olleros ML, Shebzukhov Y, Kuprash D, Vasseur V, et al. TNF in host resistance to tuberculosis infection. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11(157-79).
30. Dorhoi A, and Kaufmann SH. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Seminars in immunology.* 2014;26(3):203-9.
31. Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PP, Cole ST, Abubakar I, McHugh TD, Schito M, Maeurer M, and Nunn AJ. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet Infectious diseases.* 2014;14(4):327-40.
32. Skerry C, Harper J, Klunk M, Bishai WR, and Jain SK. Adjunctive TNF inhibition with standard treatment enhances bacterial clearance in a murine model of necrotic TB granulomas. *PloS one.* 2012;7(6):e39680.
33. Bourigault ML, Vacher R, Rose S, Olleros ML, Janssens JP, Quesniaux VF, and Garcia I. Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances Mycobacterium tuberculosis clearance and reduces lung pathology. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013;2(1):124-34.



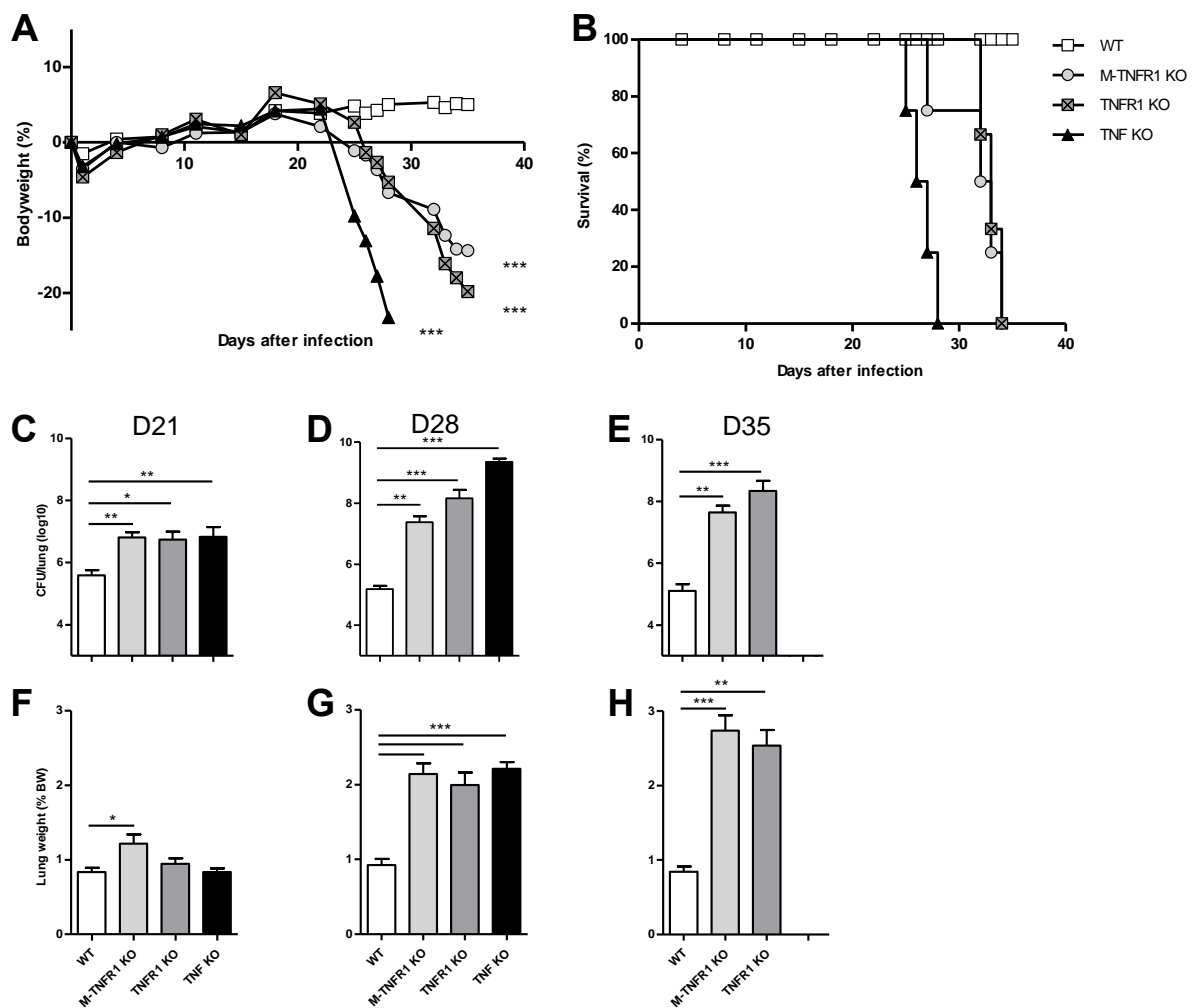
34. Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, and Ghrayeb J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine*. 1995;7(3):251-9.
35. Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grunke M, Schwerdtner N, Nusslein H, Woody J, Kalden JR, and Manger B. In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol*. 1996;156(4):1646-53.
36. Olleros ML, Chavez-Galan L, Segueni N, Bourigault ML, Vesin D, Kruglov AA, Drutskaya MS, Bisig R, Ehlers S, Aly S, et al. Control of Mycobacterial Infections in Mice Expressing Human Tumor Necrosis Factor (TNF) but Not Mouse TNF. *Infect Immun*. 2015;83(9):3612-23.
37. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, and Remold HG. Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol*. 1998;161(5):2636-41.
38. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, and Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*. 1992;175(2):323-9.
39. Olleros ML, Vesin D, Bisig R, Santiago-Raber ML, Schuepbach-Mallepell S, Kollias G, Gaide O, and Garcia I. Membrane-bound TNF induces protective immune responses to M. bovis BCG infection: regulation of memTNF and TNF receptors comparing two memTNF molecules. *PLoS one*. 2012;7(5):e31469.
40. Ma X, Sun J, Papasavvas E, Riemann H, Robertson S, Marshall J, Bailer RT, Moore A, Donnelly RP, Trinchieri G, et al. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol*. 2000;164(4):1722-9.
41. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, and Martineau AR. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends in immunology*. 2012;33(1):14-25.
42. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, and Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*. 2008;205(1):105-15.
43. Brenner D, Blaser H, and Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362-74.
44. Blomgran R, Desvignes L, Briken V, and Ernst JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*. 2012;11(1):81-90.
45. Lim K, Hyun YM, Lambert-Emo K, Capece T, Bae S, Miller R, Topham DJ, and Kim M. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8(+) T cells in the airways. *Science*. 2015;349(6252):aaa4352.
46. Blomgran R, and Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 2011;186(12):7110-9.
47. Duque-Correa MA, Kuhl AA, Rodriguez PC, Zedler U, Schommer-Leitner S, Rao M, Weiner J, 3rd, Hurwitz R, Qualls JE, Kosmiadi GA, et al. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(38):E4024-32.
48. Dorhoi A, Iannaccone M, Maertzdorf J, Nouailles G, Weiner J, 3rd, and Kaufmann SH. Reverse translation in tuberculosis: neutrophils provide clues for understanding development of active disease. *Frontiers in immunology*. 2014;5(36).
49. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, and Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell*. 1993;73(3):457-67.

50. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(15):8093-8.
51. Jacobs M, Brown N, Allie N, and Ryffel B. Fatal Mycobacterium bovis BCG infection in TNF-LT-alpha-deficient mice. *Clin Immunol*. 2000;94(3):192-9.
52. Pfaffl MW, Horgan GW, and Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*. 2002;30(9):e36.
53. Muller M, Eugster HP, Le Hir M, Shakhov A, Di Padova F, Maurer C, Quesniaux VF, and Ryffel B. Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. *Mol Med*. 1996;2(2):247-55.
54. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.



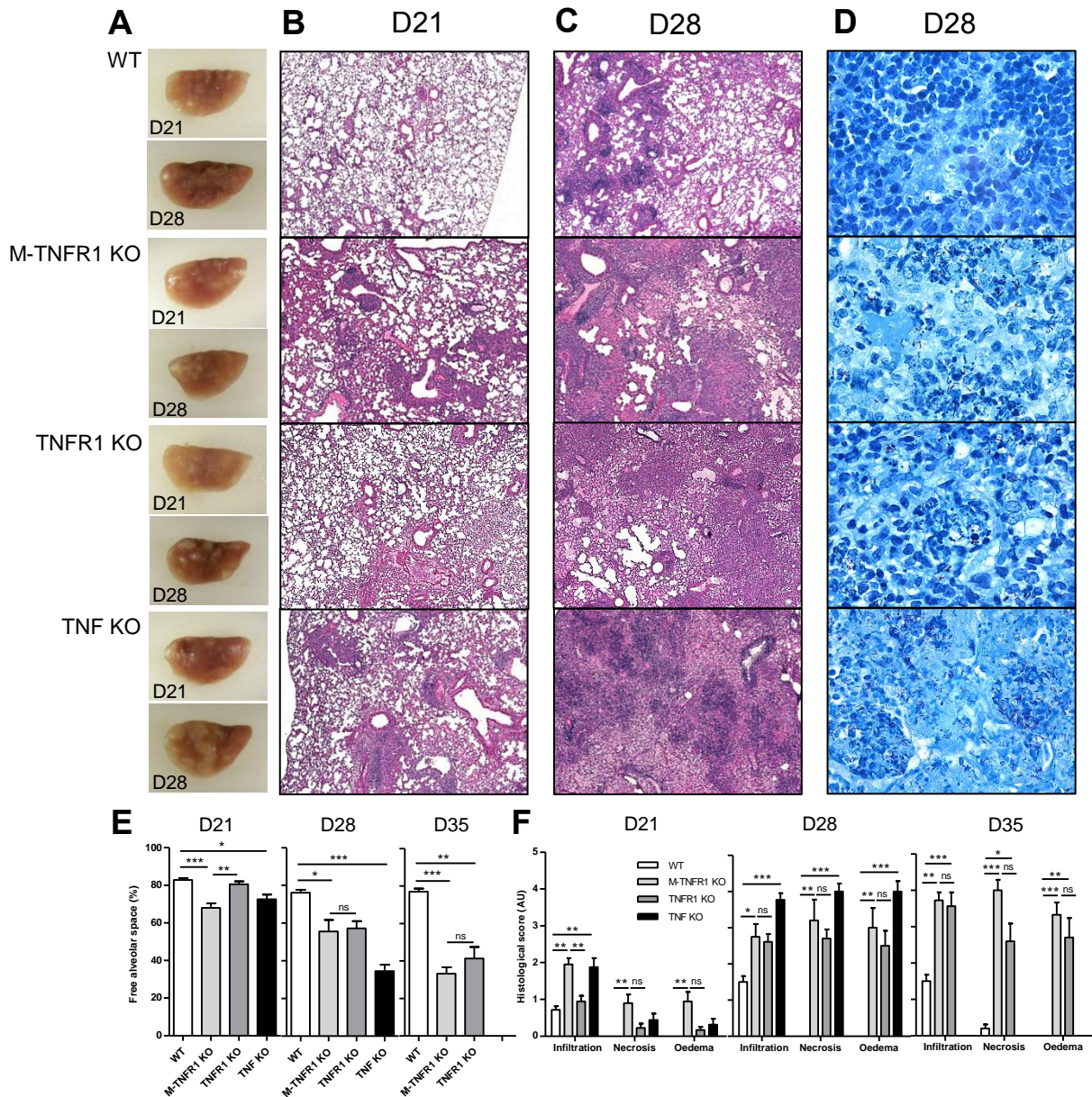
**Figure 1. TNFR1 pathway on haematopoietic cells is crucial to control *M.tuberculosis* infection.**

TNFR1 deficient mice were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow from either Ly5.1 WT mice (WT BM => TNFR1 KO) or TNFR1 KO mice (TNFR1 KO BM => TNFR1 KO) before *M.tuberculosis* intranasal infection. As controls, Ly5.2 C57Bl6 mice were irradiated and reconstituted with Ly5.1 WT BM (WT BM => WT), or irradiated Ly5.1 WT received TNFR1 KO BM (TNFR1 KO BM => WT). Experimental groups were monitored for bodyweight (**A**). Lung bacterial load (**B**) and inflammation (**C**) were determined 30 days after infection. Lungs were harvested and fixed in 4% formol for HE staining. Bar graphs (**D**, **E**) summarize free alveolar space and scores of cell infiltration, necrosis and oedema. Results are expressed as mean +/- SEM (n=6-7 mice per group). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



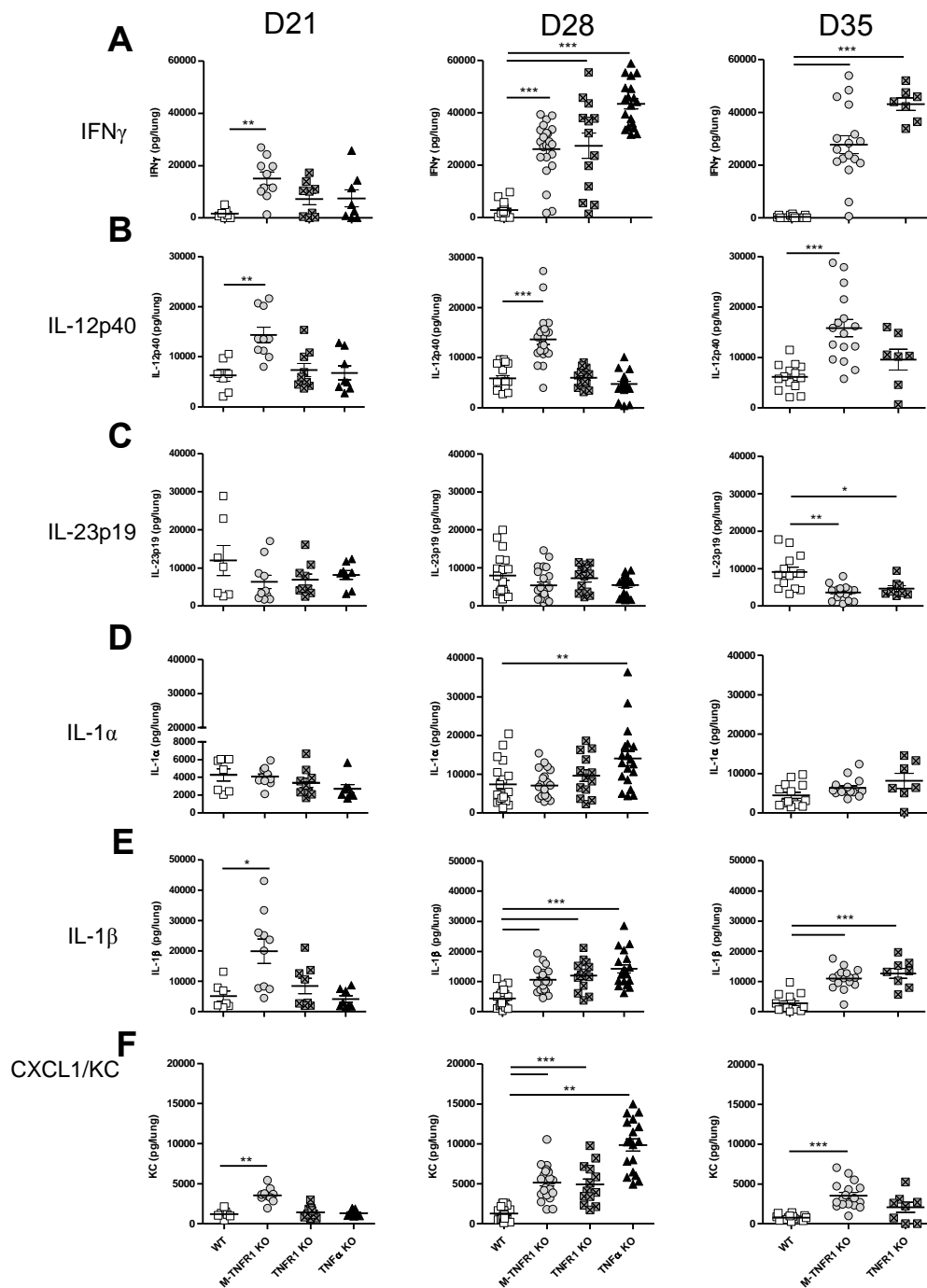
**Figure 2. M-TNFR1 KO mice are unable to control acute *M. tuberculosis* infection.**

Mice deficient for TNF $\alpha$ , TNFR1 or specifically deficient for TNFR1 in myeloid cells (M-TNFR1 KO) and wild-type mice were exposed to an aerogenic dose of *M. tuberculosis* H37Rv (1000 CFU/mouse i.n.) and monitored for relative body weight gain (A) and survival (B). Data are means from n=15-20 mice per group pooled from 4 independent experiments. Pulmonary bacterial load (C, D, E) and lung wet weight (F, G, H) were quantified after 21 days (C, F), 28 days (D, G) and 35 days (E, H) of infection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=7-10 from 2 experiments at day 21, n=13-24 from 4 experiments at day 28 and n=8-16 from 3 experiments at day 35). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



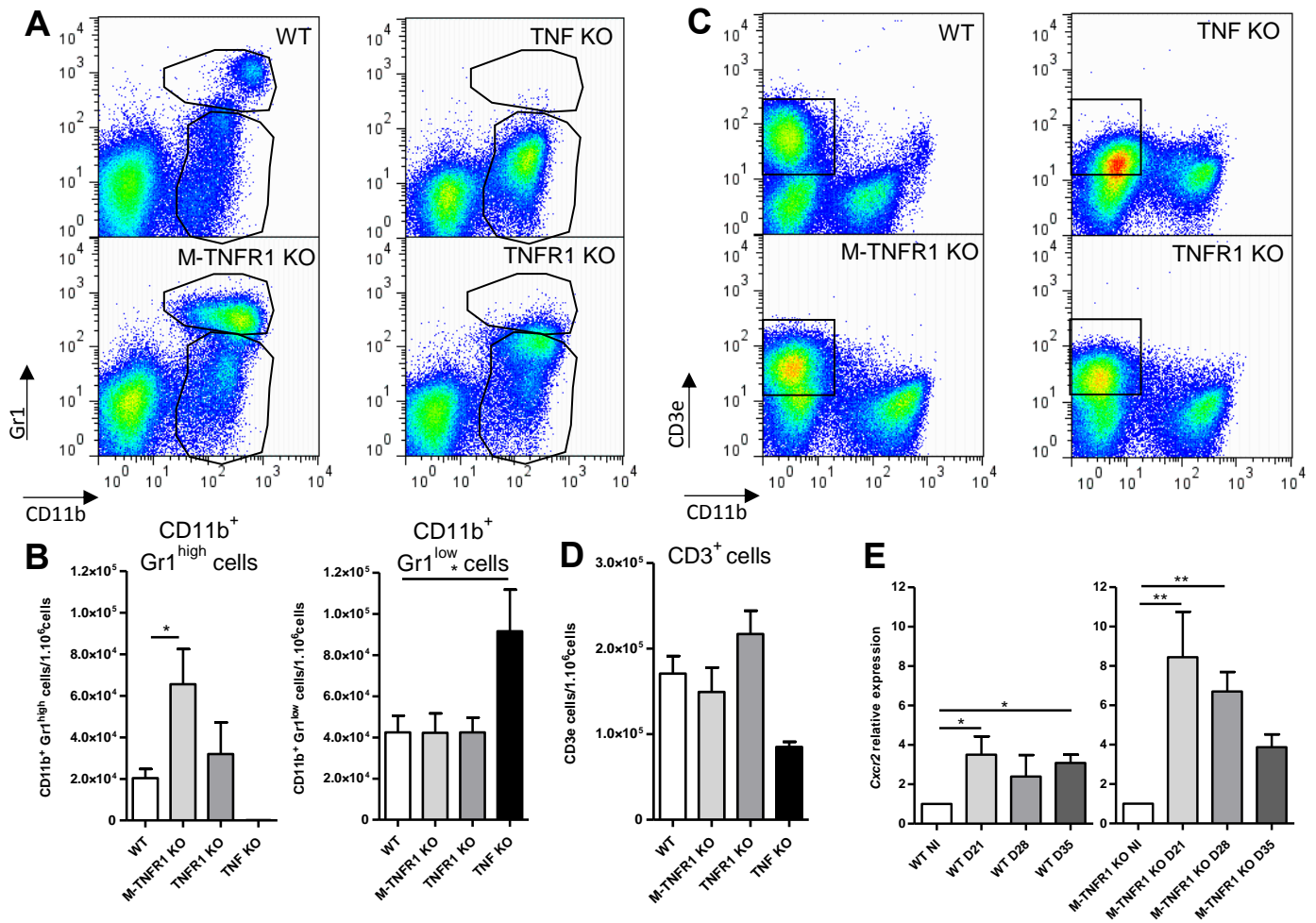
**Figure 3. M-TNFR1-deficient mice exhibit acute necrotic pneumonia with nodules but defective granuloma formation in response to *M. tuberculosis* infection, similar to TNFR1-deficient mice.**

Lungs from mice deficient for TNF $\alpha$ , TNFR1 or specifically deficient for TNFR1 in myeloid cells and wild-type mice were harvested on day 21 and day 28 after *M. tuberculosis* H37Rv infection as in Figure 2 (1000 CFU/mouse i.n.) and fixed in 4% formol for macroscopic (A) and microscopic (B, C, D) analyses. HE staining was performed on day 21 (B) and day 28 (C). Mycobacteria were visible at day 28 with ZN staining (D). HE staining magnification x50, ZN staining magnification x1000. Bar graphs (E, F) summarize free alveolar space and scores of cell infiltration, necrosis and oedema (n=7-11 from 2 independent experiments); \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



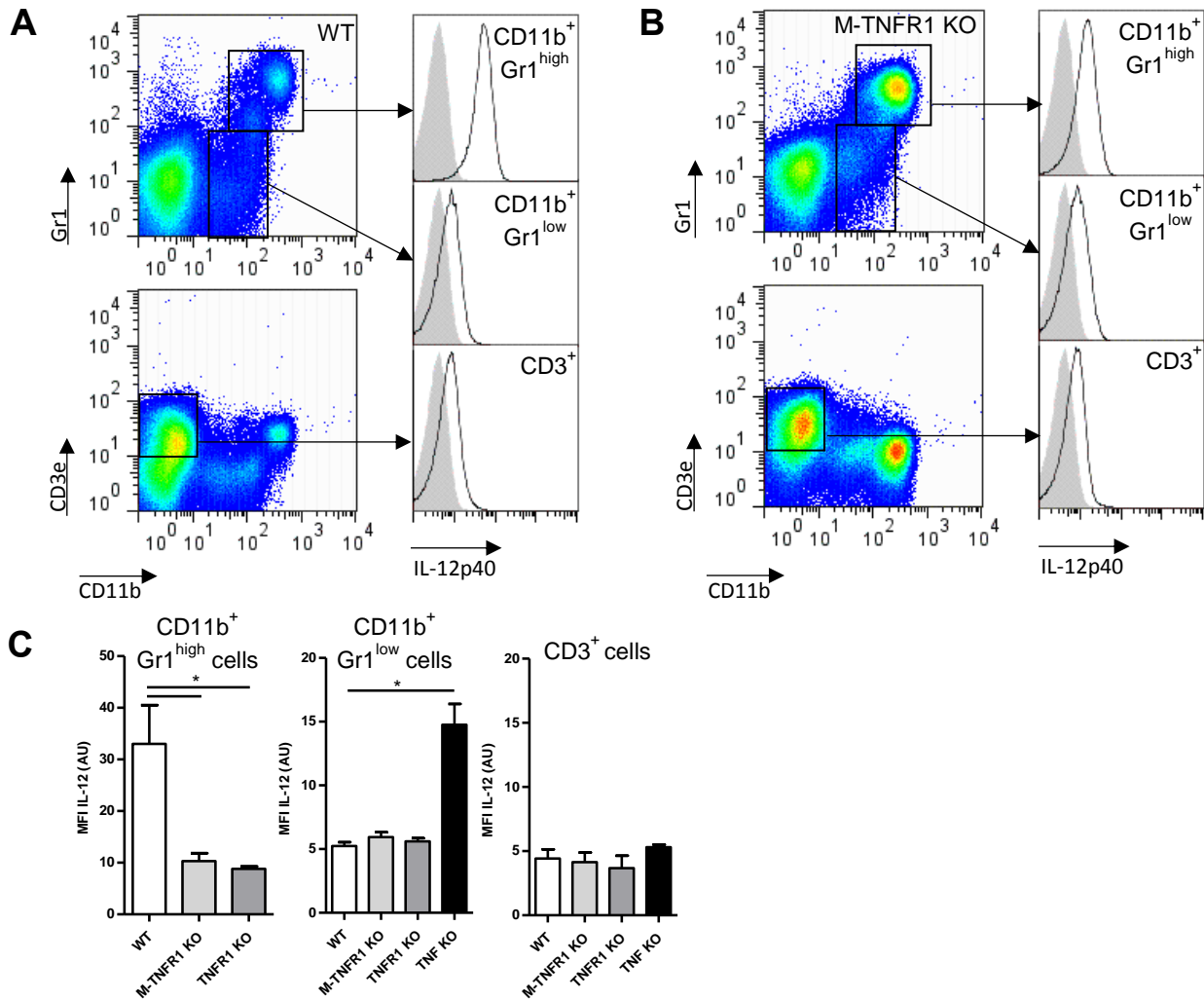
**Figure 4. Influence of myeloid TNFR1 expression on cytokine levels in the lungs of *M. tuberculosis* infected mice.**

Cytokine concentrations were determined in lung homogenates of mice deficient for TNF, TNFR1, or specifically deficient for TNFR1 in myeloid cells (M-TNFR1 KO) and wild-type mice 21, 28 or 35 days after *M. tuberculosis* infection, as indicated. IFN $\gamma$  (A), IL-12/IL-23 p40 (B), IL-23 p19 (C), IL-1 $\alpha$  (D), IL-1 $\beta$  (E), and CXCL1/KC (F) were quantified by ELISA. Results are expressed as single points and mean  $\pm$  SEM of n=7-10 from 2 experiments at day 21, n=13-24 from 4 experiments at day 28 and n=8-16 from 3 experiments at day 35. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



**Figure 5. M-TNFR1 dependent granulocytes recruitment in *M. tuberculosis* infected lungs.**

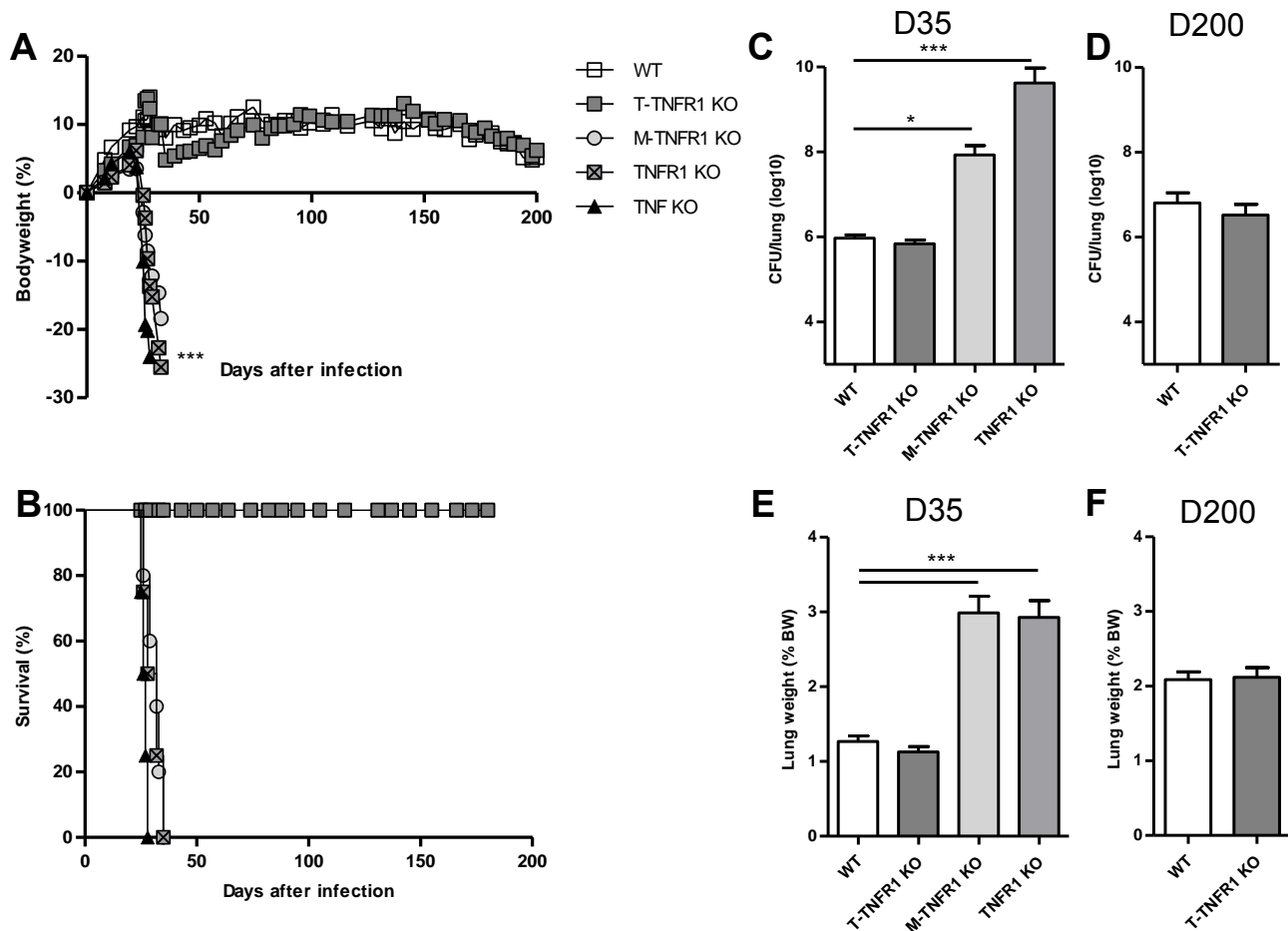
Lungs from M-TNFR1-, TNFR1-, or TNF $\alpha$ -deficient mice and wild-type controls were harvested on day 28 after *M. tuberculosis* H37Rv infection (1000 CFU/mouse i.n.) for flow cytometry analysis. (A) Representative dot plots of CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> cells. (B) Proportion of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> and CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells in *M. tuberculosis*-infected lungs. (C) Representative dot plots of CD11b<sup>+</sup>CD3e<sup>+</sup> cells. (D) Proportion of CD3e<sup>+</sup> cells in the lungs of M-TNFR1-, TNFR1-, or TNF $\alpha$ -deficient mice and wild-type controls. (E) Relative gene expression of *Cxcr2* in the lung of infected M-TNFR1-, TNFR1-, or TNF $\alpha$ -deficient mice and wild-type controls. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=2-5 mice per group (B, D) and n=4-11 (E) from two independent experiments. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



**Figure 6. M-TNFR1 dependent IL-12 production in granulocytes from *M. tuberculosis* infected lungs.**

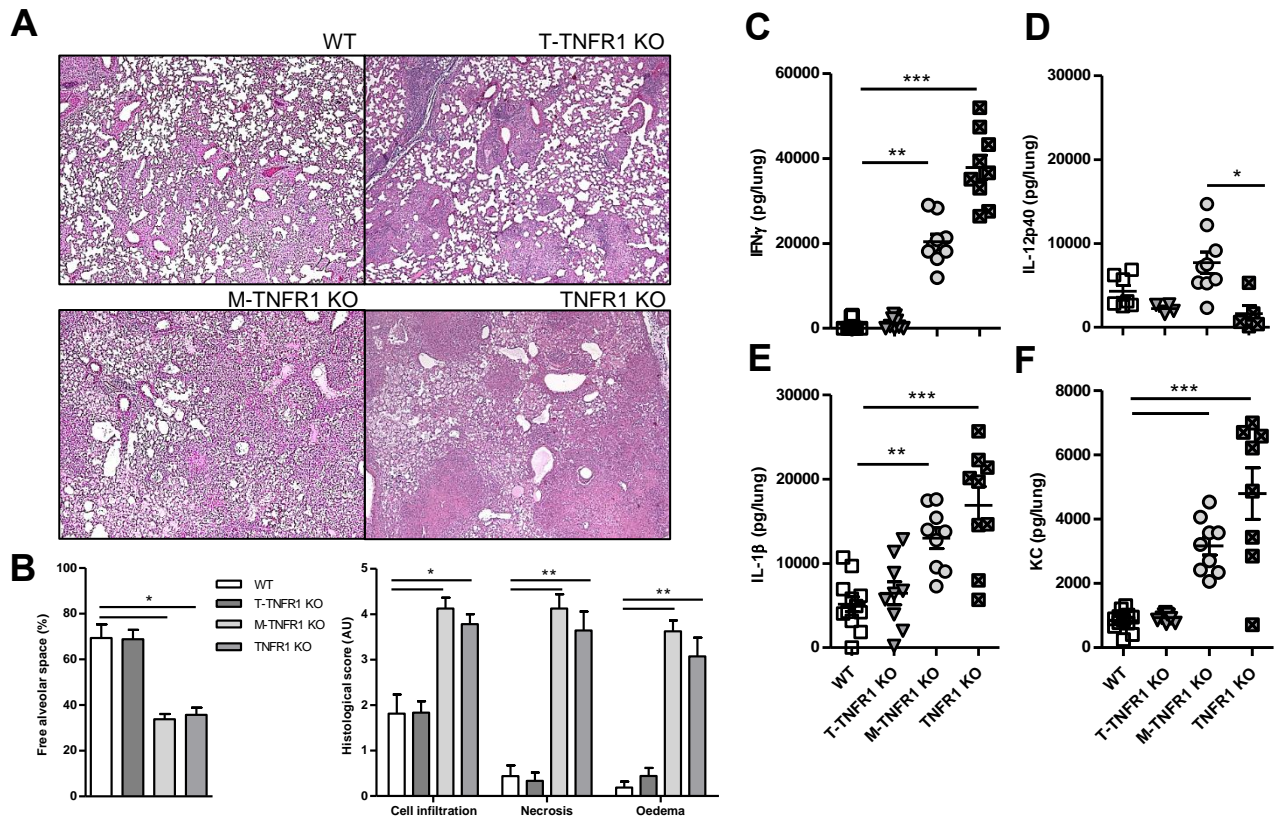
(A-C). Intracellular IL-12p40 expression in CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup> cells, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> cells or in CD3e<sup>+</sup> cells was represented in WT mice (A) and in M-TNFR1 KO mice (B). Bar graphs (C) summarise IL-12p40 MFI in each cell populations for WT, M-TNFR1-, TNFR1-, or TNF $\alpha$  KO mice. Results are expressed as mean +/- SEM of n=2-5 mice per group from two independent experiments. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.





**Figure 7. T-TNFR1 KO mice control acute *M. tuberculosis* infection.**

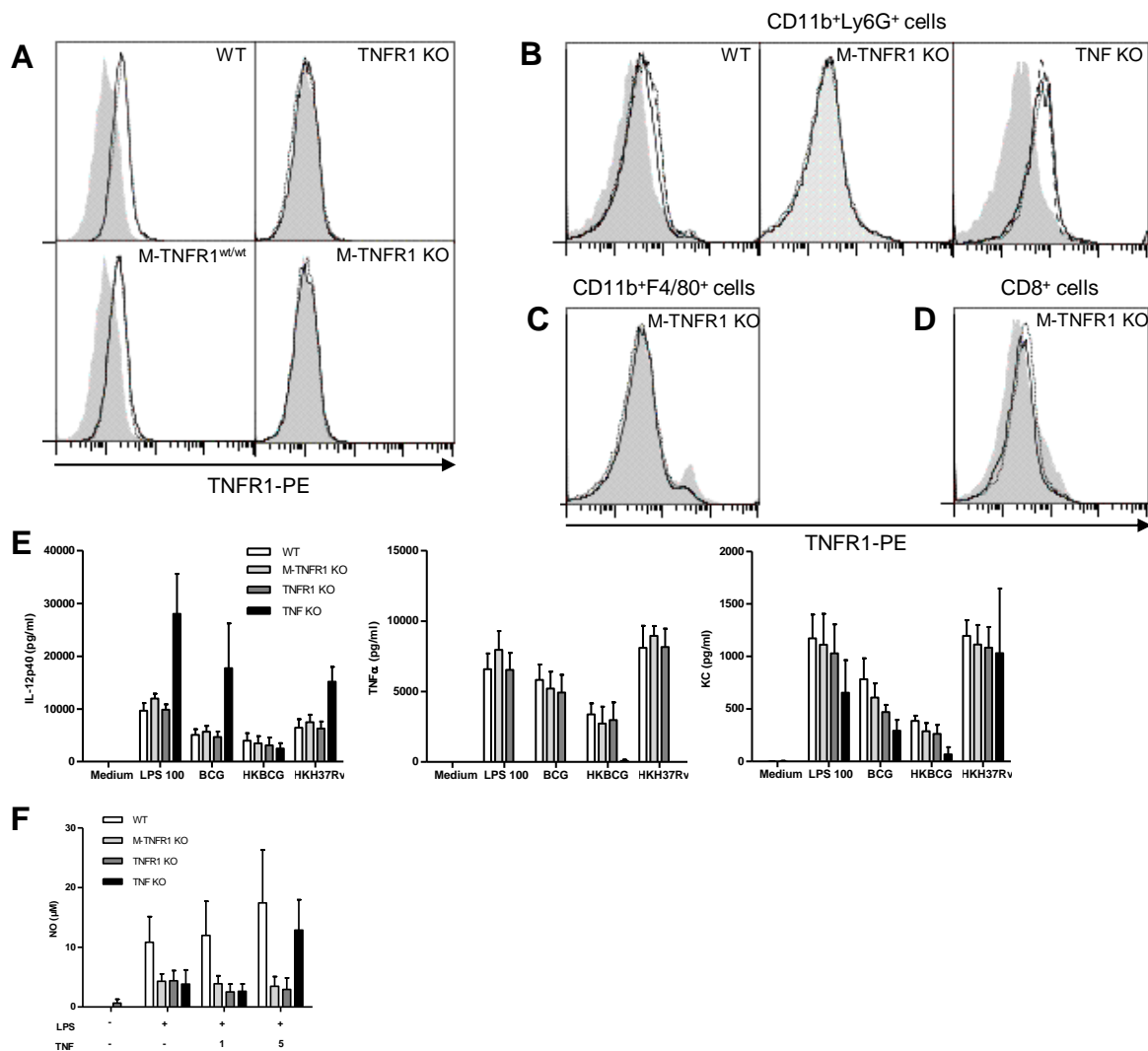
Mice specifically deficient for TNFR1 in T cells (T-TNFR1 KO) or myeloid cells (M-TNFR1 KO), fully TNFR1 or TNF $\alpha$  deficient mice and wild-type mice were exposed to *M. tuberculosis* H37Rv (1000 CFU/mouse i.n.) and monitored for relative body weight gain (A) and survival (B). Pulmonary bacterial load (C, D) and lung wet weight (E, F) were measured at 35 days (C, E) and 201 days (D, F) post-infection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from n=9-12 mice per group pooled from 3 independent experiments up to day 35 and n=9-10 from 2 experiments thereafter. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



**Figure 8. Absence of TNFR1 on T-cells does not increase lung pathology and inflammation after *M. tuberculosis* infection.**

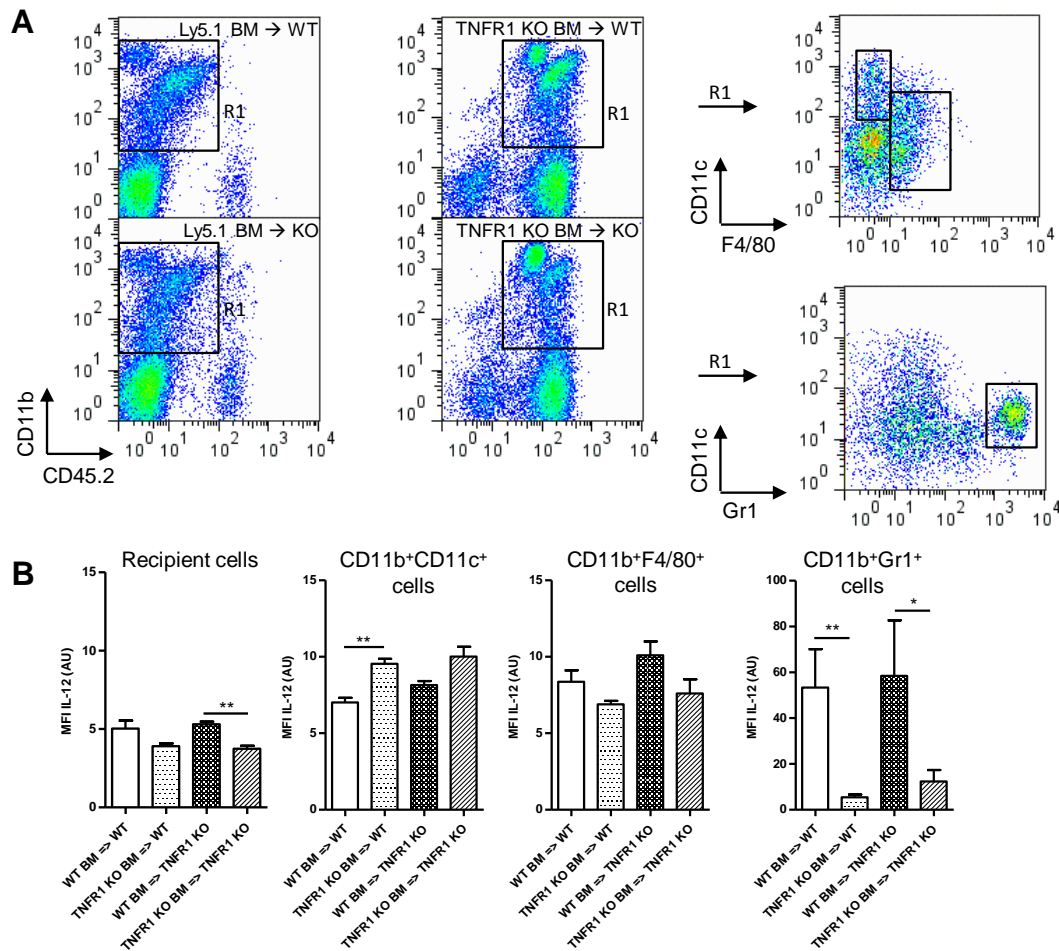
Lungs from T-TNFR1, M-TNFR1, fully TNFR1 or TNF $\alpha$  deficient mice and wild-type controls were harvested on day 35 post-infection and fixed in 4% formol for microscopic analyses, A-B. HE staining was performed on lung sections on day 35 (A) (magnification x50). Bar graphs (B) summarise free alveolar space and scores of cell infiltration, necrosis and oedema (n=9-10 from 2 independent experiments). (C-F). Cytokine concentrations were determined by ELISA in the lung homogenates on day 35 for IFN $\gamma$  (C), IL-12/IL-23 p40 (D), IL-1 $\beta$  (E), and CXCL1/KC (F). Results are expressed as single points and mean  $\pm$  SEM of n=9-10 from 2 experiments. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.

## Supplemental figures



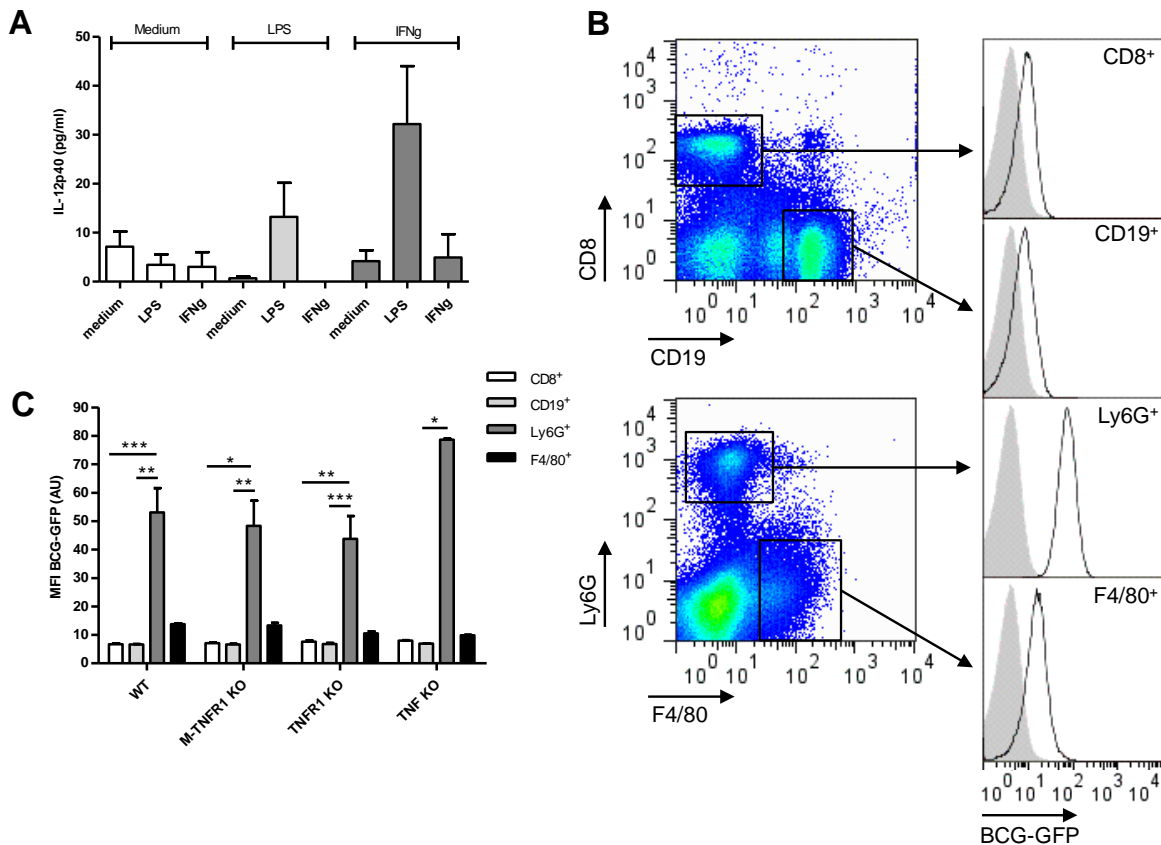
**Figure S1. Macrophages from M-TNFR1 KO mice do not express functional TNFR1 but respond to mycobacterial stimuli.**

(A) Bone marrow derived macrophages (BMDM) from C57BL/6 (WT), TNFR1, *Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>wt/wt</sup>* (M-TNFR1 <sup>wt/wt</sup>) or *Tnfrsf1α<sup>fl/fl</sup> LysM<sup>cre/wt</sup>* (M-TNFR1 KO) mice were incubated with hamster  $\alpha$ -mouse TNFR1/CD120a and revealed with biotinylated  $\alpha$ -hamster IgG plus PE-streptavidine (n=2, dark line and dotted line), as compared to isotype controls (grey). (B-D). Spleen cells from WT, M-TNFR1- or TNF KO mice were isolated and stained for cytometry analysis 41 days after *M.bovis* BCG infection. TNFR1/CD120a expression was measured in CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> cells (B), CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells (C) and CD8<sup>+</sup> cells (D). (E) BMDM from WT, M-TNFR1-, TNFR1- or TNF KO mice were stimulated with LPS (100ng/ml), or live or heat-killed mycobacteria (MOI 2) for 20h. IL-12p40, TNF and KC were measured in supernatants. Results are mean +/- SEM of n=6 mice per group, from 3 independent experiments (F) BMDMs were primed with TNF at 5ng/ml for 16h prior to LPS stimulation (at 1ng/ml) for 18h and NO measured in supernatants. Results are mean +/- SEM of n=4 mice per group from 2 independent experiments.



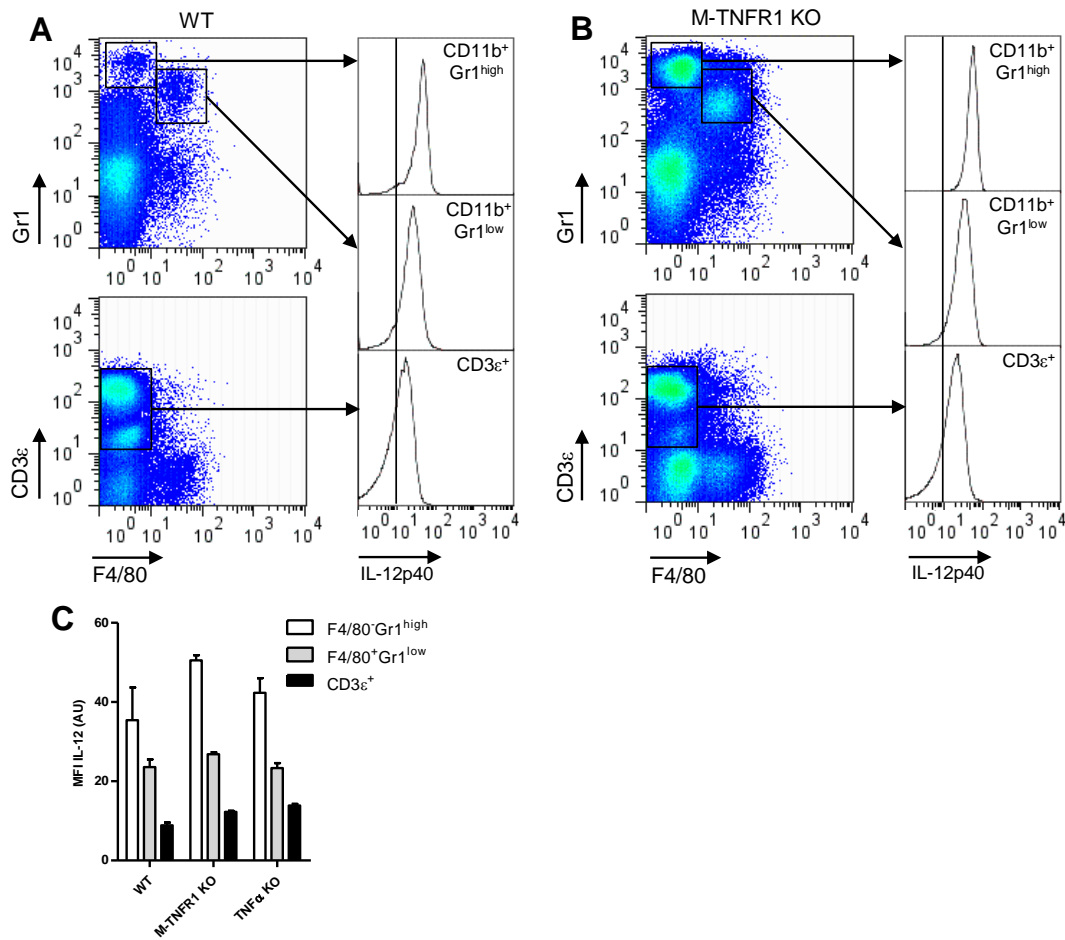
**Figure S2. Hematopoietic cells are the major source of IL-12p40 in the lungs after *M. tuberculosis* infection.**

TNFR1 deficient mice and WT mice were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow from either WT mice or TNFR1 KO mice before *M.tuberculosis* intranasal infection. Lungs were harvested 30 days post-infection and stained for CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, Gr1 and IL-12p40. (A) Gating strategy used for IL-12p40 MFI determination is shown as CD45.2/CD11b, F4/80/CD11c and Gr1/CD11c dot plots. (B) Mean fluorescence intensity of IL-12p40 in each cell population is represented as bar graphs. Results are expressed as mean +/- SEM (n=6-7 mice per group). \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



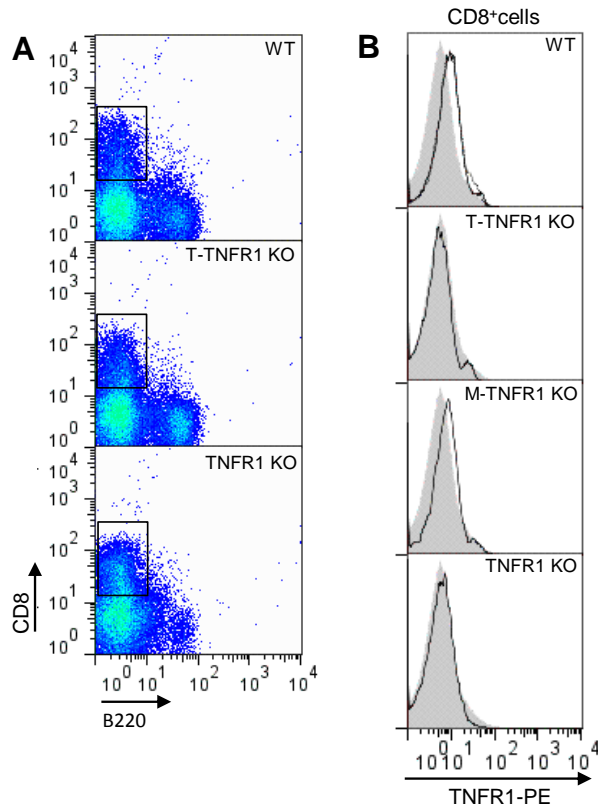
**Figure S3. Neutrophils are the major infected cells in the spleen after *M.bovis* BCG infection**

(A) Neutrophils isolated from C57BL/6 mice bone marrow were primed with LPS or IFN $\gamma$  for 12 hours prior to stimulation with LPS or IFN $\gamma$  for 12 hours. Supernatants were harvested for IL-12p40 determination by ELISA. (B-C) Mice deficient for TNF-, TNFR1 or myeloid TNFR1 and wild type mice were infected with GFP expressing *M. bovis* BCG ( $2 \cdot 10^6$  CFU/mouse i.v.) and spleen cells were isolated at day 41 post infection for analysis BCG-GFP internalization by flow cytometry. Representative dot plots of CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup> cells are shown in B. Each population was analysed for GFP intensity of fluorescence, as compared to isotype control (grey). Bar graphs representing mean fluorescence intensity of BCG-GFP in the different spleen cell populations from WT, M-TNFR1-, TNFR1 and TNF KO mice are shown in C.



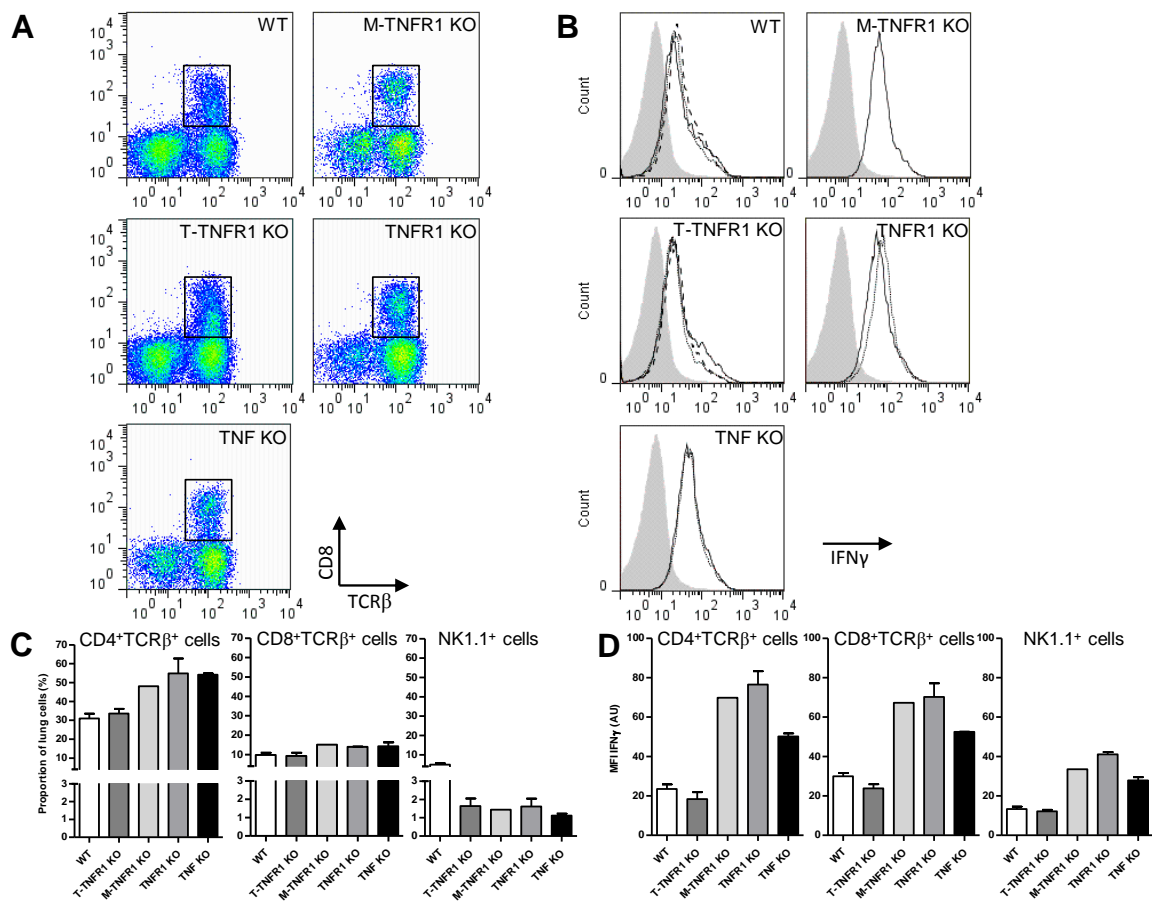
**Figure S4. Splenic neutrophils express IL-12p40 after *M.bovis* BCG infection**

(A-C) Intracytoplasmic IL-12p40 staining was measured in splenic CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> or in CD3ε<sup>+</sup> cells from WT (A) and M-TNFR1 KO mice (B). IL-12p40 mean fluorescence intensity (MFI) is represented as bar graph in WT, M-TNFR1 KO and TNF KO mice (C). Results are expressed as mean +/- SEM of n=3-6 pooled from 2 independent experiments. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001.



**Figure S5. Lymphocytes from T-TNFR1 KO mice do not express TNFR1 ex-vivo**

Lung cells from WT and T-TNFR1<sup>-</sup>, M-TNFR1<sup>-</sup>, and TNFR1-deficient mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv (1000 CFU/mouse i.n.) were isolated on day 28 and stained for CD8 and B220. (A) Representative dot plots for CD8<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells are shown for each experimental group. (B) TNFR1 expression was measured as mean fluorescence intensity in CD8<sup>+</sup> cells as compared to isotype control (in grey).



**Figure S6. High IFN $\gamma$  secretion is correlated with susceptibility to *M.tuberculosis* infection but does not require TNF/TNFR1 pathway.**

Lung cells from WT and TNF<sup>-</sup>, TNFR1<sup>-</sup>, M-TNFR1-deficient mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv (1000 CFU/mouse i.n.) were harvested on day 28 and stained for CD3 $\epsilon$ , CD4, CD8, TCR $\beta$ , NK1.1 and IFN $\gamma$  using a secretion kit. **(A)** Representative dot plots for CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ CD8<sup>+</sup> cells are shown for each experimental group. **(B)** Secreted IFN $\gamma$  intensity in TCR $\alpha\beta$ CD8<sup>+</sup> cells was plotted for each group (n=2-3, dark, dotted and dashed lines) as compared to isotype control (in grey). **(C-D)** The percentages of CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ , CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$  cells and CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> cell populations **(C)** and IFN $\gamma$  MFI **(D)** are represented as bar graphs. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=2-3 mice.



## *B. Etablissement d'un modèle murin pour l'étude des traitements anti-TNF humains*

### **Article 3: Control of mycobacterial infections in mice expressing human Tumor Necrosis Factor but not mouse TNF**

Maria L. Olleros, Leslie Chavez-Galan, **Noria Segueni**, Marie L. Bourigault, Dominique Vesin, Andrey A. Kruglov, Marina S. Drutskaya, Ruth Bisig, Stefan Ehlers, Sahar Aly, Kerstin Walter, Dmitry V. Kuprash, Miliana Chouchkova, Sergei V. Kozlov, François Erard, Bernard Ryffel, Valérie Quesniaux, Sergei A. Nedospasov and Irene Garcia.

Infect. Immun. 2015 Jun 29. pii: IAI.00743-15.

L'incidence de la tuberculose dans le monde est toujours très élevée (près de 9 millions de nouveaux cas par an), et on considère qu'1/3 de la population est infectée sous une forme latente (Dye and Williams, 2010). Cette capacité de la mycobactérie à persister dans l'organisme sans induire de symptômes a entraîné l'apparition de nombreux cas de réactivation de tuberculoses latentes suite à l'utilisation de traitements anti-TNF : la neutralisation de cette cytokine, révolutionnaire pour le traitement de maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn, s'est révélée désastreuse chez les patients présentant une forme latente non diagnostiquée de tuberculose (Keane, 2005; Keane *et al.*, 2001; Mariette *et al.*, 2012).

Actuellement, deux types de traitements anti-TNF existent : les anticorps monoclonaux ciblant le TNF, comme l'Infliximab, et les protéines recombinantes du TNFR2 soluble, comme l'Etanercept. Ces traitements ont tous les deux engendré des cas de réactivation de tuberculose latente chez les patients, bien que l'Etanercept semble avoir un effet moindre, et les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus (Wallis and Ehlers, 2005). Des anticorps monoclonaux anti-TNF murin ainsi que du TNFR2 soluble murin ont été testés chez la souris et ont apportés quelques réponses sur les mécanismes d'action de ces traitements. Ainsi, en phase précoce, il n'y a aucune différence entre les deux traitements : les souris traitées avec l'anti-TNF ou avec le TNFR2 soluble présentent un phénotype très sensible et ne contrôlent pas l'infection par *M. tuberculosis*. En revanche, en phase chronique, les souris traitées avec le TNFR2 soluble sont toujours capables de contrôler l'infection tandis que les souris traitées avec l'anti-TNF succombent à l'infection en 4

semaines après le début du traitement. Les auteurs de cette étude précisent que le TNFR2 soluble pénètre moins bien dans les granulomes que les anticorps anti-TNF, et cette différence mécanistique expliquerait les phénotypes des souris (Plessner *et al.*, 2007). Cependant, l'étude *in vivo* de ces traitements humains est limitée par la spécificité d'espèce. Ainsi, pouvoir tester les traitements anti-TNF humain chez la souris est essentiel dans la compréhension et l'identification des meilleurs candidats de deuxième génération.

Dans le présent travail, nous avons généré des souris humanisées, exprimant le TNF humain à la place du TNF murin. Ces souris sont capables d'établir une réponse immunitaire à une infection par des mycobactéries de manière similaire à celle des souris de type sauvage. En effet, les macrophages issus des souris humanisées sont capables de sécréter du TNF humain en réponse à une stimulation mycobactérienne, et ces souris sont capables de contrôler efficacement une infection par *M. bovis* BCG ou par *M. tuberculosis*. De plus, le traitement de ces souris humanisées par des anti-TNF humains (Infliximab, Etanercept et Adalimumab) induit une susceptibilité à l'infection par *M. tuberculosis*, avec une charge bactérienne plus élevée et la présence de larges structures granulomateuses et nécrotiques.

Nous démontrons ainsi que l'évaluation de l'efficacité des traitements anti-TNF humains et de leurs effets potentiels sur une infection mycobactérienne latente est rendue possible par l'utilisation de ce modèle murin. Ce modèle pourra permettre éventuellement l'étude du mécanisme d'action des anti-TNF *in vivo* mais surtout aider à prédire les risques d'augmenter la susceptibilité à la tuberculose des nouveaux candidats.

L'article présenté dans cette partie a été publié dans *Infection and Immunity* en Juin 2015.

## Control of Mycobacterial Infections in mice expressing human

### Tumor Necrosis Factor but not mouse TNF

1  
2 **Maria L. Olleros,<sup>a</sup> Leslie Chavez-Galan,<sup>a,j</sup> Noria Segueni,<sup>b</sup> Marie L. Bourigault,<sup>b</sup>**  
3 **Dominique Vesin,<sup>a</sup> Andrey A. Kruglov,<sup>c, d, 1</sup> Marina S. Drutskaya,<sup>e</sup> Ruth Bisig,<sup>a</sup> Stefan**  
4 **Ehlers,<sup>f</sup> Sahar Aly,<sup>g, \*</sup> Kerstin Walter,<sup>h</sup> Dmitry V. Kuprash,<sup>e, 1</sup> Miliana Chouchkova,<sup>i</sup>**  
5 **Sergei V. Kozlov,<sup>k</sup> François Erard,<sup>b</sup> Bernard Ryffel,<sup>b</sup> Valérie Quesniaux,<sup>b</sup> Sergei A.**  
6 **Nedospasov,<sup>c, d, e, 1</sup> and Irene Garcia,<sup>a</sup>**

7 Department of Pathology and Immunology, CMU, Faculty of Medicine, University of  
8 Geneva, Switzerland<sup>a</sup>; University of Orleans and CNRS, UMR7355 and Experimental and  
9 Molecular Immunology and Neurogenetics, Orleans, France<sup>b</sup>; Belozersky Institute of Physico-  
10 Chemical Biology and Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow  
11 119991, Russia<sup>c</sup>; German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute, Berlin  
12 10117, Germany<sup>d</sup>; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
13 Moscow 119991, Russia<sup>e</sup>; Priority Research Area Infections, Research Center Borstel, 23845  
14 Borstel, Germany<sup>g</sup>; German Center for Infection Research, Thematic Translational Unit  
15 Tuberculosis, Germany<sup>h</sup>; BulBio-National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia,  
16 Bulgaria<sup>i</sup>; Laboratory of Integrative Immunology, National Institute of Respiratory Diseases,  
17 Mexico 14080, Mexico<sup>j</sup>; Center for Advanced Preclinical Research, Laboratory Animal  
18 Sciences Program, Leidos Biomed, Inc., Frederick, USA<sup>k</sup>; Laboratory of Experimental  
19 Immunology, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 603950 Nizhni Novgorod,  
20 Russia<sup>1</sup>.

21  
22  
23  
24 **Running title:** TB protection in mice expressing only human TNF

25  
26 **Address correspondence and reprint requests to:** Irene Garcia,  
27 [Irene.garcia-gabay@unige.ch](mailto:Irene.garcia-gabay@unige.ch).

28 \*Present address: Charité, University Medicine Berlin, Medical Clinic for Infection Biology  
29 and Pneumology, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin.

30

31

32 **ABSTRACT**

33 Tumor Necrosis Factor (TNF) is a cytokine that is important for host defence against  
34 pathogens but is also associated with the development of human immunopathologies. TNF  
35 blockade effectively ameliorates many chronic inflammatory conditions but compromises  
36 host immunity to tuberculosis. The search for novel, more specific human TNF blockers  
37 requires the development of a reliable animal model. We used novel mouse model with  
38 complete replacement of mouse TNF gene by its human ortholog (huTNF knockin mice) to  
39 determine resistance to *Mycobacterium bovis* BCG and *M. tuberculosis* infections and to  
40 investigate whether TNF inhibitors of clinical use reduce host immunity. Our results show  
41 that macrophages from huTNF KI mice responded to BCG and LPS by NF- $\kappa$ B activation and  
42 cytokine production similarly to wild-type macrophages. While TNF-deficient mice rapidly  
43 succumbed to mycobacterial infection, huTNF KI mice survived, controlling bacterial burden  
44 and activating bactericidal mechanisms. Administration of TNF neutralising biologics  
45 disrupted the control of mycobacterial infection in huTNF KI mice, leading to increased  
46 bacterial burden and hyperinflammation. Thus, our findings demonstrate that human TNF can  
47 functionally replace murine TNF *in vivo* providing mycobacterial resistance that could be  
48 compromised by TNF neutralization. This new animal model will be helpful for testing  
49 specific biologics neutralizing human TNF.

50

51 **Key words:** Mice humanized for Tumor Necrosis Factor, *M. bovis* BCG infection, *M.*52 *tuberculosis* infection, granuloma formation, anti-TNF treatment, anti-TNF

53 antibodies/biologic

54

## 55 INTRODUCTION

56 Tumor necrosis factor (TNF) is critical for resistance against intracellular bacterial infections,  
57 however, its dysregulation may be associated with the development of human  
58 immunopathologies (1-5). Anti-TNF therapies have shown their efficacy for the treatment of  
59 autoimmune inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease and are  
60 being explored for the treatment of other severe human pathologies such as chronic  
61 obstructive pulmonary disease (6-8). However, the complete blockade of TNF has confirmed  
62 the essential role of TNF in the control of tuberculosis (TB) infection as treated patients  
63 develop both TB and nontuberculous mycobacterial diseases (9-12). TB is still a major  
64 health problem newly affecting in its active form nearly 9 million people every year. One  
65 third of the global population is considered to be infected by *Mycobacterium tuberculosis* in a  
66 latent form (13). *M. bovis* BCG is used for vaccination in countries with high TB incidence  
67 that appears to control severe forms of tuberculosis in children but fails to prevent TB in  
68 adults (14).

69 TNF is initially synthesised as a membrane protein released under activation by infectious and  
70 inflammatory stimuli. Two types of TNF inhibitors blocking membrane and soluble TNF are  
71 currently used to treat inflammatory diseases and comprise anti-TNF antibodies (Infliximab,  
72 Adalimumab, Certolizumab, etc) and soluble TNF receptor 2 (sTNFR2; Etanercept) (15).  
73 These drugs have distinct neutralization efficacy in human diseases, and they are associated  
74 with distinct risks of TB reactivation with the anti-TNF antibody-based drugs being more  
75 pronounced in TB reactivation than sTNFR2 (16, 17). However, mechanistically this  
76 phenomenon is not well understood and cannot be studied in mouse models since the  
77 antibodies are species-specific and only biologics based on TNFR that react with mouse TNF  
78 can be tested *in vivo* (15, 18). To that end, Plessner *et al.* compared soluble murine TNFR2-Fc  
79 to an anti-mouse TNF antibody and reported that while during primary infection both TNF

80 inhibitors had similar effect of exacerbating TB infection, the effect of the sTNFR2 during  
81 chronic infection was lower than that of the antibody due to decreased penetration into  
82 granulomas (19). Nevertheless, most TNF blockers are human-specific and do not interact  
83 with mouse TNF creating one of the limitations to their *in vivo* analysis. To test new  
84 molecules inhibiting human TNF *in vivo* and select the best candidates, a specific mouse  
85 model is required. In the present study, humanized TNF mice in which mouse TNF gene was  
86 replaced by the human TNF gene (human TNF knock-in; huTNF KI) were used to show that  
87 human TNF expressed in mice can functionally substitute for mouse TNF in terms of  
88 development of host immunity in response to mycobacterial infections. We further  
89 demonstrated that anti-human TNF antibodies used in the clinic jeopardize such protection,  
90 validating the use of this animal model for testing the effects of new human-specific TNF-  
91 neutralizing molecules.

92

93 **MATERIAL AND METHODS**

94 **Ethics Statement.** Animal experiments were approved by the Cantonal Veterinary Office  
95 from Geneva (authorization N° 31.1.1005/3202/2), the Ethics Committee for Animal  
96 Experimentation of CNRS Campus Orleans (authorization N° CLE CCO 2012-1001) and the  
97 Ministry of Environment, Nature Protection and Agriculture in Kiel (authorization no. V312-  
98 72241.1123-3(36-3/09).

99 **Mice.** Humanized TNF (huTNF KI) mice were generated by conventional technology of  
100 homologous recombination in embryonic stem cells followed by removal of the positive  
101 selection marker using LoxP-Cre system. Mouse genomic locus containing TNF gene was  
102 replaced by the syntenic portion of the human genome (Supplementary Figure S1), resulting  
103 in full replacement of mouse TNF by its human ortholog (20) (Kruglov et al, manuscript in  
104 preparation). C57BL/6, huTNF KI and TNF KO (21) mice were housed under conventional  
105 conditions at the CMU and SPF conditions at the CNRS (TAAM UPS44, Orleans) and the  
106 RCB.

107 **Bone marrow-derived macrophage culture.** BMDM were derived from bone marrow cells  
108 obtained from femurs and cultured as described (22). BMDM were infected with BCG  
109 Connaught (MOI 1) or activated with LPS (1 µg/mL, *E. coli*; Serotype 0111: B4, Sigma) or  
110 with IFN-γ (100 units/mL) and supernatants were harvested after 24 hrs.

111 **Evaluation of cytokines, chemokines, and TNF bioactivity.** Cytokines (TNF, IFN-γ, IL-  
112 12p40), chemokines (RANTES, MCP-1) were evaluated by ELISA in cellular supernatants,  
113 serum and lungs (homogenized in 0.04% Tween 80/NaCl, 125 mg tissue/mL). TNF  
114 bioactivity of BMDM culture supernatants was measured on WEHI164 cells (subclone 13) as  
115 described (23). Addition of sTNFR1 (5 µg/mL from sTNFR1 tg mouse serum (24) or anti-  
116 TNF (2 µg/mL, MP6-XT22) inhibited TNF bioactivity of samples.

117 **BCG and *M. tuberculosis* infections, colony forming units (CFU) from infected organs**  
118 **and treatment with TNF blockers.** Mice were infected intravenously (i.v.) with  $5 \times 10^6$  CFU  
119 of living BCG strain Sofia (25), or with  $1 \times 10^7$  CFU of living BCG strain Connaught (26) or  
120 with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG Pasteur strain 1173 P2, as indicated. Survival experiments were  
121 pursued for up to 200 days. Intraperitoneal injection of Infliximab (10 mg/kg; Remicade®,  
122 Centocor), or vehicle (0.9 % NaCl) was at day 6 post-infection and twice a week for 3 weeks.  
123 Mice were infected either by intranasal (i.n.) with 1000 CFU or by aerogenic infection with  
124 500 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv using a Glas-Col aerosol infection device, Terre-Haute,  
125 IN. TNF blockers were diluted in 0.9% NaCl and intraperitoneal application started at day 14  
126 post-infection and was continued for 2 weeks. Infliximab (Remicade) and Adalimumab  
127 (Humira) were administered once a week (10 mg/kg) while the treatment with Etanercept  
128 (Enbrel) was done twice weekly (40 mg/kg). Lung bacterial load and pathology were  
129 determined at indicated time points post-infection (27-29).

130 **Histological analyses, Ziehl-Neelsen and acid phosphatase activity.** Histological analyses  
131 of infected organs were done at 4 weeks post-infection on fixed tissues for hematoxylin/eosin  
132 (H&E) and Ziehl-Neelsen (ZN) staining and on frozen livers for acid phosphatase activity  
133 (24). Histopathological analyses were performed on tissue sections from lung and liver using  
134 digital microscopic images acquired by Mirax Digital Slide Scanner and analyzed with  
135 Panoramic Viewer software (Carl Zeiss) (30). For liver analysis, the area with lesions were  
136 quantified and represented as % area with lesions corresponding to area of granulomas /  
137 surface of total liver which was  $50 \pm 11$  mm<sup>2</sup> per liver section and animal. For lung analysis,  
138 the area without and with lesions were quantified in a lung surface of  $40 \pm 18$  mm<sup>2</sup> per lung  
139 section (one or two lobes) and per animal. Data are represented as % free alveolar space  
140 corresponding to % area of lung lesion free / total area of lung. Cellular infiltration, necrosis



141 and oedema were quantified using a semi-quantitative score with increasing severity of  
142 changes (0-5) by two independent observers including a trained pathologist.

143 **Western blot analyses.** Liver proteins and Western blot were performed as described (31).  
144 Primary Ab was either a rabbit polyclonal anti-NF- $\kappa$ B p65 Ab (Santa Cruz Biotech) or a  
145 rabbit monoclonal anti-phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 (Cell Signaling Tech) and secondary a  
146 goat anti-rabbit HRP Ab (Bio-Rad). We used a polyclonal rabbit anti-mouse iNOS  
147 (Calbiochem) and an anti-actin Ab (Sigma-Aldrich). Blots were developed with LumiGlo  
148 chemiluminescent substrate (KPL). The density of bands was quantified by Quantity One<sup>®</sup>  
149 analysis software (Bio-Rad).

150 **Ex vivo stimulation and flow cytometry analyses of splenocytes.** Spleen cells were  
151 prepared from 4 weeks-infected mice (BCG Pasteur,  $5 \times 10^6$  CFU) as described (32).  
152 Splenocytes were stimulated with medium, BCG culture filtrate antigens (CFA; 20  $\mu$ g/mL)  
153 and BCG (MOI 1) and supernatants evaluated for IFN- $\gamma$  and NO. Nitrite content, as an  
154 indicator of NO, was assessed by Griess reagent (31).

155 Flow cytometry on splenocytes was performed using a FACSCyan (Beckman Coulter, Inc),  
156 typically, 50,000 events were acquired. The following Abs were used: anti-CD3 (145-2C11),  
157 anti-CD4 (GK1.5), anti-Ly6G (RB6-8C5), anti-MHC II (M5/114.15.2) and anti-CD11b  
158 (M1/70) from eBioscience (San Diego, CA) and 2.4G2 anti-Fc $\gamma$  RII/III mAb. Data were  
159 analysed with FlowJo software (Tree Star, Inc. Ashland). Data analysis was performed using  
160 FlowJo software (Tree Star). To precisely control the gating were used in parallel for each  
161 mouse isotype controls as well as Fluorescence minus one control.

162 **Statistical analyses.** Statistical analyses were done with GraphPad Prism software (GraphPad  
163 Soft., La Jolla, Calif.). A *P* value < 0.05 was considered as statistically significant.  
164 Experiments with 2 groups were analysed with an unpaired Student *t* test and experiments  
165 with more than two groups with one-way ANOVA and non-parametric Turkey tests.

166

167 **RESULTS**

168 **Cytokine responses and NF- $\kappa$ B activation in BMDM from huTNF KI mice.** To determine  
169 whether macrophages from huTNF KI mice (Supplementary Figure S1) have the capacity to  
170 respond normally to BCG infection and to other stimuli, bone marrow-derived macrophages  
171 (BMDM) from huTNF KI mice were compared to WT cells in their ability to produce  
172 cytokines. Levels of murine TNF induced by BCG, LPS and IFN- $\gamma$  in WT BMDM were  
173 similar to those of human TNF activated in huTNF KI BMDM (Fig. 1A). No measurable  
174 human TNF was released by activated WT murine cells and *vice versa*, indicating that all  
175 assays were species-specific (data not shown). Levels of bioactive TNF made by BCG-  
176 infected BMDM were similar in huTNF KI and WT cell supernatants, as measured by WEHI  
177 cell death induction (Fig. S2A). Concentrations of activated soluble TNFR1 and TNFR2 were  
178 comparable in both WT and huTNF KI BMDM supernatants (Fig. 1B and 1C). IL-6 levels  
179 were similar in huTNF KI and WT, while BCG-infected TNF KO BMDM produced lower IL-  
180 6 amounts (Fig. 1D). Interestingly, BCG-induced MCP-1 expression by huTNF KI BMDM  
181 was significantly lower than that by WT cells (Fig. 1E). To assess whether BMDM from  
182 huTNF KI mice can activate intracellular signalling after BCG infection, NF- $\kappa$ B  
183 phosphorylation patterns were analysed by Western blot. Phosphorylated p65 NF- $\kappa$ B  
184 progressively increased in WT and huTNF KI BMDM after BCG infection and both presented  
185 a similar activation profile, which appeared much lower in TNF KO BMDM (Fig. 1F, 1G and  
186 Fig. S2B). Human TNF is efficiently induced by different stimuli including live mycobacteria  
187 in huTNF KI macrophages lacking endogenous mouse TNF expression.

188

189 **HuTNF KI mice are resistant to BCG infection.** The previous results encouraged us to  
190 explore the ability of human TNF to protect mice from BCG infection *in vivo*. Infection of  
191 huTNF KI, TNF KO and WT mice with BCG (Connaught,  $1 \times 10^7$  CFU) led to rapid death of

192 TNF KO mice with dramatic loss of body weight while both huTNF KI and WT mice resisted  
193 the infection for more than 6 months of the experiment (Fig. 2A and 2B). Similar results were  
194 obtained after infection with BCG Pasteur strain ( $5 \times 10^6$  CFU), with over 4 months survival of  
195 huTNF KI mice (not shown). We then infected mice with the attenuated BCG Sofia strain  
196 ( $5 \times 10^6$  CFU) (25) which allows TNF KO mice to survive for more than 8 weeks after  
197 infection. Liver and lung bacterial loads were highly increased in TNF KO mice at 8 wks after  
198 infection, and less so in huTNF KI mice which harboured intermediate bacterial loads as  
199 compared with WT mice (Fig. 3A and 3B). Histopathologic examination revealed that liver  
200 granulomas of huTNF KI mice were transiently of smaller size but later appeared well-  
201 differentiated and similar to those observed in WT mice correlating with the acid phosphatase  
202 activity which is expressed by activated monocytes/macrophages including epithelioid cells  
203 recruited to liver granulomas as previously described. Granulomas were not formed in the  
204 liver of 4-weeks infected TNF KO mice in which only a weak acid phosphatase activity of  
205 Kupffer cells was observed, and after 8 weeks, granulomas were very small with impaired  
206 acid phosphatase activity (Fig. 3C) (33). Similarly, at 4 weeks infection the number of hepatic  
207 granulomas was transiently lower in huTNF KI than in WT and absent in TNF KO mice but  
208 after 8 weeks infection, similar numbers were observed in both huTNF KI and WT but very  
209 low numbers in TNF KO mice (Fig. 3D). Similar pattern was obtained after analysis of liver  
210 area with lesions (Fig. S3A). We also explored the development of bactericidal mechanisms  
211 such as iNOS activation, a mechanism essential for BCG clearance and mouse survival (34).  
212 Expression of iNOS in huTNF KI and TNF KO mice correlated with the number of liver  
213 granulomas and showed that at 8 weeks post-infection liver from huTNF KI but not TNF KO  
214 expressed functional granulomas at WT mice (Fig. 3E and 3F). These data indicated that  
215 although huTNF KI mice may have a delay in BCG-induced immune responses, these mice  
216 are able to activate bactericidal mechanisms and control the infection.

217

218 **Human TNF expression sustains BCG induction of cytokine and chemokines.** To explore  
219 whether huTNF KI mice respond to BCG infection by producing Th1-type cytokines and  
220 chemokines as WT mice do, the levels of IFN- $\gamma$ , IL-12p40, RANTES and MCP-1 were  
221 evaluated in lungs during BCG infection. IFN- $\gamma$ , IL-12p40, RANTES, and MCP-1 lung levels  
222 of huTNF KI were similar to those of WT but lower in TNF KO mice (Fig. 4A to D).  
223 Cytokine and chemokine serum levels showed more variation in huTNF KI compared to WT  
224 mice at early time infection but at late time point were similar in these two groups of mice  
225 contrasting with dysregulation observed in TNF KO mice (Fig. S2A to S2D). Thus, the  
226 expression of human TNF in huTNF KI mice allowed the expression of IFN- $\gamma$ , IL-12 p40,  
227 RANTES, MCP-1 responses to BCG infection that were impaired in TNF KO mice.

228 We further analysed the capacity of huTNF KI lymphocytes from BCG-infected mice to  
229 respond to antigenic stimulation by production of IFN- $\gamma$ . Re-stimulation of splenocytes with  
230 CFA and BCG showed lower levels of IFN- $\gamma$  in huTNF KI splenocytes than in WT cells at 4  
231 weeks post-infection (Fig. 4E). Nitrite levels were also decreased in huTNF KI splenocytes  
232 after CFA activation, while BCG led to similar NO amounts suggesting that huTNF KI  
233 macrophage function was similar to WT cells (Fig. 4F). We asked if IFN- $\gamma$  production by  
234 huTNF KI splenocytes could be attributed to differences in the number of splenic  
235 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells at this time point. FACS analyses showed that the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell  
236 population was lower in huTNF KI mice, but total numbers of CD11b<sup>+</sup>LY6G<sup>+</sup> (neutrophils)  
237 and CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> (macrophages) were comparable in huTNF KI and WT mice at 4 weeks  
238 post-infection ( Fig. S4).

239 **HuTNF KI mice become sensitive to BCG infection upon treatment with Infliximab.**

240 Inhibition of mouse TNF during BCG infection by anti-mouse TNF antibodies has  
241 demonstrated the critical role of TNF during this infection (24, 35). We now evaluated

242 whether inhibition of human TNF in huTNF KI mice may render animals susceptible to  
243 mycobacterial infection. Anti-human TNF administration to mice at day 6 post-infection and  
244 then twice a week for 3 weeks post-infection, did not affect WT mice but clearly resulted in  
245 increased bacterial loads in both spleen and lungs of huTNF KI mice at four weeks post-  
246 infection (Fig. 5A and 5B). Relative lung weight, as first indicator of lung inflammation, was  
247 increased in Infliximab treated huTNF KI mice but not in vehicle-treated controls (Fig. 5C).  
248 Examination of lung pathology showed large granulomatous lesions and a decrease of free  
249 alveolar spaces that appeared occupied by macrophages, lymphocytes and neutrophils in  
250 huTNF KI mice treated with anti-human TNF but not in WT (Fig. 5D and 5E). Assessment of  
251 liver pathology depicted lower number of granulomas in BCG-infected huTNF KI mice  
252 compared to WT when injected with NaCl. Infliximab treatment of WT mice did not change  
253 liver granuloma pattern, however huTNF KI liver and spleen granulomas appeared more  
254 diffuse after Infliximab treatment and presented cell death (Figure S5). Thus, expression of  
255 human TNF confers susceptibility to anti-human TNF-induced impaired control for BCG  
256 infection.

257

#### 258 **HuTNF KI mice are able to control virulent *M. tuberculosis* infection, while TNF**

259 **blockers render these mice susceptible.** We then asked whether huTNF KI mice were able  
260 to control a virulent *M. tuberculosis* infection. HuTNF KI, TNF KO and WT mice were  
261 infected with *M. tuberculosis* H37Rv (1000 CFU). TNF KO mice were highly susceptible to  
262 *M. tuberculosis* challenge resulting in rapid weight loss after 3 weeks and death within 4  
263 weeks while WT mice survived the infection. Mice expressing human TNF were able to  
264 contain the infection without appreciable body weight loss (Fig. 6A) and survived during the  
265 2 months of the experiment (Fig. 6B) and beyond (follow-up up to 3 months, not shown).  
266 Additionally, TNF KO mice failed to control pulmonary mycobacterial replication within the

267 first 4 weeks of infection and developed bacterial titers 2 log<sub>10</sub> higher than WT mice, while  
268 the mycobacterial burden in huTNF KI mice was controlled, similar to the levels observed in  
269 WT mice (Fig. 6C). Increase in relative lung weight was a first indication of overall lung  
270 inflammation that correlated with bacillary burden (Fig. 6D). Lung macroscopy showed no  
271 difference between WT and huTNF KI mice (Fig. 6E). Histological assessment documented  
272 well organized pulmonary granulomas in huTNF KI mice, characterized by the accumulation  
273 of macrophages and lymphocytes, in part with perivascular and peribronchiolar lymphocyte  
274 cuffing, and without necrotic areas, that appeared better structured than in WT mice. In  
275 contrast, TNF KO mice displayed massive mononuclear and neutrophil infiltration with  
276 extensive necrosis and edema without typical granulomas (Fig. 6F). In line with the high  
277 bacterial counts, ZN staining of infected lung tissue of TNF KO mice revealed abundant  
278 mycobacteria in necrotic areas, while only few scattered mycobacteria were observed in the  
279 lungs of huTNF KI or WT mice (Fig. 6G). Free alveolar space and histological scores  
280 confirmed that the lung pathology of huTNF KI mice appeared similar to that of WT mice  
281 (Fig. 6H and 6I). Thus, the expression of human TNF is sufficient for the host to control *M.*  
282 *tuberculosis* infection.

283 Three clinically used TNF blockers were compared side-by-side in huTNF KI mice infected  
284 with *M. tuberculosis* (500 CFU, aerogenic infection). Thereby, infected huTNF KI were  
285 treated with either Infliximab, Etanercept or Adalimumab starting at 2 weeks post-infection  
286 for 2 weeks. Histological assessment of infected lung tissue at 4 weeks infection revealed that  
287 all three drugs affected granuloma integrity, characterized by massive and disorganized  
288 cellular infiltrations with large necrotic areas and eruption into bronchi. ZN staining for acid-  
289 fast bacilli revealed that granulomas of anti-TNF treated mice contained an overwhelming  
290 number of mycobacteria (Fig. 7A). Regarding the overall extent and quality of lung  
291 pathology, no major differences between the three different anti-TNF-regimens were observed

292 for these doses of the drugs, although huTNF-KI mice treated with Etanercept appeared to  
293 have developed somewhat smaller lesions. Lung bacterial burden was also evaluated and was  
294 more than 100-fold higher following treatment with either one of the three reagents when  
295 compared to mock-treated controls (Fig. 7B). Thus, during primary infection treatment with  
296 either TNF-targeted reagent was equally detrimental, resulting in uncontrolled replication of  
297 mycobacteria and disorganized granuloma formation. These data confirm that huTNF KI mice  
298 allow evaluation of human TNF-neutralizing agents in terms of their detrimental effect on  
299 host defense mechanisms against mycobacterial infections.

300

301 **DISCUSSION**

302 Our data demonstrate that human TNF can replace mouse TNF in its capacity to efficiently  
303 induce host immunity against BCG and *M. tuberculosis* infections in mice. This study also  
304 shows that *in vitro* mouse macrophages from huTNF KI mice respond to infectious and  
305 inflammatory stimuli as well as WT macrophages by secreting cytokines, chemokines and by  
306 activating intracellular signalling. *In vivo* huTNF KI mice survived mycobacterial infections,  
307 developed Th1 type immune responses and host defense mechanisms to control the infection.  
308 During BCG infection, we noticed a delay in liver granuloma formation and IFN- $\gamma$  responses  
309 in huTNF KI compared to WT mice but this was compensated as evidenced by regulated  
310 responses overcoming the infection. Based on these results we conclude that human TNF in  
311 these mice is sufficient for the control of mycobacterial infections. In addition, huTNF KI  
312 mice treated with anti-human TNF antibodies used in the clinic became sensitive to  
313 mycobacterial infections validating the use of this animal model for testing potential adverse  
314 effects of new specific anti-human TNF interacting molecules.

315

316 Human TNF is known to interact with mouse TNFR1, which is mediating Th1 immune  
317 responses and controlling TB infection (36). This study shows that cells from huTNF KI mice  
318 activate intracellular signaling through TNFR1 similarly to WT cells. In addition, the release  
319 of TNFR1 and TNFR2 after several stimuli was comparable in huTNF and WT macrophages.  
320 TNFR2 has been previously shown to interact preferentially with transmembrane TNF which  
321 plays a protective role during acute TB infection in the absence of released TNF (37). TNFR2  
322 has been shown to play a minor role during BCG infection (38), but upregulation and release  
323 of TNFR2 during *M. avium* infection was proposed to modulate TNF anti-bacterial activities  
324 (39). *M. tuberculosis* induced release of TNFR2 neutralizing TNF was proposed as a  
325 mechanism of evasion (40). Recently, TNFR2 has been considered to play a detrimental role



326 via TNF neutralization by sTNFR2 during TB, with complete absence of TNFR2 leading to  
327 increased control of bacterial infection and survival (41).

328 Anti-TNF therapy is efficient in the treatment of inflammatory disease demonstrating the  
329 critical role of TNF in the development of pro-inflammatory cascades sustaining chronic  
330 autoimmune inflammatory diseases. However, its inhibition has detrimental side effects that  
331 can be related to TNF activity in immune homeostasis and in host defense mechanisms (3). A  
332 critical role of TNF and TNFR1 in granuloma integrity and in the control of mycobacterial  
333 growth has been shown (42). The two types of clinically used TNF neutralizing biologics,  
334 antibodies versus sTNFR, showed distinct effects during infection underscoring different risks  
335 of TB reactivation. To explain these differential effects, several mouse models comparing  
336 anti-mouse TNF antibodies and murine sTNFR2 have been reported (19). In addition,  
337 computational models have been developed and effects attributed to different binding kinetics  
338 and permeability of the two drugs (15, 18). However, a complete mechanistic explanation for  
339 such differences is still lacking. Our results reveal no differential effect on the overall failure  
340 to contain TB following treatment with three different anti-TNF reagents. They are proof of  
341 principle that efficient TNF neutralization is detrimental for TB control, but provide no  
342 evidence that any one of the reagents is superior in terms of reducing the risk of TB  
343 reactivation. In future experiments, huTNF KI mice may be used to elucidate potential  
344 differences in the underlying molecular mechanisms of TNF neutralization by different  
345 reagents, particularly when other routes and times of administration as well as dose titration  
346 experiments of novel TNF-targeted drugs are performed. In addition, development of next  
347 generation human TNF blockers may now include testing in a TNF-humanized animal model  
348 expressing only human TNF for studying both, therapeutic effects and side effects, of the  
349 drugs.

350

351 In conclusion, huTNF KI mice represent a useful animal model system allowing comparative  
352 evaluation of various species-specific human TNF neutralizing drugs in compromising host  
353 defense functions that constitute a clinically important dark side of systemic anti-TNF  
354 therapy. This novel humanized TNF animal model will be helpful for predicting the risk of  
355 TNF blocking biologics in patients to reactivate tuberculosis infection.

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374 **ACKNOWLEDGMENTS**

375 We thank S. Rose, R. Vacher, and C. Gabay for their various contributions throughout the  
376 project. This work was supported by the FNS (31-46833), Joint Swiss-Russia Cooperation  
377 Program, Ligue Pulmonaire Genevoise (to IG), EU FP7 grant TB-REACT, Region Centre,  
378 France (to VQ and BR), a special grant from Wyeth (to SE and SAN), a BMBF grant (TTU  
379 Tuberculosis: German Center for Infection Research; to SE and KW), by MCB Program from  
380 the Russian Academy of Sciences and by Russian Federation Government and Ministry of  
381 Education and Science of RF (contract No. 14.Z50.31.0008 of 19.03.2014) (to SAN), by  
382 Fondation Ernst et Lucie Schmidheiny (to MLO) and by the Consejo Nacional de Ciencia y  
383 Tecnología (CONACyT), México (fellowship 207760 to LCG).

384

385

386

## 387 REFERENCES

- 388 1. **Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH.** 2012. Historical perspectives on tumor necrosis  
389 factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**:651-665.
- 390 2. **Kruglov AA, Kuchmiy A, Grivennikov SI, Tumanov AV, Kuprash DV,**  
391 **Nedospasov SA.** 2008. Physiological functions of tumor necrosis factor and the  
392 consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine*  
393 *Growth Factor Rev* **19**:231-244.
- 394 3. **Vassalli P.** 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*  
395 **10**:411-452.
- 396 4. **Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D.** 1999. On the role of tumor  
397 necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis,  
398 multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* **169**:175-194.
- 399 5. **Garcia I, Olleros ML, Quesniaux VF, Jacobs M, Allie N, Nedospasov SA,**  
400 **Szymkowski DE, Ryffel B.** 2011. Roles of soluble and membrane TNF and related  
401 ligands in mycobacterial infections: effects of selective and non-selective TNF  
402 inhibitors during infection. *Adv Exp Med Biol* **691**:187-201.
- 403 6. **Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP.** 2008. Tumor necrosis  
404 factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*  
405 **117**:244-279.
- 406 7. **Rennard SI, Flavin SK, Agarwal PK, Lo KH, Barnathan ES.** 2013. Long-term  
407 safety study of infliximab in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary  
408 disease. *Respir Med* **107**:424-432.
- 409 8. **Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, Long W, Ramsdell J, Allison J, Mahler D,**  
410 **Saadeh C, Siler T, Snell P, Korenblat P, Smith W, Kaye M, Mandel M, Andrews**  
411 **C, Prabhu R, Donohue JF, Watt R, Lo KH, Schlenker-Herceg R, Barnathan ES,**  
412 **Murray J, Investigators C.** 2007. The safety and efficacy of infliximab in moderate  
413 to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **175**:926  
414 934.
- 415 9. **Keane J.** 2005. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old  
416 topic. *Rheumatology (Oxford)* **44**:714-720.
- 417 10. **Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ,**  
418 **Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G,**  
419 **Scholvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P,**  
420 **Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori GB, Lange C.** 2010. The risk of  
421 tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET  
422 consensus statement. *Eur Respir J* **36**:1185-1206.
- 423 11. **Wallis RS.** 2008. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and  
424 tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis* **8**:601-611.
- 425 12. **Yoo JW, Jo KW, Kang BH, Kim MY, Yoo B, Lee CK, Kim YG, Yang SK, Byeon**  
426 **JS, Kim KJ, Ye BD, Shim TS.** 2014. Mycobacterial diseases developed during anti-  
427 tumour necrosis factor-alpha therapy. *Eur Respir J* **44**:1289-1295.
- 428 13. **Dye C, Fine PE.** 2013. A major event for new tuberculosis vaccines. *Lancet* **381**:972  
429 974.
- 430 14. **Dye C, Glaziou P, Floyd K, Raviglione M.** 2013. Prospects for tuberculosis  
431 elimination. *Annu Rev Public Health* **34**:271-286.
- 432 15. **Wallis RS, Ehlers S.** 2005. Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining  
433 the differential infection risk of etanercept and infliximab. *Semin Arthritis Rheum*  
434 **34**:34-38.

- 435 16. **Wallis RS.** 2009. Infectious complications of tumor necrosis factor blockade. *Curr*  
436 *Opin Infect Dis* **22**:403-409.
- 437 17. **Marino S, Sud D, Plessner H, Lin PL, Chan J, Flynn JL, Kirschner DE.** 2007.  
438 Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are  
439 based on bioavailability in granulomatous tissue. *PLoS Comput Biol* **3**:1909-1924.
- 440 18. **Fallahi-Sichani M, Flynn JL, Linderman JJ, Kirschner DE.** 2012. Differential risk  
441 of tuberculosis reactivation among anti-TNF therapies is due to drug binding kinetics  
442 and permeability. *J Immunol* **188**:3169-3178.
- 443 19. **Plessner HL, Lin PL, Kohno T, Louie JS, Kirschner D, Chan J, Flynn JL.** 2007.  
444 Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) by antibody but not TNF receptor  
445 fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis. *J Infect Dis* **195**:1643-1650.
- 446 20. **Winsauer C, Kruglov AA, Chashchina AA, Drutskaya MS, Nedospasov SA.** 2014.  
447 Cellular sources of pathogenic and protective TNF and experimental strategies based  
448 on utilization of TNF humanized mice. *Cytokine Growth Factor Rev* **25**:115-123.
- 449 21. **Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A,**  
450 **Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ.** 1997. Characterization of tumor  
451 necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:8093-8098.
- 452 22. **Fotio AL, Olleros ML, Vesin D, Tauzin S, Bisig R, Dimo T, Nguenefack TB,**  
453 **Dongo E, Kamtchoung P, Garcia I.** 2010. In vitro inhibition of lipopolysaccharide  
454 and mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin-induced inflammatory cytokines  
455 and in vivo protection from D-galactosamine/LPS -mediated liver injury by the  
456 medicinal plant *Sclerocarya birrea*. *Int J Immunopathol Pharmacol* **23**:61-72.
- 457 23. **Olleros ML, Vesin D, Lambou AF, Janssens JP, Ryffel B, Rose S, Fremont C,**  
458 **Quesniaux VF, Szymkowski DE, Garcia I.** 2009. Dominant-negative tumor necrosis  
459 factor protects from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin (BCG) and  
460 endotoxin-induced liver injury without compromising host immunity to BCG and  
461 Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* **199**:1053-1063.
- 462 24. **Garcia I, Miyazaki Y, Araki K, Araki M, Lucas R, Grau GE, Milon G, Belkaid**  
463 **Y, Montixi C, Lesslauer W, et al.** 1995. Transgenic mice expressing high levels of  
464 soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral  
465 malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major*  
466 infections. *Eur J Immunol* **25**:2401-2407.
- 467 25. **Stefanova T, Chouchkova M, Hinds J, Butcher PD, Inwald J, Dale J, Palmer S,**  
468 **Hewinson RG, Gordon SV.** 2003. Genetic composition of Mycobacterium bovis  
469 BCG strain Sofia. *J Clin Microbiol* **41**:5349.
- 470 26. **Olleros ML, Vesin D, Bisig R, Santiago-Raber ML, Schuepbach-Mallepell S,**  
471 **Kollias G, Gaide O, Garcia I.** 2012. Membrane-bound TNF induces protective  
472 immune responses to *M. bovis* BCG infection: regulation of memTNF and TNF  
473 receptors comparing two memTNF molecules. *PLoS One* **7**:e31469.
- 474 27. **Allie N, Keeton R, Court N, Abel B, Fick L, Vasseur V, Vacher R, Olleros ML,**  
475 **Drutskaya MS, Guler R, Nedospasov SA, Garcia I, Ryffel B, Quesniaux VF,**  
476 **Jacobs M.** 2010. Limited Role for Lymphotoxin alpha in the Host Immune  
477 Response to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* doi:jimmunol.1000650 [pii]  
478 10.4049/jimmunol.1000650.
- 479 28. **Ehlers S, Holscher C, Scheu S, Tertilt C, Hehlgans T, Suwinski J, Endres R,**  
480 **Pfeffer K.** 2003. The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling  
481 infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and *Listeria*  
482 *monocytogenes*. *J Immunol* **170**:5210-5218.

- 483 29. **Guler R, Olleros ML, Vesin D, Parapanov R, Garcia I.** 2005. Differential effects of  
484 total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to  
485 *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Infect Immun* **73**:3668-3676.
- 486 30. **Segueni N, Vigne S, Palmer G, Bourigault ML, Olleros ML, Vesin D, Garcia I,**  
487 **Ryffel B, Quesniaux VF, Gabay C.** 2015. Limited Contribution of IL-36 versus IL-1  
488 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection. *PLoS One*  
489 **10**:e0126058.
- 490 31. **Olleros ML, Vesin D, Fotio AL, Santiago-Raber ML, Tauzin S, Szymkowski DE,**  
491 **Garcia I.** 2010. Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced  
492 hepatitis. *J Hepatol* **53**:1059-1068.
- 493 32. **Olleros ML, Guler R, Corazza N, Vesin D, Eugster HP, Marchal G, Chavarot P,**  
494 **Mueller C, Garcia I.** 2002. Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated  
495 immunity and resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection  
496 in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* **168**:3394-3401.
- 497 33. **Garcia I, Miyazaki Y, Marchal G, Lesslauer W, Vassalli P.** 1997. High sensitivity  
498 of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial  
499 infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of  
500 protective granulomas. *Eur J Immunol* **27**:3182-3190.
- 501 34. **Garcia I, Guler R, Vesin D, Olleros ML, Vassalli P, Chvatchko Y, Jacobs M,**  
502 **Ryffel B.** 2000. Lethal *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection in  
503 nitric oxide synthase 2-deficient mice: cell-mediated immunity requires nitric oxide  
504 synthase 2. *Lab Invest* **80**:1385-1397.
- 505 35. **Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P.** 1989. The inducing role  
506 of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG  
507 infection. *Cell* **56**:731-740.
- 508 36. **Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ,**  
509 **Schreiber R, Mak TW, Bloom BR.** 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in  
510 the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice.  
511 *Immunity* **2**:561-572.
- 512 37. **Dambuza I, Allie N, Fick L, Johnston N, Fremont C, Mitchell J, Quesniaux VF,**  
513 **Ryffel B, Jacobs M.** 2008. Efficacy of membrane TNF mediated host resistance is  
514 dependent on mycobacterial virulence. *Tuberculosis (Edinb)* **88**:221-234.
- 515 38. **Jacobs M, Brown N, Allie N, Chetty K, Ryffel B.** 2000. Tumor necrosis factor  
516 receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity. *Pathobiology* **68**:68-75.
- 517 39. **Corti A, Fattorini L, Thoresen OF, Ricci ML, Gallizia A, Pelagi M, Li Y, Orefici**  
518 **G.** 1999. Upregulation of p75 tumor necrosis factor alpha receptor in *Mycobacterium*  
519 *avium*-infected mice: evidence for a functional role. *Infect Immun* **67**:5762-5767.
- 520 40. **Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG.** 1998. Pathogenic  
521 *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-  
522 R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* **161**:2636-2641.
- 523 41. **Keeton R, Allie N, Dambuza I, Abel B, Hsu NJ, Sebesho B, Randall P, Burger P,**  
524 **Fick E, Quesniaux VF, Ryffel B, Jacobs M.** 2014. Soluble TNFRp75 regulates host  
525 protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* **124**:1537  
526 1551.
- 527 42. **Fallahi-Sichani M, El-Kebir M, Marino S, Kirschner DE, Linderman JJ.** 2011.  
528 Multiscale computational modeling reveals a critical role for TNF-alpha receptor 1  
529 dynamics in tuberculosis granuloma formation. *J Immunol* **186**:3472-3483.
- 530  
531

532 **Figure Legends:**

533 **FIG 1.** BMDM from huTNF KI mice respond to BCG, LPS, and IFN $\gamma$  as WT cells producing  
534 cytokines, chemokines and phosphorylate p65 NF- $\kappa$ B upon BCG infection. BMDM from  
535 huTNF KI and WT mice were activated for 24h with BCG Connaught (MOI 1), LPS or IFN $\gamma$ .  
536 (A), murine TNF in supernatants of WT BMDM and human TNF, in supernatants of huTNF  
537 KI BMDM, (B) soluble TNFR1 and (C) TNFR2, levels of IL-6 (D) and MCP-1 (E) were  
538 determined in culture supernatants ( $n = 6$ ). (F) Phosphorylated and non-phosphorylated p65  
539 NF- $\kappa$ B proteins were detected by Western blot in uninfected or infected BMDM with BCG at  
540 different time points, one representative out of three Western blot is shown. (G) The graph  
541 represents ratio of phosphorylate versus non phosphorylated NF- $\kappa$ Bp65 bands from three  
542 Western blots corresponding to three experiments. Quantification was done by Quantity One<sup>®</sup>  
543 analysis software and represented as relative units of phosphorylated p65 NF- $\kappa$ B / total p65  
544 NF- $\kappa$ B ( $n = 3$ /group). Bar graphs show mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus WT.

545

546 **FIG 2.** Humanized TNF KI mice survive to BCG infection as WT mice

547 (A) Body weight changes after infection of WT, huTNF KI and TNF KO mice with BCG  
548 Connaught ( $10 \times 10^6$  CFU). (B) Survival of BCG-infected mice was monitored for more than  
549 200 days post-infection ( $n = 7$  WT,  $n = 9$  huTNF KI,  $n = 3$  TNFKO).

550 **FIG 3.** Bacterial load, granuloma formation and iNOS expression in huTNF KI mice during  
551 BCG infection. Liver and lung bacterial load in WT, huTNF KI and TNF KO mice at (A) 4  
552 and (B) 8 wks after BCG infection ( $5 \times 10^6$  CFU of BCG Sofia strain) ( $n = 9$  for WT and  
553 huTNF KI,  $n = 4$  TNF KO). (C), Microscopic examination of liver granulomas in WT, huTNF  
554 KI, and TNF KO mice after H&E staining (magnification 400x) and acid phosphatase  
555 activity (magnification 400x) on liver sections at 4 and 8 weeks after infection. Liver sections  
556 show granulomas in WT mice compared with granulomas in huTNF KI and absence in TNF

557 KO mice and the active monocytes/macrophages expressing acid phosphatase activity  
558 forming granulomas (activity is colored in red). Data are representative of two experiments ( $n$   
559 = 6-7 per group). (D) number of liver granulomas was assessed in WT, huTNF KI, and TNF  
560 KO mice 4 weeks post-infection and in WT and huTNF KI mice at 8 weeks infection ( $n = 6$   
561 for WT,  $n=10$  for huTNF KI and  $n=3$  for TNF KO mice). E), Relative units of hepatic iNOS  
562 protein expression 4 and 8 weeks after BCG infection on Western blot was done by Quantity  
563 One<sup>®</sup> analysis software on three different experiments, relative units of iNOS/actin. F),  
564 Representative Western blot revealing iNOS and actin ( $n = 8$  for WT and huTNF KI and  $n = 3$   
565 for TNFKO mice). Bar graphs show mean  $\pm$  SEM (\*,  $p<0.05$  versus WT).

566

567 **FIG 4.** Pulmonary levels of cytokines and chemokines during BCG infection and after ex-  
568 vivo splenocyte stimulation. (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-12p40, (C), RANTES and (D) MCP-1 lung  
569 levels were assessed at the indicated time points post-infection in WT, huTNF KI and TNF  
570 KO mice ( $n = 4-9$  per group). (E) IFN- $\gamma$  and (F) nitrite were evaluated in culture  
571 supernatants of splenocytes derived from 4 weeks BCG-infected mice after incubation with  
572 CFA (20  $\mu$ g/mL) or BCG Pasteur (MOI 1) ( $n = 4$  animals/group). Bar graphs show mean  $\pm$   
573 SEM, \*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ , \*\*\*,  $p<0.001$ , \*\*\*\*,  $p<0.0001$  versus WT . NT, not treated;  
574 CFA, culture filtrate antigens.

575

576 **FIG 5.** HuTNF KI mice become sensitive to BCG infection upon Infliximab treatment. (A)  
577 Spleen and (B) lung bacterial loads in WT and huTNF KI animals treated with Infliximab or  
578 vehicle (at day 6 of infection and twice a week), after 4 weeks of BCG Pasteur infection (i.v.  
579  $5 \times 10^6$  CFU) ( $n = 5$  mice/group). (C) Relative lung weight of BCG-infected mice at 4 weeks  
580 post-infection. (D) Microscopic examination (H&E) of lungs from WT and huTNF KI at 4  
581 weeks infection and treated with Infliximab (magnification 10x and 20x), one experiment



582 representative of 5 independent experiments. (E) Percentage of free alveolar space in lung  
583 from WT and huTNF KI at 4 weeks infection and treated with Infliximab ( $n = 10$   
584 mice/group). Bar graphs show mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  versus WT.

585

586 **FIG 6.** Human TNF sustains host control of acute *M. tuberculosis* infection in huTNF KI  
587 mice. WT, TNF KO and huTNF KI mice were infected *M. tuberculosis* H37Rv (i.n., 1000  
588 CFU/lung) and monitored for (A) body weight ( $n = 19$  WT,  $n = 22$ , huTNF KI,  $n = 5$  TNF  
589 KO) and (B) survival ( $n = 8-10$ ), data are mean values from one experiment representative of  
590 2 independent experiments. (C) Pulmonary bacterial load or CFU and (D) Lung weight in  
591 WT, huTNF KI and TNF KO animals was measured at 4 weeks post-infection ( $n = 5$ /group).  
592 (E) Macroscopic examination of infected lungs. (F) and (G) microscopic examination of WT,  
593 huTNF KI, TNF KO mice on day 28 after infection using H&E (F; magnification 50 x and  
594 200 x) or Ziehl-Neelsen staining (G; magnification 50x and 400x).. (H) and (I) Semi-  
595 quantitative scores of inflammatory cell infiltration to the lung, necrosis and oedema on day  
596 28 ( $n = 5$ /group). Bar graphs show mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  versus WT.

597

598 **FIG 7.** Validation of huTNF KI mice for evaluation and comparison of anti-human TNF  
599 compounds in *M. tuberculosis*-infected mice. (A) Lung pathology in WT, huTNF KI and  
600 TNF-depleted huTNF KI mice treated with Infliximab (10 mg/kg once a week, Etanercept (40  
601 mg/kg twice a week) and Adalimumab 10mg/kg (once a week) after aerosol infection with *M.*  
602 *tuberculosis*. Sections from diluent (NaCl) and anti-TNF treated mice at 4 weeks post-  
603 infection stained with H&E to compare quantity and quality of granuloma formation  
604 (magnification 40x) or by the Ziehl-Neelsen method for acid-fast bacilli (magnification 400x).  
605 (B) Bacterial burden in the lung of WT, huTNF KI mice and huTNF KI mice treated with 3  
606 anti-huTNF reagents 4 weeks after aerosol infection with *M. tuberculosis* ( $n = 4-6$  /group). Bar

607 graphs show mean  $\pm$  SD. Log-transformed data was statistically analysed using one way  
608 ANOVA and Bonferroni's posthoc test; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  versus vehicle treated huTNFKI  
609 group.

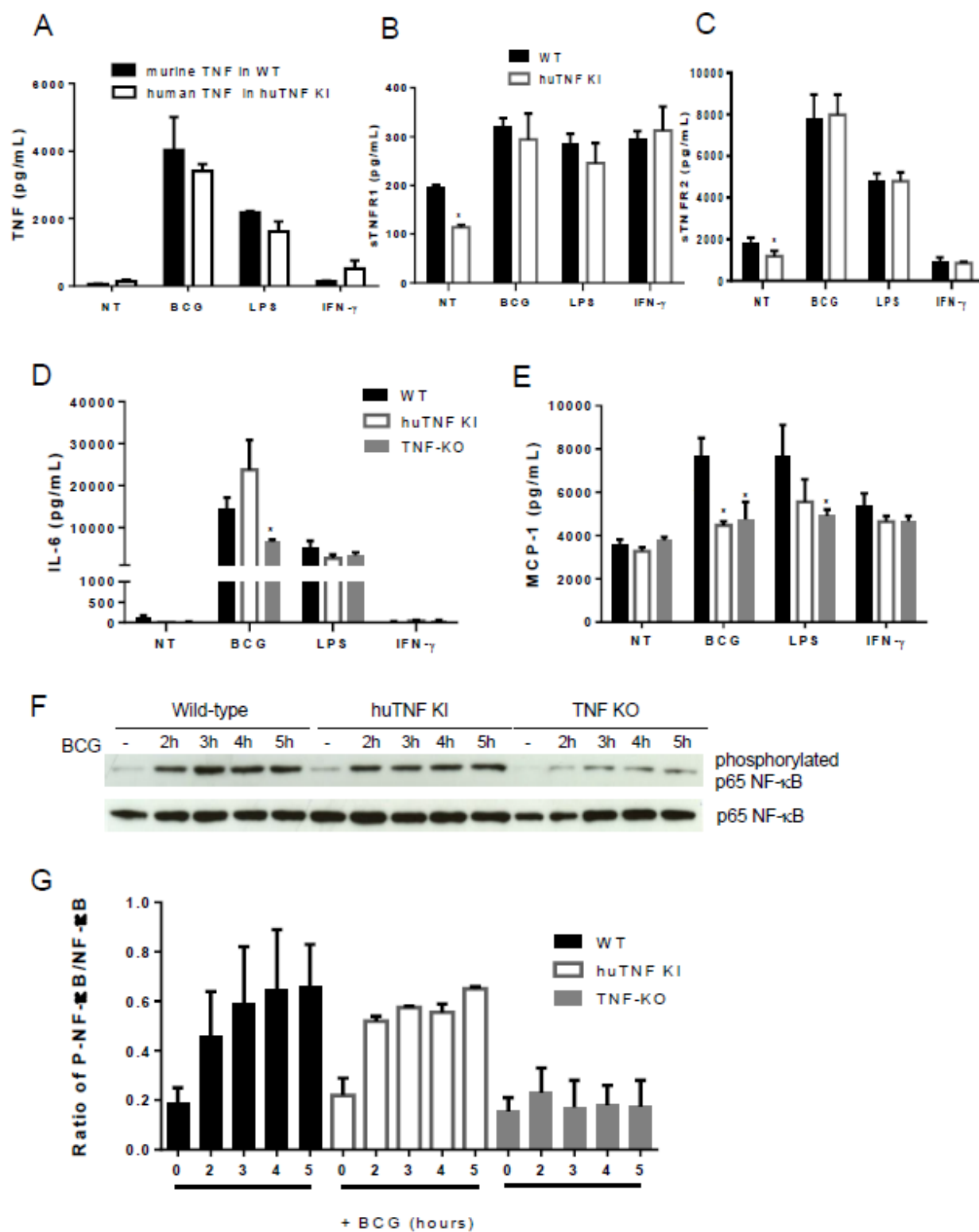


Figure 1

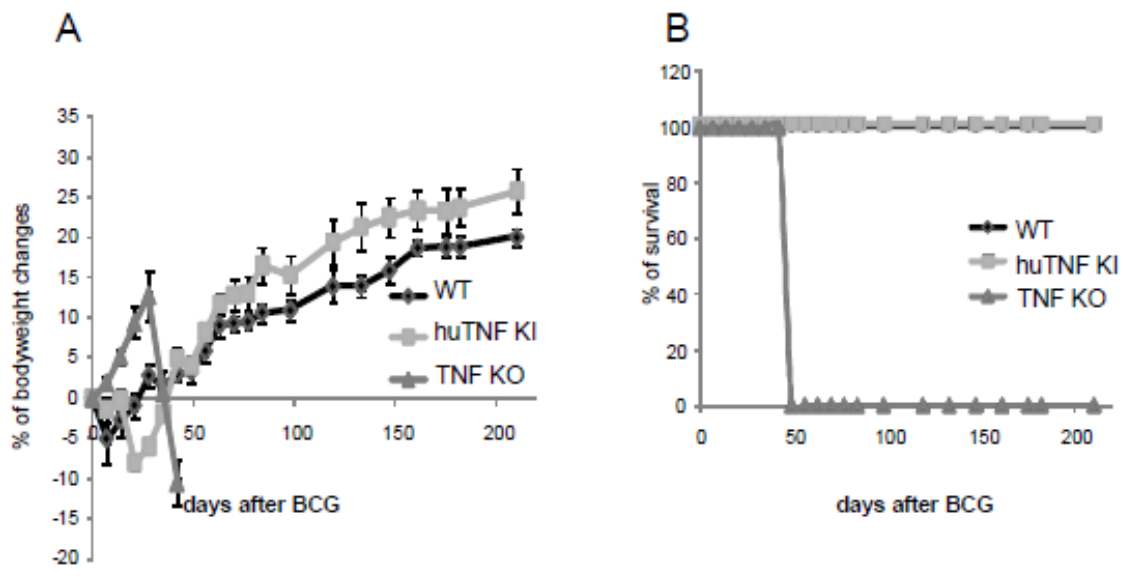


Figure 2

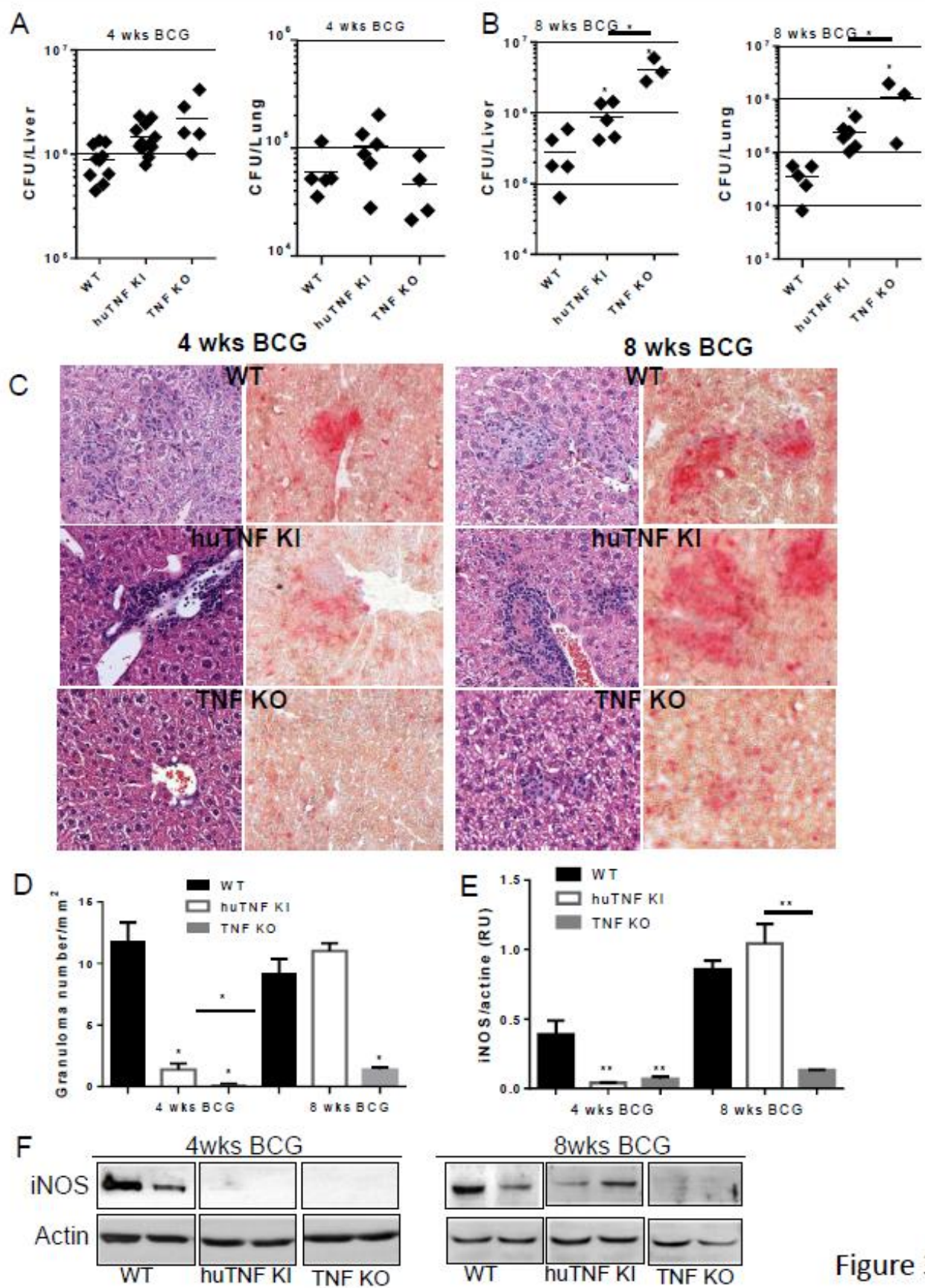


Figure 3

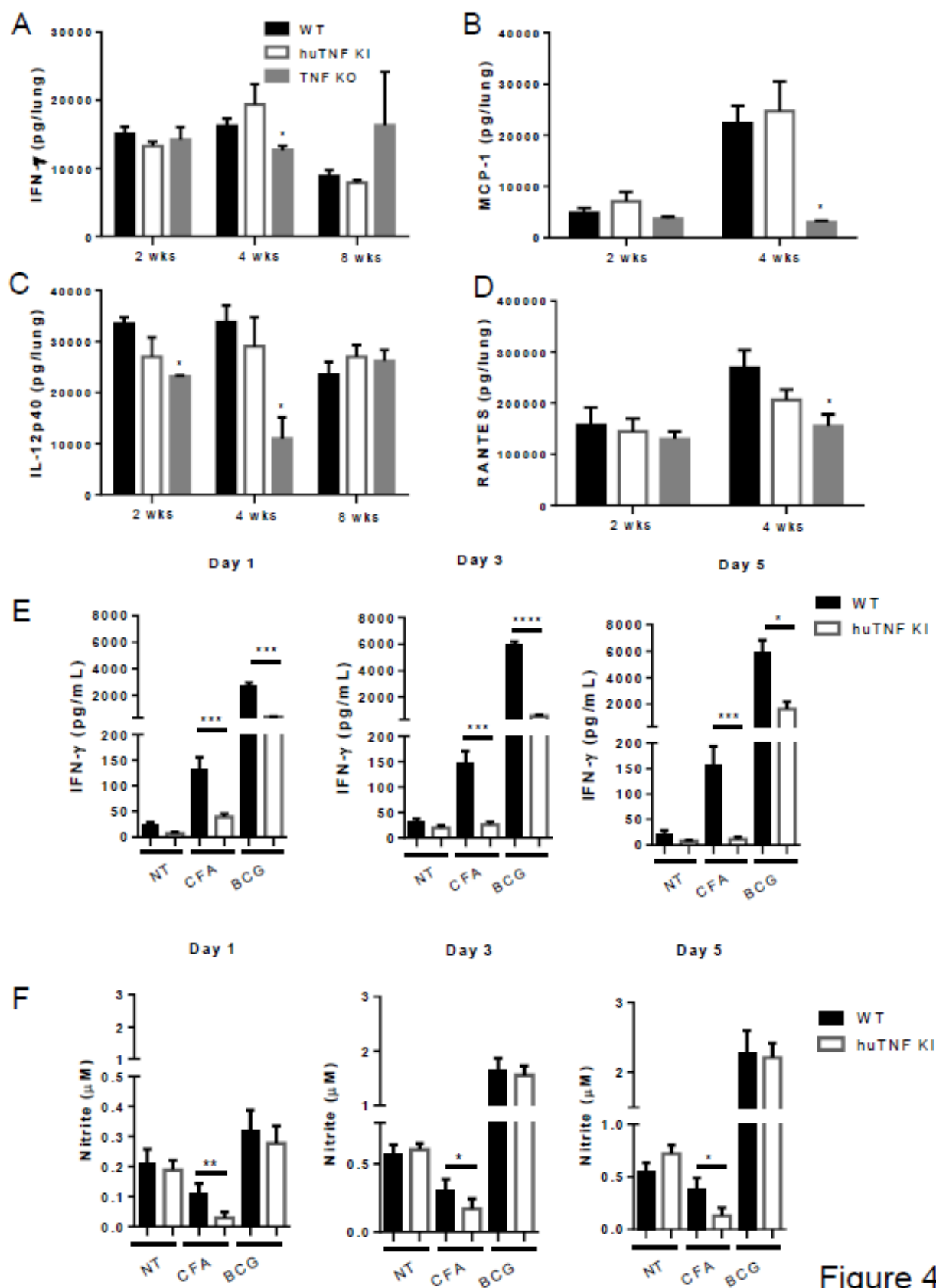


Figure 4

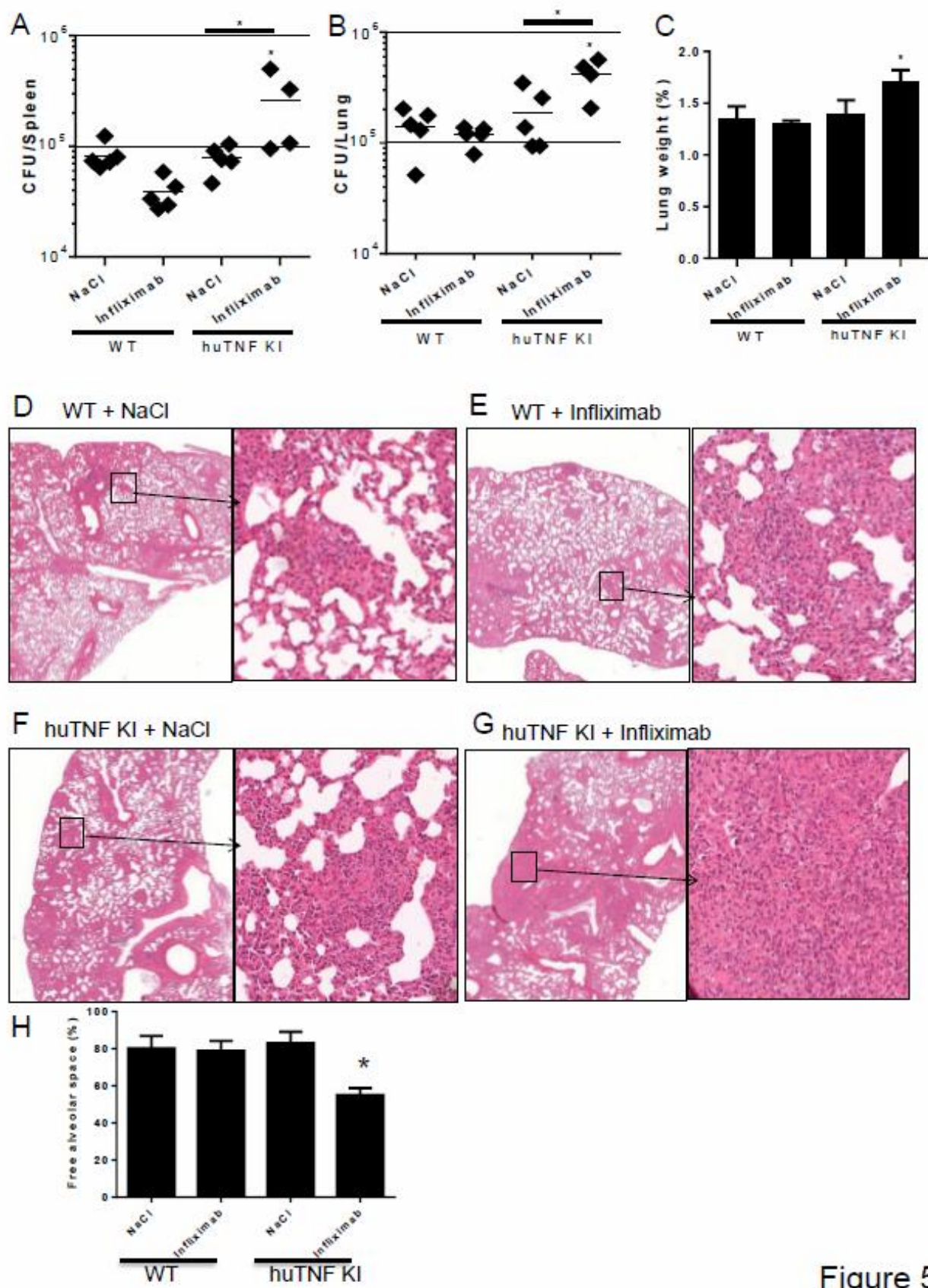


Figure 5

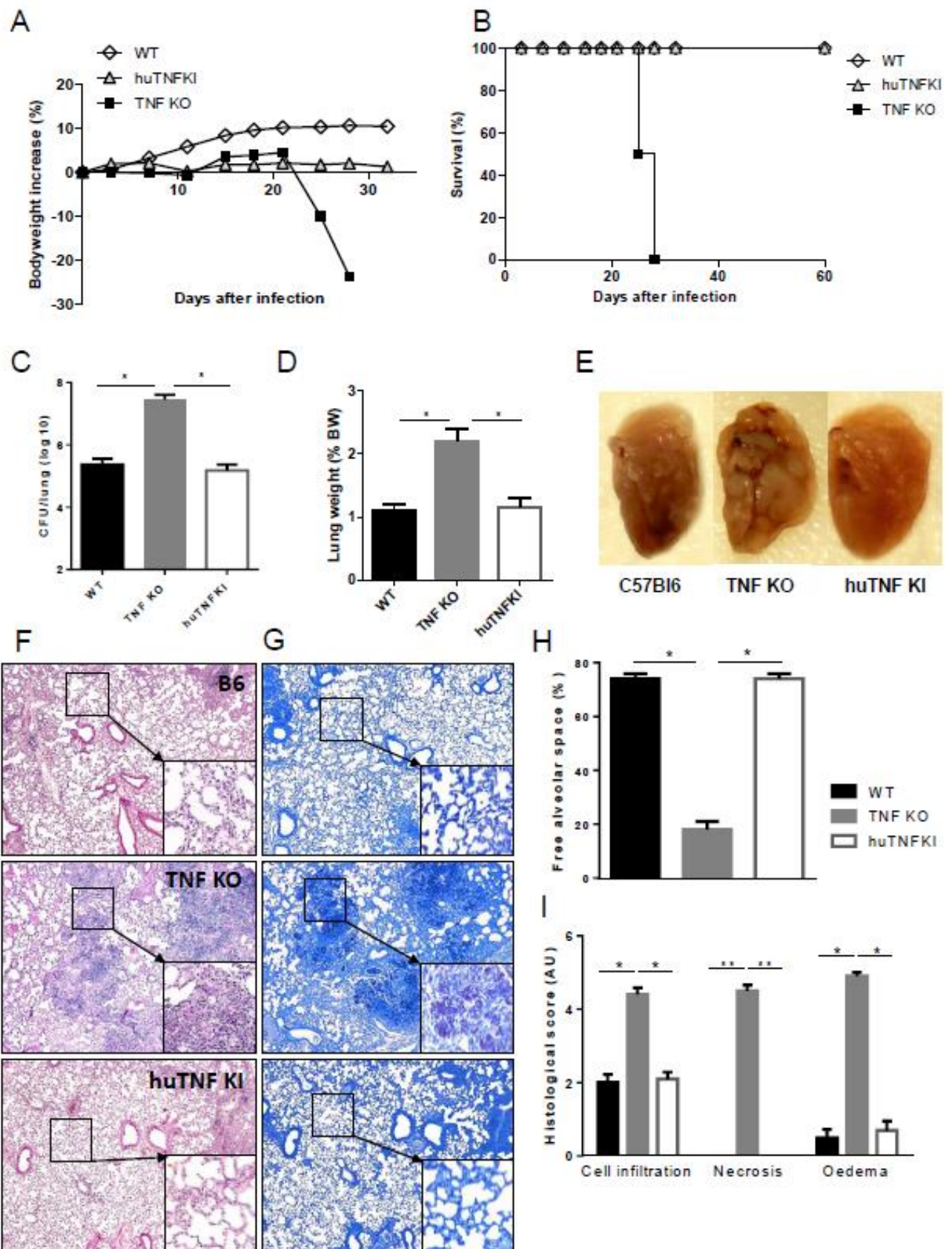


Figure 6



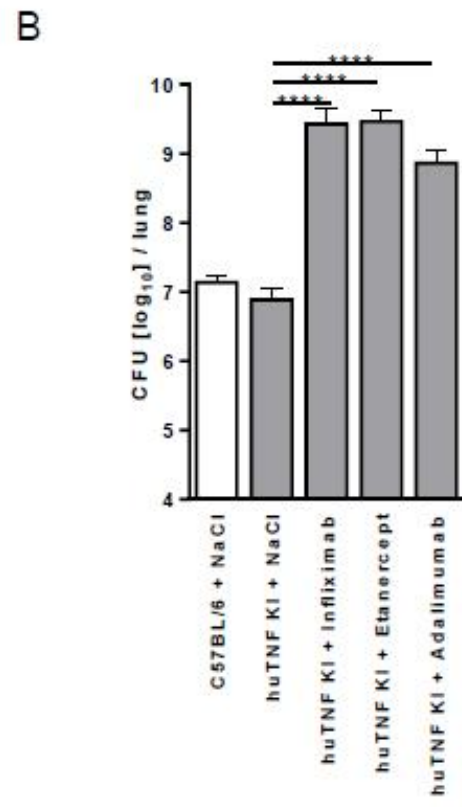
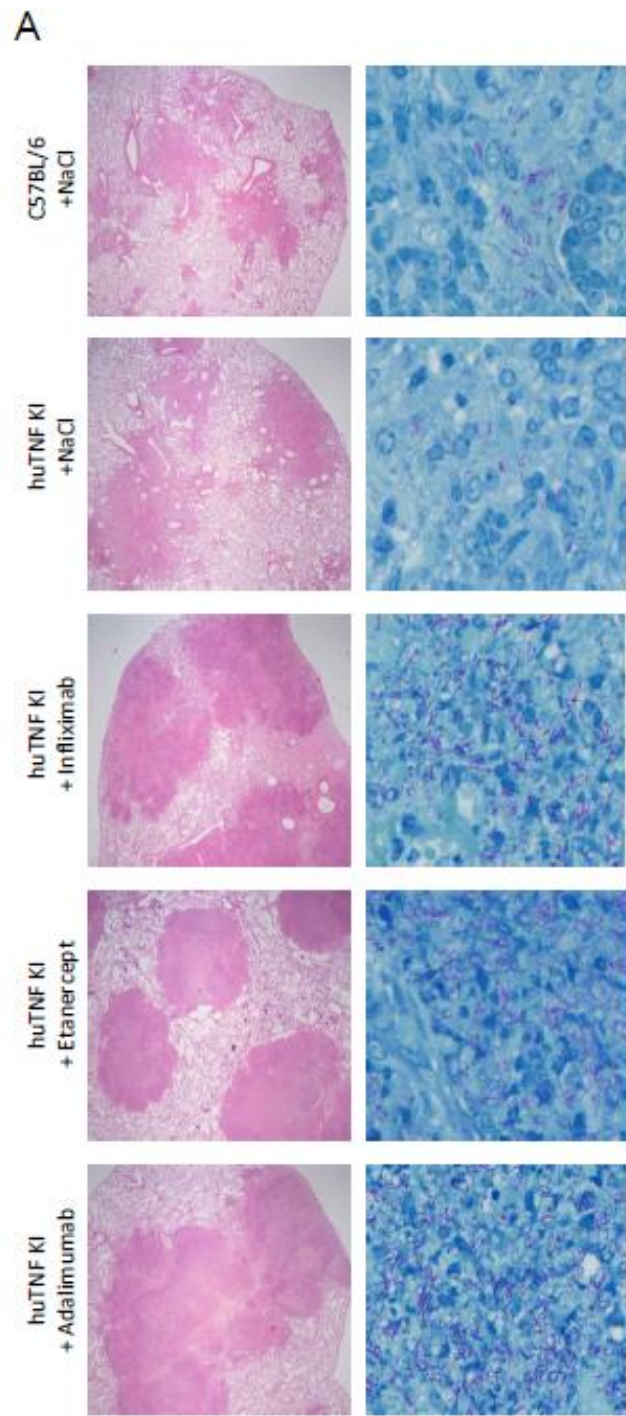


Figure 7



### *III. Contribution des voies IL-17 et IL-22 dans le contrôle de l'infection*

#### **Article 4: IL-17 blockade has no effect on host response and gene expression upon *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice, unlike TNF $\alpha$ blockade**

**Noria Segueni**, Elaine Tritto, Marie-Laure Bourigault, Stéphanie Rose, François Erard, Marc Le Bert, Muazzam Jacobs, Franco Di Padova, Pierre Moulin, Dominique Brees, Salah-Dine Chibout, Bernhard Ryffel, Michael Kammüller, and Valerie F.J. Quesniaux.

Plusieurs médiateurs sont essentiels pour le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* comme l'IFN $\gamma$ , l'IL-12 et le TNF. Nous avons notamment pu observer une augmentation significative de l'expression de l'IL-17A chez des souris déficientes pour le TNF après infection, suggérant un rôle de cette cytokine dans la réponse de l'hôte à la tuberculose. Par ailleurs, l'IL-17 est une cible thérapeutique de choix dans le traitement de nombreuses maladies auto-immunes (Mease, 2015). Cependant, la littérature est très contradictoire sur l'implication de la voie IL-17, qui semble dépendre de la souche de *M. tuberculosis* utilisée, ainsi que de la dose et de la voie d'infection (Freches *et al.*, 2013; Gopal *et al.*, 2014; Khader *et al.*, 2007; Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). L'IL-17 est produite par les cellules Th17, mais celles-ci produisent également de l'IL-22 qui peut agir en synergie avec l'IL-17 sur l'épithélium pulmonaire par exemple, et participer ainsi aux défenses immunitaires (McAleer and Kolls, 2014). Ainsi, des mécanismes de compensation entre ces deux voies de signalisation dans le développement de la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis* ont été proposés (Behrends *et al.*, 2013).

Pour étudier cet éventuel phénomène de compensation, nous avons infecté des souris double-déficientes pour l'IL-17RA et l'IL-22 avec *M. tuberculosis* et évalué leur susceptibilité à l'infection. Nous avons pu mettre en évidence que l'absence de ces deux voies de signalisation n'induisait pas de susceptibilité à l'infection. En effet, les souris IL-17RAxIL-22 double-déficientes survivent jusqu'à 6 mois après infection, avec une charge bactérienne et un profil histologique similaires aux souris de type sauvage. D'autre part, l'infiltration cellulaire au niveau des poumons était comparable entre les souris de type sauvages et les souris IL-17RAxIL-22<sup>-/-</sup>. Nous démontrons donc que l'absence d'IL-22 n'est pas compensée par la voie IL-17RA et

réciroquement, et que ces deux voies ont une contribution limitée dans l'établissement et le maintien de la réponse immunitaire à la tuberculose.

En parallèle, nous avons comparé les effets de la neutralisation de l'IL-17 avec ceux, connus, de la neutralisation du TNF, au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. En effet, de nombreux anticorps ciblant l'IL-17 sont actuellement en essais cliniques pour le traitement de pathologies auto-immunes (Mease, 2015), et le risque de réactivation de tuberculose latente chez les patients suite à ces traitements n'a pas été évalué. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles différents : un modèle aigu, dans lequel les anticorps neutralisants ont été administrés dès le début de l'infection, et un modèle de réactivation, dans lequel l'infection est déjà bien établie avant de commencer les traitements.

Nous avons donc traité des souris de type sauvage infectées par *M. tuberculosis* avec des anticorps neutralisants l'IL-17A, l'IL-17F ou le TNF. Comme attendu, les souris traitées avec l'anti-TNF présentaient une susceptibilité accrue à l'infection et une charge bactérienne très élevée. D'autre part, le profil transcriptomique de ces souris était très altéré par rapport aux souris de type sauvage. En revanche, le traitement anti-IL-17A et anti-IL-17F n'induisait pas d'inflammation excessive des poumons, et la réponse immunitaire de l'hôte n'était pas affectée au niveau transcriptomique par rapport aux souris de type sauvage.

Ce travail supporte les données existantes sur le rôle crucial du TNF dans la réponse immunitaire à la tuberculose, tandis que la neutralisation de l'IL-17 ne perturbe pas le contrôle de l'infection, ni en phase précoce, ni en phase chronique. Ainsi, ces traitements présentent potentiellement moins de risques que les traitements anti-TNF dans la réactivation de tuberculose latente, du moins avec une souche de virulence similaire à celle utilisée au cours de notre étude. D'autre part, nous avons rejeté l'hypothèse d'un mécanisme de compensation entre les voies de signalisation IL-17 et IL-22, dans des conditions où la déficience en TNF suffit à observer une inflammation pulmonaire exacerbée et une infection non contrôlée.

L'article suivant est soumis pour publication.

# **Control of *Mycobacterium tuberculosis* infection under IL-17A or IL-17F**

## **blockade in mice**

Noria Segueni 1,2,<sup>°</sup>, Elaine Tritto 3,<sup>°</sup>, Marie-Laure Bourigault 1,2, Stéphanie Rose 1,2, François Erard 1,2, Marc Le Bert 1,2, Muazzam Jacobs 4,5, Franco Di Padova 3, Pierre Moulin 3, Dominique Brees 3, Salah-Dine Chibout 3, Bernhard Ryffel 1,2,4,\* , Michael Kammüller 3,\* and Valerie F. Quesniaux 1,2,\*

1 CNRS, UMR7355, Orleans, France

2 University of Orleans, INEM, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Orleans, France

3 Novartis Institutes for Biomedical Research, CH-4002, Basel, Switzerland

4 Division of Immunology, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Health Sciences Faculty, University of Cape Town, South Africa

5 National Health Laboratory Service, South Africa

<sup>°</sup>,\* contributed equally to this work

Corresponding authors:

Valerie Quesniaux, INEM UMR7355, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orleans, France;

Michael Kammüller, Novartis Institutes for Biomedical Research, Klybeckstrasse 151, CH-4057, Basel, Switzerland;

Author's contributions:

Conception and design: NS, MB, MJ, FDP, BR, MK, VQ; Performed the experiments: NS, MB, SR, FDP; Analysis and interpretation: NS, ET, MB, FE, MLB, FDP, PM, MK, VQ; Drafting the manuscript for important intellectual content: VQ, NS, ET, FDP, PM, SDC, DB, BR, MK.

Supports: The authors acknowledge the support from CNRS through International Associated Laboratory « TB IMMUNITY » (LIA N°236) and Novartis Institutes for Biomedical Research, CH-4002, Basel, Switzerland.

Running head: IL-17A/F axis in *M. tuberculosis* infection

Descriptor Number: 11.4 Mycobacterial Disease: Host Defenses

Total word count: 3457

Abstract word count: 228

## Abstract

**Rationale:** Antibodies targeting IL-17A or its receptor IL-17RA show unprecedented efficacy in the treatment of autoimmune diseases such as psoriasis. These therapies, by neutralizing critical mediators of immunity, may increase susceptibility to infections. *Mycobacterium tuberculosis* reactivation is a concern following anti-TNF $\alpha$  therapy.

**Objective:** We compared the effect of antibodies neutralizing IL-17A or IL-17F with TNF $\alpha$ -neutralizing antibodies in acute and reactivation murine *M. tuberculosis* infection models.

**Methods:** BL6 mice treated with antibodies targeting IL-17A, IL-17F or TNF $\alpha$  were infected with *M. tuberculosis*. We evaluated susceptibility to infection by microbiological, histological and lung transcriptome analyses.

**Measurements and Main Results:** Extensive gene array analyses of infected lungs revealed major changes of inflammatory and immune gene expression signatures 4 weeks post-infection, which were further augmented by TNF $\alpha$  blockade. Specifically, the expression of *Ifng*, *Il1b* and *Ilrn* genes, and to a lesser extent of *Cxcl1*, *Ccl2*, *Il10*, *Il17a*, *Il17ra* and *Il21* was increased. By contrast gene expression was not different after IL-17A or F blockade from infected BL6 mice. Importantly, IL-17 blockade had no effect on host resistance to TB infection unlike TNF blockade. The absence of both IL-17RA and IL-22 pathways did not profoundly compromise host control of *M. tuberculosis* over a 6-months period, which argues against compensation between these two pathways.

**Conclusion:** IL-17A or IL-17F antibody blockade did not compromise host responses to *M. tuberculosis* infection, in contrast to TNF $\alpha$  neutralization.

## Introduction

Antibodies targeting IL-17A or IL-17RA are in clinical trials for the treatment of several autoimmune diseases (1, 2). However, these therapies, by neutralizing critical mediators of innate and adaptive immunity, carry a risk of an increased susceptibility to specific infections, such as *Candida albicans* (3-5). In particular, the importance of IL-17 cytokine family members in reactivating intracellular *Mycobacterium tuberculosis* infections is less clear, in comparison with established anti-tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) antibody treatments, known to have a clinical risk of reactivating *M. tuberculosis* infections (6).

The role of Th17 cells and IL-17A in *M. tuberculosis* infection has been addressed in mouse studies (7-11). The IL-17 pathway seems to be dispensable for low dose *M. tuberculosis* host resistance (10), while control of a high inoculum of *M. tuberculosis* H37Rv or of the hypervirulent *M. tuberculosis* strain HN878 appears to induce an IL-17A dependent-inflammation (8, 10).

The physiological importance of the Th17/IL-17 pathway in immune surveillance of mostly extracellular pathogens at mucocutaneous barrier tissues (12) questions a key role of this pathway in host resistance to the intracellular pathogen *M. tuberculosis*. CD4<sup>+</sup> T cells, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, together with the IL-1/IL-1R1 pathway, nitric oxide, reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates, are essential to control intracellular *M. tuberculosis* infection (13-15). The importance of TNF $\alpha$  in *M. tuberculosis* -triggered immune responses, identified in the mouse early on (16), has also been documented by numerous clinical studies (17). While TNF $\alpha$  from myeloid cells mediates early host resistance, T cell-derived TNF $\alpha$  is essential to sustain protection during chronic mycobacterial infection in mice (18).

Th17 cells were originally shown to produce IL-17A, IL-17F, but also IL-21 and IL-22 (19, 20). IL-17 and IL-22 play an important role coordinating pulmonary immune defense, with IL-17 and IL-22 primarily acting on the lung epithelium, inducing antimicrobial proteins and neutrophil chemoattractants (21). IL-17 and IL-22 are produced by both cells from the innate (LTi and ILC3)

and adaptive immune system (Th17 and Th22) (22). Distinct IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response (23) (32), and local concentrations of IL-22 exceed IL-17 in *M. tuberculosis* infected patients, supporting a role for IL-22 in tuberculosis-induced pathology or repair (24). In mice, IL-22 is mainly produced by IFN $\gamma$ -secreting cells, but is dispensable for host protection against *M. tuberculosis* infection as seen in IL-22<sup>-/-</sup> mice (25), and a possible compensation of IL-22 by IL-17A or IL-17F has been proposed to control *M. tuberculosis* infection (23).

In this study we directly compared the effect of antibodies neutralizing IL-17A or IL-17F with those of TNF $\alpha$ -neutralizing antibodies on acute *M. tuberculosis* infection in mice and investigated the effect of IL-17A neutralization in a reactivation model, using TNF $\alpha$ -deficient mice as susceptible controls. We also addressed potential compensation between IL-17A, IL-17F and IL-22 pathways during acute and chronic *M. tuberculosis* infection in IL-17RA<sup>-</sup>, IL-22<sup>-</sup> and double IL-17RA-IL-22-deficient mice.



## Materials and Methods

**Mice.** IL-17RA- (26), IL-22- (27) and double IL-17RA-IL-22-deficient mice obtained by intercrossing, mice deficient for TNF $\alpha$  exon 1 and 2 (28) backcrossed at least 10 times on C57BL/6 genetic background were bred in the UPS44 animal facility (CNRS, Orleans). For experiments, adult (8-12 week old) animals were kept in isolators in a biohazard animal unit, monitored daily for clinical status and weighed twice weekly. All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the "Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans" (CCO) under N° CLE CCO 2012-1001.

**Bacteria and infection.** Pulmonary infection with *M. tuberculosis* H37Rv was performed as described (14) by delivering 1000+300 CFU bacteria into the nasal cavities, and the inoculum size was verified 24h after infection by determining lung bacterial load.

**Antibody treatment.** An anti-mIL-17A antibody (rat IgG2a; MAB421 R&D; clone 50104), used previously (29) and shown to have anti-arthritic activity during a 6-7 week treatment (30) was injected intraperitoneally at 500  $\mu$ g (20 mg/kg), starting 1 day before the infection and subsequently once per week into *M. tuberculosis* H37Rv-infected mice (Supplementary Figure 1A). Another group of mice was treated with an anti-mIL-17F (rat IgG1, 16-7473 e-bioscience; clone RN17) antibody according to above treatment schedule. An anti-mTNF $\alpha$  antibody (rat IgG1; MAB4101 R&D; clone MP6-XT22, which has been used previously in murine *M. tuberculosis* infection experiments (31, 32), was injected intraperitoneally at 250  $\mu$ g (10 mg/kg). Respective isotype control rat IgG2a (MAB006: R&D; anti-KLH) and rat IgG1 (MAB005: R&D; anti-KLH) antibodies were administered according to aforementioned schedule. A parallel group of naïve, non-infected mice served as baseline control. To confirm exposure, plasma anti-IL-17A antibody levels were determined by ELISA.

**Microarray Analysis.** Total RNA was extracted from frozen tissues by a combined Trizol®/RNeasy® extraction method according to the manufacturer's instructions. A DNase treatment step was included to remove any concomitant DNA contamination. Total RNA was quantified by the absorbance at 260 nm, and the quality is determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Agilent Technologies; Palo Alto, U.S). Target preparation was performed with a starting amount of 1 to 4 ng of total RNA using the NuGEN Ovation® Pico WTA system according to manufacturer's instruction (NuGEN Technologies Inc.). SPIA cDNA were then fragmented and labeled using the Encore Biotin module (NuGEN Technologies Inc.). After confirmation of cDNA size distribution (before and after fragmentation) by agarose-gel electrophoresis, approximately 4.55 µg of biotinylated cDNA per samples was hybridized onto Affymetrix Mouse 430\_2 microarrays. Microarray slides were stained on Affymetrix Fluidics Workstation 450 and scanned on Affymetrix Scanner 3000 according to manufacturer's technical manual. The data was normalized using Affymetrix's MAS 5.0 algorithm using a target intensity of 150. Analysis of microarray data was performed with R and Bioconductor. Differentially expressed genes were selected by Limma having a fold change greater or equal to |2| and p-value lower or equal to 0.05.

## Results

**Neutralizing IL-17A or IL-17F does not compromise host response to acute *M. tuberculosis* infection, in contrast to TNF $\alpha$  neutralization.** To assess whether blocking the IL-17 cytokine family axis may increase susceptibility to *M. tuberculosis* infection, we investigated the effect of neutralizing IL-17A or IL-17F during acute infection, in comparison to TNF $\alpha$  neutralization (see Figure E1A in the online data supplement). Doses of 500  $\mu$ g of anti-IL-17A and F antibody (approximately 20 mg/kg) and 250  $\mu$ g (approximately 10 mg/kg) of anti-TNF $\alpha$  antibody per mouse or the respective isotype control IgG were administered weekly, starting 1 day before the infection. IL-17A or IL-17F blockade did not alter survival, body or organ weights, bacterial burden and lung histopathology, whereas neutralizing TNF $\alpha$  did. Presence of plasma levels of the anti-IL-17A antibody confirmed exposure to this antibody in the respective treatment group, and was not detected in the isotype control group (data not shown). Administration of anti-mouse IL-17A and IL-17F neutralizing antibodies or their respective IgG2a and IgG1 isotype controls, had no effect on body weight development by day 28 (Figure 1A). In contrast, a TNF $\alpha$  neutralizing antibody treatment led to a decrease of body weight during the 4th week of treatment, in comparison with the anti-IgG1 isotype control. Pulmonary bacterial loads were not significantly increased in the groups treated with anti-mouse IL-17A or IL-17F neutralizing antibodies at 4 weeks as compared to the respective isotype (IgG2a and IgG1) controls, or to vehicle-treated infected control mice (Figure 1B). However, a significant difference in lung bacterial load was seen between the anti-TNF $\alpha$  antibody-treated group as compared to the anti-IgG1 isotype or vehicle control mice, reminiscent of the highly susceptible TNF $\alpha$ -deficient mice.

**Neutralizing IL-17A or IL-17F does not affect lung inflammation in response to acute *M. tuberculosis* infection, whereas blocking TNF $\alpha$  causes necrotic pneumonia.** Relative lung weight, used as a first estimate of lung inflammation, was not increased in the groups treated with

anti-mouse IL-17A or IL-17F neutralizing antibodies as compared with their isotype controls or to vehicle-treated mice (Figure 1C), while it was significantly increased after anti-mouse TNF $\alpha$ -treatment or in TNF $\alpha$ -deficient mice. A similar trend was seen for relative spleen weights (Figure 1D). Macroscopically, the pleural surface of infected mice had a nodular appearance, which was most prominent in the TNF $\alpha$ -deficient mice and anti-TNF $\alpha$ -antibody-treated group (Figure 1E). These changes were associated with a worsening of the microscopic observations in the lungs of the anti-TNF $\alpha$ -antibody-treated animals, and showed distinct reduction of free alveolar space, concurrent with high inflammatory cell infiltration in the lungs, oedema and necrosis at week 4 (Figure 1F). The inflammatory parameters in mice treated with IL-17A or IL-17F neutralizing antibodies were comparable to those of vehicle or isotype controls at 4 weeks post *M. tuberculosis* infection, namely an inflammatory response dominated by infiltration of macrophages, lymphocytes, as well as some neutrophils, a granuloma formation occupying about 30% of the airway space, with no signs of necrosis and little oedema (Figure 1E,F).

**TNF $\alpha$  neutralization exacerbates gene expression of inflammatory markers in acute *M. tuberculosis* infection, in contrast to anti-IL-17A or anti-IL-17F treatment.** To further understand the correlates of immunity and susceptibility to acute *M. tuberculosis* infection, we performed whole transcriptome microarray analysis of mouse lung tissues on day 28 after *M. tuberculosis* infection, and investigated the effect of anti-TNF $\alpha$  treatment in comparison with anti-IL-17A and anti-IL-17F treatments.

Overall, *M. tuberculosis* infection triggered many transcriptional changes in lung tissue, with 1306 upregulated and 451 downregulated genes (p-val  $\leq$  0.05 and fold change  $\geq$  |2|). Principal component analysis (PCA) clearly differentiated naïve from infected mice (Figure 2A). Figures 2B-H shows changes of major cell populations of the innate and adaptive immune system based on gene signatures (see Tables E1-7 in the online data supplement), and highlights that many

lymphoid populations are activated and increased in response to *M. tuberculosis* infection when compared to uninfected controls at day 28 after infection (Figure 2B-H). Specifically, transcriptional signatures corresponding to CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2B; Table E1), CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2C; Table E2),  $\gamma\delta$  T cells (Figure 2D; Table E3), NK cells (Figure 2E; Table E4), macrophages (Figure 2F; Table E5), monocytes (Figure 2G; Table E6), and neutrophils (Figure 2H; Table E7) were increased. Changes at day 28 were associated (but not limited) to the modulation of genes associated with host-pathogen interactions, host-antimicrobial activities and pro- and anti-inflammatory immune responses (data not shown). Here, we focus on gene modulation of selected cytokines and chemokines and show that transcripts of *Ifng*, *Il1b*, *Ilrn*, *Tnfa*, and *Il12b* genes were clearly upregulated in response to *M. tuberculosis* infection at day 28, and to a lesser extent *Cxcl1*, *Ccl2*, *Il10*, *Il17a*, *Il17ra* and *Il21* (Figure 2I).

In anti-TNF $\alpha$  antibody-treated and TNF $\alpha$ -deficient mice, which clearly separated from *M. tuberculosis* infected wild-type mice by PCA (Figure 2A), most aforementioned genes were even further up-regulated, likely reflecting the inflammatory host response to the increased bacterial burden (Figures 1B,E), while *Il12b* showed a lower expression (Figure 2I). Interestingly, neutralization of IL-17A or IL-17F by antibody treatment essentially co-localized with isotype controls by PCA mapping (Figure 2A), with no or minor effects on gene signatures reflecting recruitment of innate and adaptive immune cell populations (Figure 2B-K). CD4 and CD8 representative signatures were slightly less induced by IL-17A or IL-17F neutralizing antibody (Figures 2B,C), with a minor increased expression of IL-17A (Figure 2I) and lower *Il17ra* gene expression in anti-IL-17A treatment (Figure 2I).

**Neutralizing IL-17A does not compromise host response to *M. tuberculosis* infection in a murine reactivation model.** Next, we asked whether neutralizing either IL-17A or TNF $\alpha$  (by Enbrel, a TNF-neutralizing TNFR2 fusion molecule) would impair the control of a reactivating *M.*

*tuberculosis* infection (33) (see Figure E1B in the online data supplement). Immunocompromised TNF $\alpha$ -deficient mice served as controls for infection reactivation (Figure 3A). The antibiotic treatment effectively reduced lung bacterial load (from 47000 to 50 CFU/lung; Figure 3B). While *M. tuberculosis* infected TNF $\alpha$ -deficient mice receiving no antibiotics developed a severe disease within 3 weeks, Isoniazid and Rifampicin treated TNF $\alpha$ -deficient mice survived beyond 8 weeks post infection (Figure 3A). Four to five weeks after antibiotic treatment, TNF $\alpha$ -deficient mice rapidly lost weight, developed severe illness, and were terminated at 10 weeks with lung bacterial loads of 3x10<sup>6</sup> CFU/lung (Figure 3B), severe inflammation and necrotic pneumonia, displaying distinct morphological signs of *M. tuberculosis* infection reactivation (Figures 3C,E,G). In wild-type mice, after infection and INH and RIF treatment, cytokine neutralization treatment for four weeks did not induce any signs of inflammation or reactivation of infection (Figures 3C,E). The lung bacterial load at day 62 ranged from 140 to 620 CFU/lung, in saline, isotype control, anti-IL-17A antibody treatment, the highest being associated with Enbrel, although this did not reach statistical significance (Figures 3E,G), and resolved two weeks after cessation of the treatments on day 80, with minimal lung inflammation (Figures 3D,F,H).

**Contained *M. tuberculosis* infection in the absence of both IL-17RA and IL-22 pathways.** As IL-17A, IL-17F and IL-22 are often simultaneously expressed during infection and inflammation, we next addressed the potential redundancy between IL-17RA and IL-22 pathways in controlling *M. tuberculosis* infection (see Figure E1C in the online data supplement).

IL-17RA, IL-22 and double IL-17RA-IL-22-deficient mice contained chronic *M. tuberculosis* infection as they survived the six-month duration of the experiment (Figures 4A, B), while susceptible, TNF $\alpha$ -deficient control mice succumbed rapidly to aerogenic *M. tuberculosis* H37Rv within 4 weeks, with very high bacterial lung burden and inflammation (Figures 4C-E). After six months the relative lung weight of IL-17RA-deficient mice was slightly higher than that of wild

type, IL-22 or double IL-17RA-IL-22-deficient mice (Figure 4F). In line with their somewhat increased lung weight, IL-17RA<sup>-/-</sup> -deficient mice exhibited reduced free airway space and enhanced inflammatory cell infiltration (Figure 4G), although lung inflammation at six months was seen in all infected groups (Figure 4G). The bacterial burden was slightly increased in IL-17RA<sup>-/-</sup> and double IL-17RA-IL-22-deficient mice (Figure 4D), and acid-fast bacilli were visible in the lungs of these groups at this time-point (Figure 4G right panel).

At earlier time-points double IL-17RA-IL-22-deficient mice contained the infection, unlike the TNF $\alpha$  deficient mice (Figure 5A-D). Double IL-17RA-IL-22-deficient mice and wild-type mice developed progressive inflammation in infected lungs at 1 and 2 months which was most prominent at 6 months, with no signs of necrosis and little oedema (Figures 5F,G). The inflammation was milder in IL-17RA-IL-22-deficient than wild-type mice at 2 months, with higher free alveolar space and reduced inflammatory cell infiltration (Figures 5H,I), a difference less prominent at 6 months when acid-fast bacilli were detected (Figure 5G).

Although in TNF $\alpha$ -deficient mice lung infiltrating cells showed increased CD11b<sup>+</sup> and granulocyte Ly6G<sup>+</sup> cell response, the absence of IL-17RA and/or IL-22 had little influence on Ly6G<sup>+</sup> or Ly6C<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> cells one month post-infection (Figure 6A). Two months after infection CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> cell response was lower in the lung of IL-17RA<sup>-/-</sup> and IL-17RA-IL-22-deficient mice, compared to wild type mice and IL-22-deficient mice (Figure 6B). Among the lymphocyte populations  $\gamma\delta$ T-cells were increased in IL-17RA-deficient mice two months after infection, but not in IL-22- or double IL-17RA-IL-22-deficient mice (Figure 6C).

Pulmonary levels of IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC were highly increased in TNF $\alpha$ -deficient mice one month after infection, when severe pathology develops, with a reduction of IL-12/23p40 and p19 (Figure 7A), and in line with transcriptome data (Figure 2I). No significant differences were observed in lung homogenates of double IL-17RA-IL-22-deficient mice at one month (Figure 7A), but two months post infection there was a trend toward reduced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and

CXCL1 lung concentrations which reached statistical significance for IL-1 $\alpha$  (Figure 7B), while IL-23p19 seemed to increase. This was transient and no difference in cytokine levels was detected at 6 months (Figure 7C). Increased expression of IL-17A by CD4<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ T-cells was reported in IL-17RA-deficient mice 5 weeks post *M. tuberculosis* infection (11). We addressed the influence of IL-22 on IL-17A over-expression and show that IL-17A expression was also slightly increased in double IL-17RA-IL-22-deficient mice, which was associated with CD4<sup>+</sup> T-cells and  $\gamma\delta$ T-cells, 2 months after *M. tuberculosis* infection (see Figure E2 in the online data supplement).



## Discussion

We compared the effect of antibodies neutralizing IL-17A or IL-17F directly with those of a TNF $\alpha$ -neutralizing antibody in an acute *M. tuberculosis* infection model in mice, and document that TNF $\alpha$  blockade resulted in a rapid loss of control of infection, whereas neutralization of IL-17A or IL-17F did not seem to compromise the host response. To further understand the correlates of immunity in more detail, we performed whole genome microarray analysis of mouse lung tissues on day 28 after *M. tuberculosis* infection and show that anti-IL-17A or anti-IL-17F treatments have few subtle effects on host lung transcriptomic profiles in response to *M. tuberculosis* infection, in contrast to the marked gene expression profile changes induced both in anti-TNF $\alpha$  treated and TNF $\alpha$ -deficient mice. Since IL-17A may be expressed in inflammatory conditions that include other cytokines such as IL-17F and IL-22 (20), we addressed possible compensation mechanisms between the two pathways in double IL-17RA-IL-22-deficient mice. This comparative study supports the concept that neither IL-17 nor IL-22 pathways are central for controlling *M. tuberculosis* infection, unlike TNF $\alpha$ .

The increase of mycobacterial burden in mice treated with a neutralizing anti-TNF $\alpha$  antibody (rat anti-murine TNF antibody, clone MP6-XT22) – as well as in TNF $\alpha$ -deficient mice – was orders of magnitude higher than for anti-IgG1 isotype control or vehicle-treated infected C57BL/6 mice, consistent with earlier reports (16, 18, 31, 32, 34) and with the risk of mycobacterial infection associated with anti-TNF $\alpha$  therapy (17, 35). Transcriptional profiles at day 28 of infection match gene expression profiles reported by Gonzalez et al (36) and Kang et al (37) between day 12 and 100 in comparable mouse *M. tuberculosis* infection models. Interestingly, there was a marked exacerbation of the gene expression responses to *M. tuberculosis* infection in both anti-TNF $\alpha$  antibody treated and TNF $\alpha$ -deficient mice, while anti-IL-17A and anti-IL-17F neutralisation had minimal effects on host transcriptomic profiles. Macrophages showed the most robust signature in terms of number of modulated genes and magnitude of changes. Specifically alveolar

macrophages, a target cell population of the infection (38), may play a key role determining the outcome of *M. tuberculosis* infection (38-40). Increase of immunoregulatory cytokine IL-10 under TNF $\alpha$  neutralization has been reported earlier (34, 41). One of the most challenging questions in *M. tuberculosis* research is investigating the dynamic interplay between the host and pathogen (36), and understanding the complexities of cross-regulatory cytokine networks which provide protection during infectious disease with minimum damage to the host (42). The observed upregulation of Il1f9 (IL-36 $\gamma$ ) gene expression in anti-TNF $\alpha$  treated and TNF $\alpha$ -deficient *M. tuberculosis* infected mice, and the finding that IL-36 signaling is involved in mediating Th1 immune responses to *M. bovis* BCG infection (43) suggests additional complexity although recent data show only a limited contribution of IL-36 pathway in controlling *M. tuberculosis* infection (44).

Further, we showed that anti-IL-17A antibody treatment did not compromise host resistance in a pharmacological reactivation model of *M. tuberculosis* infection and we asked whether IL-17 and IL-22 pathways are interdependent in view of their coordinating role in pulmonary immune defense (20, 21, 25). IL-17RA is shared among the members of the IL-17 family in different heterodimers, IL-17A and IL-17F signalling through a complex composed of IL-17RA and IL-17RC (4). IL-17RA and double IL-17RA-IL-22-deficient mice survived a 6 month infection, although they exhibited a slightly higher bacterial burden, in line with a previous report in IL-17A deficient mice (9). Thus the absence of both IL-17RA and IL-22 pathways did not profoundly compromise host control of *M. tuberculosis*, which argues against compensation between these two pathways. The reduced lung pathology and inflammatory responses at 2 months post-infection in double IL-17RA-IL-22-deficient mice was associated with a reduced infiltration of CD11b+Ly6G+ granulocytic cells in the lung. IL-17A and IL-17F are involved in neutrophil recruitment (45). Furthermore, we show that double IL-17RA-IL-22-deficient mice also express slightly higher levels of IL-17A, mostly in  $\gamma\delta$  and CD4+ T cells, in line with IL-17RA-deficient mice (9, 46). We hypothesize that a negative feedback loop might also exist for IL-22 akin to the

IL-17RA-mediated one described above, which could explain why the exacerbated lung inflammation seen at 6 months in IL-17RA-deficient mice is not present in the absence of IL-22, in double IL-17RA-IL-22-deficient mice. A cross-regulation of the two pathways was demonstrated in a model of asthma, as IL-17A and IL-17F expression were strongly up-regulated in lungs of IL-22-deficient mice (47).

In conclusion, anti-IL-17A or IL-17F antibody blockade does neither alter gene expression nor compromise host responses to acute *M. tuberculosis* infection, in contrast to TNF $\alpha$  neutralization. In addition, IL-17 and IL-22 pathways are not central to control *M. tuberculosis* infection. Therefore, the risk of mycobacterial infection by anti-IL-17A therapy in human patients may be minor as compared to anti-TNF $\alpha$  treatment. In fact recent clinical data from phase 2 and 3 studies with the anti-IL-17A antibody Secukinumab show no evidence for reactivation of tuberculosis infection in patients treated for psoriasis (48, 49).

## **Acknowledgments**

We wish to thank Timothy Wright MD PhD for his scientific support, and Federico Bolognani MD PhD for his contribution to gene transcription analysis.

## References

1. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery* 2012; 11: 763-776.
2. Mease PJ. Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Current opinion in rheumatology* 2015; 27: 127-133.
3. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, Rivas E, Tsai TF, Wasel N, Tying S, Salko T, Hampele I, Notter M, Karpov A, Helou S, Papavassilis C, Group ES, Group FS. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 326-338.
4. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 585-600.
5. Cypowyj S, Picard C, Marodi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012; 42: 2246-2254.
6. Winthrop KL, Iseman M. Bedfellows: mycobacteria and rheumatoid arthritis in the era of biologic therapy. *Nature reviews Rheumatology* 2013; 9: 524-531.
7. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007; 8: 369-377.
8. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 2010; 184: 4414-4422.
9. Freches D, Korf H, Denis O, Havaux X, Huygen K, Romano M. Mice genetically inactivated in interleukin-17A receptor are defective in long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 2013; 140: 220-231.
10. Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, Fallert Junecko BA, Ramos-Payan R, Stallings CL, Reinhart TA, Kolls JK, Kaushal D, Nagarajan U, Rangel-Moreno J, Khader SA. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. *PLoS pathogens* 2014; 10: e1004099.
11. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews* 2010; 21: 455-462.

12. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual review of pathology* 2013; 8: 477-512.
13. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 93-101.
14. Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, Jacobs M, Ryffel B, Quesniaux VF. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2007; 179: 1178-1189.
15. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology* 2013; 31: 475-527.
16. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2: 561-572.
17. Keane J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* 2005.
18. Allie N, Grivennikov SI, Keeton R, Hsu NJ, Bourigault ML, Court N, Fremont C, Yermeev V, Shebzukhov Y, Ryffel B, Nedospasov SA, Quesniaux VF, Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep* 2013; 3: 1809.
19. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000; 165: 6107-6115.
20. Busman-Sahay KO, Walrath T, Huber S, O'Connor W, Jr. Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines. *J Leukoc Biol* 2015; 97: 499-510.
21. McAleer JP, Kolls JK. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunological reviews* 2014; 260: 129-144.
22. Eyerich S, Zielinski CE. Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur J Immunol* 2014; 44: 3475-3483.
23. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan HY, Wilkinson RJ, Walzl G, Gelderbloem SJ, Mahomed H, Hussey GD, Hanekom WA. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 2008; 180: 1962-1970.
24. Matthews K, Wilkinson KA, Kalsdorf B, Roberts T, Diacon A, Walzl G, Wolske J, Ntsekhe M, Syed F, Russell J, Mayosi BM, Dawson R, Dheda K, Wilkinson RJ, Hanekom WA, Scriba TJ. Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2011; 91: 587-593.

25. Behrends J, Renauld JC, Ehlers S, Holscher C. IL-22 is mainly produced by IFN $\gamma$ -secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. PLoS one 2013; 8: e57379.
26. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med 2001; 194: 519-527.
27. Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renauld JC, Becher B. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2007; 179: 8098-8104.
28. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997; 94: 8093-8098.
29. Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, Bancroft GJ, O'Garra A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. Eur J Immunol 2010; 40: 2200-2210.
30. Wu HJ, Ivanov, II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. Immunity 2010; 32: 815-827.
31. Plessner HL, Lin PL, Kohno T, Louie JS, Kirschner D, Chan J, Flynn JL. Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) by antibody but not TNF receptor fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis. J Infect Dis 2007; 195: 1643-1650.
32. Bigbee CL, Gonchoroff DG, Vratsanos G, Nadler SG, Haggerty HG, Flynn JL. Abatacept treatment does not exacerbate chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Arthritis and rheumatism 2007; 56: 2557-2565.
33. Botha T, Ryffel B. Reactivation of Latent Tuberculosis Infection in TNF-Deficient Mice. J Immunol 2003; 171: 3110-3118.
34. Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, Huang L, Flynn J, Chan J. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. Infect Immun 2008; 76: 916-926.

35. Cantini F, Niccoli L, Goletti D. Adalimumab, etanercept, infliximab, and the risk of tuberculosis: data from clinical trials, national registries, and postmarketing surveillance. *The Journal of rheumatology Supplement* 2014; 91: 47-55.
36. Gonzalez-Juarrero M, Kingry LC, Ordway DJ, Henao-Tamayo M, Harton M, Basaraba RJ, Hanneman WH, Orme IM, Slayden RA. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* and identification of molecular markers of disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009; 40: 398-409.
37. Kang DD, Lin Y, Moreno JR, Randall TD, Khader SA. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *PloS one* 2011; 6: e16161.
38. Rajaram MV, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Seminars in immunology* 2014; 26: 471-485.
39. Marino S, Cilfone NA, Mattila JT, Linderman JJ, Flynn JL, Kirschner DE. Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2015; 83: 324-338.
40. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological reviews* 2015; 264: 182-203.
41. Dutta NK, Illei PB, Jain SK, Karakousis PC. Characterization of a novel necrotic granuloma model of latent tuberculosis infection and reactivation in mice. *Am J Pathol* 2014; 184: 2045-2055.
42. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 87-103.
43. Vigne S, Palmer G, Martin P, Lamacchia C, Strebel D, Rodriguez E, Olleros ML, Vesin D, Garcia I, Ronchi F, Sallusto F, Sims JE, Gabay C. IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2012; 120: 3478-3487.
44. Segueni N, Vigne S, Palmer G, Bourigault ML, Olleros ML, Vesin D, Garcia I, Ryffel B, Quesniaux VF, Gabay C. Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection. *PloS one* 2015; 10: e0126058.
45. von Vietinghoff S, Ley K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 2009; 183: 865-873.
46. Smith E, Stark MA, Zarbock A, Burcin TL, Bruce AC, Vaswani D, Foley P, Ley K. IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor. *J Immunol* 2008; 181: 1357-1364.
47. Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, Renauld JC, Willart M, Lambrecht B, Teixeira MM, Charron S, Fick L, Erard F, Warszawska K, Wolk K, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D. Dual

Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 183: 1153-1163.

48. Tsai T.F., A. Blauvelt, A. Karpov, J. Huang, S. Cooper, T. Fox. 2014. Evaluation of Infections With Secukinumab in a Pooled Analysis of 10 Clinical Studies of Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *J Invest Dermatol* 134:S33.
49. Tsai T.F., A. Blauvelt, Y. Gong, J. Huang, T. Fox. 2015. Secukinumab Treatment Shows No Evidence for Reactivation of Previous or Latent TB Infection in Subjects with Psoriasis: A Pooled Phase 3 Safety Analysis. *Am Acad Dermatology Abstract* 607.



## Figure legends

**Figure 1. Neutralizing IL-17A or IL-17F does not compromise host response to acute *M. tuberculosis* infection, in contrast to TNF $\alpha$  neutralization.** *M. tuberculosis* infected C57BL/6 mice (H37Rv, 1000 CFU i.n.) were treated once per week with anti-mouse IL-17A or IL-17F antibodies (20 mg/kg i.p.), anti-mouse TNF $\alpha$  antibody (10 mg/kg), respective isotype control antibodies, or vehicle, starting 1 day before the infection, and monitored for body weight (A). Pulmonary bacterial load (B), lung (C) and spleen (D) relative weights were measured on day 28 post-infection. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=10 mice per group, from one experiment representative of two independent experiments. (E) Lung pathology was assessed on day 28. Lungs of TNF $\alpha$ -deficient mice with large, confluent nodules are included for comparison. Microscopic examination showing extensive inflammation and necrosis in lungs of infected TNF $\alpha$ -deficient mice or anti-TNF $\alpha$  antibody treated mice (Left: haematoxylin and eosin, magnification x 50) as well as numerous acid-fast bacilli (Right: Ziehl-Nielson, magnification x 1000). (F) Histopathological score of free alveolar space, cell infiltration, necrosis and oedema were determined by two independent observers. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 as compared with vehicle or isotype controls.

**Figure 2. TNF $\alpha$  neutralization exacerbates gene expression of inflammatory markers in acute *M. tuberculosis* infection, in contrast to anti-IL-17A or anti-IL-17F treatment.** Transcriptional profiling of lungs from *M. tuberculosis* infected C57BL/6 mice (H37Rv, 1000 CFU i.n.) treated once per week with anti-mouse IL-17A or IL-17F antibodies (20 mg/kg i.p.), anti-mouse TNF $\alpha$  antibody (10 mg/kg i.p.), respective isotype control antibodies, or vehicle, starting 1 day before the infection, and from non-infected C57BL/6 mice treated with vehicle or from *M. tuberculosis* infected and non-infected TNF $\alpha$ -deficient mice was performed on day 28 to assess molecular changes in the different conditions. (A) Principal component analysis plot of the

gene expression data showing the first two principal components. Each dot represents an individual animal. **(B-H)** Bar plot graphs showing the geometric mean for the fold changes of all the genes in the manually-curated gene lists for CD4 T cells **(B)**, CD8 T cells **(C)**,  $\gamma\delta$ T cells **(D)**, NK cells **(E)**, macrophages **(F)**, monocytes **(G)** and neutrophils **(H)**. For any given gene, the fold change for *M. tuberculosis* infected vehicle, IgG2a isotype, anti IL-17A, IgG1 isotype, anti IL-17F and anti TNF $\alpha$  treated groups was calculated relative to non-infected vehicle-treated animals, while the fold change for TB infected TNF $\alpha$ -deficient animals was calculated relative to non-infected TNF $\alpha$ -deficient animals. **(I)** Boxplots for selected cytokines and chemokines and receptors showing the MAS5 normalized expression level for each individual animal, the lower and upper quartiles and the median for the group.

**Figure 3. Neutralizing IL-17A does not compromise host response to *M. tuberculosis* infection in a murine reactivation model.** Two weeks following *M. tuberculosis* infection of C57BL/6 mice or TNF $\alpha$ -deficient mice (H37Rv, 1000 CFU i.n.), mice were subsequently treated for 3 weeks with isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) to control the infection. At 5 weeks, mice were injected i.p. weekly with an IL-17A neutralizing antibody (IgG2a; MAB421 R&D), or the respective isotype control antibody (MAB 006 R&D; all 1 mg/mouse) or with Enbrel (30 mg/kg) for 4 weeks. Body weight **(A)** and pulmonary bacterial load **(B)** in wild-type and TNF $\alpha$ -deficient mice were monitored during 80 days. Lung bacterial load **(C, D)** and relative weight **(E, F)** were measured on day 62 **(C, E)** and 80 **(D, F)** post-infection, except for TNF $\alpha$ -deficient mice which had to be sacrificed at day 72. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=10 mice per group. Lung pathology was assessed on day 62 **(G)** and 80 **(H)**. Microscopic examination showing extensive inflammation and necrosis in infected TNF $\alpha$ -deficient lungs with large, confluent nodules on day 72 are included for comparison (haematoxylin and eosin, magnification x 50). \*\*  $p < 0.01$  as compared with vehicle controls.

**Figure 4. Contained chronic *M. tuberculosis* infection in the absence of IL-17RA and/or IL-22 pathways.** Mice deficient for IL-17RA, IL-22, both IL-17RA and IL-22, and TNF $\alpha$  mice as well as wild-type mice were infected with *M. tuberculosis* (H37Rv, 1000 CFU/mouse i.n.). Body weight (A) and survival (B) were monitored during 200 days. Pulmonary bacterial load (C, D) and lung relative weight (E, F) were measured at 1 month (C, E) for sensitive TNF $\alpha$ -deficient mice and at 6 months post-infection for the IL-17RA- and/or IL-22-deficient mice (D, F). Lung pathology was assessed at 6 months (G). Macroscopically large, confluent nodules were visible in all groups. Microscopic examination showed extensive inflammation with limited free alveolar space (Left, haematoxylin and eosin, magnification x 50), with the presence of acid-fast bacilli (Right, Ziehl-Nielson, magnification x 1000). Histopathological score of free alveolar space and cell infiltration per group are indicated. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=4-7 mice per group, \* p<0.05.

**Figure 5. Kinetics of lung *M. tuberculosis* control and inflammation in double IL-17RA-IL-22-deficient mice.** Mice deficient for both IL-17RA and IL-22, TNF $\alpha$  deficient mice and wild-type mice were exposed to *M. tuberculosis* (H37Rv, 1000 CFU/mouse i.n.) and monitored for body weight (A) and survival (B). Data are from 17-19 mice per group, pooled from 4 independent experiments. Lung (C) and spleen (D) relative weights, and pulmonary bacterial load (E) were measured at 1 month for TNF $\alpha$ -deficient mice and at 1, 2 and 6 months post-infection for double IL-17RA-IL-22-deficient and wild-type control mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=13-14 from 3 experiments at 1 month, n = 7-8 from 2 experiments at 2 months and n=11-12 from 3 experiments at 6 months). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 as compared with wild-type controls. Microscopic examination at 1, 2 and 6 months showed progressive inflammation in infected lungs in all groups, most prominent at 6 months (F, haematoxylin and eosin staining, magnification x 50) with abundant acid fast mycobacteria in the extracellular space for TNF $\alpha$ -deficient mice (G, Ziehl-Neelsen staining, magnification x 1000). Bar graphs summarise scoring

of cell infiltration in the parenchyma (**H**) and free alveolar space (**I**) at these time points (n = 7-9 mice per group from 2 independent experiments). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

**Figure 6. *M. tuberculosis* induced lung inflammatory cell infiltration in the absence of IL-17RA and IL-22.** Mice deficient for IL-17RA, IL-22, both IL-17RA and IL-22, and TNF $\alpha$  mice as well as wild-type mice were infected with *M. tuberculosis* (H37Rv, 1000 CFU/mouse i.n.). Inflammatory lung infiltrating cells were analysed by flow cytometry, and bar graphs show data from 2 to 3 individual mice per group, and 2 pools of 2 TNF $\alpha$ -deficient mice, at 1 (**A**) or 2 months (**B**) post-infection, expressed as mean  $\pm$  SEM. Representative dot plots of CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> cell populations, and Ly6G<sup>+</sup> and Ly6C<sup>+</sup> cells gated on CD11b<sup>+</sup> cells are shown (**A**). In (**C**), the gating strategy and relative populations of B220<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T lymphocyte populations are shown.

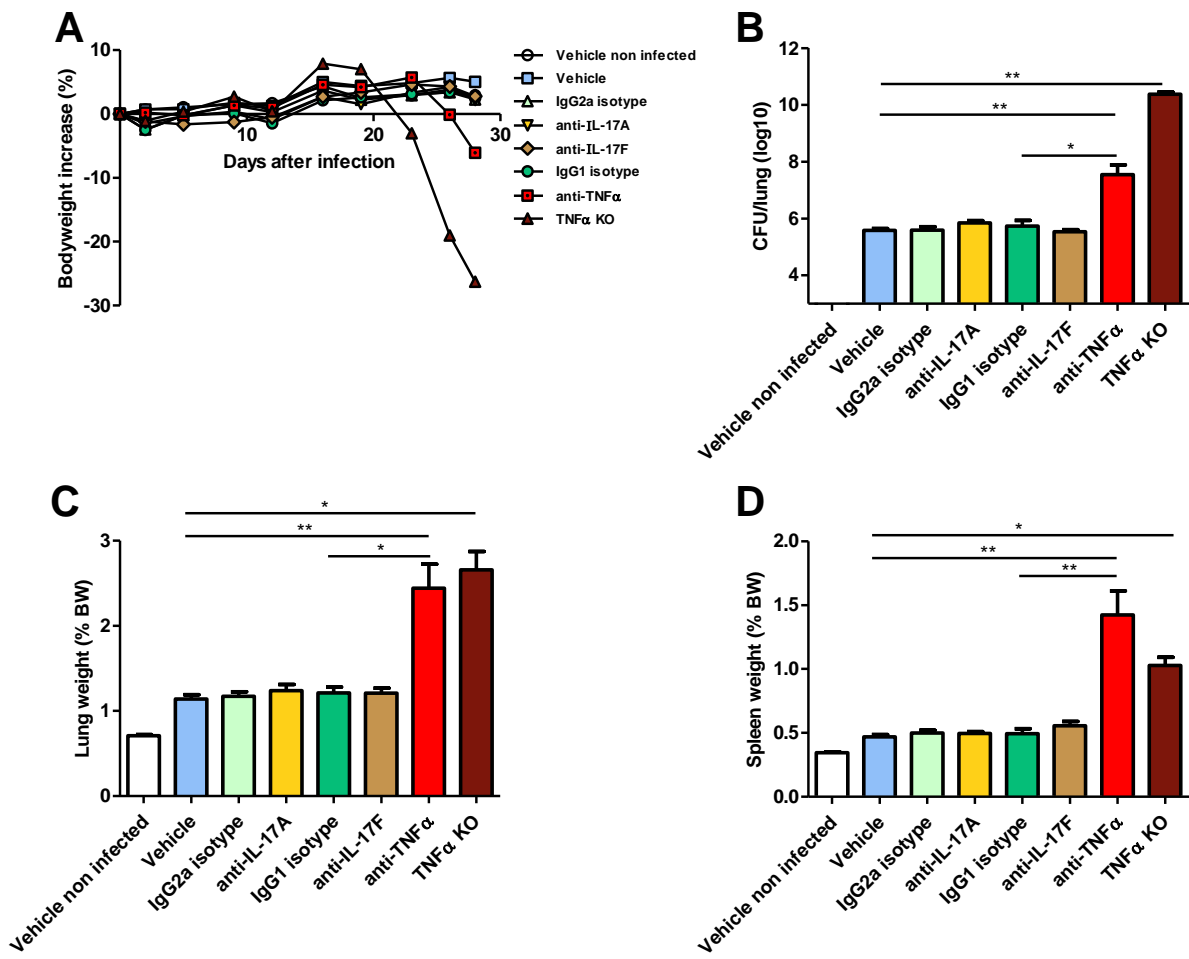
**Figure 7. Pulmonary cytokine levels in *M. tuberculosis* infected double IL-17RA-IL-22-deficient mice.** Cytokine concentrations were determined in lung homogenates of mice deficient for IL-17RA and IL-22 and wild-type mice at 1 month (**A**), 2 months (**B**) and 6 months (**C**) post *M. tuberculosis* infection as outlined in Figure 4. Concentrations of IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1, IL-12/IL-23 p40 and IL-23 p19 were quantified by ELISA. Results are shown for individual mice, with mean  $\pm$  SEM, and are from 2 independent experiments at 1 and 2 months and from 3 independent experiment at 6 months. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

**Supplementary Figure 1. Schematic overview of utilized *M. tuberculosis* infection models.**

(A) Comparison of anti-IL-17A, anti-IL17F, anti-TNF $\alpha$  antibody treatment and TNF $\alpha$ -deficient mice in acute *M. tuberculosis* model. (B) Comparison of anti-IL-17A antibody treatment and TNF $\alpha$ -deficient mice in *M. tuberculosis* reactivation model. (C) Comparison of IL-17RA-, IL-22-, IL-17RA-IL-22- and TNF $\alpha$ -deficient mice in acute and chronic *M. tuberculosis* model.

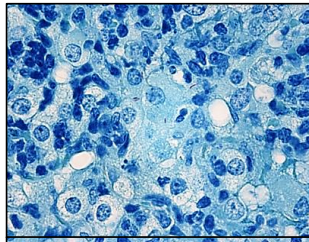
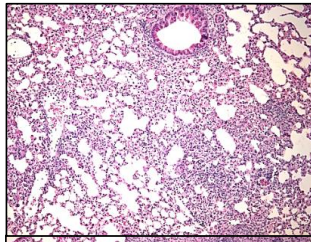
**Supplementary Figure 2.** IL-17A expression by CD4<sup>+</sup> T-cells and  $\gamma\delta$ T cells in the absence of IL-17RA and IL-22. Lung infiltrating cells from mice deficient for IL-17RA and/or IL-22 and wild-type mice exposed to *M. tuberculosis* (1000 CFU/mouse i.n.) were analysed by flow cytometry at 2 months post-infection. Intracellular staining for IL-17A is shown for B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> B cells, CD4<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> T-cells and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>  $\gamma\delta$ T-cells, as indicated (A). Representative histograms are shown for 2 individual mice per group with isotype controls in light grey. (B) Representative dot plots are shown to illustrate the gating strategy.

Figure 1

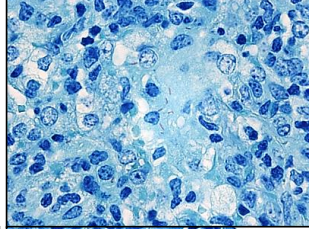
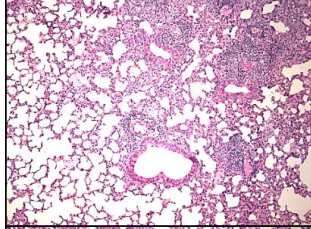


**E**

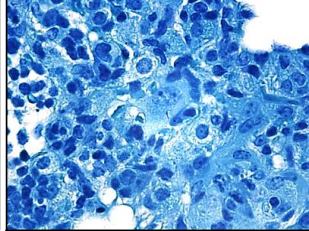
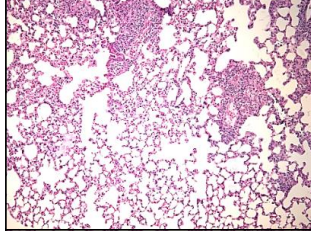
**WT vehicle**



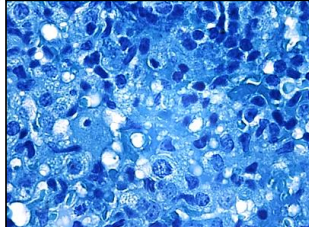
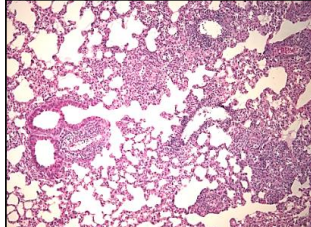
**IgG2a isotype**



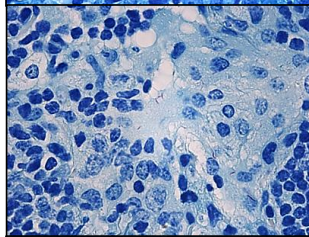
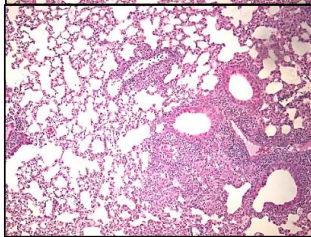
**anti-IL-17A**



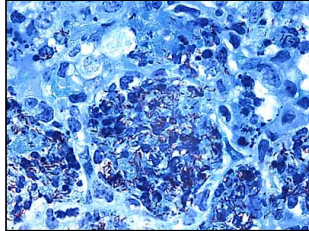
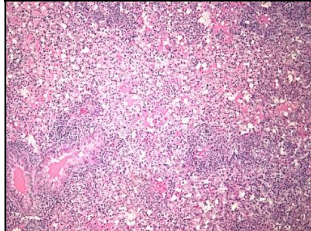
**IgG1 isotype**



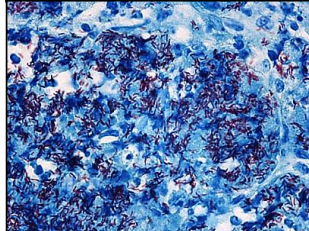
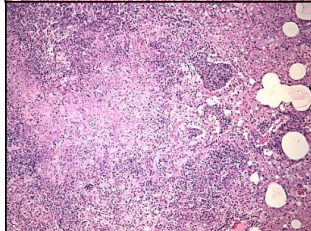
**anti-IL-17F**



**anti-mTNF $\alpha$**



**TNF $\alpha$  KO**



**F**

**Figure 1**

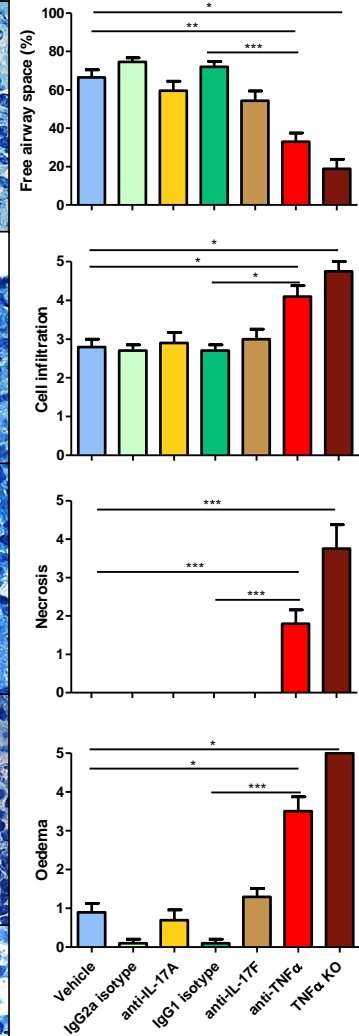


Figure 2

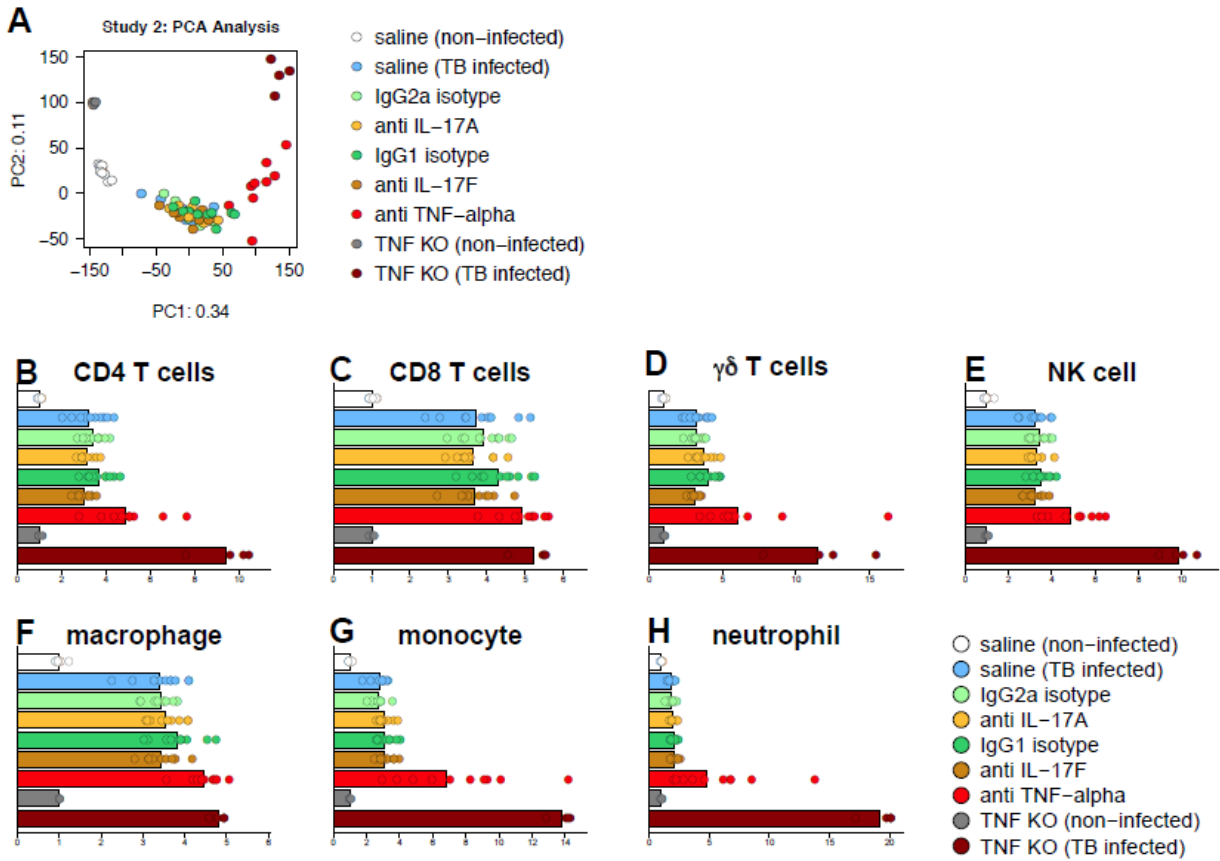




Figure 2

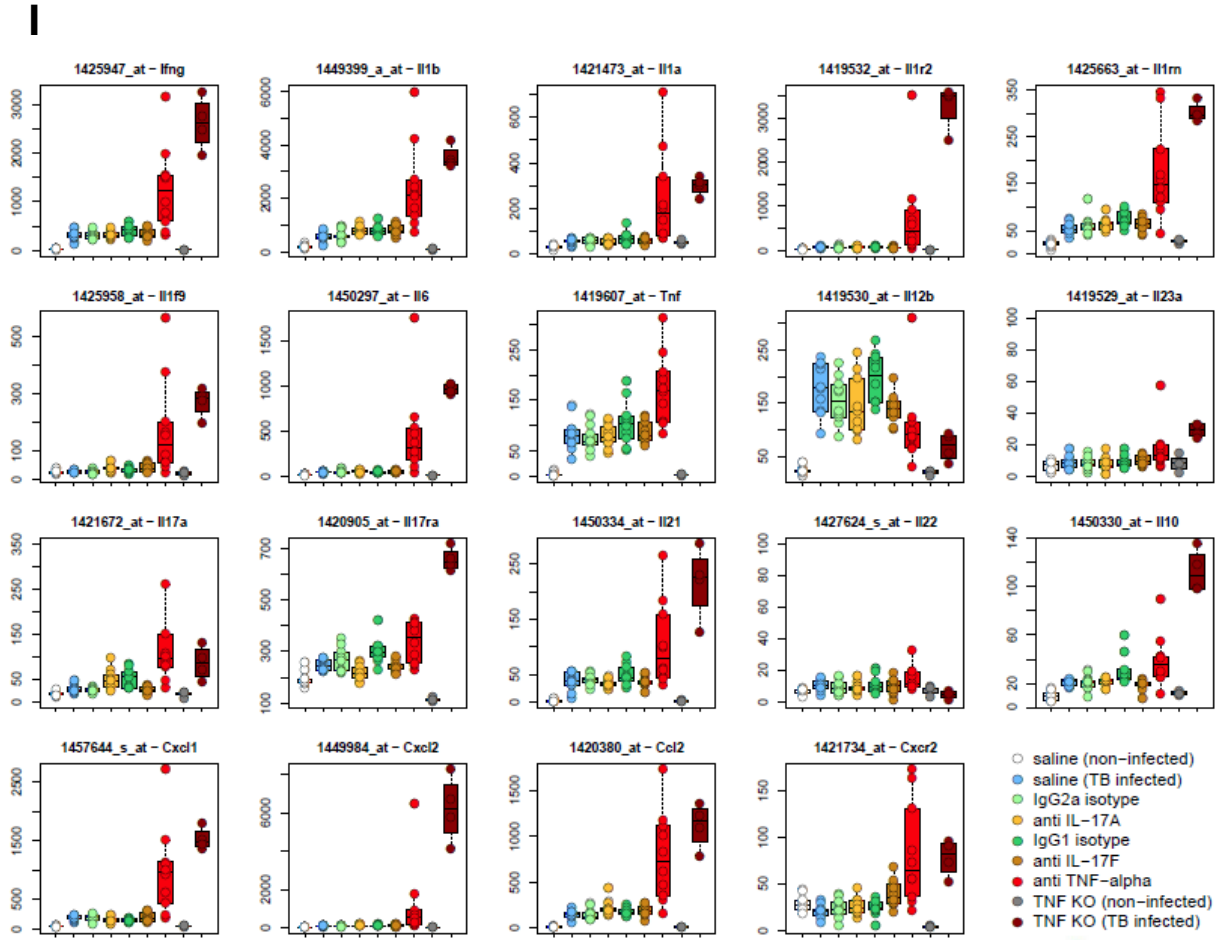


Figure 3

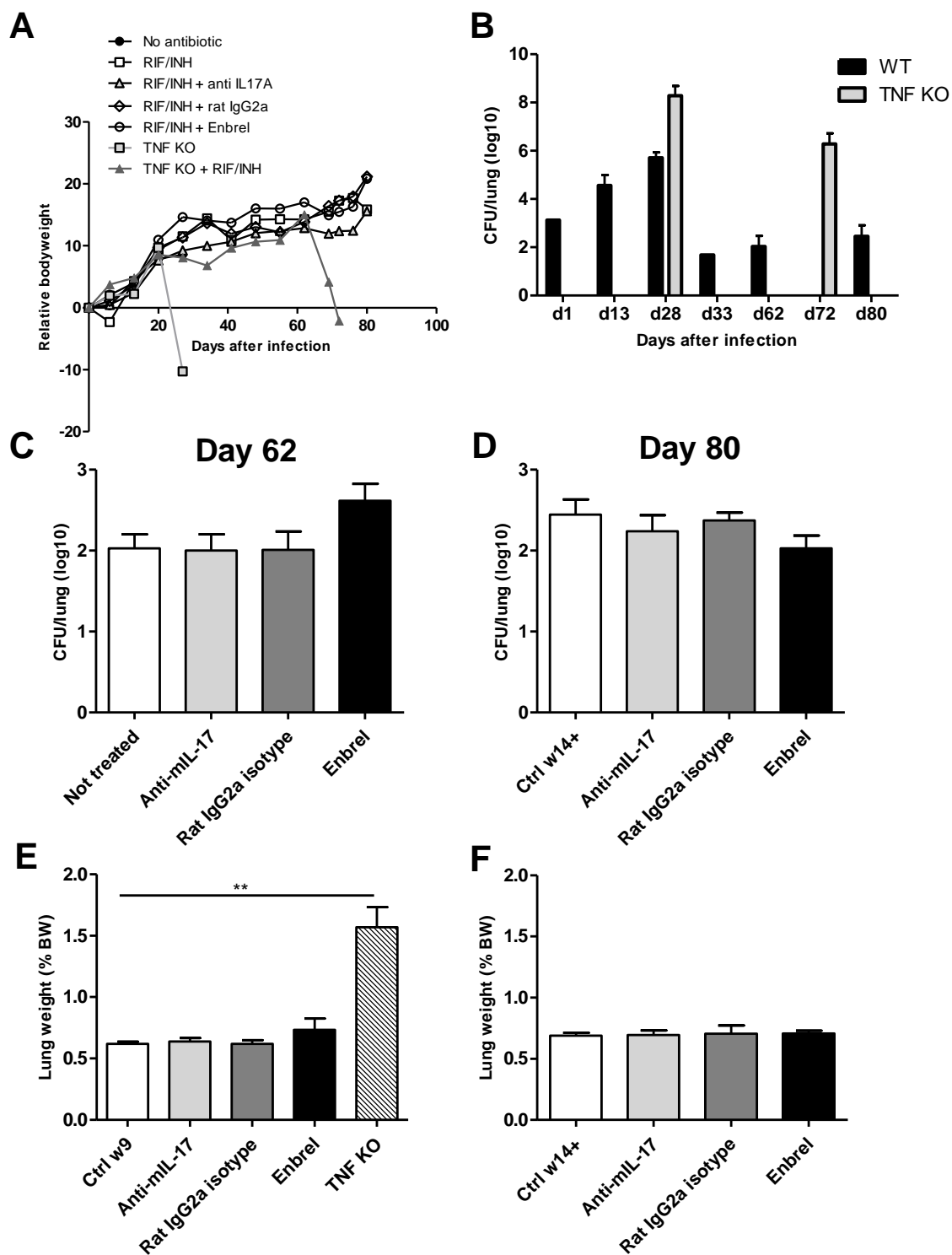
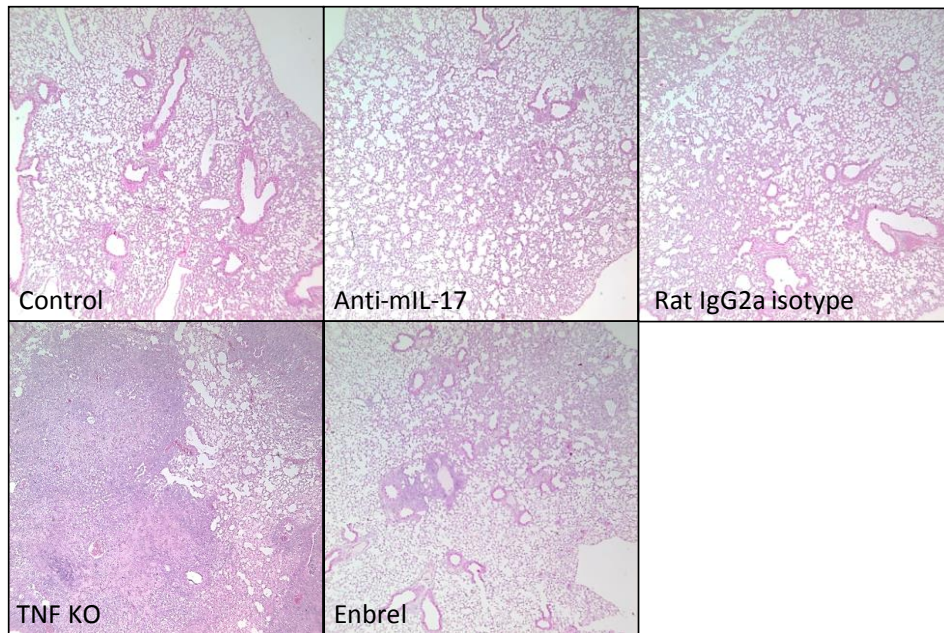


Figure 3

**G**  
Day 62



**H**  
Day 80

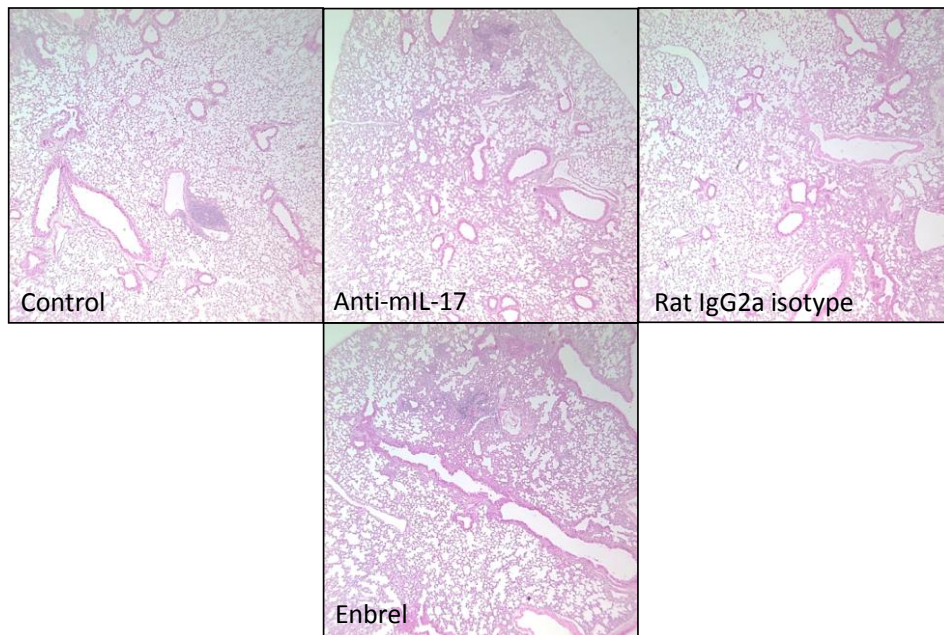


Figure 4

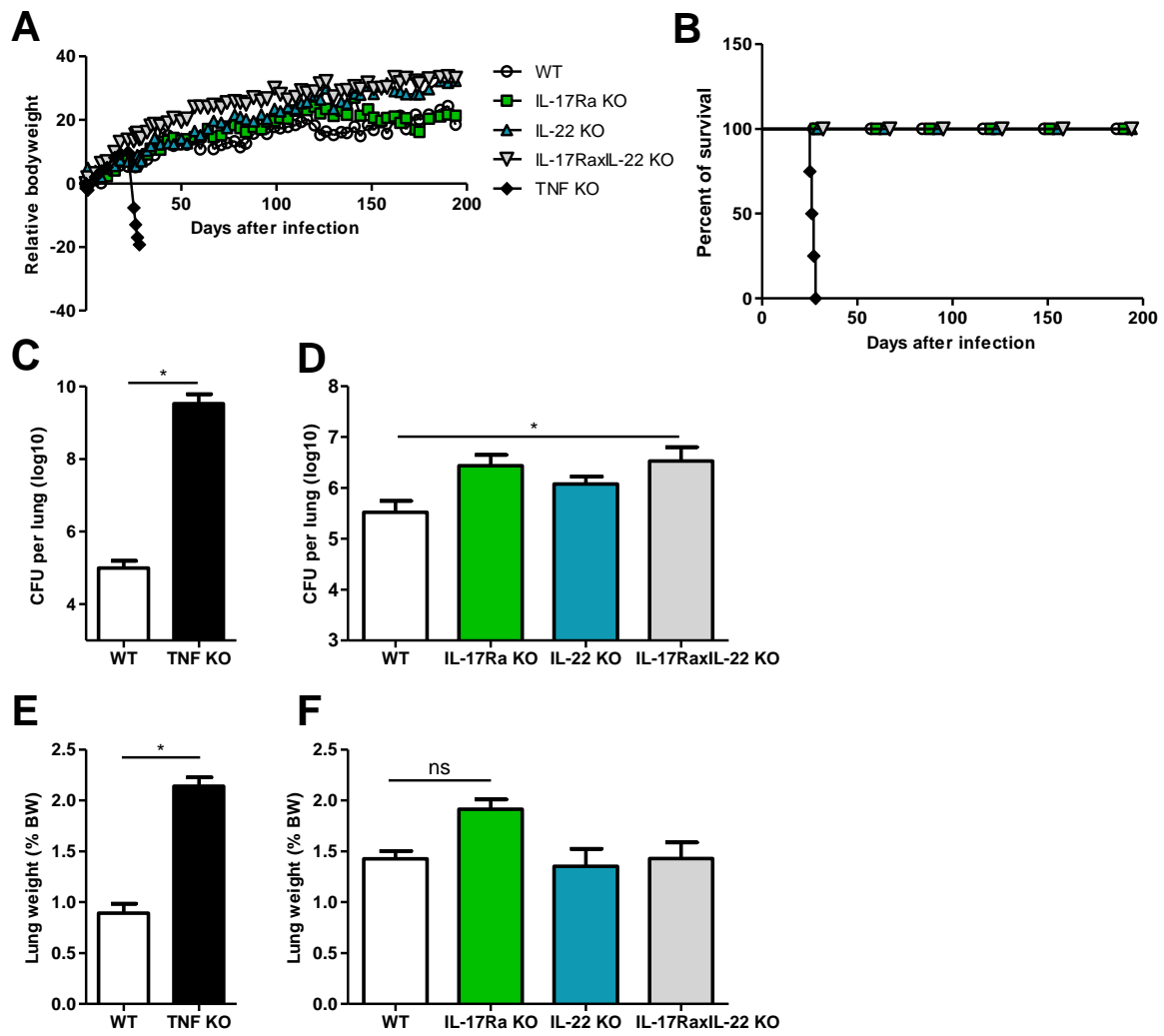


Figure 4

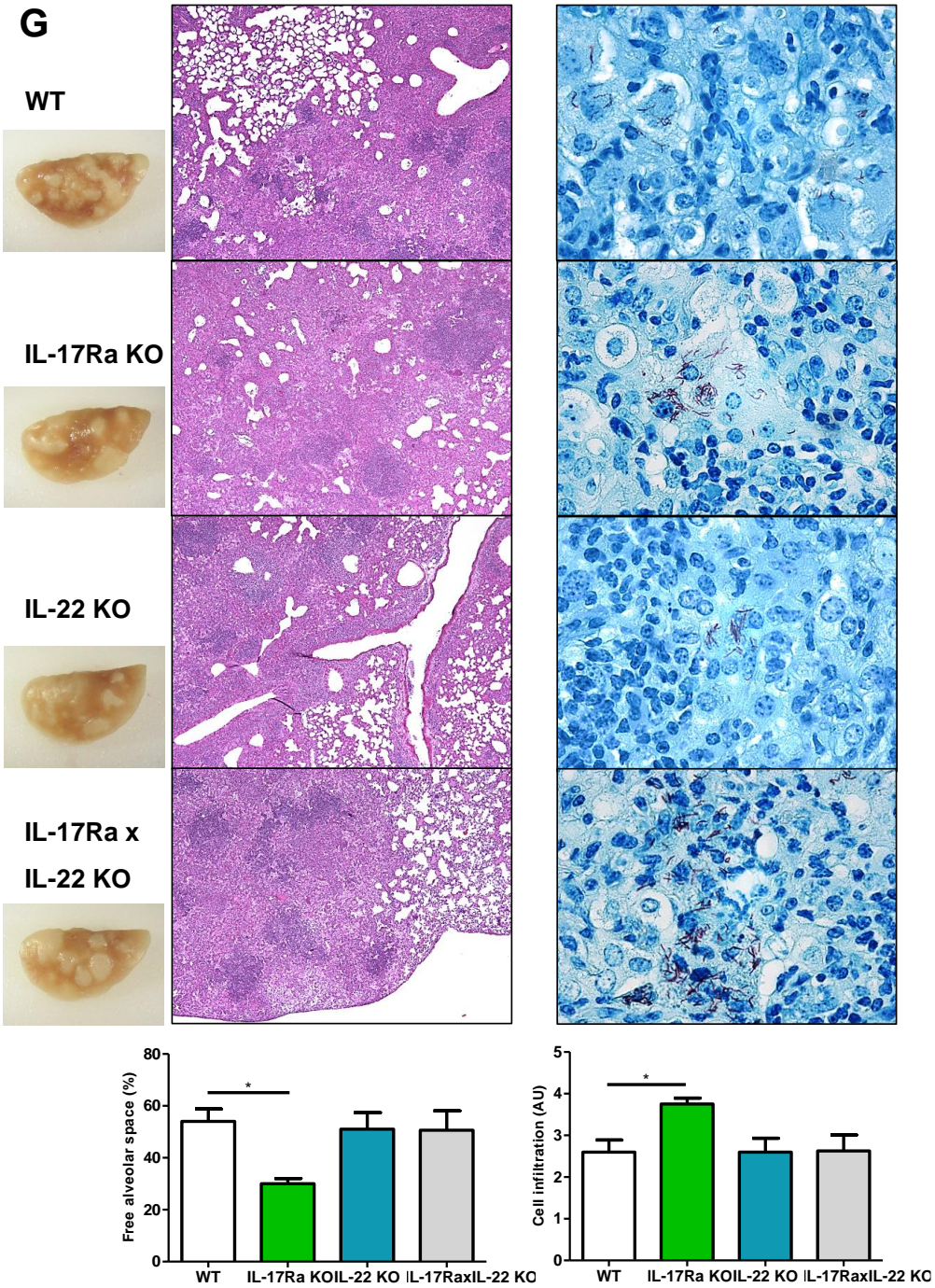


Figure 5

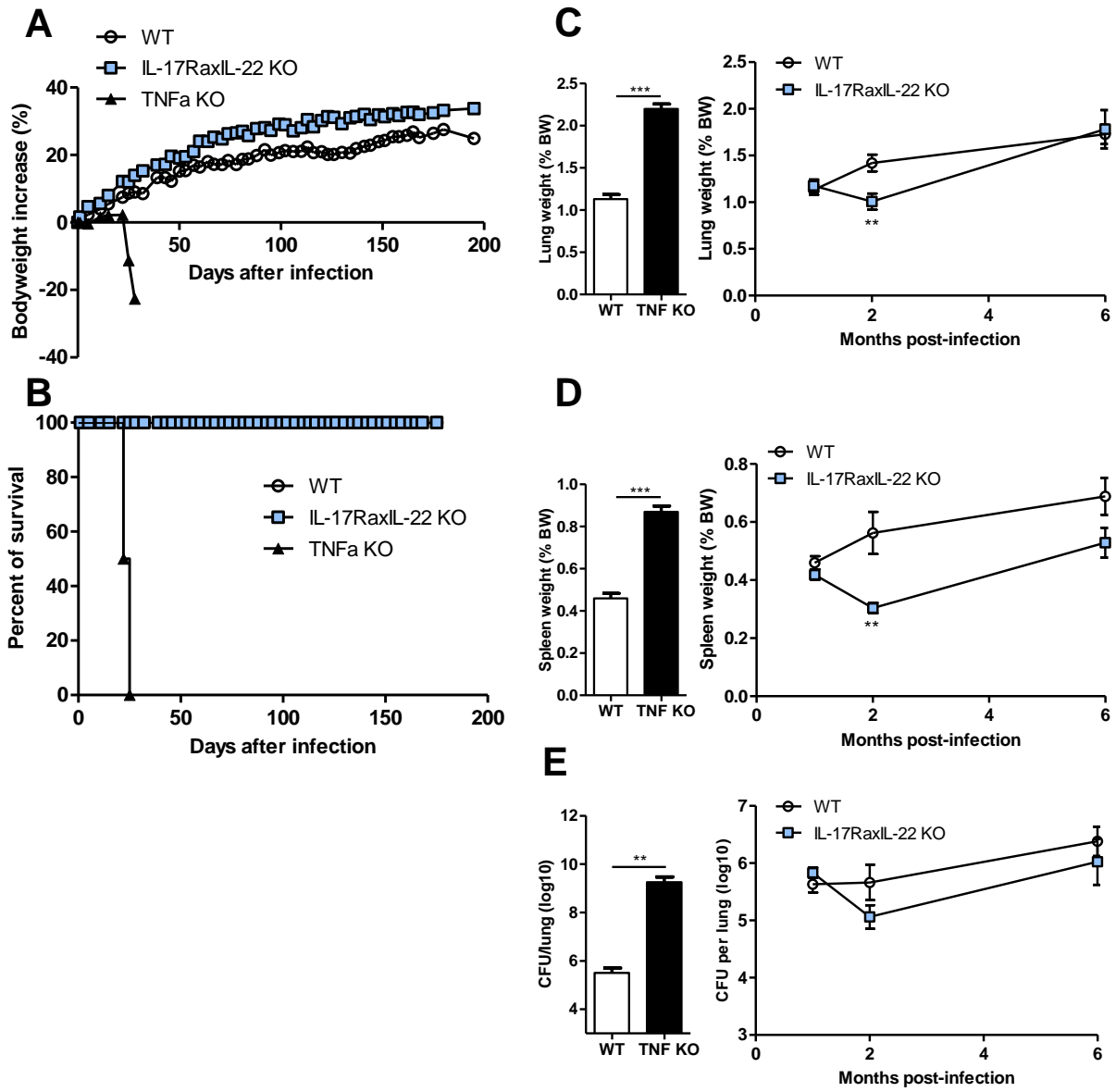


Figure 5

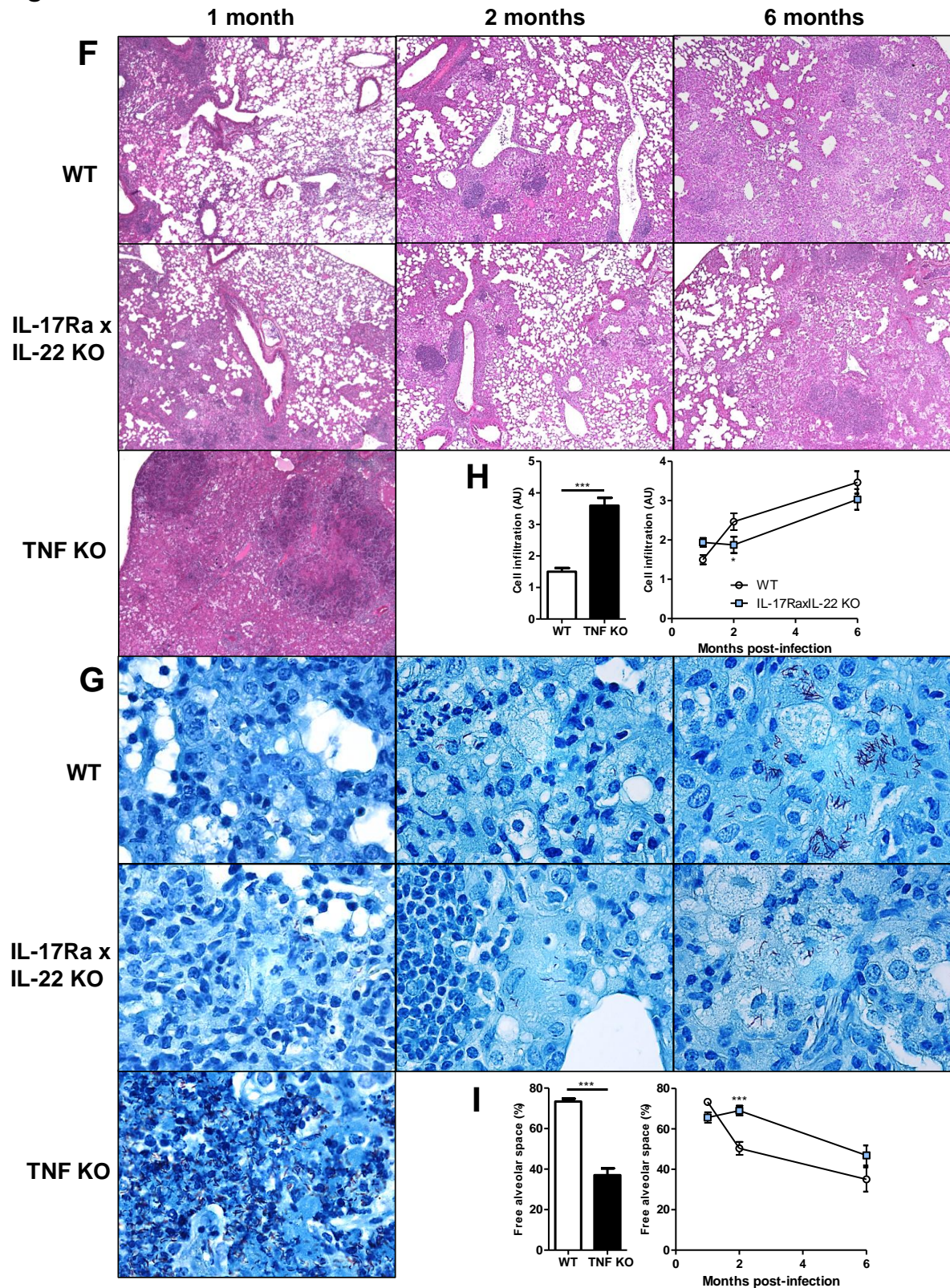
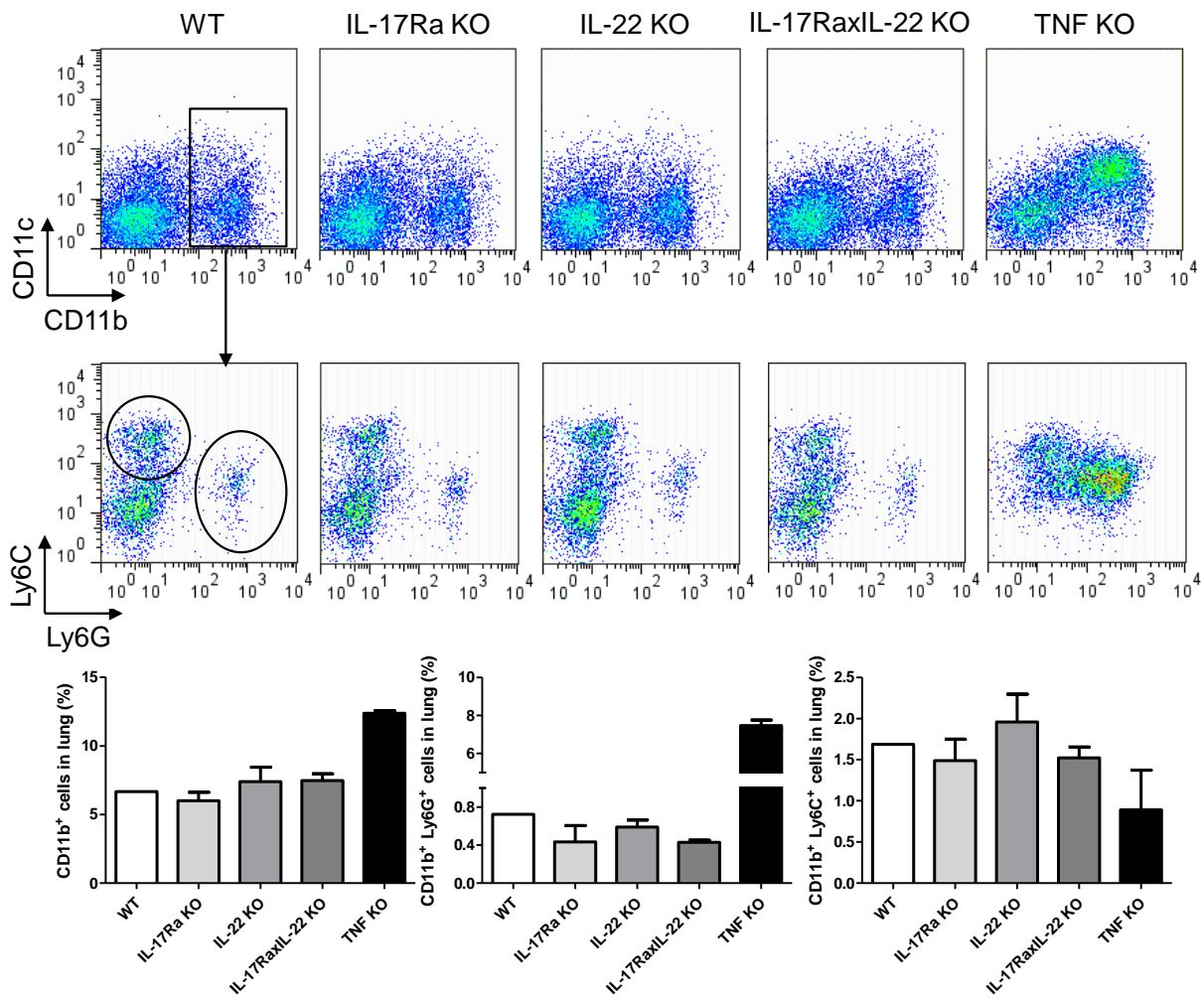


Figure 6

**A : 1 month**



**B : 2 months**

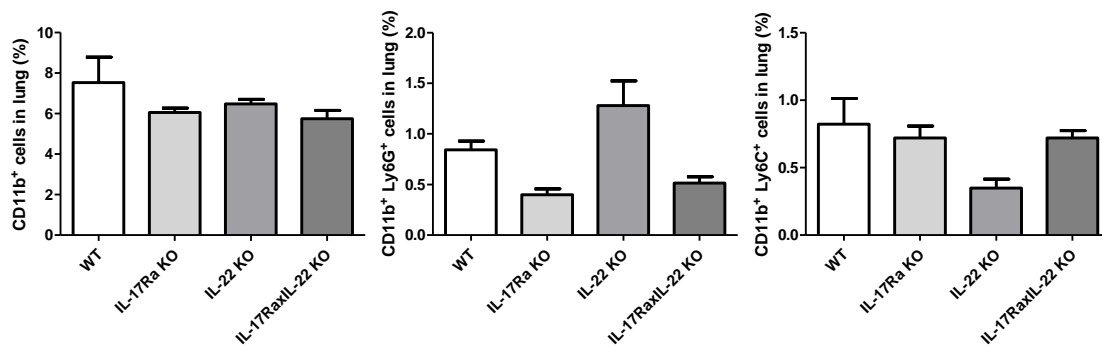




Figure 6

C

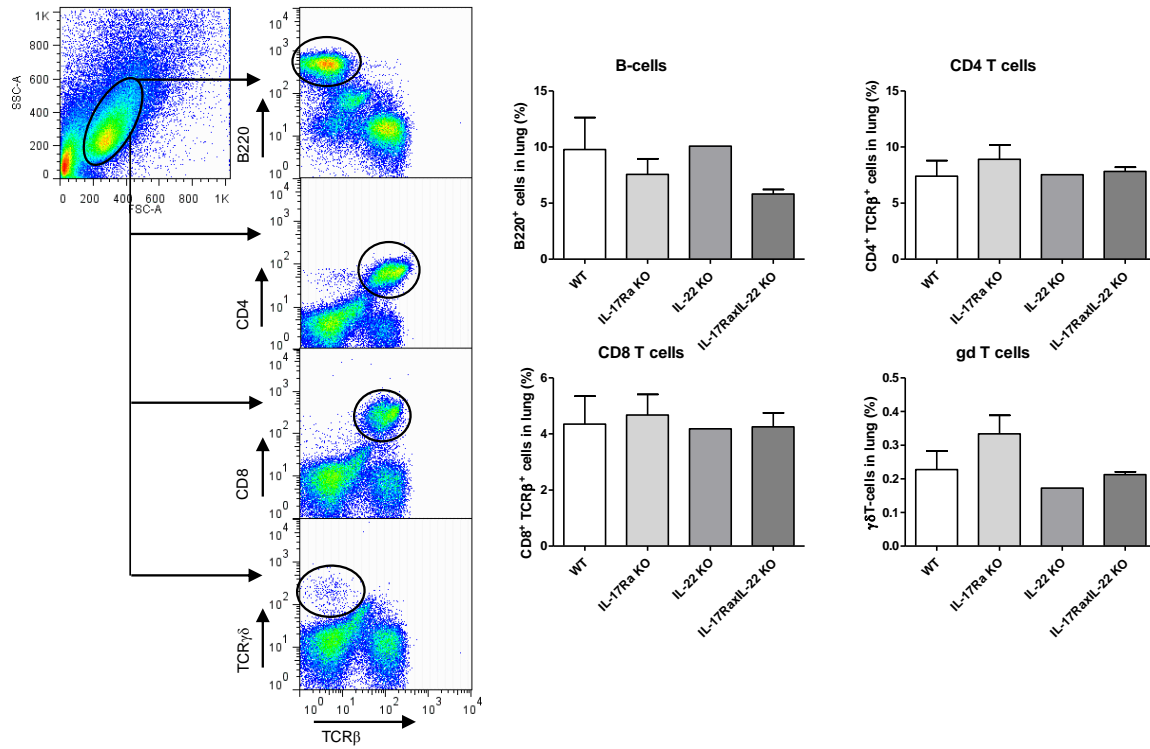
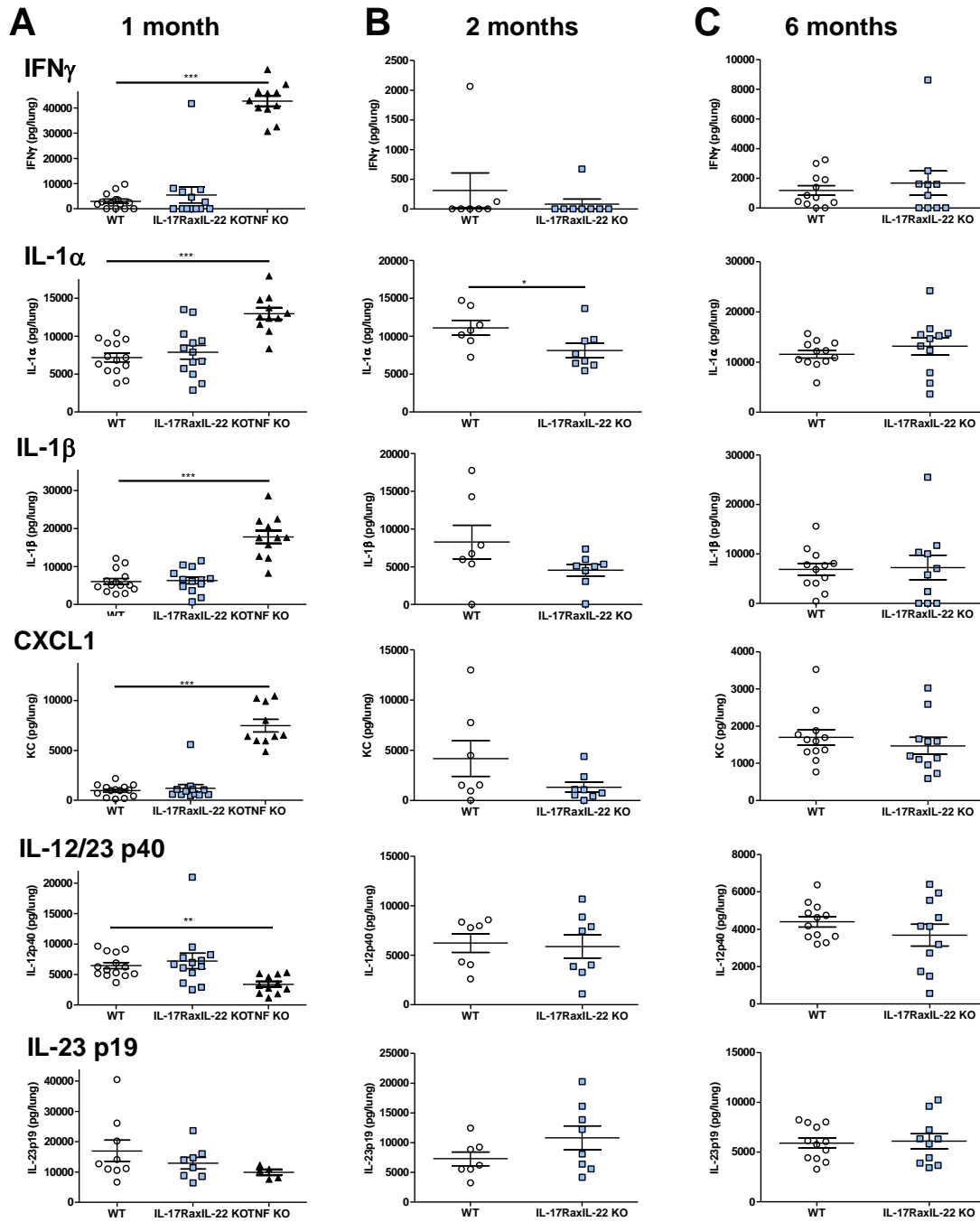
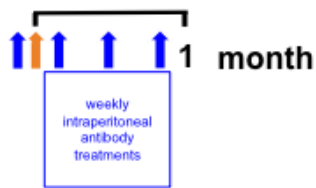


Figure 7

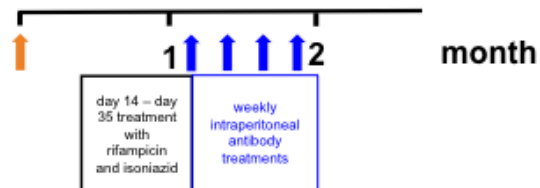


## Supplementary Figure 1

A. Comparison of anti-IL-17A, anti-IL17F, anti-TNF $\alpha$  antibody treatment and TNF $\alpha$ -deficient mice in acute *M. tuberculosis* model



B. Comparison of anti-IL-17A antibody treatment and TNF $\alpha$ -deficient mice in *M. tuberculosis* reactivation model



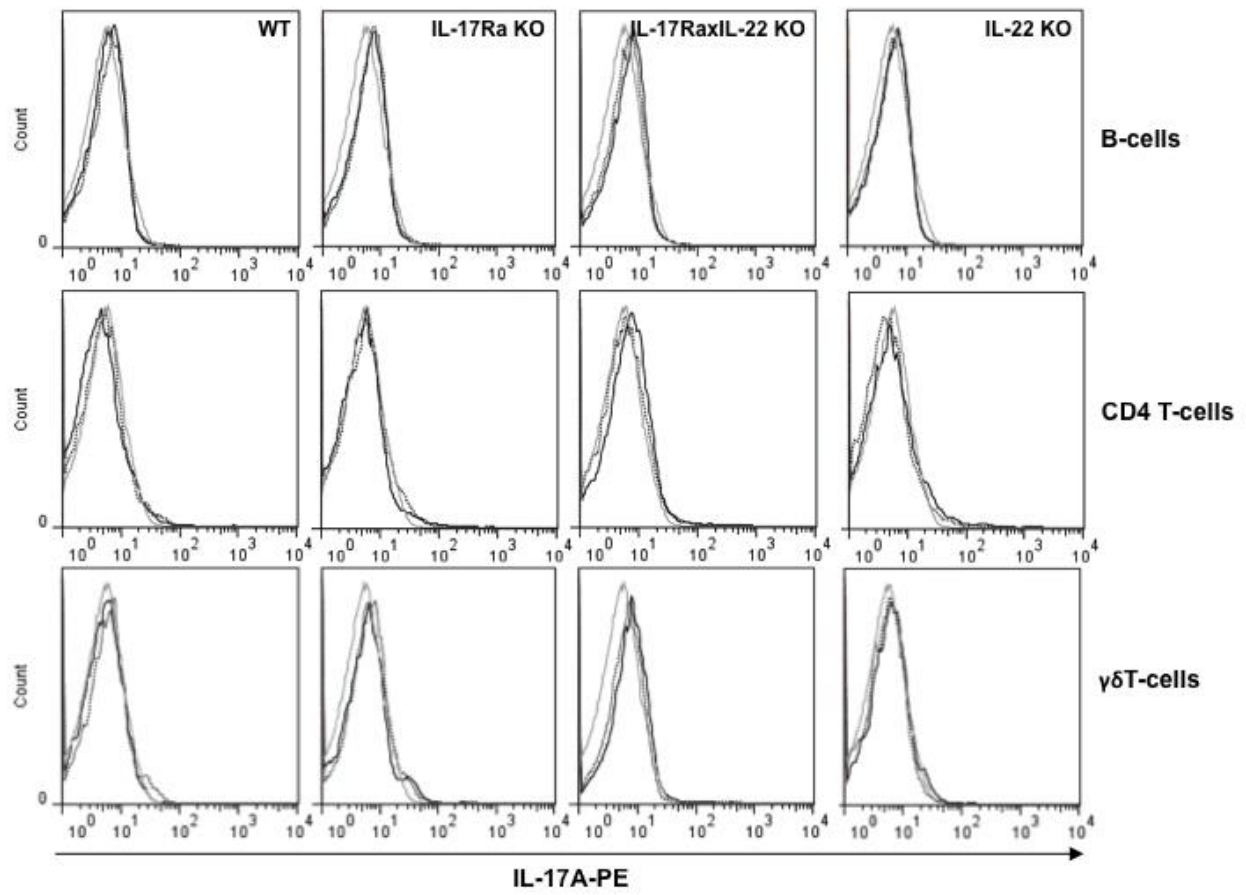
C. Comparison of IL-17RA-, IL-22-, IL-17RA-IL-22- and TNF $\alpha$ -deficient mice in chronic *M. tuberculosis* model



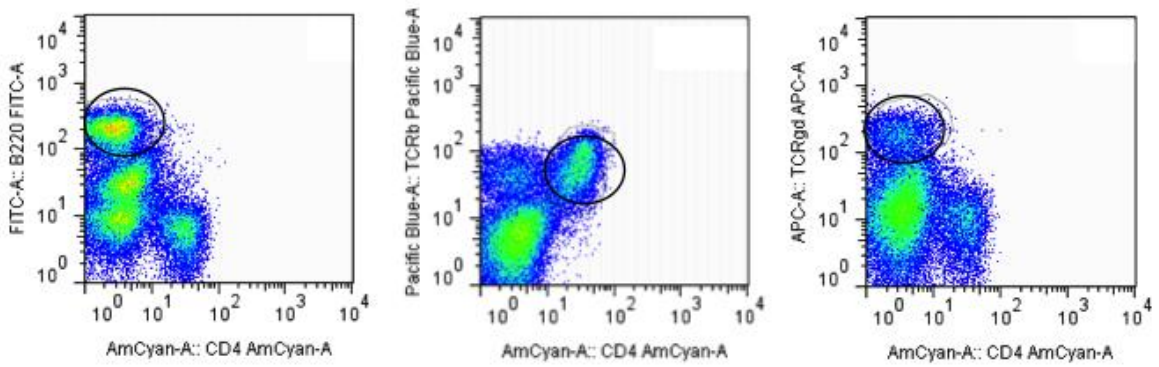
1000 CFU aerosol  
*Mycobacterium tuberculosis*  
infection

## Supplementary Figure 2

**A**



**B**



## ~ Discussion ~

---

Avec 9 millions de nouveaux cas et une mortalité s'élevant à plus d'1,5 million chaque année, la tuberculose est un problème de santé majeur au niveau mondial et fait partie des principaux plans de lutte de l'OMS. De nombreuses équipes de recherche se penchent sur de nouveaux candidats pour une vaccination plus efficace, et les efforts internationaux se concentrent également sur un diagnostic efficace des populations pour prendre en charge un maximum de patients (Tye *et al.*, 2015; WHO, 2014). Il est essentiel de mieux comprendre les relations entre le système immunitaire de l'homme et *M. tuberculosis* pour parvenir à établir des stratégies thérapeutiques efficaces, et ceci est rendu possible grâce à l'utilisation de modèles animaux, qui seront discutés en partie I. Au cours de mes 3 années de thèse, j'ai pu aborder plusieurs aspects de ces relations Hôte/Pathogène à travers l'étude de deux voies de signalisation : la voie IL-36/IL-36R et la voie TNF/TNFR1. Ainsi, alors que nous démontrons une implication limitée de l'IL-36 au cours de la réponse à l'infection par *M. tuberculosis*, nous avons approfondi les connaissances sur le rôle de la signalisation par le TNF dans cette réponse. Ces deux études seront discutées dans les parties II et III.

J'ai également eu la chance de pouvoir m'impliquer dans la recherche translationnelle en mettant à profit notre modèle murin de tuberculose pour étudier les effets d'anticorps neutralisants l'IL-17A et l'IL-17F, en comparaison directe avec les effets connus des anticorps anti-TNF. Pour aller plus loin, nous avons également adressé la question de compensation entre les voies IL-17 et IL-22 en utilisant des souris déficientes pour ces deux voies de signalisation. Cette étude nous a permis de conclure que l'utilisation de traitements ciblant l'IL-17 ne devrait avoir que peu d'impact sur la réponse immunitaire à la tuberculose, et que les risques de réactivation liés à ces anticorps neutralisants sont très limités. Ces résultats seront discutés dans la partie IV.

## *I. Relevance du modèle murin pour l'étude de la réponse immunitaire à la tuberculose*

Il existe de nombreux modèles d'étude de la tuberculose : rongeurs, macaques, lapin, poisson-zèbre... Les différentes expériences que j'ai menées au cours de ma thèse se sont appuyées sur le modèle murin déjà établi au laboratoire. La souris nous offre certes de très nombreux avantages techniques et scientifiques, mais il existe malgré tout des divergences entre sa réponse immunitaire de celle de l'homme.

Tout d'abord, il est difficile de modéliser l'infection latente chez la souris, telle qu'elle se met en place chez l'homme. En effet, la croissance bactérienne suit une courbe logarithmique jusqu'à atteindre un plateau d'environ  $1.10^6$  bactéries dans les poumons au bout de 3-4 semaines, au moment où l'immunité cellulaire se met en place (Flynn *et al.*, 2005). Il s'agit donc plutôt d'une phase chronique chez la souris, avec une charge bactérienne qui demeure relativement élevée et une pathologie qui progresse du fait de la présence constante de mycobactéries dans les poumons (Rhoades *et al.*, 1997). Chez l'homme, en revanche, le nombre de bactéries dans les poumons est quasi-indétectable en phase latente. L'administration d'antibiotiques permet de diminuer efficacement la charge bactérienne chez la souris et ainsi de mimer la latence de la pathologie (Scanga *et al.*, 1999). Une autre différence majeure dans la pathologie murine concerne la formation, la structure et aussi l'évolution des granulomes ([Figure 14](#)). Alors que le granulome humain est bien structuré en couches concentriques sphéroïdes avec des macrophages au centre et des lymphocytes en périphérie, le tout limité par une coiffe fibrotique, le granulome murin est certes localisé et structuré, mais les couches concentriques sont moins bien discernables et la plupart du temps non sphéroïdes. De plus, les structures granulomateuses murines présentent peu d'hétérogénéité contrairement à l'homme : les centres nécrotiques, les cavités et les coiffes fibrotiques observées chez l'homme ne sont pas ou très peu visibles chez la souris, exception faite des animaux immunodéficients tels que les  $TNF^{-/-}$  qui vont présenter de larges zones de nécroses au sein des structures granulomateuses (Tsai *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il existe de la variabilité intra-espèce parmi les différents fonds génétiques des souris consanguines qui sont utilisées dans la recherche. Il est ainsi possible de distinguer des fonds génétiques susceptibles (CBA, C3HeB/FeJ, DBA/2, et 129SvJ) et des fonds génétiques résistants (C57BL/6 J et BALB/c). Cependant, les analyses des différences génétiques entre ces souches murines ont permis d'approfondir les connaissances de la communauté scientifique sur la réponse immunitaire à la tuberculose (Gautam *et al.*, 2015; Keller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2004).

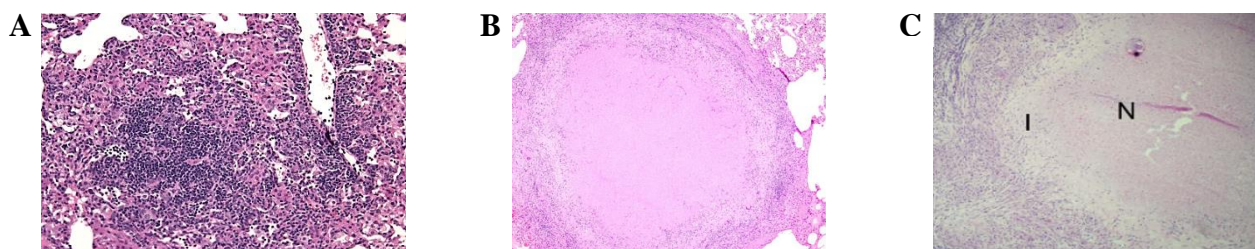
Il est important de noter que la dose d'infection utilisée puisse influencer la susceptibilité/la résistance des animaux. A forte dose, les animaux de fond génétique résistant ne présentent pas de phénotype différent des souris susceptibles (Medina and North, 1998). La dose choisie pour les expérimentations est ainsi un paramètre essentiel, mais elle dépend de la virulence de la souche de mycobactéries utilisée ; bien que virulente, la souche de laboratoire H37Rv que nous avons utilisée dans nos expérimentations est sans doute moins virulente que certains isolats cliniques, et elle peut même s'atténuer au fil du temps. Pour tenter de s'affranchir des biais introduits par des différences de virulence entre les batchs de *M. tuberculosis* utilisés, nous « calibrons » la dose d'instillation à chaque batch dans des souris TNF<sup>-/-</sup> et nous ajoutons donc à chaque expérience un groupe référence de souris déficientes pour le TNF, de manière à observer un phénotype similaire d'une expérience à l'autre. D'autre part, la voie d'administration est très importante : l'infection par aérosols ou par voie intranasale va privilégier la colonisation de l'organe cible, le poumon, tandis que l'infection par voie intraveineuse va d'abord atteindre la rate et le foie par la circulation sanguine avant d'atteindre le poumon.

Malgré ces limites, la souris est un organisme mammifère, avec toute la complexité que cela implique, qui permet l'étude des relations Hôte-Pathogène dans un environnement cellulaire similaire à celui de l'homme. D'un point de vue technique, la souris est idéale pour cette étude tant au niveau du coût d'élevage, de l'éthique, de la faisabilité, que de sa taille qui la rend facile à manipuler et du nombre d'individus par groupe expérimentaux. En outre, les lignées transgéniques ainsi que les outils génétiques et moléculaires disponibles chez la souris sont extrêmement nombreux et développés. *M. tuberculosis*, la souche virulente pour l'homme, est capable d'induire une pathologie principalement pulmonaire chez la souris, et le modèle murin est généralement résistant à la tuberculose comme 90% de la population humaine, alors que le cochon d'Inde par exemple est extrêmement sensible à l'infection même d'une mycobactérie unique. La progression de la pathologie chez les souris immunodéficientes est assez représentative de ce qui est observé chez les patients immunodéprimés, infectés par le VIH par exemple. Ainsi, la pathologie tuberculeuse chez la souris présente des similitudes avec celle observée chez l'homme (McMurray, 2001; Orme and Basaraba, 2014) y compris dans la structuration des granulomes. Une étude a ainsi décrit dans les granulomes humains la présence d'agrégats de cellules T CD4<sup>+</sup> parmi des macrophages, un nombre plus limité de cellules T CD8<sup>+</sup> quelques agrégats de cellules B, ce qui correspond à ce qu'il est possible d'observer chez la souris (Brighenti and Andersson, 2012). De plus, l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-12, l'IFN $\gamma$  ou encore le TNF par exemple a montré l'implication cruciale de ces médiateurs dans l'établissement de la réponse

immunitaire à *M.tuberculosis* chez la souris, ce qui a aussi été mis en évidence chez l'homme (Bustamante *et al.*, 2014; Filipe-Santos *et al.*, 2006).

Les primates non humains sont également utilisés en tant que modèle d'étude de la tuberculose. Ils présentent l'énorme avantage de développer une pathologie cliniquement très proche de celle de l'homme, que ce soit dans la structure et l'hétérogénéité des granulomes, l'établissement de formes actives et latentes de tuberculose, mais aussi dans la cinétique et l'évolution de la pathologie (Flynn *et al.*, 2015). De plus, les réactifs et traitements établis chez l'homme sont également actifs chez le primate : l'utilisation d'un tel modèle permet donc non seulement l'étude de la réponse immunitaire au niveau local (granulomes), avec la possibilité de transposer plus facilement les résultats chez l'homme, mais aussi de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Néanmoins, travailler avec les primates non-humains présente également des contraintes éthiques et pratiques importantes : le coût d'élevage et d'expérimentation sur l'animal est extrêmement élevé, le nombre d'individus par groupes expérimentaux est restreint, la manipulation de l'animal est plus complexe que celle de la souris, et l'expérimentation est rendue difficile par les contraintes éthiques. De plus, les outils génétiques et moléculaires sont moins développés pour ce modèle.

Ainsi, l'utilisation du modèle murin a, sans aucun doute, permis de très grandes avancées aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche clinique, au niveau de l'immunité antituberculeuse (Cooper, 2015; Dharmadhikari and Nardell, 2008). Cela reste cependant un modèle, avec ses avantages et ses limites, et les différences physiopathologiques entre l'homme et la souris doivent être prises en compte non seulement lors de la conception des expérimentations mais également lors de l'interprétation des résultats obtenus. Enfin, la souris n'exempte pas l'utilisation des autres modèles expérimentaux, comme le lapin le cochon d'Inde ou le primate non humain : il est primordial au contraire de garder cette diversité et de comparer et confronter les résultats obtenus dans chaque modèle avec la tuberculose chez l'homme afin d'enrichir nos connaissances des relations hôte-pathogène qui influencent l'issue de la pathologie.



**Figure 14. Comparaison des granulomes observés chez différentes espèces.** Chez la souris, les granulomes présentent des agrégats de lymphocytes parmi de nombreux macrophages (A, données propres). Les macaques (B, Flynn JL., 2015) développent en revanche des granulomes extrêmement similaires à ceux observés chez l'homme (C, Russel D., 2009). On distingue un centre nécrotique (N) entouré de macrophages spumeux constituant une interface (I), puis d'une couronne lymphocytaire.



## II. L'IL-36 n'est pas essentielle au contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*

Une partie de ma thèse s'est portée sur l'étude d'une cytokine, l'IL-36, récemment découverte et membre de la famille de l'IL-1. Nous avons notamment montré une augmentation de l'expression de l'IL-36 $\gamma$ , forme majoritaire dans les poumons, lors d'inflammation pulmonaire induite par le LPS mais aussi après infection systémique par *M. bovis* BCG, ou de manière encore plus marquée après l'infection intranasale par *M. tuberculosis* chez des souris TNF<sup>-/-</sup>. De même, l'IL-36 $\gamma$  est induite dans les poumons suite à une instillation d'*Aspergillus fumigatus*, et la voie de signalisation de l'IL-36 est impliquée dans l'induction des réponses Th1 et Th17 dans ce modèle (Gresnigt *et al.*, 2013). Or, la polarisation Th1 et la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> compétents sont essentielles pour contrôler l'infection (Mogues *et al.*, 2001): de fait, l'épidémie de VIH, qui induit une lymphopénie importante des T CD4<sup>+</sup>, est dévastatrice parmi les patients tuberculeux (Kwan and Ernst, 2011; Markowitz *et al.*, 1997). Nous avons donc souhaité adresser le rôle de l'IL-36 dans le contrôle des infections mycobactériennes.

Nous avons infecté des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-36 avec *M. bovis* BCG à raison de 2.10<sup>6</sup> CFU par voie intraveineuse ou *M. tuberculosis* (1000 CFU par poumon par voie intranasale). Dans ces deux modèles, nos résultats démontrent une implication limitée de la voie IL-36 dans le contrôle des infections mycobactériennes : en effet, bien que la déficience en IL-36R induise une inflammation pulmonaire et une expression de CXCL1 plus importante, ceci reste transitoire et n'a pas d'impact sur la survie des animaux, ni sur la charge bactérienne et la réponse inflammatoire.

L'IL-36 étant une cytokine pro-inflammatoire capable de stimuler la réponse Th1, nous nous attendions à une implication plus conséquente dans la réponse à l'infection mycobactérienne. En effet, L'IL-36 induit la production d'IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF et IL-23 par les BMDCs et augmente l'expression de CD80, CD86 et du CMH II. D'autre part, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisent, en réponse à l'IL-36, des cytokines telles que l'IFN $\gamma$ , l'IL-4 et l'IL-17 (Vigne *et al.*, 2011). Le rôle crucial de l'IL-12, l'IFN $\gamma$  et du TNF dans la réponse immunitaire à *M. tuberculosis* suggère que l'IL-36 pourrait être importante pour l'initiation de cette réponse. En outre, l'IL-36 $\gamma$  semble être majoritairement produite par les cellules épithéliales bronchiques, qui font partie des premières cellules en contact avec les bacilles lors de la primo-infection, et est capable d'augmenter le recrutement de neutrophiles et la production de chimiokines dans les poumons (Ramadas *et al.*, 2011). Or, les neutrophiles sont importants pour contrôler la charge bactérienne

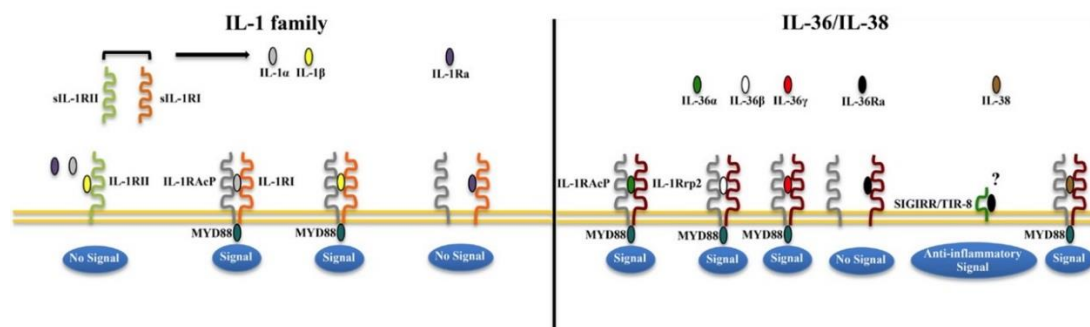
dès la première semaine après infection par *M. tuberculosis* (Pedrosa *et al.*, 2000) ; donc l'IL-36, en induisant un recrutement précoce de neutrophiles, participerait à l'immunité antituberculeuse. Cependant, nous démontrons ici que la voie IL-36R n'est pas indispensable à la mise en place de la réponse immunitaire aux mycobactéries, dans des conditions expérimentales qui sont fatales pour des souris TNF<sup>-/-</sup>.

Notre équipe s'intéresse à l'étude de la famille de l'IL-1 depuis maintenant plusieurs années. Nous avons ainsi précédemment démontré l'implication cruciale de l'IL-1R1 et de sa molécule adaptatrice MyD88 dans le contrôle de l'infection (Fremond *et al.*, 2007; Fremond *et al.*, 2004). Récemment, l'apparition de traitements anti-inflammatoires ciblant les ligands de l'IL-1R1 nous a conduit à nous demander si leur utilisation pourrait entraîner des cas de réactivation de tuberculose latente chez les patients. Nous nous sommes donc attachés aux rôles respectifs des deux ligands de l'IL-1R1, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , en utilisant des souris déficientes respectivement pour l'IL-1 $\alpha$  ou pour l'IL-1 $\beta$ . Nous avons ainsi pu démontrer que la présence d'au moins un ligand de l'IL-1R1 suffit au contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* (Bourigault *et al.*, 2013a) et que la virulence de la souche infectieuse a très probablement un effet sur l'implication de la voie IL-1, ce qui expliquerait les résultats d'autres équipes (Mayer-Barber *et al.*, 2011; Mayer-Barber *et al.*, 2010). En effet, des souris déficientes en IL-1R1 ou double déficientes en IL-1 $\alpha\beta$  sont très susceptibles à l'infection par *M. tuberculosis* et succombent en 5 semaines, alors qu'elles sont capables de contrôler une infection par *M. bovis* BCG : des souris TNF<sup>-/-</sup>, en revanche, sont incapables d'établir une réponse immunitaire efficace après infection par *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis* et ne survivent que 4-5 semaines (Bourigault *et al.*, 2013a). La virulence de la souche utilisée semble donc déterminante dans les voies de signalisation nécessaire pour l'établissement d'une réponse immunitaire correcte. De fait, les IFN de type I sont induits par *M. tuberculosis* mais pas par *M. bovis* BCG, ce qui semble être associé à la présence du complexe ESX-1 (Novikov *et al.*, 2011; Stanley *et al.*, 2007), et ont potentiellement un effet délétère pour l'hôte. Il a récemment été montré que l'induction de ces IFN de type I serait liée à l'activation de la voie cGAS/STING via le système de sécrétion ESX-1 qui induirait une perforation de la membrane des phagosomes pour l'exposition des PAMPs de *M. tuberculosis* au système de surveillance cytosolique (Manzanillo *et al.*, 2012). Des patients atteints de la forme active de la tuberculose présentent une signature transcriptomique typique, dominée par les IFN de type I, et ce profil est diminué par un traitement efficace (Berry *et al.*, 2010), ce qui démontre une implication négative des IFN de type I dans la pathogenèse de la tuberculose chez l'homme. D'autre part, la virulence de différentes souches de *M. tuberculosis* a été associée avec de forts taux d'IFN de type I (Manca *et al.*, 2001; Manca *et al.*, 2005). Ce rôle délétère des IFN de type I semblerait imputé à

l'inhibition de la réponse Th1 : ainsi, les IFN de type I seraient capables d'inhiber la production d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* via l'induction d'IL-10 et d'IL-1Ra, mais aussi via l'inhibition de l'inflammasome NLRP3, responsable de la maturation post-traductionnelle de l'IL-1 $\beta$  (Guarda *et al.*, 2011; Mayer-Barber *et al.*, 2011; McNab *et al.*, 2015; Novikov *et al.*, 2011). Les différences existant entre une souche virulente et une souche avirulente sont donc essentielles pour l'activation et la mise en place de la réponse immunitaire, et les voies de signalisation impliquées peuvent différer fortement selon la virulence. Nous avons testé le rôle de la voie de signalisation de l'IL-36 dans un modèle d'infection systémique à *M. bovis* BCG et dans un modèle d'infection des voies aériennes par *M. tuberculosis*. Nos résultats indiquent que l'activation de la voie IL-36R n'est pas essentielle au contrôle de l'infection aussi bien par *M. bovis* BCG que par *M. tuberculosis*.

Une étude plus récente a montré que l'IL-1 $\beta$  requiert la voie de signalisation TNF pour l'inhibition de la réplication de *M. tuberculosis* dans les macrophages, alors que les effets antimicrobiens du TNF sont indépendants de la voie IL-1 (Jayaraman *et al.*, 2013). Il semble donc que le TNF seul soit suffisant pour le contrôle de l'infection par une souche non virulente comme *M. bovis* BCG ; cependant, la maîtrise de la croissance de *M. tuberculosis* au sein des macrophages nécessite une boucle d'amplification de la voie TNF apportée par l'IL-1. Ainsi, si les animaux infectés par *M. bovis* BCG et déficients pour la voie IL-36 sont capables de contrôler l'infection, comme dans le cas de la voie IL-1, la présence du TNF dans ces souris IL-36R<sup>-/-</sup> est peut-être suffisante pour le contrôle de l'infection. Cependant, contrairement aux souris IL-1R1<sup>-/-</sup>, les souris déficientes pour l'IL-36R établissent une réponse immunitaire capable de contrôler l'infection par une souche virulente de *M. tuberculosis*. Il semble donc que la présence des voies IL-1 et TNF soient suffisantes pour une immunité compétente contre l'infection par *M. tuberculosis*, de manière indépendante de l'IL-36. De plus, des souris déficientes pour l'IL-1 $\alpha$  ou pour l'IL-1 $\beta$  présentent une charge bactérienne significativement plus élevée que les souris de type sauvage 4 mois post-infection (Bourigault 2013 et données non publiées), tandis que la charge bactérienne est similaire entre les souris IL-36R<sup>-/-</sup> et les contrôles. Ceci suggère que la présence de l'IL-36 et d'un des 2 ligands de l'IL-1R1 n'est pas suffisante pour un bon contrôle de l'infection en phase chronique. D'autre part, l'IL-36R et l'IL-1R1 partagent l'utilisation de la chaîne IL-1RAcP pour leur signalisation : ainsi, l'absence de l'IL-36R peut même potentiellement favoriser la voie IL-1 en laissant des chaînes IL-1RAcP disponibles si celles-ci sont limitantes ([Figure 15.](#)), et donc augmenter légèrement la clairance des bacilles dans les poumons. Les interactions et le mode de fixation de l'IL-1RAcP avec l'IL-1R1 et l'IL-1 $\beta$  ont été élucidées (Thomas *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010) et ont révélées des domaines particuliers situés pour la

plupart au niveau de boucles connectrices. Par analogie, il a été établi que les résidus mis en jeu dans les interactions entre l'IL-1RAcP et l'IL-36R seraient similaires, mais aucune étude ne l'a encore démontré. Récemment, il a néanmoins été montré que les résidus impliqués dans l'interaction de l'IL-36 $\gamma$  et l'IL-36Ra avec le récepteur IL-36R diffèrent de ceux mis en œuvre entre l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1Ra avec l'IL-1R1 (Gunther and Sundberg, 2014). Ces résultats indiquent que des différences fines existent entre les voies IL-1 et IL-36, et impliquent une possible différence d'affinité de l'IL-1RAcP pour l'IL-1R1 et l'IL-36R. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires pour évaluer si la chaîne IL-1RAcP est effectivement limitante dans les signalisations IL-1 et IL-36.



**Figure 15. Comparaison des voies IL-1 et IL-36.** Les IL-1s signalent via l'association des chaînes IL-1R1 et IL-1RAcP, et font intervenir la molécule adaptatrice MyD88. De manière similaire, l'IL-36 se fixe sur son récepteur IL-36R (ou IL-1Rrp2) associé à la chaîne IL-1RAcP pour induire le recrutement de MyD88 et la cascade de signalisation (Adapté de (Lopetuso *et al.*, 2013)).

Des études ont montré que la voie IL-36 est fortement impliquée dans la pathogenèse du psoriasis. Ainsi, la surexpression d'IL-36 au niveau de la peau conduit à des lésions de type psoriasique chez la souris via l'augmentation de la production de TNF, IL-17A et IL-23, connus pour leur implication dans cette pathologie. De plus, l'absence d'IL-36Ra, l'antagoniste de l'IL-36R, dans ce modèle de surexpression aggrave le phénotype des animaux (Blumberg *et al.*, 2010). Par ailleurs, les souris déficientes pour l'IL-36R sont protégées du développement du psoriasis induit par l'imiquimod, alors que des souris IL-36Ra<sup>-/-</sup> présentent un phénotype aggravé par rapport aux souris de type sauvage (Tortola *et al.*, 2012). Enfin, un traitement anti-IL-36R de souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) greffées avec des échantillons de peau humaine atteinte de lésions psoriasiques conduit à une normalisation de la pathologie observable sur les échantillons de peau greffés (Blumberg *et al.*, 2010). Ainsi des anticorps ciblant l'IL-36 sont envisagés dans le traitement du psoriasis (Wolf and Ferris, 2014), et sont en cours de développement aux Etats-Unis. Nos résultats suggèrent ici que l'utilisation de tels traitements neutralisant l'IL-36 ne devrait pas compromettre la réponse de l'hôte à *M. tuberculosis* avec un risque de réactivation de tuberculose latente limité, contrairement aux traitements neutralisant le TNF, utilisés depuis une dizaine d'années dans l'indication du psoriasis (Chong and Wong, 2007; Tobin and Kirby, 2005).

### *III. La voie TNF/TNFR<sub>1</sub> au centre de l'immunité antituberculeuse*

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis, mais aussi le SIDA, le cancer, la sclérose en plaque... Une exposition chronique au TNF conduit à la cachexie associée au SIDA ou au cancer ; ainsi, la neutralisation du TNF a été envisagée comme traitement de certaines de ces pathologies (Esposito and Cuzzocrea, 2009). Néanmoins, en faibles quantités, le TNF est important pour le maintien de l'homéostasie et le remodelage tissulaire (Tracey and Cerami, 1990). D'autre part, le TNF est essentiel dans la réponse immunitaire à la tuberculose (Flynn *et al.*, 1995). La régulation du TNF est donc cruciale pour maintenir l'équilibre entre système immunitaire compétent et inflammation chronique.

Une seconde partie de ma thèse a donc concerné l'étude de cette voie de signalisation centrale dans l'immunité antituberculeuse, avec non seulement une approche fondamentale dans la compréhension du rôle de la voie TNFR<sub>1</sub> au sein de populations cellulaires spécifiques, mais aussi une approche plus appliquée avec l'établissement d'un modèle animal qui permettra l'étude du mécanisme d'action des traitements anti-TNF.

#### *A. La réponse immunitaire à *M. tuberculosis* nécessite une signalisation fonctionnelle du TNFR<sub>1</sub> sur les cellules myéloïdes*

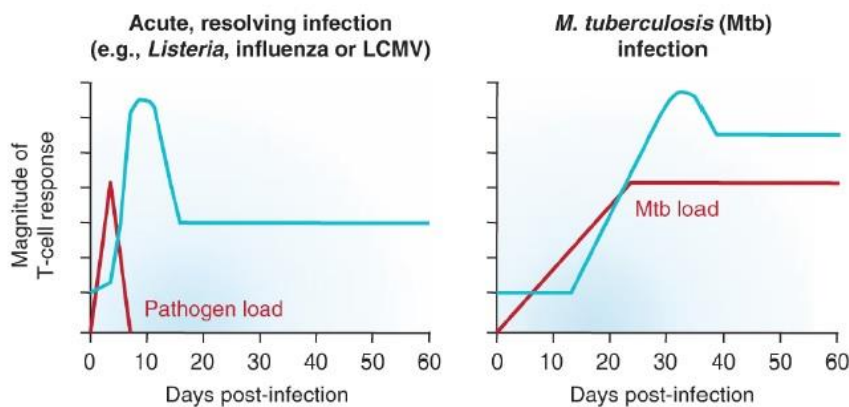
Produit par les macrophages et les cellules dendritiques, les lymphocytes T (Barnes *et al.*, 1993; Bodnar *et al.*, 2001; Giacomini *et al.*, 2001) mais également par les cellules épithéliales et endothéliales, il a été très clairement établi que le TNF est nécessaire et crucial pour le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* via sa fixation au TNFR<sub>1</sub> (Flynn *et al.*, 1995). Ce sont les cellules hématopoïétiques qui sont importantes pour la production de TNF nécessaire au contrôle de l'infection par *M. bovis* BCG (Jacobs *et al.*, 2000c) et parmi elles, le TNF produit par les cellules myéloïdes permet de contrôler la charge bactérienne en phase précoce d'infection, tandis que le TNF issu des lymphocytes T est essentiel pour le contrôle de l'infection à long terme (Allie *et al.*, 2013). De plus, une récente étude démontre que la formation d'agrégats de lymphocytes B dans les poumons après infection par *M. tuberculosis* est dépendante de la sécrétion de TNF par ces

cellules, mais l'absence de production de TNF par les lymphocytes B et donc l'absence des agrégats n'a pas d'incidence sur l'issue de l'infection (Kondratieva *et al.*, 2014). Il semblerait donc que les cellules importantes pour la sécrétion de TNF au cours de l'infection par *M. tuberculosis* soient les macrophages, neutrophiles et/ou cellules dendritiques d'une part, et les lymphocytes T d'autre part. L'objectif de cette partie de ma thèse a été d'étudier la contribution relative de ces différentes populations cellulaires dans la réponse au TNF. Ainsi, notre étude a permis de mettre en évidence un rôle prépondérant du TNFR1 des cellules myéloïdes dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* par rapport au TNFR1 des cellules T ou des cellules non-hématopoïétiques. Ainsi, l'absence du TNFR1 sur les cellules myéloïdes est associée à une très forte susceptibilité des souris à l'infection, tandis que des animaux déficients pour le TNFR1 sur les lymphocytes T ne présentent pas de défaut de contrôle de l'infection.

Dans cette étude, nous avons donc tout d'abord utilisé des souris chimères, possédant soit de la moelle osseuse issue de souris TNFR1<sup>-/-</sup> soit de la moelle osseuse de souris de type sauvage. Nos résultats montrent qu'en transférant de la moelle osseuse TNFR1<sup>-/-</sup> à des animaux de type sauvage, nous transférons également le phénotype de susceptibilité associé à la déficience en TNFR1. En effet, les souris ont dû être sacrifiées 4 semaines post-infection, et présentaient une inflammation et une charge bactérienne pulmonaire plus élevée que les animaux contrôles (souris de type sauvage ayant reçu de la moelle osseuse de type sauvage). A l'inverse, en transférant de la moelle osseuse issue de souris de type sauvage à des animaux déficients pour le TNFR1, l'infection semble contrôlée, avec une survie, une inflammation pulmonaire et une charge bactérienne similaire au groupe contrôle. Ceci indique donc que le TNFR1 exprimé par les cellules hématopoïétiques est essentiel pour le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*.

Par la suite, nous démontrons que des animaux déficients pour le TNFR1 uniquement sur les cellules myéloïdes (M-TNFR1 KO) sont incapables de contrôler l'infection par *M. tuberculosis*, et que l'absence du TNFR1 uniquement sur cette population cellulaire récapitule le phénotype observé chez les souris TNFR1<sup>-/-</sup>. Ainsi, les animaux M-TNFR1 KO ne survivent que 4-5 semaines et présentent une très forte inflammation pulmonaire associée à une charge bactérienne augmentée par rapport aux souris de type sauvage, de manière similaire aux souris TNFR1<sup>-/-</sup>. En revanche, les animaux M-TNFR1 KO présentaient déjà une augmentation significative de l'inflammation pulmonaire ainsi que de la charge bactérienne 3 semaines post-infection, contrairement aux autres groupes expérimentaux, et les niveaux d'IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  et CXCL1, très élevés chez les animaux M-TNFR1 KO, TNFR1<sup>-/-</sup> et TNF<sup>-/-</sup> à 4 et 5 semaines après infection, étaient déjà significativement augmentés chez les souris M-TNFR1 KO 3 semaines post-infection par rapport aux souris de type sauvage. Environ 17-20 jours sont nécessaires pour

permettre la migration des cellules dendritiques vers les ganglions, la maturation des lymphocytes T et enfin leur arrivée dans les poumons après infection par *M. tuberculosis* (Chackerian *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2007). La migration des cellules dendritiques ainsi que l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> est dépendante de la production d'IL-12p40 (Khader *et al.*, 2006) et il a été montré que l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> nécessite un certain nombre de bactéries au niveau des ganglions, le seuil semblant être d'environ 1500 bacilles (Wolf *et al.*, 2008). Ces éléments peuvent expliquer le délai de réponse immunitaire adaptative observé dans les infections par *M. tuberculosis* par rapport aux autres infections ([Figure 16](#)).



**Figure 16. Retard de la réponse immunitaire adaptative après l'infection par *M. tuberculosis*.** Classiquement, la réponse T est initiée 3-5 jours post-infection, et le pathogène est totalement éliminé. En revanche, après l'entrée de *M. tuberculosis* dans les poumons, la réponse T ne s'initie qu'entre 9 et 11 jours plus tard, et les bacilles ne sont pas éliminés (Urdahl *et al.*, 2011).

Les bacilles sont en croissance pendant les deux premières semaines d'infection, puis la charge bactérienne atteint un plateau coïncidant avec le début d'expression d'IFN $\gamma$  dans les poumons (Wolf *et al.*, 2008). De fait, le contrôle de la croissance mycobactérienne a été associé à l'établissement de la réponse immunitaire adaptative dans les poumons. Nos résultats montrent en revanche une augmentation de la charge bactérienne à jour 21 chez les souris M-TNFR1 KO, TNFR1<sup>-/-</sup> et TNF<sup>-/-</sup> ; de manière intéressante, ceci est associé à des taux d'IFN $\gamma$  plus élevés uniquement chez les souris M-TNFR1 KO. En revanche, la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> est plus importante aussi bien chez les souris M-TNFR1 KO que chez les souris TNFR1<sup>-/-</sup> et TNF<sup>-/-</sup> par rapport aux souris de type sauvage 21 jours post-infection (données non montrées), et nous montrons également que la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup>, bien que plus élevée que chez les souris de type sauvage, n'est pas différente entre les souris M-TNFR1 KO, TNF<sup>-/-</sup> et TNFR1<sup>-/-</sup>. La surproduction d'IFN $\gamma$  observée dans les poumons des souris M-TNFR1 KO n'est donc pas due à un nombre plus important de cellules productrices, ni à une production plus importante par cellules. La différence majeure entre les souris M-TNFR1 KO et les souris TNFR1<sup>-/-</sup> est la présence du récepteur TNFR1 sur les cellules lymphoïdes chez les premières. Nous avons donc

posé l'hypothèse que cette surproduction d'IFN $\gamma$  pourrait être due à la fixation du TNF sur le TNFR1 des lymphocytes. Mais nos résultats ont montré que la sécrétion d'IFN $\gamma$  n'est pas dépendante de la signalisation TNF sur les lymphocytes T (Figure S3). Cette différence observée entre les souris M-TNFR1 KO et les souris déficientes pour le TNF ou pour le TNFR1 au niveau des taux d'IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  et CXCL1 à 21 jours post-infection n'est plus visible à 28 et 35 jours ; il en va de même pour la charge bactérienne et l'inflammation pulmonaire. Ainsi, l'augmentation de la production d'IFN $\gamma$  est probablement la conséquence d'un nombre important de bactéries dans les poumons : le défaut de contrôle de cette charge bactérienne pourrait s'expliquer par l'absence de l'activation des mécanismes bactéricides des macrophages par le TNF. Ceci implique par ailleurs que l'IFN $\gamma$  n'est pas suffisant pour activer les macrophages à détruire le bacille, et qu'il agit uniquement en synergie avec le TNF.

De manière intéressante, nous avons pu observer une augmentation de la production d'IL-12p40 au niveau des poumons des souris M-TNFR1 KO à 3, 4 et 5 semaines post-infection par rapport non seulement aux souris de type sauvage mais aussi aux souris TNFR1<sup>-/-</sup>. L'analyse de la source cellulaire de cette IL-12p40 pulmonaire a révélé que ce sont les neutrophiles qui produisent en majorité cette cytokine au cours de l'infection, et que l'absence de TNFR1 sur les neutrophiles induit une plus faible production d'IL-12p40 par ces cellules. Cependant, nos données montrent un recrutement massif de neutrophiles dans les poumons des souris M-TNFR1 KO par rapport aux autres groupes expérimentaux. Ainsi, la surproduction d'IL-12p40 observée chez les souris M-TNFR1 KO suite à l'infection est due à une augmentation du nombre de cellules productrices, et non à une production plus importante par cellule. Nous avons vérifié *in vitro* la capacité des neutrophiles à produire de l'IL-12p40 : la présence d'IL-12p40 dans le surnageant de culture est observable suite à un priming IFN $\gamma$  suivie d'une stimulation LPS, et ceci est concordant avec la littérature (Petrofsky M., 1999). Nous démontrons donc ici que les neutrophiles sont la source cellulaire principale d'IL-12p40 au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. Il a été montré que les neutrophiles facilitent l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> par les cellules dendritiques lors de l'infection par *M. tuberculosis* (Blomgran *et al.*, 2012), et nos résultats suggèrent que la sécrétion d'IL-12p40 par les neutrophiles pourrait constituer un des mécanismes expliquant ce phénomène. D'autre part, les neutrophiles spléniques sont également les cellules les plus infectées par *M. bovis* BCG après infection, en corrélation avec ce qui a été rapporté chez l'homme (Eum *et al.*, 2010). Les patients atteints de la forme active de la tuberculose présentant de forts taux de neutrophiles dans le sang, ces cellules ont été associées à la pathogenèse de la tuberculose. Par ailleurs, la déplétion des neutrophiles en phase chronique induit une diminution de la charge bactérienne et de l'inflammation pulmonaire (Zhang *et al.*, 2009) et l'IL-17 semble impliquée dans



la pathogénèse de la tuberculose via le recrutement de neutrophiles (Cruz *et al.*, 2010; Redford *et al.*, 2010), contribuant à une diminution de l'efficacité de la réponse Th1 (Nandi and Behar, 2011). Néanmoins, les neutrophiles sont recrutés très tôt après infection (Pedrosa *et al.*, 2000) et leur présence permet un contrôle de la charge bactérienne en phase précoce. De plus, les neutrophiles semblent coopérer avec les macrophages pour aboutir à la destruction du pathogène, bien qu'une souche virulente de *M. tuberculosis* soit capable d'inhiber l'apoptose des neutrophiles infectés, ce qui contribue à une activation retardée des cellules T CD4<sup>+</sup> (Blomgran *et al.*, 2012; Lowe *et al.*, 2012). Ainsi, le rôle protecteur ou délétère des neutrophiles au cours de l'infection pourrait être déterminé à la fois par les facteurs génétiques de la bactérie et de l'hôte.

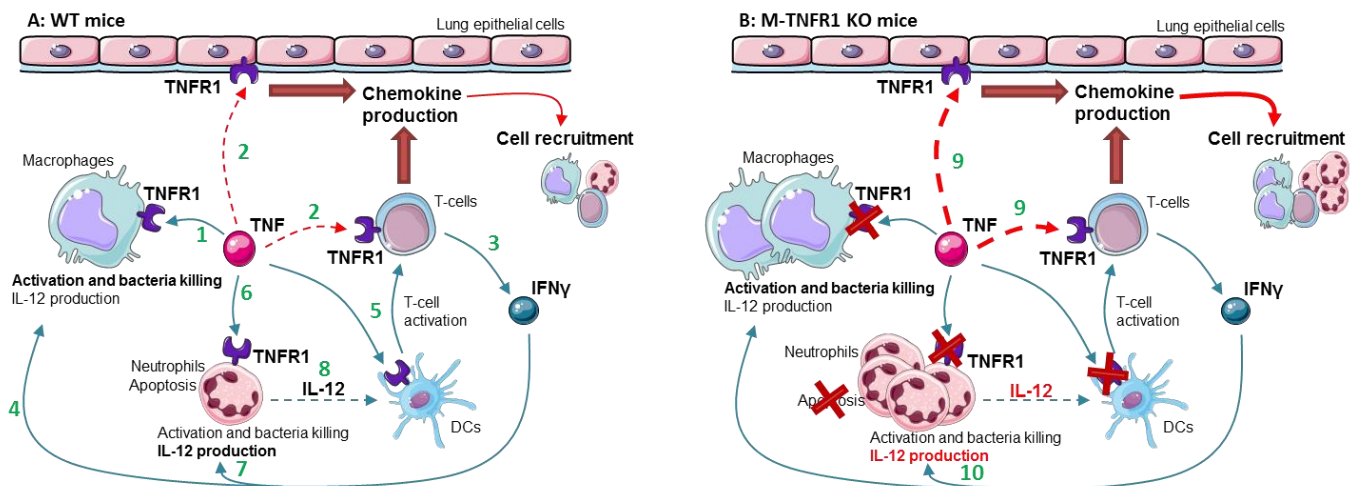
Enfin, nous avons évalué le rôle du TNFR1 des cellules lymphoïdes au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. Les souris déficientes pour le TNFR1 sur les lymphocytes T (T-TNFR1 KO) sont capables de contrôler l'infection et présentent une inflammation et une charge bactérienne similaires aux souris de type sauvage tout au long des 200 jours d'expérimentation. Ainsi, l'absence du TNFR1 sur les lymphocytes T ne compromet pas le contrôle de l'infection même en phase chronique. Des souris déficientes pour le TNF issu des cellules lymphoïdes sont, en revanche, incapables de contrôler l'infection en phase chronique (Allie *et al.*, 2013), ce qui signifie que les lymphocytes sont essentiels pour produire le TNF, qui va ensuite se fixer sur le TNFR1 des cellules myéloïdes pour maintenir une réponse immunitaire compétente capable de contrôler la croissance mycobactérienne. La signalisation TNFR1 n'a donc pas le même rôle en fonction du type cellulaire impliqué au sein du compartiment hématopoïétique essentiel pour la voie TNF/TNFR1 dans le contrôle de la tuberculose. En effet, chez les animaux M-TNFR1 KO, seule la signalisation TNFR1 sur les lymphocytes T est présente, et ceci est associé à une inflammation plus importante. En revanche, quand le TNFR1 n'est présent que sur les cellules myéloïdes, les souris contrôlent l'infection et ne présentent pas d'inflammation exacerbée. Il semble donc que le TNFR1 des cellules T soit plutôt pro-inflammatoire, en induisant la production de cytokines et/ou chimiokines qui vont conduire au recrutement massif de neutrophiles par exemple, tandis que le TNFR1 des macrophages et neutrophiles ait un rôle plutôt anti-inflammatoire en stimulant les mécanismes bactéricides des macrophages et l'apoptose des cellules infectées. Ceci peut probablement expliquer la précocité de l'inflammation pulmonaire observée chez les souris M-TNFR1 KO : nous avons pu en effet mettre en évidence une inflammation pulmonaire augmentée dès 21 jours post-infection chez les souris M-TNFR1 KO, ce qui correspond avec l'arrivée des cellules T dans les poumons (Chackerian *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2007). D'autre part, nous avons pu observer une surexpression du gène *Tbx21* codant pour T-bet, facteur de transcription des cellules Th1, chez les souris M-TNFR1 KO

21 jours post-infection, qui n'est plus observable à 28 et 35 jours post-infection (données non montrées). Or, l'influx de neutrophiles accru au niveau des poumons de ces souris M-TNFR1 KO est associé avec une forte expression d'IL-12p40. Nous pouvons donc supposer que l'IL-12p40 produite par les neutrophiles induit efficacement la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1, qui vont induire une réponse immunitaire pro-inflammatoire via le TNFR1. Les conditions sous-jacentes à l'activation de la voie NFκB ou à l'induction de l'apoptose suite à l'activation du TNFR1 sont complexes et sont encore mal connues. Les mécanismes moléculaires de ces deux cascades de signalisation ont été décrits, mais le contexte cellulaire associé à la survie ou à la mort cellulaire est inconnu à ce jour (Brenner *et al.*, 2015). Les différences que nous avons pu observer dans cette étude suggèrent que le type cellulaire a très probablement une influence sur la signalisation TNFR1. Ainsi, nos résultats semblent montrer que, dans le cadre d'une infection par *M. tuberculosis*, le TNFR1 des cellules myéloïdes serait anti-inflammatoire, tandis que le TNFR1 des cellules lymphoïdes serait pro-inflammatoire : autrement dit, la fixation du TNF sur les macrophages et les neutrophiles favoriserait la voie apoptotique liée à une meilleure clairance bactérienne, mais aussi l'activation de la production de NO et d'IL-1β via l'activation de NFκB. En revanche, la fixation du TNF sur le TNFR1 des lymphocytes T semble grandement favoriser l'activation de la réponse pro-inflammatoire liée à NFκB avec des taux d'IFNγ, IL-1β et CXCL1 très élevés. Il est possible que ce soit la présence du pathogène à l'intérieur de la cellule qui induise l'activation de la voie apoptotique du TNFR1 : il a en effet déjà été montré que la présence de *M. tuberculosis* dans le cytosol est fortement associée à l'activation de l'autophagie (Watson *et al.*, 2012). Ainsi, chez les souris M-TNFR1 KO, l'absence du TNFR1 sur les cellules myéloïdes conduirait à une survie plus importante de cellules infectées et pro-inflammatoires comme les neutrophiles qui sont présents en grande quantités au niveau des poumons, et la signalisation TNFR1 sur les lymphocytes, bien que pro-inflammatoire, n'est pas suffisante pour contrôler la charge bactérienne et maintenir la survie des animaux. Ces subtilités ne sont pas observables chez les souris totalement déficientes pour le TNF ou le TNFR1, ce qui suggère qu'énormément de voies de signalisation sont perturbées suite à la déplétion de la voie TNF/TNFR1, et qu'il est difficile de départager les causes des conséquences.

Une autre différence qui doit être notée entre les animaux M-TNFR1 KO et les animaux TNFR1<sup>-/-</sup> concerne la régulation du TNF : en effet, le récepteur TNFR1 soluble est toujours présent chez les souris M-TNFR1 KO, tandis qu'il est absent des souris TNFR1<sup>-/-</sup>. Ainsi, le TNF est potentiellement régulé à la fois par le sTNFR1 et le sTNFR2 chez les souris M-TNFR1 KO, conduisant à une neutralisation plus importante du TNF que chez les souris TNFR1<sup>-/-</sup>. Il ne semble y avoir aucune différence au niveau des taux de sTNFR1 et de sTNFR2 entre les souris M-TNFR1

KO et les souris de type sauvage (données non montrées), suggérant que l'absence de TNFR1 sur les cellules myéloïdes ne perturbent pas la régulation des récepteurs solubles TNFR1 (et TNFR2) sur les autres populations cellulaires. Ceci suggère également que la fixation du TNF sur les autres types cellulaires n'est pas favorisée par l'absence du TNFR1 sur les cellules myéloïdes.

La [Figure 17](#) résume les observations faites et les hypothèses sur le rôle différentiel du TNFR1 myéloïde et lymphoïde au cours de l'infection par *M. tuberculosis*.



**Figure 17.** Schéma récapitulatif des aspects de la réponse au TNF sur les différentes populations cellulaires au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. **A).** En se fixant sur le TNFR1 des macrophages, le TNF participe à leur activation et à la destruction des bacilles (1). Le recrutement de cellules au niveau des poumons ferait suite, en partie, à la fixation du TNF sur le TNFR des cellules T et des cellules épithéliales (2). La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T est indépendante de la présence du TNFR1 (3), et l'IFN $\gamma$  agit en synergie avec le TNF sur les macrophages pour l'activation des mécanismes bactéricides (4). Le TNF participe également à la maturation des cellules dendritiques aboutissant à l'activation des cellules T (5). Enfin, les neutrophiles constituent la principale source cellulaire d'IL-12p40 dans les poumons suite à la fixation du TNF (6) et à l'action de l'IFN $\gamma$  (7), ce qui conduirait à la facilitation de l'activation des cellules T par les cellules dendritiques (8). **B).** Chez les souris M-TNFR1 KO, la fixation du TNF sur le TNFR1 des lymphocytes et des cellules épithéliales est favorisée (9), conduisant à un important recrutement de cellules inflammatoires qui est associé à une survie prolongée des neutrophiles infectés dans les poumons. Bien que la production de l'IL-12p40 par les neutrophiles soit dépendante du TNFR1, le nombre important de neutrophiles chez les souris M-TNFR1 KO induit une surproduction d'IL-12p40 (10) qui va conduire à une réponse Th1 plus importante et donc potentiellement plus de récepteurs TNFR1 pro-inflammatoires de disponibles pour la fixation du TNF bioactif.

## B. Exploiter le modèle murin pour l'étude de nouveaux traitements anti-TNF

L'utilisation d'anti-TNF a permis de grandes avancées dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, mais a cependant causé des réactivations de tuberculoses latentes chez certains patients. Ces traitements sont de deux types : récepteurs solubles ou anticorps bloquants. Ces deux groupes d'anti-TNF ont montré des différences d'efficacité chez l'homme, ainsi que des différences au niveau des risques de réactivation de tuberculose : en effet, les anticorps bloquants sont plus souvent associés à des risques de réactivations que les récepteurs solubles (Wallis and Ehlers, 2005). De fait, il existe des différences entre les deux classes d'anti-TNF. Tout d'abord, l'Etanercept est capable de lier le trimère de TNF, tandis que l'Infliximab est capable de reconnaître à la fois la forme trimérique et la forme monomérique du TNF, et les complexes TNF-Infliximab sont plus stables que ceux formés par l'Etanercept (Santora *et al.*, 2001; Scallon *et al.*, 2002) ; de plus, les anticorps bloquants ont également une demi-vie plus longue dans le sérum que les récepteurs solubles ; elle s'étend de 8 à 10 jours pour l'Infliximab (jusqu'à 20 jours pour l'Adalimumab, un autre anticorps anti-TNF) contre 4 jours seulement pour l'Etanercept (Furst *et al.*, 2006). D'autre part, l'Infliximab est capable d'induire la cascade du complément et la cytolyse, contrairement à l'Etanercept (Barone *et al.*, 1999; Scallon *et al.*, 1995), ce qui peut conduire à une monocytopenie qui entraînerait la déstructuration des granulomes. Cette monocytopenie est observée chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde traités avec l'Infliximab et pourrait être due à la fixation des anticorps sur le TNF membranaire exprimé à la surface des monocytes, conduisant directement à la mort cellulaire (Lorenz *et al.*, 1996). Enfin, il a été montré que l'Infliximab est capable d'induire une diminution de l'expression d'IFN $\gamma$  dans un modèle de spondylarthrite ankylosante, ce qui n'est pas le cas de l'Etanercept (Zou *et al.*, 2003a, b) ; or, l'IFN $\gamma$  est crucial pour la réponse immunitaire à la tuberculose. Tous ces éléments suggèrent que l'Infliximab est plus efficace pour neutraliser le TNF que ne l'est l'Etanercept, et peuvent expliquer les différences observées entre ces deux traitements quant à la réactivation de tuberculose latente chez les patients. Il a notamment été montré que le TNF bioactif contenu dans les granulomes est moins accessible à l'Etanercept qu'à l'Infliximab (Plessner *et al.*, 2007) ; néanmoins, peu d'études concernent le mécanisme des anti-TNF dans un modèle de tuberculose. Il est en effet difficile d'étudier le mode d'action des traitements anti-TNF, ciblant le TNF humain, dans un modèle murin, dû à la spécificité d'espèce, et les études réalisées chez le macaque (Lin *et al.*, 2010a) sont compliquées par les limites liées au modèle.

Nous avons caractérisé un nouveau modèle d'étude, les souris huTNF KI (human TNF Knock-In), pour lesquelles le gène murin codant pour le TNF a été remplacé par le gène humain. Nos résultats prouvent que les souris ainsi humanisées expriment un TNF humain fonctionnel capable d'orchestrer de manière efficace la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis*. En effet, des macrophages issus de souris huTNF KI répondent aux stimuli LPS et BCG en produisant des quantités de TNF humain similaires aux niveaux de TNF murin produit par des macrophages issus de souris de type sauvage dans les mêmes conditions de stimulation. D'autre part, les souris huTNF KI survivent à l'infection par *M. bovis* BCG tout comme les souris de type sauvage, avec cependant un retard dans le développement des granulomes par rapport aux contrôles. Ce retard pourrait s'expliquer par le fait que le TNF humain ne reconnaît que le TNFR1 murin, et non le TNFR2. Il a été montré que la signalisation via le TNFR1 est cruciale dans la réponse aux infections mycobactériennes, alors que le TNFR2 semble être important pour la régulation de la réponse au TNF via sa forme soluble (Flynn *et al.*, 1995; Keeton *et al.*, 2014). Cependant, la survie des souris déficientes pour le TNFR1 seul est supérieure à celle des souris double-déficientes pour le TNFR1 et le TNFR2 (Keeton *et al.*, 2014) ; de même au cours de nos expérimentations, nous avons observé que les souris TNF<sup>-/-</sup> succombaient à l'infection par *M. tuberculosis* au bout de 28 jours post-infection, contre 35 jours pour les souris TNFR1<sup>-/-</sup>. Tout ceci suggère des effets du TNF, au-delà de sa fixation au TNFR1 : les conséquences du « reverse-signaling » par le TNF membranaire (Kiswira *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008) sont absentes dans les souris TNF<sup>-/-</sup> mais pas dans les TNFR1<sup>-/-</sup>. De plus, le TNF pourrait se fixer à son récepteur TNFR2 membranaire pour la signalisation et l'établissement d'une réponse optimale. Ainsi, dans un système où le TNF ne se fixe qu'au TNFR1, la réponse immunitaire est légèrement retardée, bien que cela n'ait aucune influence sur l'issue de l'infection. En effet, les souris huTNF KI développent une réponse Th1 similaire à celle des souris de type sauvage, avec des niveaux d'IFN $\gamma$  et d'IL-12p40 semblables. En outre, les niveaux de chimiokines telles que MCP-1 et RANTES sont également comparables entre les souris huTNF KI et les souris de type sauvage, ce qui conduit potentiellement à un recrutement cellulaire similaire au niveau des poumons. Nous avons ensuite évalué si l'inhibition du TNF humain chez les souris huTNF KI induisait une susceptibilité à l'infection par *M. bovis* BCG. L'Infliximab, un anticorps monoclonal spécifique du TNF humain, n'altère pas le contrôle de l'infection des souris de type sauvage. En revanche, le traitement des souris huTNF KI infectées par *M. bovis* BCG avec l'Infliximab entraîne une augmentation de l'inflammation et de la pathologie pulmonaire, ainsi qu'une charge bactérienne plus importante.

Nous avons finalement infecté les souris huTNF KI avec une souche virulente de *M. tuberculosis* avant d'utiliser des anti-TNF. D'après nos résultats, tout comme les souris contrôle, les souris humanisées sont capables de contrôler la charge bactérienne dans au niveau des poumons et de limiter la pathologie pulmonaire, ce qui contraste nettement avec les souris TNF<sup>-/-</sup> qui développent rapidement une inflammation pulmonaire exacerbée avec des zones de nécrose et d'œdèmes corrélés avec une charge bactérienne élevée 4 semaines post-infection. D'autre part, le traitement des souris huTNF KI avec l'Infliximab, l'Etanercept ou l'Adalimumab peut conduire à une exacerbation de l'inflammation au niveau des poumons, ce qui est associé avec une croissance bactérienne plus importante. Nous avons noté néanmoins des lésions plus petites au niveau des poumons des souris traitées avec l'Etanercept, ce qui concorde avec les données de la littérature (Marino *et al.*, 2007; Wallis and Ehlers, 2005). Ainsi, les récepteurs solubles pénétreraient moins bien les granulomes où se trouve le TNF bioactif par rapport aux anticorps monoclonaux (Plessner *et al.*, 2007).

Les souris humanisées huTNF KI représentent donc un nouveau modèle d'étude pour évaluer l'efficacité des traitements anti-TNF ainsi que leurs effets délétères dans le cadre d'infections mycobactériennes. Cependant, comme tout modèle, il présente des limites. En effet, les demi-vies des anti-TNF humains sont probablement modifiées dans ce modèle murin, et ceci impliquerait notamment le récepteur néonatal Fc (FcRn) spécifique d'espèce. Ce récepteur est impliqué dans le recyclage, la transcytose et probablement également la phagocytose des IgGs circulantes (Magdelaine-Beuzelin *et al.*, 2009). La fixation des IgGs au récepteur FcRn permet d'éviter le catabolisme et de restituer les IgGs intacts dans la circulation sanguine (Anderson *et al.*, 2006; Brambell *et al.*, 1964). Le FcRn est également impliqué dans la biodistribution des IgGs via le phénomène de transcytose, qui serait dépendant de la phosphorylation d'un résidu sérine du FcRn (McCarthy *et al.*, 2001). Ce récepteur joue donc un rôle central dans la demi-vie et par conséquent l'efficacité des anticorps thérapeutiques. Les séquences du FcRn humain et murin présentent 65% d'homologie et il a été rapporté que le FcRn humain possède une faible affinité pour les IgGs murins (Ober, 2001 #2990). Il est donc probable qu'à l'inverse, l'Infliximab ne soit que faiblement reconnu par le FcRn murin dans notre modèle de souris huTNF KI. Ce paramètre est susceptible d'influencer la pharmacocinétique de ces anti-TNF et modifier le mécanisme d'action de ces anticorps thérapeutiques par rapport à leur utilisation chez des patients.

Ainsi, dans ce modèle, de futures expérimentations pourraient permettre de comprendre les mécanismes d'action sous-jacents à la neutralisation du TNF au cours d'une infection par des mycobactéries, et peut-être ainsi conduire à concevoir des anti-TNF de deuxième génération efficaces dans le traitement des pathologies inflammatoires mais présentant des effets délétères

minimes au niveau du contrôle des infections par *M. tuberculosis*. D'autres stratégies de neutralisation du TNF ont par ailleurs été mises au point dans le but de diminuer les effets indésirables du traitement liés à la perturbation de la réponse immunitaire, notamment cibler uniquement le TNF soluble, ce qui laisse le TNF membranaire intact pour la réponse de l'hôte aux infections. Steed *et al.*, ont créé une forme mutée du TNF soluble humain qui est incapable de se lier au TNFR ou au TNF membranaire, mais qui peut en revanche former très rapidement des hétérodimères avec les molécules de TNF natives. Ceci permet de séquestrer le TNF dans des hétérodimères incapables de signaler via le TNFR (Steed *et al.*, 2003). Cette inhibition spécifique du TNF soluble par ces molécules « TNF dominant-négatif » permet d'envisager une réponse immunitaire toujours efficace grâce à la signalisation par le TNF membranaire, dans le cas d'infections bactériennes par exemple ; ceci a été démontré par une étude dans le cadre de la réponse à l'infection par *M. tuberculosis*. La préservation de la signalisation par le TNF membranaire par le TNF dominant-négatif permet notamment de maintenir un recrutement cellulaire suffisant pour la formation des granulomes et la survie des souris infectées par *M. tuberculosis* (Olleros *et al.*, 2009). Ces données corroborent les études précédentes démontrant que la présence du TNF membranaire est suffisant pour assurer la survie des animaux infectés par *M. tuberculosis*, bien que le TNF soluble soit requis pour une réponse immunitaire optimale à long terme (Allie *et al.*, 2008; Fremond *et al.*, 2005; Olleros *et al.*, 2002; Olleros *et al.*, 2005). L'efficacité du traitement par TNF dominant-négatif a été de plus démontrée dans plusieurs modèles comme la maladie de Parkinson, l'arthrite rhumatoïde et plus récemment l'inflammation allergique pulmonaire (Maillet *et al.*, 2011; McCoy *et al.*, 2006; Zalevsky *et al.*, 2007).

Cependant, dans ce cas particulier, la stratégie TNF dominant-négatif ne pourrait probablement pas être testée dans notre modèle de souris humanisée huTNF KI : en effet, il a été montré que les effets protecteurs du TNF membranaire au cours de la réponse immunitaire à la tuberculose sont médiés par le TNFR2 (Allie *et al.*, 2008). Or, le TNF humain ne fixe que le TNFR1 murin. Par conséquent, il est fort probable que l'inhibition du TNF humain soluble par le traitement TNF dominant-négatif dans les souris huTNF KI ne résulte en une perte de contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*. Dans ce cas, une évaluation dans des souris chimériques humanisées, présentant un système hématopoïétique humain, serait plus appropriée (Calderon *et al.*, 2013). Le TNF dominant-négatif n'en demeure pas moins une piste pour la mise au point d'inhibiteurs de TNF de deuxième génération, efficaces dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques mais épargnant la réponse immunitaire de l'hôte aux infections.

## *IV. L'IL-17 et l'IL-22 ont un rôle limité dans la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis**

Des inhibiteurs ciblant l'IL-23, l'IL-17A ou l'IL-17RA sont en essais cliniques et les résultats semblent assez positifs concernant le traitement du psoriasis et de l'arthrite rhumatoïde (Miossec and Kolls, 2012). Mais les patients enrôlés dans ces essais cliniques sont d'abord testés pour la réactivité à la tuberculine, et la littérature au sujet du rôle de la voie IL-17 au cours de l'infection par *M. tuberculosis* n'est pas très claire. Ainsi, la neutralisation de l'IL-17, en comparaison directe avec le blocage du TNF, n'a jamais été étudiée dans un modèle murin de tuberculose. D'autre part, aucune étude ne s'est penchée sur la possible compensation entre l'IL-17 et l'IL-22 dans la réponse de l'hôte aux mycobactéries. Ainsi, une dernière partie de ma thèse s'est attachée d'une part à l'effet de la neutralisation de l'IL-17 au cours de l'infection, aussi bien en phase aigüe qu'en phase chronique. D'autre part, nous avons infecté des animaux déficients pour l'IL-17RA et/ou l'IL-22 et évalué leur réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis*.

Nous avons tout d'abord évalué l'effet de la neutralisation de l'IL-17 dans un modèle d'infection aigüe. Nos résultats montrent que la neutralisation de l'IL-17A ou de l'IL-17F n'a pas d'impact sur la survie, l'inflammation pulmonaire et la charge bactérienne, dans des conditions d'infection telles que les souris déficientes pour le TNF succombent en 28 jours. La neutralisation du TNF, en revanche, conduit comme attendu à une forte susceptibilité à l'infection se rapprochant de ce que nous pouvons observer chez les souris TNF<sup>-/-</sup>. Les mêmes observations peuvent être faites au niveau de l'histopathologie pulmonaire : la neutralisation de l'IL-17A ou de l'IL-17F n'induit pas d'augmentation de l'infiltration cellulaire ni de lésions nécrotiques, qui sont en revanche visibles dans les poumons des souris traitées avec les anticorps anti-TNF ou des souris déficientes pour le TNF. Les signatures transcriptomiques de différentes populations cellulaires ainsi que l'expression de certains gènes, sont augmentées par l'infection par *M. tuberculosis* et en accord avec la littérature (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2009). Nous montrons ici que ces différences de signatures sont largement plus élevées chez les animaux traités par des anti-TNF ainsi que chez les souris TNF<sup>-/-</sup>. En revanche, les traitements anti-IL-17A et anti-IL-17F n'ont que peu d'effets sur les profils transcriptomiques des souris en réponse à l'infection par rapport aux souris de type sauvage infectées. Nous avons noté cependant une augmentation de l'expression de l'IL-17A et de l'IL-17RA chez les souris déficientes pour le TNF<sup>-/-</sup>, ce qui pourrait suggérer que la voie de signalisation de l'IL-17 est impliquée dans l'inflammation exacerbée et la physiopathologie de la tuberculose chez la souris en absence de TNF.



Le modèle d'infection aiguë nous a permis de montrer l'innocuité des traitements anti-IL-17A et anti-IL-17F dans le cadre de primo-infections par des mycobactéries virulentes chez la souris. Afin d'évaluer le risque de réactivation de tuberculose latente, nous avons utilisé un modèle murin de réactivation dans lequel les souris, après infection par *M. tuberculosis*, sont traitées avec des antibiotiques (ici isoniazide et rifampicine) de manière à diminuer la charge bactérienne et donc modéliser une pathologie latente, selon une adaptation du modèle de Cornell (Scanga *et al.*, 1999). Le traitement antibiotique est ensuite stoppé avant de commencer les injections d'anticorps anti-IL-17 ou d'Etanercept. Nos résultats démontrent que le blocage de l'IL-17 en phase chronique, dans le cadre d'une infection contrôlée, n'induit pas de réactivation de la tuberculose, contrairement à l'absence de TNF. L'Etanercept n'a eu que peu d'effets sur la réactivation de la tuberculose dans notre modèle murin, ce qui est en accord avec l'étude de Plessner *et al.* (Plessner *et al.*, 2007). Le nombre de lésions tissulaires étant similaire au niveau histologique entre le groupe traité avec des anticorps anti-IL-17 et le groupe contrôle, il semblerait que l'IL-17 seule ne soit que peu impliquée dans la réponse immunitaire et/ou la réparation tissulaire après infection par *M. tuberculosis*.

Nous avons ensuite évalué la compensation entre les voies IL-17 et IL-22 au cours de la réponse à l'infection par *M. tuberculosis*. Dans nos conditions d'expérimentation induisant une mortalité précoce des souris TNF<sup>-/-</sup>, les animaux déficients pour l'IL-17RA et l'IL-22 contrôlent l'infection chronique (6 mois) de manière similaire aux souris de type sauvage et aux souris déficientes pour l'IL-17RA ou pour l'IL-22. En revanche, les souris IL-17RA<sup>-/-</sup> présentent une inflammation exacerbée associée à un nombre élevé de bactéries dans les poumons, contrairement aux souris déficientes pour l'IL-22, 6 mois post-infection. Il est probable qu'il existe une boucle de régulation négative entre l'IL-17 et l'IL-22 au cours de l'infection par *M. tuberculosis*, comme il a été suggéré (Behrends *et al.*, 2013), qui a déjà été montré par Besnard *et al.* dans un modèle d'asthme allergique (Besnard *et al.*, 2011).

En phase plus précoce d'infection (1 et 2 mois post-infection), seul le groupe de souris déficientes pour le TNF présentent une inflammation exacerbée avec une infiltration neutrophilique importante et ne contrôlent pas la croissance mycobactérienne, contrairement aux souris IL-17RAxIL-22<sup>-/-</sup> et aux souris de type sauvage. En revanche, les souris double-déficientes pour l'IL-17RA et l'IL-22 présentent une diminution de la charge bactérienne et de l'inflammation pulmonaire par rapport aux souris de type sauvage à 2 mois post-infection, qui est corrélée avec une infiltration moindre de neutrophiles dans les poumons ; ceci peut s'expliquer par la perte de la signalisation IL-17A (von Vietinghoff and Ley, 2009) et suggère qu'en plus des chimiokines sécrétées, l'IL-17 serait impliquée dans le recrutement des neutrophiles sur le site d'infection. Il a

déjà été montré que l'IL-17 participait à la réponse inflammatoire pulmonaire après infection par *M. tuberculosis* (Cruz *et al.*, 2010), en contribuant par exemple à la formation des granulomes (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). Ici, nos résultats montrent que la voie IL-17 serait responsable du maintien d'une réponse inflammatoire en phase chronique d'infection en induisant le recrutement continu de neutrophiles sur le site d'infection, du moins de manière transitoire : en effet, l'inflammation pulmonaire des souris IL-17RAxIL-22 double-déficientes augmente pour être similaire aux souris de type sauvage 6 mois post-infection. Les absences de l'IL-17 et de l'IL-22 chez la souris ne semblent donc pas compromettre de manière drastique la réponse immunitaire à la tuberculose. Ceci va contre l'hypothèse d'un phénomène de compensation entre ces deux voies de signalisation (Behrends *et al.*, 2013), mais appuie en revanche l'idée d'utiliser des anticorps ciblant l'IL-17 dans le traitement de certaines pathologies sans risquer une potentielle réactivation de la tuberculose chez les patients.

Il faut tout de même tenir compte du modèle animal et de ses limites : ainsi, le rôle de l'IL-17 dans la tuberculose humaine est encore moins clair. L'IL-17 et l'IL-22 sont sécrétées par des populations cellulaires distinctes suite à l'infection (Scriba *et al.*, 2008), et il semble que l'IL-22 soit présente en quantités plus importantes chez les patients tuberculeux (Matthews *et al.*, 2011), suggérant un rôle de ces deux cytokines soit dans la pathologie, soit dans le maintien de l'intégrité des tissus. Les taux d'IL-17 ont été corrélés dans une étude avec la sévérité de la tuberculose chez l'homme (Jurado *et al.*, 2012), tandis que ces niveaux d'IL-17 ne semblent pas être associés avec le stade de la maladie dans une autre étude plus récente (Fan *et al.*, 2015; Matthews *et al.*, 2011), évoquant un rôle moindre de l'IL-17 dans la réponse immunitaire à la tuberculose chez l'homme. Ces divergences pourraient s'expliquer par l'équilibre existant entre la réponse Th1 et la réponse Th17. En effet, il a été montré que des souris déficientes pour l'IFN $\gamma$  présentaient un nombre élevé de cellules Th17 après infection par *M. tuberculosis* (Cruz *et al.*, 2006) et l'IFN $\gamma$  est capable d'inhiber la production d'IL-17 par les cellules Th17 (Nandi and Behar, 2011). Ainsi, la cross-régulation entre les cellules Th1 et les cellules Th17 serait importante dans la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis* (Khader and Cooper, 2008). Dans cette optique, une étude récente a démontré que *M. tuberculosis* est capable de privilégier la réponse Th17 par rapport à la Th1, conduisant à la diminution des taux d'IFN $\gamma$ . Ainsi, la mycobactérie joue sur les cellules dendritiques humaines pour favoriser l'expansion d'une sous-population de DCs CD14<sup>+</sup>, faible productrice d'IL-12p70. Cette sous-population n'induit que peu de sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup>, et favorise plutôt la multiplication de cellules T CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ <sup>+</sup>, qui vont produire de l'IL-17A (Sondergaard *et al.*, 2014). Ce processus est réversible par l'ajout d'IFN $\gamma$  exogène. L'induction de la voie IL-17 constituerait donc un mécanisme d'échappement de la bactérie lui

permettant d'éviter la présence de forts taux d'IFN $\gamma$ , corrélés avec une activité microbicide augmentée chez les macrophages. Dans le même ordre d'idée, l'absence de TNF conduit à l'augmentation de l'expression de l'IL-17 : ainsi, de faibles taux de TNF ou d'IFN $\gamma$  sont associés à des niveaux élevés d'IL-17 dans les poumons. On pourrait supposer que l'augmentation d'IL-17 dans les poumons est une conséquence d'une dérégulation de la réponse immunitaire soit au niveau innée (TNF), soit au niveau adaptatif (IFN $\gamma$ ), mais n'est pas elle-même la cause de l'immuno-pathologie associée à la sévérité de la tuberculose. Néanmoins, l'IL-17 est exprimée non seulement par les cellules de l'immunité acquise mais aussi par certaines cellules de l'immunité innée (Eyerich and Zielinski, 2014) et l'IL-17A et son récepteur sont essentiels au contrôle des infections à forte dose ou avec des souches hyper-virulentes (Freches *et al.*, 2013; Gopal *et al.*, 2014; Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). Tout ceci ajoute un niveau de complexité sur les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'infection et les voies d'échappement utilisées par la bactérie pour survivre dans les poumons.

Pour conclure sur cette étude, nous avons pu fournir une preuve de principe selon laquelle les traitements anti-IL-17 actuellement en phase clinique ne compromettent pas la réponse immunitaire à la souche H37Rv de *M. tuberculosis* aussi bien dans un modèle d'infection aiguë que dans un modèle de réactivation, bien que les résultats en présence d'une souche plus virulente puissent différer. Ceci contraste fortement avec les anticorps ciblant le TNF que nous avons utilisé en comparaison directe, puisque ces traitements conduisant à une susceptibilité accrue à l'infection par *M. tuberculosis* dans nos deux modèles murins. D'autre part, nous avons clairement établi que les voies IL-17 et IL-22 ne sont pas indispensables pour le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*, et qu'il n'existe pas de mécanisme de compensation entre ces deux voies de signalisation.

## V. Les relations hôte-pathogène et les stratégies thérapeutiques d'avenir

La réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis* est extrêmement complexe et nous sommes encore loin d'entrevoir l'ensemble des relations établies entre l'hôte et son pathogène. La génétique de la souche d'infection influence la réponse immunitaire mise en place. Par exemple, l'infection par *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis* ne fait pas intervenir les mêmes voies de signalisation, et ces différences de réponse sont en grande partie liées à la présence du système de sécrétion ESX-1 chez *M. tuberculosis*, élément essentiel à sa virulence. De même, les nombreux polymorphismes observés dans les différents groupes ethniques étudiés suggèrent fortement une corrélation et une coévolution entre les souches de *M. tuberculosis* et son hôte (Nicol and Wilkinson, 2008). Etudier les souches mutantes émergentes et ayant causé une épidémie de tuberculose permettrait de mieux comprendre les facteurs importants pour la bactérie mais également ceux impliqués dans la réponse immunitaire. C'est le cas de la souche HN878, extrêmement virulente, qui provoque chez la souris une mort rapide associée à de forts taux d'IFN de type I et une réponse Th1 très réduite (Manca *et al.*, 2001). Il a par la suite été mis en évidence que cette forte virulence était dépendante d'un glycolipide phénolique produit par le bacille (Tsenova *et al.*, 2005). Les forts taux d'IFN de type I induits par la souche HN878 chez la souris ont ensuite été corrélés avec des taux très élevés d'IFN de type I chez les patients atteints de tuberculose active qui correspondent également avec la sévérité de la pathologie (Berry *et al.*, 2010). Cet exemple montre bien l'importance d'étudier à la fois la génétique du pathogène mais également les voies de signalisation impliquées et la réponse mise en place par l'hôte en réponse au bacille tuberculeux. Mes travaux de thèse appuient notamment l'idée d'une interrelation très étroite entre l'hôte et son pathogène : ainsi, l'IL-36 $\gamma$  est induite suite à l'infection par *M. tuberculosis* mais aussi par *M. bovis* BCG, et néanmoins la voie de signalisation de l'IL-36R n'est pas nécessaire à l'établissement de la réponse immunitaire dans ces deux cas. De même, la contribution de l'IL-17 et de l'IL-22 est limitée dans la réponse immune, malgré une inflammation pulmonaire clairement dépendante de l'IL-17 suite à l'infection par la souche HN878.

La recherche a tout de même mis en évidence des voies de signalisation essentielles comme le TNF et l'IFN $\gamma$ /IL-12p40, qu'il serait intéressant de cibler pour de nouvelles stratégies thérapeutiques à visée plutôt immunomodulatoire. En effet, le TNF et l'IFN $\gamma$  sont très régulés au cours de l'infection, et la sévérité de la pathologie est associée à des niveaux élevés de TNF et d'IFN $\gamma$ . Cibler la réponse adaptative en jouant sur l'IFN $\gamma$  semble judicieux dans le sens où la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> due à l'infection par le VIH est délétère pour la réponse

immunitaire à la tuberculose. Cependant, une réponse immunitaire excessive peut également être fâcheuse pour l'hôte et au contraire promouvoir la croissance bactérienne. Ainsi, PD-1 est un récepteur présent à la surface des cellules T et B activées, qui va réguler négativement la prolifération et la production de cytokines de ces cellules suite à la fixation de son ligand PD-L1. Des anticorps bloquant PD-1 ou PD-L1 permettent d'augmenter la réponse IFN $\gamma$  des cellules T des patients atteints de tuberculose *in vitro* (Jurado *et al.*, 2008), mais la délétion de PD-1 chez la souris conduit à une augmentation de la charge bactérienne et est associée à une forte proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes de *M. tuberculosis* (Lazar-Molnar *et al.*, 2010), ce qui suggère que ces cellules pourraient être à l'origine de la pathologie sévère observée chez les souris PD-1<sup>-/-</sup>. D'autre part, le risque de tuberculose associé à l'infection par le VIH est augmenté avant qu'apparaisse la déplétion caractéristique des cellules T CD4<sup>+</sup> (Sonnenberg *et al.*, 2005), suggérant que l'infection par le VIH pourrait induire des défauts au niveau de la réponse immunitaire innée avant d'atteindre la réponse immunitaire adaptative.

Dans une autre optique, il est très intéressant de se pencher sur les facteurs génétiques de l'hôte, outre les polymorphismes de type SNPs pouvant exister d'une population à l'autre. En effet, comment expliquer que 90% des personnes infectées par *M. tuberculosis* vont pouvoir contrôler l'infection et présenter une forme latente de la pathologie, alors que 5% des patients vont développer une tuberculose active ? Les efforts internationaux de diagnostics des tuberculoses latentes vont pouvoir faire avancer les connaissances en ce sens, mais également l'étude des cas de co-infections tuberculose-SIDA, qui démontrent bien la nécessité d'un système immunitaire compétent pour maintenir un contrôle actif de l'infection *M. tuberculosis* mais aussi les relations complexes existant entre ces deux pathogènes. Ainsi, le traitement rétroviral associé à l'infection VIH chez les patients atteints de tuberculose est souvent, mais pas toujours, corrélé avec le syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS), caractérisé par une réponse fortement positive au test à la tuberculine, chez un patient dont ce même test était négatif avant tout traitement, et par une expansion des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes de *M. tuberculosis*. Certains facteurs de risque conduisant à l'affection TB-IRIS ont été identifiés, comme le taux de dissémination de la tuberculose, des taux très bas de cellules T CD4<sup>+</sup> avant le traitement rétroviral, ou encore un intervalle court entre le traitement antituberculeux et le traitement rétroviral (Meintjes *et al.*, 2009). Cependant, les liens de cause à effet entre le traitement des patients contre le SIDA et l'apparition du syndrome IRIS restent encore très flous. Il a notamment été mis en évidence une augmentation de la sécrétion de certaines cytokines chez les patients atteints de TB-IRIS, comme le TNF ou l'IL-6, suggérant encore une fois un rôle non négligeable de la réponse immunitaire innée dans ce syndrome (Tadokera *et al.*, 2011). Mes travaux de thèse sur la voie

TNFR1 suggèrent un rôle prépondérant des cellules myéloïdes dans la signalisation TNF nécessaire à la mise en place et à l'orchestration de toute la réponse immunitaire liée à l'infection par *M. tuberculosis*, aussi bien en phase aiguë qu'en phase chronique. La signalisation TNFR1 sur les lymphocytes T, en revanche, semble être pro-inflammatoire et promouvoir une inflammation exacerbée et précoce. D'un autre côté, la littérature semble suggérer l'existence d'une véritable pression de sélection sur le gène codant pour le TNF, conduisant à des polymorphismes touchant le taux d'expression du gène et non la conformation de la protéine (Aguillon *et al.*, 2006; Wiens and Glenney, 2011). Ainsi, modifier les taux de TNF chez l'hôte au niveau de populations cellulaires bien spécifiques semble représenter une bonne alternative de traitement. Il a déjà été rapporté chez la souris que la neutralisation du TNF entraîne une déstructuration des granulomes, libérant les bacilles dans les poumons (Chakravarty *et al.*, 2008) ; associée à un traitement antibiotique, cette neutralisation du TNF permet d'améliorer efficacement la clairance des bactéries (Bourigault *et al.*, 2013b). Cette stratégie ne semble pas applicable à des tuberculoses MDR ou XDR, insensibles aux antibiotiques actuellement sur le marché, mais de nouveaux antibiotiques candidats sont en cours de développement et des tests cliniques sont menés afin d'essayer de réduire au maximum la durée du traitement antituberculeux ainsi que ses effets indésirables (Zumla *et al.*, 2013). A l'inverse, privilégier la signalisation TNF par les cellules myéloïdes permettrait à l'hôte de mieux contrôler la croissance bactérienne y compris dans le cas de souches résistantes, et ceci pourrait être associé à des éléments comme la vitamine D qui constitue également une cible thérapeutique intéressante (Lopez-Lopez *et al.*, 2014) ou à de nouveaux antibiotiques plus efficaces. L'immunomodulation, ou l'immunothérapie, est de plus en plus envisagée ces dernières années dans la lutte antituberculeuse et plusieurs approches ont été entreprises, comme l'augmentation de la réponse Th1 ou encore l'inhibition de certaines voies de signalisation anti-inflammatoires (Gonzalez-Juarrero, 2012).

## ~ Conclusion et perspectives ~

---

Mes travaux de thèse ont permis l'étude de plusieurs aspects de la réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis*, par l'utilisation d'un modèle murin de la tuberculose. Dans une première partie, notre problématique concernait l'IL-36, cytokine de la famille de l'IL-1 elle-même très impliquée dans la réponse de l'hôte à la tuberculose. Nous avons pu mettre en évidence que des souris déficientes pour l'IL-36R étaient capables de contrôler l'infection à forte dose avec une souche virulente de *M. tuberculosis*, suggérant donc un rôle limité de cette voie de signalisation dans l'établissement de la réponse immunitaire de l'hôte. L'implication de l'IL-36 ayant été fortement documentée dans la pathogenèse du psoriasis, cibler cette cytokine dans le cadre de traitements a déjà été suggéré et est en cours d'élaboration. Nos résultats ne mettent pas en évidence de risques majeurs de défaut de contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* chez les patients traités pour le psoriasis. Cependant, il serait intéressant de tester le rôle de cette voie de signalisation en utilisant des isolats cliniques hypervirulents qui pourraient révéler, dans un modèle *in vivo*, une contribution de l'IL-36 dans la réponse immunitaire de l'hôte, comme il l'a été démontré récemment pour l'IL-17.

D'autre part, mes résultats de thèse ont permis d'approfondir les connaissances de la voie TNF/TNFR1 au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. En utilisant des animaux délétés pour le TNFR1 uniquement au sein de populations cellulaires spécifiques, nous avons pu disséquer le rôle de cette voie de signalisation et ainsi déterminer que le TNFR1 des cellules myéloïdes est crucial pour le développement de la réponse immunitaire en phase précoce et le maintien du contrôle de l'infection en phase chronique, tandis que la voie TNFR1 des lymphocytes T n'est pas nécessaire à ce contrôle. Nous avons pu également mettre en évidence que les neutrophiles constituent la source cellulaire principale d'IL-12p40 au cours de l'infection, soulevant un nouveau rôle de ce type cellulaire dans l'infection par *M. tuberculosis* dans l'induction de la réponse Th1 responsable d'une inflammation exacerbée lors de l'arrivée des lymphocytes T dans les poumons. Néanmoins, évaluer le rôle respectif du TNFR1 des cellules myéloïdes et des lymphocytes dans le cadre d'une réactivation de la tuberculose serait important pour la continuation de l'étude. Ainsi, il faudrait traiter des animaux M-TNFR1 KO et T-TNFR1 KO préalablement infectés avec *M. tuberculosis* avec des antibiotiques, puis stopper ce traitement et évaluer les paramètres de survie, inflammation et charge bactérienne pulmonaire dans les différents groupes expérimentaux. D'autre part, il serait intéressant de pouvoir contrôler la charge bactérienne de manière à vérifier que les différences

moléculaires observées au cours de mes travaux sont bien le fait de la déplétion du récepteur TNFR1 sur les cellules myéloïdes, et non dues à une surcharge en bactéries dans les poumons. Pour cela, nous avons entrepris d'utiliser une souche de *M. tuberculosis* auxotrophe à la streptomycine permettant de contrôler la croissance bactérienne dans les poumons des souris infectées, qui s'est révélé être un protocole difficile et mériterait davantage de temps pour la mise au point. Par ailleurs, nous avons en parallèle mis en place un nouveau modèle murin humanisé qui permettra l'étude des traitements anti-TNF actuels et futurs, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réactivation de la tuberculose suite à la neutralisation du TNF.

Pour finir, j'ai participé à un projet collaboratif avec la société Novartis visant à étudier l'impact d'anticorps anti-IL-17A ou anti-IL-17F sur la réponse immunitaire à la tuberculose. Nous avons, en parallèle, étudié la compensation entre l'IL-17 et l'IL-22 soulevée dans la littérature, dans un modèle murin de tuberculose. Nos résultats montrent que la neutralisation de l'IL-17 ne perturbe pas la réponse immunitaire et le contrôle de l'infection aigüe, tant au niveau phénotypique que moléculaire et transcriptomique. De plus, ces résultats vont également à l'encontre d'une compensation éventuelle entre les voies de signalisation IL-17 et IL-22 dans l'établissement de la réponse immunitaire de l'hôte à la tuberculose. Ainsi, le blocage de la voie IL-17, stratégie thérapeutique suggérée dans le traitement de certaines maladies auto-immunes, n'entraînera pas ou peu de cas de réactivation chez les patients atteints de la forme latente de la tuberculose.

Même si les facteurs génétiques du bacille et de l'hôte sont importants, mieux comprendre les liens et les relations existants entre l'homme et son pathogène *M. tuberculosis* est également essentiel pour espérer établir des stratégies thérapeutiques efficaces. Ainsi, plus les connaissances de la pathologie humaine seront étendues, plus il sera possible d'améliorer les modèles expérimentaux animaux nécessaires pour étudier les relations hôte-pathogène. Il est cependant toujours crucial de garder en tête les limitations de chaque modèle, et ce n'est qu'en confrontant plusieurs modèles expérimentaux et en les comparant avec la pathologie telle qu'elle est chez l'homme que de réelles avancées seront réalisées dans la compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte et par conséquent dans le dépistage et le diagnostic des différentes formes de tuberculoses observées chez les patients. Enfin, tenter le pari de l'immunomodulation pourrait sans doute donner un nouveau souffle aux traitements actuels en diminuant à la fois la durée et les effets indésirables des cures antituberculeuses.



# ~ Références bibliographiques ~

**Abel, B.**, Thieblemont, N., Quesniaux, V.J.F., Brown, N., Mpagi, J., Miyake, K., Bihl, F., and Ryffel, B. (2002). Toll-Like Receptor 4 Expression Is Required to Control Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. *The Journal of Immunology* *169*, 3155-3162.

**Ablasser, A.**, Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E., and Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* *503*, 530-534.

**Achkar, J.M.**, Chan, J., and Casadevall, A. (2015). B cells and antibodies in the defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunol Rev* *264*, 167-181.

**AFSSAPS** (2005). Recommendations nationales: Prévention et prise en charge des tuberculoses survenant sous anti-TNFa. [www.afssaps.sante.fr](http://www.afssaps.sante.fr).

**Agostini, L.**, Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* *20*, 319-325.

**Aguillon, J.C.**, Cruzat, A., Aravena, O., Salazar, L., Llanos, C., and Cuchacovich, M. (2006). Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology* *211*, 75-84.

**Aleman, M.**, Schierloh, P., de la Barrera, S.S., Musella, R.M., Saab, M.A., Baldini, M., Abbate, E., and Sasiain, M.C. (2004). Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infection and immunity* *72*, 5150-5158.

**Algood, H.M.**, Lin, P.L., and Flynn, J.L. (2005). Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis* *41 Suppl 3*, S189-193.

**Allie, N.**, Alexopoulou, L., Quesniaux, V.J., Fick, L., Kranidioti, K., Kollias, G., Ryffel, B., and Jacobs, M. (2008). Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection. *Immunology*.

**Allie, N.**, Grivennikov, S.I., Keeton, R., Hsu, N.J., Bourigault, M.L., Court, N., Fremond, C., Yeremeev, V., Shebzukhov, Y., Ryffel, B., *et al.* (2013). Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Scientific reports* *3*, 1809.

**Alonso, S.**, Pethe, K., Russell, D.G., and Purdy, G.E. (2007). Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 6031-6036.

**Altare, F.**, Durandy, A., Lammas, D., Emile, J.F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., *et al.* (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* *280*, 1432-1435.

**Anderson, C.L.**, Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C.L., Wani, M.A., and Mohanty, S. (2006). Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends in immunology* *27*, 343-348.

**Antoine, D.**, Belghiti, F., Guthmann, J.P., Campese, C., Lévy-Bruhl, D., and Che, D. (2014). Les cas de tuberculose déclarés en France en 2012. *Bull Epidémiol Hebd* *2014;(20)*, 352-359.

**Astarie-Dequeker, C.**, N'Diaye, E.N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., and Maridonneau-Parini, I. (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and immunity* *67*, 469-477.

**Aujla, S.J.**, Dubin, P.J., and Kolls, J.K. (2007). Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in immunology* *19*, 377-382.

- Awomoyi, A.A.**, Charurat, M., Marchant, A., Miller, E.N., Blackwell, J.M., McAdam, K.P., and Newport, M.J. (2005). Polymorphism in IL1B: IL1B-511 association with tuberculosis and decreased lipopolysaccharide-induced IL-1beta in IFN-gamma primed ex-vivo whole blood assay. *Journal of endotoxin research* *11*, 281-286.
- Azad, A.K.**, Sadee, W., and Schlesinger, L.S. (2012). Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and immunity* *80*, 3343-3359.
- Bafica, A.**, Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* *202*, 1715-1724.
- Baker, J.J.**, Johnson, B.K., and Abramovitch, R.B. (2014). Slow growth of *Mycobacterium tuberculosis* at acidic pH is regulated by phoPR and host-associated carbon sources. *Mol Microbiol* *94*, 56-69.
- Balcewicz-Sablinska, M.K.**, Keane, J., Kornfeld, H., and Remold, H.G. (1998). Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* *161*, 2636-2641.
- Barksdale, L.**, and Kim, K.S. (1977). *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* *41*, 217-372.
- Barnes, P.F.**, Abrams, J.S., Lu, S., Sieling, P.A., Rea, T.H., and Modlin, R.L. (1993). Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infection and immunity* *61*, 197-203.
- Barnes, P.F.**, Fong, S.J., Brennan, P.J., Twomey, P.E., Mazumder, A., and Modlin, R.L. (1990). Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol* *145*, 149-154.
- Barone, D.**, Krantz, C., Lambert, D., Maggiora, K., and Mohler, K. (1999). Comparative analysis of the ability of etanercept and infliximab to lyse TNF-expressing cells in a complement dependent fashion. *Arthritis and rheumatism Suppl: S90*.
- Barrios-Payan, J.**, Aguilar-Leon, D., Lascurain-Ledezma, R., and Hernandez-Pando, R. (2006). [Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis]. *Gac Med Mex* *142*, 273-281.
- Barry, C.E.**, 3rd, Boshoff, H.I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R.J., and Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* *7*, 845-855.
- Bean, A.G.**, Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., and Britton, W.J. (1999). Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* *162*, 3504-3511.
- Behler, F.**, Steinwede, K., Balboa, L., Ueberberg, B., Maus, R., Kirchhof, G., Yamasaki, S., Welte, T., and Maus, U.A. (2012). Role of Mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice. *J Immunol* *189*, 3121-3129.
- Behrends, J.**, Renauld, J.C., Ehlers, S., and Holscher, C. (2013). IL-22 is mainly produced by IFN-gamma-secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One* *8*, e57379.
- Bekiaris, V.**, Sedy, J.R., Rossetti, M., Spreafico, R., Sharma, S., Rhode-Kurnow, A., Ware, B.C., Huang, N., Macauley, M.G., Norris, P.S., *et al.* (2013). Human CD4+CD3- innate-like T cells provide a source of TNF and lymphotoxin-alpha and are elevated in rheumatoid arthritis. *J Immunol* *191*, 4611-4618.
- Beltan, E.**, Horgen, L., and Rastogi, N. (2000). Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Microbial pathogenesis* *28*, 313-318.
- Ben-Ali, M.**, Barbouche, M.R., Bousnina, S., Chabbou, A., and Dellagi, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* *11*, 625-626.
- Bermudez, L.E.**, and Young, L.S. (1988). Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol* *140*, 3006-3013.

- Berry, M.P.**, Graham, C.M., McNab, F.W., Xu, Z., Bloch, S.A., Oni, T., Wilkinson, K.A., Banchereau, R., Skinner, J., Wilkinson, R.J., *et al.* (2010). An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* *466*, 973-977.
- Besnard, A.G.**, Sabat, R., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Willart, M., Lambrecht, B., Teixeira, M.M., Charron, S., Fick, L., Erard, F., *et al.* (2011). Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *American journal of respiratory and critical care medicine* *183*, 1153-1163.
- Black, R.A.**, Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* *385*, 729-733.
- Blomgran, R.**, Desvignes, L., Briken, V., and Ernst, J.D. (2012). Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe* *11*, 81-90.
- Blomgran, R.**, and Ernst, J.D. (2011). Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* *186*, 7110-7119.
- Blumberg, H.**, Dinh, H., Dean, C., Jr., Trueblood, E.S., Bailey, K., Shows, D., Bhagavathula, N., Aslam, M.N., Varani, J., Towne, J.E., and Sims, J.E. (2010). IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J Immunol* *185*, 4354-4362.
- Bodnar, K.A.**, Serbina, N.V., and Flynn, J.L. (2001). Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells. *Infection and immunity* *69*, 800-809.
- Boehm, U.**, Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* *15*, 749-795.
- Borgdorff, M.W.**, Sebek, M., Geskus, R.B., Kremer, K., Kalisvaart, N., and van Soolingen, D. (2011). The incubation period distribution of tuberculosis estimated with a molecular epidemiological approach. *Int J Epidemiol* *40*, 964-970.
- Bosio, C.M.**, Gardner, D., and Elkins, K.L. (2000). Infection of B Cell-Deficient Mice with CDC 1551, a Clinical Isolate of Mycobacterium tuberculosis: Delay in Dissemination and Development of Lung Pathology. *The Journal of Immunology* *164*, 6417-6425.
- Botos, I.**, Segal, D.M., and Davies, D.R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* *19*, 447-459.
- Bourigault, M.L.**, Segueni, N., Rose, S., Court, N., Vacher, R., Vasseur, V., Erard, F., Le Bert, M., Garcia, I., Iwakura, Y., *et al.* (2013a). Relative contribution of IL-1alpha, IL-1beta and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immunity, inflammation and disease* *1*, 47-62.
- Bourigault, M.L.**, Vacher, R., Rose, S., Olleros, M.L., Janssens, J.P., Quesniaux, V.F., and Garcia, I. (2013b). Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances Mycobacterium tuberculosis clearance and reduces lung pathology. *Am J Clin Exp Immunol* *2*, 124-134.
- Brambell, F.W.**, Hemmings, W.A., and Morris, I.G. (1964). A THEORETICAL MODEL OF GAMMA-GLOBULIN CATABOLISM. *Nature* *203*, 1352-1354.
- Brassard, P.**, Kezouh, A., and Suissa, S. (2006). Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis. *Clin Infect Dis* *43*, 717-722.
- Brenner, D.**, Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* *15*, 362-374.
- Brighenti, S.**, and Andersson, J. (2012). Local immune responses in human tuberculosis: learning from the site of infection. *The Journal of infectious diseases* *205 Suppl 2*, S316-324.
- Brust, B.**, Lecoufle, M., Tuailon, E., Dedieu, L., Canaan, S., Valverde, V., and Kremer, L. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One* *6*, e25078.

- Bulat-Kardum, L.J.**, Etokebe, G.E., Lederer, P., Balen, S., and Dembic, Z. (2015). Genetic Polymorphisms in the Toll-like Receptor 10, Interleukin (IL)17A and IL17F Genes Differently Affect the Risk for Tuberculosis in Croatian Population. *Scand J Immunol* 82, 63-69.
- Burdette, D.L.**, Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R.E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515-518.
- Busman-Sahay, K.O.**, Walrath, T., Huber, S., and O'Connor, W., Jr. (2015). Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines. *Journal of leukocyte biology* 97, 499-510.
- Bustamante, J.**, Boisson-Dupuis, S., Abel, L., and Casanova, J.L. (2014). Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. *Seminars in immunology* 26, 454-470.
- Calderon, V.E.**, Valbuena, G., Goetz, Y., Judy, B.M., Huante, M.B., Sutjita, P., Johnston, R.K., Estes, D.M., Hunter, R.L., Actor, J.K., *et al.* (2013). A humanized mouse model of tuberculosis. *PLoS One* 8, e63331.
- Calligaro, G.L.**, Moodley, L., Symons, G., and Dheda, K. (2014). The medical and surgical treatment of drug-resistant tuberculosis. *J Thorac Dis* 6, 186-195.
- Calmette, A.** (1927). Sur la vaccination préventive des enfants nouveau-nés contre la tuberculose par le BCG. *Annales de l'Institut Pasteur* *XLI*, 201-232.
- Calmette, A.** (1931). Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med* 24, 1481-1490.
- Cambier, C.J.**, Falkow, S., and Ramakrishnan, L. (2014a). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159, 1497-1509.
- Cambier, C.J.**, Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2014b). *Mycobacteria* manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505, 218-222.
- Caws, M.**, Thwaites, G., Dunstan, S., Hawn, T.R., Lan, N.T., Thuong, N.T., Stepniewska, K., Huyen, M.N., Bang, N.D., Loc, T.H., *et al.* (2008). The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 4, e1000034.
- Cayrol, C.**, and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9021-9026.
- Chackerian, A.A.**, Alt, J.M., Perera, T.V., Dascher, C.C., and Behar, S.M. (2002). Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity. *Infection and Immunity* 70, 4501-4509.
- Chakravarty, S.D.**, Zhu, G., Tsai, M.C., Mohan, V.P., Marino, S., Kirschner, D.E., Huang, L., Flynn, J., and Chan, J. (2008). Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infection and immunity* 76, 916-926.
- Chao, M.C.**, and Rubin, E.J. (2010). Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu Rev Microbiol* 64, 293-311.
- Chatterjee, D.** (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol* 1, 579-588.
- Chaurasiya, S.K.**, and Srivastava, K.K. (2009). Downregulation of protein kinase C- $\alpha$  enhances intracellular survival of *Mycobacteria*: role of PknG. *BMC microbiology* 9, 271.
- Chong, B.F.**, and Wong, H.K. (2007). Immunobiologics in the treatment of psoriasis. *Clinical immunology* 123, 129-138.
- Chustz, R.T.**, Nagarkar, D.R., Puposki, J.A., Favoreto, S., Jr., Avila, P.C., Schleimer, R.P., and Kato, A. (2011). Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45, 145-153.

- Clay, H., Volkman, H.E., and Ramakrishnan, L. (2008).** Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 29, 283-294.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., Leimer, A.H., and Cheronis, J. (1999).** Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6261-6266.
- Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M.R., Voronov, E., Martin, M.U., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2010).** Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2574-2579.
- Cohen, T., and Murray, M. (2005).** Incident tuberculosis among recent US immigrants and exogenous reinfection. *Emerg Infect Dis* 11, 725-728.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, et al. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Cooper, A.M. (2009).** Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology* 27, 393-422.
- Cooper, A.M. (2015).** Mouse model of tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, a018556.
- Cooper, A.M., Kipnis, A., Turner, J., Magram, J., Ferrante, J., and Orme, I.M. (2002).** Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 168, 1322-1327.
- Cooper, A.M., Magram, J., Ferrante, J., and Orme, I.M. (1997).** Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186, 39-45.
- Cooper, A.M., Roberts, A.D., Rhoades, E.R., Callahan, J.E., Getzy, D.M., and Orme, I.M. (1995).** The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 84, 423-432.
- Court, N., Vasseur, V., Vacher, R., Fremont, C., Shebzukhov, Y., Yermeev, V.V., Maillet, I., Nedospasov, S.A., Gordon, S., Fallon, P.G., et al. (2010).** Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 184, 7057-7070.
- Cruz, A., Fraga, A.G., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Torrado, E., Saraiva, M., Pereira, D.R., Randall, T.D., Pedrosa, J., Cooper, A.M., and Castro, A.G. (2010).** Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 207, 1609-1616.
- Cruz, A., Khader, S.A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J.E., Pedrosa, J., Cooper, A.M., and Castro, A.G. (2006).** Cutting Edge: IFN- $\gamma$  Regulates the Induction and Expansion of IL-17-Producing CD4 T Cells during Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology* 177, 1416-1420.
- Daniel, T.M. (2006).** The history of tuberculosis. *Respir Med* 100, 1862-1870.
- Davis, J.M., Clay, H., Lewis, J.L., Ghori, N., Herbomel, P., and Ramakrishnan, L. (2002).** Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* 17, 693-702.
- de Valliere, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R.M., and Hoft, D.F. (2005).** Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and immunity* 73, 6711-6720.
- Dharmadhikari, A.S., and Nardell, E.A. (2008).** What animal models teach humans about tuberculosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39, 503-508.
- Dheda, K., and Migliori, G.B. (2012).** The global rise of extensively drug-resistant tuberculosis: is the time to bring back sanatoria now overdue? *Lancet* 379, 773-775.
- Dinarello, C.A. (1996).** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

- Divangahi, M.,** Desjardins, D., Nunes-Alves, C., Remold, H.G., and Behar, S.M. (2010). Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* *11*, 751-758.
- Dorhoi, A.,** Desel, C., Yeremeev, V., Pradl, L., Brinkmann, V., Mollenkopf, H.J., Hanke, K., Gross, O., Ruland, J., and Kaufmann, S.H. (2010). The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. *J Exp Med* *207*, 777-792.
- Du, J.,** Han, J., Li, X., Zhang, Y., Li, H., and Yang, S. (2015). StIL-17 gene polymorphisms in the development of pulmonary tuberculosis. *Int J Clin Exp Pathol* *8*, 3225-3229.
- Dye, C.,** and Williams, B.G. (2010). The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* *328*, 856-861.
- Ehlers, S.,** Kutsch, S., Ehlers, E.M., Benini, J., and Pfeffer, K. (2000). Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55<sup>-/-</sup> mice is dependent on T cells and IL-12. *J Immunol* *165*, 483-492.
- Engering, A.J.,** Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* *27*, 2417-2425.
- Espósito, E.,** and Cuzzocrea, S. (2009). TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem* *16*, 3152-3167.
- Eum, S.Y.,** Kong, J.H., Hong, M.S., Lee, Y.J., Kim, J.H., Hwang, S.H., Cho, S.N., Via, L.E., and Barry, C.E., 3rd (2010). Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* *137*, 122-128.
- Eyerich, S.,** and Zielinski, C.E. (2014). Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur J Immunol* *44*, 3475-3483.
- Fan, L.,** Xiao, H., Mai, G., Su, B., Ernst, J., and Hu, Z. (2015). Impaired *M. tuberculosis* Antigen-Specific IFN-gamma Response without IL-17 Enhancement in Patients with Severe Cavitory Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One* *10*, e0127087.
- Feng, C.G.,** Jankovic, D., Kullberg, M., Cheever, A., Scanga, C.A., Hieny, S., Caspar, P., Yap, G.S., and Sher, A. (2005). Maintenance of Pulmonary Th1 Effector Function in Chronic Tuberculosis Requires Persistent IL-12 Production. *The Journal of Immunology* *174*, 4185-4192.
- Feng, C.G.,** Scanga, C.A., Collazo-Custodio, C.M., Cheever, A.W., Hieny, S., Caspar, P., and Sher, A. (2003). Mice Lacking Myeloid Differentiation Factor 88 Display Profound Defects in Host Resistance and Immune Responses to *Mycobacterium avium* Infection Not Exhibited by Toll-Like Receptor 2 (TLR2)- and TLR4-Deficient Animals. *The Journal of Immunology* *171*, 4758-4764.
- Filipe-Santos, O.,** Bustamante, J., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C., and Casanova, J.L. (2006). Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Seminars in immunology* *18*, 347-361.
- Flores-Villanueva, P.O.,** Ruiz-Morales, J.A., Song, C.H., Flores, L.M., Jo, E.K., Montano, M., Barnes, P.F., Selman, M., and Granados, J. (2005). A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* *202*, 1649-1658.
- Flynn, J.,** Cooper, A., and Bishai, W. (2005). Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* (Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR, eds) *Washington, DC: ASM Press*, 547-560.
- Flynn, J.L.,** Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., and Bloom, B.R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* *178*, 2249-2254.
- Flynn, J.L.,** Gideon, H.P., Mattila, J.T., and Lin, P.L. (2015). Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. *Immunol Rev* *264*, 60-73.
- Flynn, J.L.,** Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., and Bloom, B.R. (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* *2*, 561-572.

- Fratti, R.A.**, Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of cell biology* *154*, 631-644.
- Freches, D.**, Korf, H., Denis, O., Havaux, X., Huygen, K., and Romano, M. (2013). Mice genetically inactivated in interleukin-17A receptor are defective in long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* *140*, 220-231.
- Fremont, C.**, Allie, N., Dambuza, I., Grivennikov, S.I., Yeremeev, V., Quesniaux, V.F., Jacobs, M., and Ryffel, B. (2005). Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respiratory research* *6*, 136.
- Fremont, C.M.**, Togbe, D., Doz, E., Rose, S., Vasseur, V., Maillet, I., Jacobs, M., Ryffel, B., and Quesniaux, V.F.J. (2007). IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology* *179*, 1178-1189.
- Fremont, C.M.**, Yeremeev, V., Nicolle, D.M., Jacobs, M., Quesniaux, V.F., and Ryffel, B. (2004). Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *Journal of Clinical Investigation* *114*, 1790-1799.
- Furst, D.E.**, Wallis, R., Broder, M., and Beenhouwer, D.O. (2006). Tumor necrosis factor antagonists: different kinetics and/or mechanisms of action may explain differences in the risk for developing granulomatous infection. *Seminars in arthritis and rheumatism* *36*, 159-167.
- Gabay, C.**, and Towne, J.E. (2015). Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *Journal of leukocyte biology* *97*, 645-652.
- Gansert, J.L.**, Kiessler, V., Engele, M., Wittke, F., Rollinghoff, M., Krensky, A.M., Porcelli, S.A., Modlin, R.L., and Stenger, S. (2003). Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol* *170*, 3154-3161.
- Garlanda, C.**, Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* *39*, 1003-1018.
- Gautam, U.S.**, Mehra, S., and Kaushal, D. (2015). In-Vivo Gene Signatures of *Mycobacterium tuberculosis* in C3HeB/FeJ Mice. *PLoS One* *10*, e0135208.
- Geijtenbeek, T.B.**, Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* *1*, 353-357.
- Geijtenbeek, T.B.**, Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B.**, and van Kooyk, Y. (2003). Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS* *111*, 698-714.
- Giacomini, E.**, Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I., and Coccia, E.M. (2001). Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with *Mycobacterium tuberculosis* Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. *The Journal of Immunology* *166*, 7033-7041.
- Godaly, G.**, and Young, D.B. (2005). *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection of human neutrophils induces CXCL8 secretion by MyD88-dependent TLR2 and TLR4 activation. *Cellular microbiology* *7*, 591-601.
- Gomez, L.M.**, Camargo, J.F., Castiblanco, J., Ruiz-Narvaez, E.A., Cadena, J., and Anaya, J.M. (2006). Analysis of IL1B, TAP1, TAP2 and IKBL polymorphisms on susceptibility to tuberculosis. *Tissue Antigens* *67*, 290-296.
- Gonzalez-Juarrero, M.** (2012). Immunity to TB and targets for immunotherapy. *Immunotherapy* *4*, 187-199.
- Gonzalez-Juarrero, M.**, Kingry, L.C., Ordway, D.J., Henao-Tamayo, M., Harton, M., Basaraba, R.J., Hanneman, W.H., Orme, I.M., and Slayden, R.A. (2009). Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* and identification of molecular markers of disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *40*, 398-409.

- Gonzalez-Juarrero, M.**, and Orme, I.M. (2001). Characterization of murine lung dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* *69*, 1127-1133.
- Gopal, R.**, Monin, L., Slight, S., Uche, U., Blanchard, E., Fallert Junecko, B.A., Ramos-Payan, R., Stallings, C.L., Reinhart, T.A., Kolls, J.K., *et al.* (2014). Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. *PLoS Pathog* *10*, e1004099.
- Greenfeder, S.A.**, Varnell, T., Powers, G., Lombard-Gillooly, K., Shuster, D., McIntyre, K.W., Ryan, D.E., Levin, W., Madison, V., and Ju, G. (1995). Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 beta confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. Implications for IL-1 bioactivity. *The Journal of biological chemistry* *270*, 22460-22466.
- Grell, M.**, Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and *et al.* (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* *83*, 793-802.
- Gresnigt, M.S.**, Rosler, B., Jacobs, C.W., Becker, K.L., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Netea, M.G., Dinarello, C.A., and van de Veerdonk, F.L. (2013). The IL-36 receptor pathway regulates *Aspergillus fumigatus*-induced Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol* *43*, 416-426.
- Gringhuis, S.I.**, den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* *26*, 605-616.
- Guarda, G.**, Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Forster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R.A., Romero, P., and Tschopp, J. (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* *34*, 213-223.
- Gunther, S.**, and Sundberg, E.J. (2014). Molecular determinants of agonist and antagonist signaling through the IL-36 receptor. *J Immunol* *193*, 921-930.
- Guo, H.**, and Topham, D.J. (2010). Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *Journal of virology* *84*, 7750-7759.
- Gutierrez, M.C.**, Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., and Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* *1*, e5.
- Gutierrez, M.G.**, Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* *119*, 753-766.
- Hmama, Z.**, Gabathuler, R., Jefferies, W.A., de Jong, G., and Reiner, N.E. (1998). Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol* *161*, 4882-4893.
- Holscher, C.**, Reiling, N., Schaible, U.E., Holscher, A., Bathmann, C., Korb, D., Lenz, I., Sonntag, T., Kroger, S., Akira, S., *et al.* (2008). Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur J Immunol* *38*, 680-694.
- Houben, E.N.**, Walburger, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Thompson, C.J., Miess, C., Vogel, G., Mueller, B., and Pieters, J. (2009). Differential expression of a virulence factor in pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* *72*, 41-52.
- Ikeuchi, H.**, Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and rheumatism* *52*, 1037-1046.
- Ishikawa, H.**, Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788-792.
- Jacobs, M.**, Brown, N., Allie, N., Chetty, K., and Ryffel, B. (2000a). Tumor necrosis factor receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity. *Pathobiology* *68*, 68-75.
- Jacobs, M.**, Brown, N., Allie, N., and Ryffel, B. (2000b). Fatal *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-LT-alpha-deficient mice. *Clinical immunology* *94*, 192-199.



- Jacobs, M.**, Marino, M.W., Brown, N., Abel, B., Bekker, L.G., Quesniaux, V.J., Fick, L., and Ryffel, B. (2000c). Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest* 80, 901-914.
- Jacobs, M.**, Samarina, A., Grivennikov, S., Botha, T., Allie, N., Fremond, C., Togbe, D., Vasseur, V., Rose, S., Erard, F., *et al.* (2007). Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization. *European cytokine network* 18, 5-13.
- Jayaraman, P.**, Sada-Ovalle, I., Nishimura, T., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K., Remold, H.G., and Behar, S.M. (2013). IL-1beta promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. *J Immunol* 190, 4196-4204.
- Jin, W.**, and Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections* 2, e60.
- Jouanguy, E.**, Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Fondaneche, M.C., Tuerlinckx, D., Blanche, S., Emile, J.F., Gaillard, J.L., Schreiber, R., Levin, M., *et al.* (1997). Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculous bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *The Journal of clinical investigation* 100, 2658-2664.
- Juffermans, N.P.**, Florquin, S., Camoglio, L., Verbon, A., Kolk, A.H., Speelman, P., van Deventer, S.J., and van Der Poll, T. (2000). Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 182, 902-908.
- Jurado, J.O.**, Alvarez, I.B., Pasquinelli, V., Martinez, G.J., Quiroga, M.F., Abbate, E., Musella, R.M., Chuluyan, H.E., and Garcia, V.E. (2008). Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 181, 116-125.
- Jurado, J.O.**, Pasquinelli, V., Alvarez, I.B., Pena, D., Rovetta, A.I., Tateosian, N.L., Romeo, H.E., Musella, R.M., Palmero, D., Chuluyan, H.E., and Garcia, V.E. (2012). IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *Journal of leukocyte biology* 91, 991-1002.
- Kang, P.B.**, Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E., and Schlesinger, L.S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 202, 987-999.
- Kawai, T.**, and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
- Keane, J.** (2005). TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)*.
- Keane, J.**, Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W.D., Siegel, J.N., and Braun, M.M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345, 1098-1104.
- Keeton, R.**, Allie, N., Dambuza, I., Abel, B., Hsu, N.J., Sebesho, B., Randall, P., Burger, P., Fick, E., Quesniaux, V.F., *et al.* (2014). Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of clinical investigation* 124, 1537-1551.
- Keller, C.**, Hoffmann, R., Lang, R., Brandau, S., Hermann, C., and Ehlers, S. (2006). Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infection and immunity* 74, 4295-4309.
- Keller, C.**, Lauber, J., Blumenthal, A., Buer, J., and Ehlers, S. (2004). Resistance and susceptibility to tuberculosis analysed at the transcriptome level: lessons from mouse macrophages. *Tuberculosis (Edinb)* 84, 144-158.
- Khader, S.A.**, Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cillely, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., *et al.* (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8, 369-377.
- Khader, S.A.**, and Cooper, A.M. (2008). IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41, 79-83.

- Khader, S.A.,** Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D.M., Swain, S., Pearl, J.E., Ghilardi, N., Desauvage, F.J., Lund, F.E., and Cooper, A.M. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 203, 1805-1815.
- Khader, S.A.,** Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jelley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSavauge, F., and Cooper, A.M. (2005). IL-23 Compensates for the Absence of IL-12p70 and Is Essential for the IL-17 Response during Tuberculosis but Is Dispensable for Protection and Antigen-Specific IFN- Responses if IL-12p70 Is Available. *The Journal of Immunology* 175, 788-795.
- Khawcharoenporn, T.,** Apisarnthanarak, A., Sangkitporn, S., Rudeeaneksin, J., Srisungngam, S., Bunchoo, S., and Phetsuksiri, B. (2015). Tuberculin skin test and QuantiFERON(R)-TB Gold In-tube Test for diagnosing latent tuberculosis infection among Thai healthcare workers. *Jpn J Infect Dis.*
- Kisich, K.O.,** Higgins, M., Diamond, G., and Heifets, L. (2002). Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils. *Infection and immunity* 70, 4591-4599.
- Kisiswa, L.,** Osorio, C., Erice, C., Vizard, T., Wyatt, S., and Davies, A.M. (2013). TNFalpha reverse signaling promotes sympathetic axon growth and target innervation. *Nat Neurosci* 16, 865-873.
- Kleinnijenhuis, J.,** Joosten, L.A., van de Veerdonk, F.L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B.J., van der Ven, A., Ottenhoff, T.H., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2009). Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol* 39, 1914-1922.
- Kleinnijenhuis, J.,** Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G., and Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin Dev Immunol* 2011, 405310.
- Koch, R.** (1932). Die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K.Krause. *Am Rev Tuberc* 25, 285-323.
- Kondratieva, T.K.,** Linge, I.A., Kondratieva, E.V., Dyatlov, A.V., Drutskaya, M.S., Zvartsev, R.V., Nedospasov, S.A., and Apt, A.S. (2014). Formation of compact aggregates of B-lymphocytes in lung tissue during mycobacterial infection in mice depends on TNF production by these cells and is not an element of the host's immunological protection. *Biochemistry. Biokhimiia* 79, 1358-1362.
- Krysko, D.V.,** Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2006). Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ* 13, 2011-2022.
- Kusuhara, K.,** Yamamoto, K., Okada, K., Mizuno, Y., and Hara, T. (2007). Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes. *Int J Immunogenet* 34, 35-44.
- Kwan, C.K.,** and Ernst, J.D. (2011). HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews* 24, 351-376.
- Laennec, R.T.H.** (1962). A treatise on the disease of the chest, translated by Forbes J. New York, NY. Hafner Publishing Company.
- Law, K.,** Weiden, M., Harkin, T., Tchou-Wong, K., Chi, C., and Rom, W.N. (1996). Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 153, 799-804.
- Lazar-Molnar, E.,** Chen, B., Sweeney, K.A., Wang, E.J., Liu, W., Lin, J., Porcelli, S.A., Almo, S.C., Nathenson, S.G., and Jacobs, W.R., Jr. (2010). Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13402-13407.
- Lee, H.M.,** Yuk, J.M., Shin, D.M., and Jo, E.K. (2009). Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol* 29, 795-805.
- Lemaitre, B.,** Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973-983.

- Lewis, K.N.,** Liao, R., Guinn, K.M., Hickey, M.J., Smith, S., Behr, M.A., and Sherman, D.R. (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *The Journal of infectious diseases* *187*, 117-123.
- Li, X.D.,** Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* *341*, 1390-1394.
- Lin, P.L.,** Myers, A., Smith, L., Bigbee, C., Bigbee, M., Fuhrman, C., Grieser, H., Chiosea, I., Voitenek, N.N., Capuano, S.V., *et al.* (2010a). Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model. *Arthritis and rheumatism* *62*, 340-350.
- Lin, S.C.,** Lo, Y.C., and Wu, H. (2010b). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* *465*, 885-890.
- Liu, P.T.,** and Modlin, R.L. (2008). Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current opinion in immunology* *20*, 371-376.
- Lopetuso, L.R.,** Chowdhry, S., and Pizarro, T.T. (2013). Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Frontiers in immunology* *4*, 181.
- Lopez-Lopez, N.,** Gonzalez-Curiel, I., Castaneda-Delgado, J., Montoya-Rosales, A., Gandara-Jasso, B., Enciso-Moreno, J.A., and Rivas-Santiago, B. (2014). Vitamin D supplementation promotes macrophages' anti-mycobacterial activity in type 2 diabetes mellitus patients with low vitamin D receptor expression. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *16*, 755-761.
- Lorenz, H.M.,** Antoni, C., Valerius, T., Repp, R., Grunke, M., Schwerdtner, N., Nusslein, H., Woody, J., Kalden, J.R., and Manger, B. (1996). In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol* *156*, 1646-1653.
- Lowe, D.M.,** Redford, P.S., Wilkinson, R.J., O'Garra, A., and Martineau, A.R. (2012). Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends in immunology* *33*, 14-25.
- Luca, S.,** and Mihaescu, T. (2013). History of BCG Vaccine. *Maedica (Buchar)* *8*, 53-58.
- Ma, J.,** Lu, J., Huang, H., Teng, X., Tian, M., Yu, Q., Yuan, X., Jing, Y., Shi, C., Li, J., and Fan, X. (2015). Inhalation of recombinant adenovirus expressing granulysin protects mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene therapy*.
- Ma, X.,** Reich, R.A., Gonzalez, O., Pan, X., Fothergill, A.K., Starke, J.R., Teeter, L.D., Musser, J.M., and Graviss, E.A. (2003). No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* *188*, 1116-1118.
- Magdelaine-Beuzelin, C.,** Ohresser, M., and Watier, H. (2009). [Neonatal Fc receptor, key control of immunoglobulins biodistribution]. *Med Sci (Paris)* *25*, 1053-1056.
- Maglione, P.J.,** and Chan, J. (2009). How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* *39*, 676-686.
- Maglione, P.J.,** Xu, J., Casadevall, A., and Chan, J. (2008). Fc Receptors Regulate Immune Activation and Susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology* *180*, 3329-3338.
- Maglione, P.J.,** Xu, J., and Chan, J. (2007). B Cells Moderate Inflammatory Progression and Enhance Bacterial Containment upon Pulmonary Challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* *178*, 7222-7234.
- Maillet, I.,** Schnyder-Candrian, S., Couillin, I., Quesniaux, V.F., Erard, F., Moser, R., Fleury, S., Kanda, A., Dombrowicz, D., Szymkowski, D.E., and Ryffel, B. (2011). Allergic lung inflammation is mediated by soluble tumor necrosis factor (TNF) and attenuated by dominant-negative TNF biologics. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *45*, 731-739.
- Majeed, M.,** Perskvist, N., Ernst, J.D., Orselius, K., and Stendahl, O. (1998). Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microbial pathogenesis* *24*, 309-320.

- Manca, C.,** Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., Barry, C.E., 3rd, Freedman, V.H., and Kaplan, G. (2001). Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha$  / $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 5752-5757.
- Manca, C.,** Tsenova, L., Freeman, S., Barczak, A.K., Tovey, M., Murray, P.J., Barry, C., and Kaplan, G. (2005). Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* *25*, 694-701.
- Manganelli, R.,** Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., and Smith, I. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* *41*, 423-437.
- Manzanillo, P.S.,** Shiloh, M.U., Portnoy, D.A., and Cox, J.S. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe* *11*, 469-480.
- Marakalala, M.J.,** Guler, R., Matika, L., Murray, G., Jacobs, M., Brombacher, F., Rothfuchs, A.G., Sher, A., and Brown, G.D. (2011). The Syk/CARD9-coupled receptor Dectin-1 is not required for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *13*, 198-201.
- Mariette, X.,** Baron, G., Tubach, F., Liote, F., Combe, B., Miceli-Richard, C., Flipo, R.M., Goupille, P., Allez, M., Salmon, D., *et al.* (2012). Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon gamma release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* *71*, 1783-1790.
- Marino, S.,** Sud, D., Plessner, H., Lin, P.L., Chan, J., Flynn, J.L., and Kirschner, D.E. (2007). Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue. *PLoS computational biology* *3*, 1909-1924.
- Markowitz, N.,** Hansen, N.I., Hopewell, P.C., Glassroth, J., Kvale, P.A., Mangura, B.T., Wilcosky, T.C., Wallace, J.M., Rosen, M.J., and Reichman, L.B. (1997). Incidence of tuberculosis in the United States among HIV-infected persons. The Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Ann Intern Med* *126*, 123-132.
- Martineau, A.R.,** Wilkinson, K.A., Newton, S.M., Floto, R.A., Norman, A.W., Skolimowska, K., Davidson, R.N., Sorensen, O.E., Kampmann, B., Griffiths, C.J., and Wilkinson, R.J. (2007). IFN- $\gamma$ - and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* *178*, 7190-7198.
- Matthews, K.,** Wilkinson, K.A., Kalsdorf, B., Roberts, T., Diacon, A., Walzl, G., Wolske, J., Ntsekhe, M., Syed, F., Russell, J., *et al.* (2011). Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* *91*, 587-593.
- Mayer-Barber, K.D.,** Andrade, B.B., Barber, D.L., Hieny, S., Feng, C.G., Caspar, P., Oland, S., Gordon, S., and Sher, A. (2011). Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* *35*, 1023-1034.
- Mayer-Barber, K.D.,** Andrade, B.B., Oland, S.D., Amaral, E.P., Barber, D.L., Gonzales, J., Derrick, S.C., Shi, R., Kumar, N.P., Wei, W., *et al.* (2014). Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature* *511*, 99-103.
- Mayer-Barber, K.D.,** Barber, D.L., Shenderov, K., White, S.D., Wilson, M.S., Cheever, A., Kugler, D., Hieny, S., Caspar, P., Nunez, G., *et al.* (2010). Caspase-1 independent IL-1 $\beta$  production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *J Immunol* *184*, 3326-3330.
- McAleer, J.P.,** and Kolls, J.K. (2014). Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunol Rev* *260*, 129-144.
- McCarthy, K.M.,** Lam, M., Subramanian, L., Shakya, R., Wu, Z., Newton, E.E., and Simister, N.E. (2001). Effects of mutations in potential phosphorylation sites on transcytosis of FcRn. *J Cell Sci* *114*, 1591-1598.
- McCoy, M.K.,** Martinez, T.N., Ruhn, K.A., Szymkowski, D.E., Smith, C.G., Botterman, B.R., Tansey, K.E., and Tansey, M.G. (2006). Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* *26*, 9365-9375.

- McKinney, J.D.**, Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchetti, J.C., Jacobs, W.R., Jr., and Russell, D.G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* *406*, 735-738.
- McMurray, D.N.** (2001). Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med* *7*, 135-137.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* *15*, 87-103.
- Means, T.K.**, Jones, B.W., Schromm, A.B., Shurtleff, B.A., Smith, J.A., Keane, J., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., and Fenton, M.J. (2001). Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol* *166*, 4074-4082.
- Means, T.K.**, Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., and Fenton, M.J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* *163*, 3920-3927.
- Mease, P.J.** (2015). Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatol* *27*, 127-133.
- Medina, E.**, and North, R.J. (1998). Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology* *93*, 270-274.
- Medzhitov, R.**, Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Meintjes, G.**, Rabie, H., Wilkinson, R.J., and Cotton, M.F. (2009). Tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome and unmasking of tuberculosis by antiretroviral therapy. *Clin Chest Med* *30*, 797-810, x.
- Miller, A.C.**, Schattenberg, D.G., Malkinson, A.M., and Ross, D. (1994). Decreased content of the IL1 alpha processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone. *Toxicol Lett* *74*, 177-184.
- Miossec, P.**, and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 763-776.
- Mogues, T.**, Goodrich, M.E., Ryan, L., LaCourse, R., and North, R.J. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med* *193*, 271-280.
- Mohan, A.K.**, Cote, T.R., Block, J.A., Manadan, A.M., Siegel, J.N., and Braun, M.M. (2004). Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Clin Infect Dis* *39*, 295-299.
- Moller, M.**, Flachsbarth, F., Till, A., Thyse, T., Horstmann, R.D., Meyer, C.G., Osei, I., van Helden, P.D., Hoal, E.G., Schreiber, S., *et al.* (2010). A functional haplotype in the 3'untranslated region of *TNFRSF1B* is associated with tuberculosis in two African populations. *American journal of respiratory and critical care medicine* *181*, 388-393.
- Mootoo, A.**, Stylianou, E., Arias, M.A., and Reljic, R. (2009). TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets* *8*, 53-62.
- Morahan, G.**, Kaur, G., Singh, M., Rappaport, C.C., Kumar, N., Katoch, K., Mehra, N.K., and Huang, D. (2007). Association of variants in the *IL12B* gene with leprosy and tuberculosis. *Tissue Antigens* *69 Suppl 1*, 234-236.
- Mwandumba, H.C.**, Russell, D.G., Nyirenda, M.H., Anderson, J., White, S.A., Molyneux, M.E., and Squire, S.B. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* resides in nonacidified vacuoles in endocytically competent alveolar macrophages from patients with tuberculosis and HIV infection. *J Immunol* *172*, 4592-4598.
- Nandi, B.**, and Behar, S.M. (2011). Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med* *208*, 2251-2262.
- Naude, P.J.**, den Boer, J.A., Luiten, P.G., and Eisel, U.L. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *The FEBS journal* *278*, 888-898.

- Nerlich, A.G.,** Haas, C.J., Zink, A., Szeimies, U., and Hagedorn, H.G. (1997). Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet* *350*, 1404.
- Netea, M.G.,** van de Veerdonk, F.L., van der Meer, J.W., Dinarello, C.A., and Joosten, L.A. (2015). Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annual review of immunology* *33*, 49-77.
- Neufert, C.,** Pai, R.K., Noss, E.H., Berger, M., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2001). Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol* *167*, 1542-1549.
- Neyrolles, O.,** and Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* *91*, 187-195.
- Neyrolles, O.,** Hernandez-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornes, P., Tailleux, L., Barrios Payan, J.A., Pivert, E., Bordat, Y., Aguilar, D., Prevost, M.C., *et al.* (2006). Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? *PLoS One* *1*, e43.
- Nicol, M.P.,** and Wilkinson, R.J. (2008). The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* *102*, 955-965.
- North, R.J.,** and Jung, Y.J. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annual review of immunology* *22*, 599-623.
- Novikov, A.,** Cardone, M., Thompson, R., Shenderov, K., Kirschman, K.D., Mayer-Barber, K.D., Myers, T.G., Rabin, R.L., Trinchieri, G., Sher, A., and Feng, C.G. (2011). Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1beta production in human macrophages. *J Immunol* *187*, 2540-2547.
- O'Garra, A.,** Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., and Berry, M.P. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology* *31*, 475-527.
- Ocejo-Vinyals, J.G.,** de Mateo, E.P., Hoz, M.A., Arroyo, J.L., Agüero, R., Ausin, F., and Farinas, M.C. (2013a). The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Cytokine* *64*, 58-61.
- Ocejo-Vinyals, J.G.,** Puente de Mateo, E., Ausin, F., Agüero, R., Arroyo, J.L., Gutierrez-Cuadra, M., and Farinas, M.C. (2013b). Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* *17*, 652-654.
- Ogus, A.C.,** Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., and Yegin, O. (2004). The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *European Respiratory Journal* *23*, 219-223.
- Okamoto Yoshida, Y.,** Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. (2010). Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* *184*, 4414-4422.
- Olleros, M.L.,** Guler, R., Corazza, N., Vesin, D., Eugster, H.P., Marchal, G., Chavarot, P., Mueller, C., and Garcia, I. (2002). Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* *168*, 3394-3401.
- Olleros, M.L.,** Guler, R., Vesin, D., Parapanov, R., Marchal, G., Martinez-Soria, E., Corazza, N., Pache, J.C., Mueller, C., and Garcia, I. (2005). Contribution of Transmembrane Tumor Necrosis Factor to Host Defense against Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin and Mycobacterium tuberculosis Infections. *Am J Pathol* *166*, 1109-1120.
- Olleros, M.L.,** Vesin, D., Bisig, R., Santiago-Raber, M.L., Schuepbach-Mallepell, S., Kollias, G., Gaide, O., and Garcia, I. (2012). Membrane-bound TNF induces protective immune responses to M. bovis BCG infection: regulation of memTNF and TNF receptors comparing two memTNF molecules. *PLoS One* *7*, e31469.
- Olleros, M.L.,** Vesin, D., Lambou, A.F., Janssens, J.P., Ryffel, B., Rose, S., Fremond, C., Quesniaux, V.F., Szymkowski, D.E., and Garcia, I. (2009). Dominant-negative tumor necrosis factor protects from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin (BCG) and endotoxin-induced liver injury without compromising host immunity to BCG and Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* *199*, 1053-1063.
- Onwueme, K.C.,** Vos, C.J., Zurita, J., Ferreras, J.A., and Quadri, L.E. (2005). The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in lipid research* *44*, 259-302.

- Orenstein, E.W.**, Basu, S., Shah, N.S., Andrews, J.R., Friedland, G.H., Moll, A.P., Gandhi, N.R., and Galvani, A.P. (2009). Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9, 153-161.
- Orme, I.M.**, and Basaraba, R.J. (2014). The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in immunology* 26, 601-609.
- Ottenhoff, T.H.**, and Kaufmann, S.H. (2012). Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog* 8, e1002607.
- Pai, M.**, Denkinger, C.M., Kik, S.V., Rangaka, M.X., Zwerling, A., Oxlade, O., Metcalfe, J.Z., Cattamanchi, A., Dowdy, D.W., Dheda, K., and Banaei, N. (2014). Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical microbiology reviews* 27, 3-20.
- Pan, C.X.**, Tang, J., Wang, X.Y., Wu, F.R., Ge, J.F., and Chen, F.H. (2014). Role of interleukin-22 in liver diseases. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 63, 519-525.
- Pawelczyk, J.**, and Kremer, L. (2014). The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiol Spectr* 2, MGM2-0003-2013.
- Pedrosa, J.**, Saunders, B.M., Appelberg, R., Orme, I.M., Silva, M.T., and Cooper, A.M. (2000). Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infection and immunity* 68, 577-583.
- Peng, R.**, Yue, J., Han, M., Zhao, Y., Liu, L., and Liang, L. (2013). The IL-17F sequence variant is associated with susceptibility to tuberculosis. *Gene* 515, 229-232.
- Peters, W.**, and Ernst, Joel D. (2003). Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 5, 151-158.
- Peyron, P.**, Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffe, M., Emile, J.F., Marchou, B., Cardona, P.J., *et al.* (2008). Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 4, e1000204.
- Plessner, H.L.**, Lin, P.L., Kohno, T., Louie, J.S., Kirschner, D., Chan, J., and Flynn, J.L. (2007). Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) by antibody but not TNF receptor fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 195, 1643-1650.
- Pooran, A.**, Pieterse, E., Davids, M., Theron, G., and Dheda, K. (2013). What is the cost of diagnosis and management of drug resistant tuberculosis in South Africa? *PLoS One* 8, e54587.
- Prabhu Anand, S.**, Selvaraj, P., Jawahar, M.S., Adhilakshmi, A.R., and Narayanan, P.R. (2007). Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 126, 135-138.
- Puissegur, M.P.**, Lay, G., Gilleron, M., Botella, L., Nigou, J., Marrakchi, H., Mari, B., Duteyrat, J.L., Guerardel, Y., Kremer, L., *et al.* (2007). Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrin-mediated pathway. *J Immunol* 178, 3161-3169.
- Pym, A.S.**, Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., and Cole, S.T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 46, 709-717.
- Quesniaux, V.**, Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yermeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., *et al.* (2004a). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6, 946-959.
- Quesniaux, V.J.**, Nicolle, D.M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., and Ryffel, B. (2004b). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 172, 4425-4434.
- Rajaram, M.V.**, Brooks, M.N., Morris, J.D., Torrelles, J.B., Azad, A.K., and Schlesinger, L.S. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol* 185, 929-942.

- Rajaram, M.V.**, Ni, B., Morris, J.D., Brooks, M.N., Carlson, T.K., Bakthavachalu, B., Schoenberg, D.R., Torrelles, J.B., and Schlesinger, L.S. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 17408-17413.
- Ramadas, R.A.**, Ewart, S.L., Iwakura, Y., Medoff, B.D., and LeVine, A.M. (2012). IL-36alpha exerts pro-inflammatory effects in the lungs of mice. *PLoS One* *7*, e45784.
- Ramadas, R.A.**, Ewart, S.L., Medoff, B.D., and LeVine, A.M. (2011). Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *44*, 134-145.
- Redford, P.S.**, Boonstra, A., Read, S., Pitt, J., Graham, C., Stavropoulos, E., Bancroft, G.J., and O'Garra, A. (2010). Enhanced protection to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol* *40*, 2200-2210.
- Reiling, N.**, Holscher, C., Fehrenbach, A., Kroger, S., Kirschning, C.J., Goyert, S., and Ehlers, S. (2002). Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology* *169*, 3480-3484.
- Rhoades, E.R.**, Frank, A.A., and Orme, I.M. (1997). Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Tuber Lung Dis* *78*, 57-66.
- Robinson, M.J.**, Sancho, D., Slack, E.C., LeibundGut-Landmann, S., and Reis e Sousa, C. (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* *7*, 1258-1265.
- Roca, F.J.**, and Ramakrishnan, L. (2013). TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* *153*, 521-534.
- Rothfuchs, A.G.**, Bafica, A., Feng, C.G., Egen, J.G., Williams, D.L., Brown, G.D., and Sher, A. (2007). Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol* *179*, 3463-3471.
- Russell, D.G.**, Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S., and Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* *10*, 943-948.
- Saidenberg-Kermanac'h, N.**, Semerano, L., Naccache, J.M., Brauner, M., Falgarone, G., Dumont-Fischer, D., Guillot, X., Valeyre, D., and Boissier, M.C. (2012). Screening for latent tuberculosis in anti-TNF-alpha candidate patients in a high tuberculosis incidence setting. *Int J Tuberc Lung Dis* *16*, 1307-1314.
- Salamon, H.**, Bruiners, N., Lakehal, K., Shi, L., Ravi, J., Yamaguchi, K.D., Pine, R., and Gennaro, M.L. (2014). Cutting edge: Vitamin D regulates lipid metabolism in Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* *193*, 30-34.
- Salgame, P.**, Geadas, C., Collins, L., Jones-Lopez, E., and Ellner, J.J. (2015). Latent tuberculosis infection--Revisiting and revising concepts. *Tuberculosis (Edinb)* *95*, 373-384.
- Sander, P.**, Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S.K., Kroppenstedt, R.M., Ehlers, S., Keller, C., Keeble, J.R., Hagemeyer, M., Colston, M.J., *et al.* (2004). Lipoprotein processing is required for virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* *52*, 1543-1552.
- Santora, L.C.**, Kaymakcalan, Z., Sakorafas, P., Krull, I.S., and Grant, K. (2001). Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore. *Anal Biochem* *299*, 119-129.
- Scallon, B.**, Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X.Y., Shealy, D., and Wagner, C. (2002). Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* *301*, 418-426.
- Scallon, B.J.**, Moore, M.A., Trinh, H., Knight, D.M., and Ghrayeb, J. (1995). Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* *7*, 251-259.
- Scanga, C.A.**, Bafica, A., Feng, C.G., Cheever, A.W., Hieny, S., and Sher, A. (2004). MyD88-Deficient Mice Display a Profound Loss in Resistance to Mycobacterium tuberculosis Associated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. *Infection and Immunity* *72*, 2400-2404.



- Scanga, C.A.**, Mohan, V.P., Joseph, H., Yu, K., Chan, J., and Flynn, J.L. (1999). Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infection and immunity* *67*, 4531-4538.
- Scanga, C.A.**, Mohan, V.P., Tanaka, K., Alland, D., Flynn, J.L., and Chan, J. (2001). The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infection and immunity* *69*, 7711-7717.
- Schlesinger, L.S.**, Hull, S.R., and Kaufman, T.M. (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* *152*, 4070-4079.
- Schoggins, J.W.**, MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., *et al.* (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* *505*, 691-695.
- Scriba, T.J.**, Kalsdorf, B., Abrahams, D.A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H.Y., Wilkinson, R.J., Walzl, G., Gelderbloem, S.J., *et al.* (2008). Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* *180*, 1962-1970.
- Sellam, J.**, Hamdi, H., Roy, C., Baron, G., Lemann, M., Puechal, X., Breban, M., Berenbaum, F., Humbert, M., Weldingh, K., *et al.* (2007). Comparison of in vitro-specific blood tests with tuberculin skin test for diagnosis of latent tuberculosis before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* *66*, 1610-1615.
- Shabgah, A.G.**, Fattahi, E., and Shahneh, F.Z. (2014). Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy dermatologii i alergologii* *31*, 256-261.
- Simeone, R.**, Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* *8*, e1002507.
- Sims, J.E.**, and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* *10*, 89-102.
- Sondergaard, J.N.**, Laursen, J.M., Rosholm, L.B., and Brix, S. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* promotes Th17 expansion via regulation of human dendritic cells toward a high CD14 and low IL-12p70 phenotype that reprograms upon exogenous IFN-gamma. *Int Immunol* *26*, 705-716.
- Song, X.**, and Qian, Y. (2013). The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* *62*, 175-182.
- Sonnenberg, G.F.**, Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* *12*, 383-390.
- Sonnenberg, P.**, Glynn, J.R., Fielding, K., Murray, J., Godfrey-Faussett, P., and Shearer, S. (2005). How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *The Journal of infectious diseases* *191*, 150-158.
- Spencer, C.T.**, Abate, G., Sakala, I.G., Xia, M., Truscott, S.M., Eickhoff, C.S., Linn, R., Blazevic, A., Metkar, S.S., Peng, G., *et al.* (2013). Granzyme A produced by gamma(9)delta(2) T cells induces human macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen. *PLoS Pathog* *9*, e1003119.
- Stanley, S.A.**, Johndrow, J.E., Manzanillo, P., and Cox, J.S. (2007). The Type I IFN Response to Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Requires ESX-1-Mediated Secretion and Contributes to Pathogenesis. *The Journal of Immunology* *178*, 3143-3152.
- Steed, P.M.**, Tansey, M.G., Zalevsky, J., Zhukovsky, E.A., Desjarlais, J.R., Szymkowski, D.E., Abbott, C., Carmichael, D., Chan, C., Cherry, L., *et al.* (2003). Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* *301*, 1895-1898.
- Stein, C.M.**, Zalwango, S., Chiunda, A.B., Millard, C., Leontiev, D.V., Horvath, A.L., Cartier, K.C., Chervenak, K., Boom, W.H., Elston, R.C., *et al.* (2007). Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNFalpha cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes. *Human genetics* *121*, 663-673.
- Stenger, S.**, Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., *et al.* (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* *282*, 121-125.

- Sugawara, I.**, Udagawa, T., and Yamada, H. (2004). Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infection and immunity* 72, 1804-1806.
- Sugawara, S.**, Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., and Takada, H. (2001). Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* 167, 6568-6575.
- Sun, L.**, Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786-791.
- Tadokera, R.**, Meintjes, G., Skolimowska, K.H., Wilkinson, K.A., Matthews, K., Seldon, R., Chegou, N.N., Maartens, G., Rangaka, M.X., Rebe, K., *et al.* (2011). Hypercytokinaemia accompanies HIV-tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. *Eur Respir J* 37, 1248-1259.
- Tailleux, L.**, Neyrolles, O., Honore-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.P., Lagrange, P.H., Gluckman, J.C., Rosenzweig, M., and Herrmann, J.L. (2003). Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 1939-1948.
- Tailleux, L.**, Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J.L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P.H., de Blic, J., Tazi, A., *et al.* (2005). DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med* 2, e381.
- Tang, P.**, Hung, M.C., and Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35, 8216-8225.
- Tanne, A.**, Ma, B., Boudou, F., Tailleux, L., Botella, H., Badell, E., Levillain, F., Taylor, M.E., Drickamer, K., Nigou, J., *et al.* (2009). A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 206, 2205-2220.
- Tanne, A.**, and Neyrolles, O. (2010). C-type lectins in immune defense against pathogens: the murine DC-SIGN homologue SIGNR3 confers early protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence* 1, 285-290.
- Tapping, R.I.**, and Tobias, P.S. (2003). Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *Journal of endotoxin research* 9, 264-268.
- Thavarajah, K.**, Wu, P., Rhew, E.J., Yeldandi, A.K., and Kamp, D.W. (2009). Pulmonary complications of tumor necrosis factor-targeted therapy. *Respir Med* 103, 661-669.
- Thomas, C., Bazan, J.F., and Garcia, K.C. (2012). Structure of the activating IL-1 receptor signaling complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 455-457.
- Tian, T.**, Woodworth, J., Skold, M., and Behar, S.M. (2005). In Vivo Depletion of CD11c+ Cells Delays the CD4+ T Cell Response to *Mycobacterium tuberculosis* and Exacerbates the Outcome of Infection. *The Journal of Immunology* 175, 3268-3272.
- Tobin, A.M.**, and Kirby, B. (2005). TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs* 19, 47-57.
- Tobin, D.M.**, Roca, F.J., Oh, S.F., McFarland, R., Vickery, T.W., Ray, J.P., Ko, D.C., Zou, Y., Bang, N.D., Chau, T.T., *et al.* (2012). Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* 148, 434-446.
- Torrado, E.**, and Cooper, A.M. (2010). IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 455-462.
- Tortola, L.**, Rosenwald, E., Abel, B., Blumberg, H., Schafer, M., Coyle, A.J., Renaud, J.C., Werner, S., Kisielow, J., and Kopf, M. (2012). Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *The Journal of clinical investigation* 122, 3965-3976.
- Towne, J.E.**, Garka, K.E., Renshaw, B.R., Virca, G.D., and Sims, J.E. (2004). Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *The Journal of biological chemistry* 279, 13677-13688.

- Towne, J.E.**, Renshaw, B.R., Douangpanya, J., Lipsky, B.P., Shen, M., Gabel, C.A., and Sims, J.E. (2011). Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36alpha, IL-36beta, and IL-36gamma) or antagonist (IL-36Ra) activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 42594-42602.
- Tracey, K.J.**, and Cerami, A. (1990). Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci* 587, 325-331.
- Trinchieri, G.**, and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7, 179-190.
- Troegeler, A.**, Lugo-Villarino, G., Hansen, S., Rasolofso, V., Henriksen, M.L., Mori, K., Ohtani, K., Duval, C., Mercier, I., Benard, A., *et al.* (2015). Collectin CL-LK Is a Novel Soluble Pattern Recognition Receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 10, e0132692.
- Trunz, B.B.**, Fine, P., and Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367, 1173-1180.
- Tsai, M.C.**, Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., Tufariello, J., Flynn, J., and Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular microbiology* 8, 218-232.
- Tsao, T.C.**, Huang, C.C., Chiou, W.K., Yang, P.Y., Hsieh, M.J., and Tsao, K.C. (2002). Levels of interferon-gamma and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6, 720-727.
- Tsenova, L.**, Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A.L., Kurepina, N., Reed, M.B., Mathema, B., Barry, C.E., 3rd, and Kaplan, G. (2005). Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *The Journal of infectious diseases* 192, 98-106.
- Tso, H.W.**, Lau, Y.L., Tam, C.M., Wong, H.S., and Chiang, A.K. (2004). Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *The Journal of infectious diseases* 190, 913-919.
- Tye, G.J.**, Lew, M.H., Choong, Y.S., Lim, T.S., Sarmiento, M.E., Acosta, A., and Norazmi, M.N. (2015). Vaccines for TB: Lessons from the Past Translating into Future Potentials. *Journal of immunology research* 2015, 916780.
- Ulrichs, T.**, Kosmiadi, G.A., Trusov, V., Jorg, S., Pradl, L., Titukhina, M., Mishenko, V., Gushina, N., and Kaufmann, S.H. (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *The Journal of pathology* 204, 217-228.
- Underhill, D.M.**, Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14459-14463.
- Urdahl, K.B.**, Shafiani, S., and Ernst, J.D. (2011). Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal immunology* 4, 288-293.
- van Crevel, R.**, Parwati, I., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Ottenhoff, T.H., Netea, M.G., van der Ven, A., Nelwan, R.H., van der Meer, J.W., Alisjahbana, B., and van de Vosse, E. (2009). Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 200, 1671-1674.
- Verbon, A.**, Juffermans, N., Van Deventer, S.J., Speelman, P., Van Deutekom, H., and Van Der Poll, T. (1999). Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol* 115, 110-113.
- Vergne, I.**, Chua, J., Lee, H.H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4033-4038.
- Vergne, I.**, Fratti, R.A., Hill, P.J., Chua, J., Belisle, J., and Deretic, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Molecular biology of the cell* 15, 751-760.

- Vignali, D.A.**, and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* *13*, 722-728.
- Vigne, S.**, Palmer, G., Lamacchia, C., Martin, P., Talabot-Ayer, D., Rodriguez, E., Ronchi, F., Sallusto, F., Dinh, H., Sims, J.E., and Gabay, C. (2011). IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood* *118*, 5813-5823.
- Vigne, S.**, Palmer, G., Martin, P., Lamacchia, C., Strebel, D., Rodriguez, E., Olleros, M.L., Vesin, D., Garcia, I., Ronchi, F., *et al.* (2012). IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells. *Blood* *120*, 3478-3487.
- Vilcheze, C.**, Molle, V., Carrere-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., Baronian, G., Tufariello, J., Hartman, T., Veyron-Churlet, R., *et al.* (2014). Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* *10*, e1004115.
- Volkman, H.E.**, Pozos, T.C., Zheng, J., Davis, J.M., Rawls, J.F., and Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* *327*, 466-469.
- von Vietinghoff, S.**, and Ley, K. (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* *183*, 865-873.
- Walburger, A.**, Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* *304*, 1800-1804.
- Wallis, R.S.**, and Ehlers, S. (2005). Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab. *Seminars in arthritis and rheumatism* *34*, 34-38.
- Wang, D.**, Zhang, S., Li, L., Liu, X., Mei, K., and Wang, X. (2010). Structural insights into the assembly and activation of IL-1beta with its receptors. *Nat Immunol* *11*, 905-911.
- Wang, J.Q.**, Jeelall, Y.S., Ferguson, L.L., and Horikawa, K. (2014). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in immunology* *5*, 367.
- Watson, R.O.**, Manzanillo, P.S., and Cox, J.S. (2012). Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* *150*, 803-815.
- WHO (2014). Global Tuberculosis Report.
- Wiens, G.D.**, and Glenney, G.W. (2011). Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Developmental and comparative immunology* *35*, 1324-1335.
- Wilson, G.J.**, Marakalala, M.J., Hoving, J.C., van Laarhoven, A., Drummond, R.A., Kerscher, B., Keeton, R., van de Vosse, E., Ottenhoff, T.H., Plantinga, T.S., *et al.* (2015). The C-type lectin receptor CLECSF8/CLEC4D is a key component of anti-mycobacterial immunity. *Cell Host Microbe* *17*, 252-259.
- Witte, E.**, Witte, K., Warszawska, K., Sabat, R., and Wolk, K. (2010). Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine & growth factor reviews* *21*, 365-379.
- Wolf, A.J.**, Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med* *205*, 105-115.
- Wolf, A.J.**, Linas, B., Trevejo-Nunez, G.J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. *The Journal of Immunology* *179*, 2509-2519.
- Wolf, J.**, and Ferris, L.K. (2014). Anti-IL-36R antibodies, potentially useful for the treatment of psoriasis: a patent evaluation of WO2013074569. *Expert Opin Ther Pat* *24*, 477-479.
- Wolk, K.**, Witte, E., Warszawska, K., Schulze-Tanzil, G., Witte, K., Philipp, S., Kunz, S., Docke, W.D., Asadullah, K., Volk, H.D., *et al.* (2009). The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* *39*, 3570-3581.

- Wu, J.,** Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* *339*, 826-830.
- Xie, X.,** Li, F., Chen, J.W., and Wang, J. (2014). Risk of tuberculosis infection in anti-TNF-alpha biological therapy: from bench to bedside. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* *47*, 268-274.
- Yadav, M.,** and Schorey, J.S. (2006). The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* *108*, 3168-3175.
- Yazdi, A.S.,** and Drexler, S.K. (2013). Regulation of interleukin 1alpha secretion by inflammasomes. *Ann Rheum Dis* *72 Suppl 2*, ii96-99.
- Yonekawa, A.,** Saijo, S., Hoshino, Y., Miyake, Y., Ishikawa, E., Suzukawa, M., Inoue, H., Tanaka, M., Yoneyama, M., Oh-Hora, M., *et al.* (2014). Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* *41*, 402-413.
- Zalevsky, J.,** Secher, T., Ezhevsky, S.A., Janot, L., Steed, P.M., O'Brien, C., Eivazi, A., Kung, J., Nguyen, D.H., Doberstein, S.K., *et al.* (2007). Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol* *179*, 1872-1883.
- Zambrano-Zaragoza, J.F.,** Romo-Martinez, E.J., Duran-Avelar Mde, J., Garcia-Magallanes, N., and Vibanco-Perez, N. (2014). Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *International journal of inflammation* *2014*, 651503.
- Zhang, G.,** Zhou, B., Li, S., Yue, J., Yang, H., Wen, Y., Zhan, S., Wang, W., Liao, M., Zhang, M., *et al.* (2014). Allele-specific induction of IL-1beta expression by C/EBPbeta and PU.1 contributes to increased tuberculosis susceptibility. *PLoS Pathog* *10*, e1004426.
- Zhang, H.,** Yan, D., Shi, X., Liang, H., Pang, Y., Qin, N., Chen, H., Wang, J., Yin, B., Jiang, X., *et al.* (2008). Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *Journal of leukocyte biology* *84*, 789-797.
- Zhang, N.,** Pan, H.F., and Ye, D.Q. (2011). Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem* *353*, 41-46.
- Zhang, X.,** Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* *31*, 761-771.
- Zink, A.R.,** Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., and Nerlich, A.G. (2003). Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* *41*, 359-367.
- Zou, J.,** Rudwaleit, M., Brandt, J., Thiel, A., Braun, J., and Sieper, J. (2003a). Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis and rheumatism* *48*, 780-790.
- Zou, J.,** Rudwaleit, M., Brandt, J., Thiel, A., Braun, J., and Sieper, J. (2003b). Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis* *62*, 561-564.
- Zumla, A.,** Nahid, P., and Cole, S.T. (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 388-404.



## ~ Annexe ~



**Article 5: Relative contribution of IL-1a, IL-1b and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG**

Marie-Laure Bourigault, **Noria Segueni**, Stéphanie Rose, Nathalie Court, Rachel Vacher, Virginie Vasseur, François Erard, Marc Le Bert, Irene Garcia, Yoichiro Iwakura, Muazzam Jacobs, Bernhard Ryffel et Valerie F. J. Quesniaux

## ORIGINAL RESEARCH

**Relative contribution of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG**

Marie-Laure Bourigault<sup>1,2</sup>, Noria Segueni<sup>1,2</sup>, Stéphanie Rose<sup>1,2</sup>, Nathalie Court<sup>1,2</sup>, Rachel Vacher<sup>1,2</sup>, Virginie Vasseur<sup>1,2</sup>, François Erard<sup>1,2</sup>, Marc Le Bert<sup>1,2</sup>, Irene Garcia<sup>3</sup>, Yoichiro Iwakura<sup>4</sup>, Muazzam Jacobs<sup>5,6</sup>, Bernhard Ryffel<sup>1,2,5</sup>, & Valerie F. J. Quesniaux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMR7355, Orleans, France

<sup>2</sup>University of Orleans, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, Orleans, France

<sup>3</sup>Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland

<sup>4</sup>Center for Experimental Medicine, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Division of Immunology, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Health Sciences Faculty, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

<sup>6</sup>National Health Laboratory Service, Cape Town, South Africa

**Keywords**

Host response, IL-1 $\beta$ /IL-1 $\alpha$ , *M. bovis* infection, *M. tuberculosis*, TNF

**Correspondence**

Valerie F. J. Quesniaux, INEM UMR7355, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orleans, France.

Tel: +33-2-38-25-54-39;

Fax: +33-2-38-25-79-79;

E-mail: quesniaux@cnrs-orleans.fr

**Funding information**

CNRS through International Associated Laboratory "TB Immunity" (LIA n8236) and Le Studium.

Received: 16 July 2013; Revised: 6 August 2013; Accepted: 21 August 2013

*Immunity, Inflammation and Disease* 2013; 1(1):47–62

doi: 10.1002/iid3.9

**Abstract**

TNF and IL-1 are major mediators involved in severe inflammatory diseases against which therapeutic neutralizing antibodies are developed. However, both TNF and IL-1 receptor pathways are essential for the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection, and it is critical to assess the respective role of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF. Using gene-targeted mice we show that absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recapitulates the uncontrolled *M. tuberculosis* infection with increased bacterial burden, exacerbated lung inflammation, high IFN $\gamma$ , reduced IL-23 p19 and rapid death seen in IL-1R1-deficient mice. However, presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  in single-deficient mice is sufficient to control acute *M. tuberculosis* infection, with restrained bacterial burden and lung pathology, in conditions where TNF deficient mice succumbed within 4 weeks with overwhelming infection. Systemic infection by attenuated *M. bovis* BCG was controlled in the absence of functional IL-1 pathway, but not in the absence of TNF. Therefore, although both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are required for a full host response to virulent *M. tuberculosis*, the presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allows some control of acute *M. tuberculosis* infection, and IL-1 pathway is dispensable for controlling *M. bovis* BCG acute infection. This is in sharp contrast with TNF, which is essential for host response to both attenuated and virulent mycobacteria and may have implications for anti-inflammatory therapy with IL-1 $\beta$  neutralizing antibodies.

**Introduction**

Tuberculosis (TB) is still a major health problem, with about one-third of the global population considered to be infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Only 5–10% of infected individuals develop an active disease, suggesting that the host immune system is usually efficiently dealing with the mycobacteria, although the infection is not cleared and can remain in a latent form for many years [1, 2]. Quantification of bacterial growth and death rates showed that *M. tuberculosis* replicates throughout the course of

chronic tuberculosis infection in mice and is restrained by the host immune system [3]. Thus, immunodepression of the host can favour a reactivation of latent tuberculosis infection. Neutralisation of TNF for the treatment of severe inflammatory diseases has been associated with reactivation of latent tuberculosis and increased susceptibility to primary tuberculosis infection [4–7], a risk that is still present when patients do not receive appropriate chemoprophylactic treatment [8]. Although inhibiting IL-1 represents an interesting alternative to TNF neutralisation in severe inflammatory diseases [9], IL-1/IL-1R1 pathway seems also



essential for the control of acute *M. tuberculosis* infection [10–16]. Indeed, coordinated innate and adaptive immune responses are required for efficient control of *M. tuberculosis* infection, including T cells, macrophages, and the expression of IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1, IL-12, IL-17A, nitric oxide (NO), reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates [17–21]. Isolated cases of pulmonary tuberculosis reactivation in patients treated with short-lived IL-1Ra were reported [22, 23]. At a time when antibodies neutralizing IL-1 or IL-1R with long biological half-life are being developed for clinical therapies [9, 24–26], it is essential to understand the relative contribution of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and to compare it to that of TNF, for the control of *M. tuberculosis* infection. Early studies showed the protective role of the IL-1 $\alpha/\beta$  pathway in *M. tuberculosis* infection using double deficient mice [12] or mice deficient for IL-1R1 [11, 13]. An association between IL-1 $\beta$  and the resistance to tuberculosis was inferred from human IL-1B gene polymorphism [27–29]. The role of IL-1 $\beta$  was shown again recently [15], although after immunisation with virus-like particles, neutralisation of IL-1 $\alpha$  rather than IL-1 $\beta$  increased mice susceptibility to *M. tuberculosis* [30]. The recent advances in deciphering the inflammasomes and the mechanisms of IL-1 $\alpha$  versus IL-1 $\beta$  maturation were calling for a reassessment of the respective role of IL-1 $\alpha$  versus IL-1 $\beta$ . Intriguingly, the main inflammasome pathways involved in IL-1 $\beta$  maturation seem dispensable for IL-1 $\beta$  maturation during *in vivo* *M. tuberculosis* infection, although they contribute *in vitro* [15, 31–34]. We were interested in determining the relative contribution of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the response to *M. tuberculosis*. An elegant study by Mayer-Barber [16] showed myeloid cell populations co-expressing both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  that are regulated by Type I and Type 2 interferons. However, cross-regulatory mechanisms for release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  have been reported, with mutual induction of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , leading to the reduction of IL-1 $\beta$  in the absence of IL-1 $\alpha$ , and reduction of IL-1 $\alpha$  secretion in the absence of IL-1 $\beta$  acting as a shuttle [35–37]. Further, IL-1 $\beta$  and downstream TNF production leading to caspase-dependent restriction of intracellular *M. tuberculosis* growth was recently shown in macrophages *in vitro* [38].

Here we address the relative contribution of IL-1 $\alpha$  versus IL-1 $\beta$  in the dramatic impairment of host response to acute *M. tuberculosis* infection seen in the absence of IL-1R1, and compare it to the well established susceptibility of TNF deficient mice [17, 18, 39–43], using mice deficient for different members of the IL-1/IL-1R1 family, or for TNF, side by side in an acute model of aerogenic *M. tuberculosis* infection. We confirm that both TNF and IL-1 pathways are required to control *M. tuberculosis* infection since absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recapitulated the dramatic defect seen in the absence of IL-1R1 or TNF. However, presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allows some control of acute *M. tuberculosis*

infection while double deficient mice succumb rapidly. Further, although TNF is essential for the early control of infection by either virulent or attenuated mycobacteria, IL-1 pathway is dispensable for controlling less virulent infection by *M. bovis* BCG.

## Results

### Cross-regulation of IL-1 $\alpha$ and IL-1 $\beta$ release by macrophages in response to mycobacteria

Since a mutual induction of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was reported after stimulation with LPS or turpentine [35], and IL-1 $\beta$  has been identified as a necessary shuttle for IL-1 $\alpha$  secretion after LPS stimulation [37], we first assessed the interdependence of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in response to mycobacteria *in vitro*. Bone marrow derived macrophages from mice deficient singly for IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , or for IL-1R1 were stimulated with *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* BCG *in vitro* and their ability to secrete IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , or TNF, determined. As expected, no IL-1 $\alpha$  was detected in the IL-1 $\alpha$  deficient mice (Fig. 1A) and no IL-1 $\beta$  was detected in the IL-1 $\beta$  deficient mice (Fig. 1B). The level of IL-1 $\alpha$  was partially reduced in IL-1 $\beta$  deficient macrophages stimulated with TLR4 agonist LPS, *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* BCG, although this did not reach statistical significance. Similarly, the level of IL-1 $\beta$  was slightly reduced in the IL-1 $\alpha$  deficient macrophages stimulated with LPS, *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* BCG. A mutual reduction of IL-1 $\alpha$  in the absence of IL-1 $\beta$  and, conversely, a reduction of IL-1 $\beta$  in the absence of IL-1 $\alpha$ , were also seen with stimuli triggering different inflammasome pathways such as uric acid crystals (Ref. [36] and unpublished data). Such interdependence of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release could be due to indirect IL-1 amplification loops, or to the requirement for IL-1 $\beta$  shuttle effect. However, the absence of functional IL-1R1 had little effect on the release of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  (Fig. 1A and B), pointing against an IL-1/IL-1R1 mediated indirect amplification loop. TNF release induced by mycobacteria was independent of the IL-1 $\alpha/\beta$ /IL-1R1 axis *in vitro* (Fig. 1C), as expected [10–16]. Conversely, the release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in response to mycobacteria was not affected in TNF deficient macrophages (data not shown). Thus, there was some interdependence of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release after macrophage stimulation with TLR agonists or mycobacteria, which did not affect TNF release.

### Lethal *M. tuberculosis* infection in the absence of both IL-1 $\alpha$ and IL-1 $\beta$ , or TNF pathways

We showed earlier that IL-1R1 deficient mice are extremely sensitive to virulent *M. tuberculosis* H37Rv infection, similar to TNF or MyD88 deficient mice [13, 44], and we next wanted to assess the relative contribution of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$

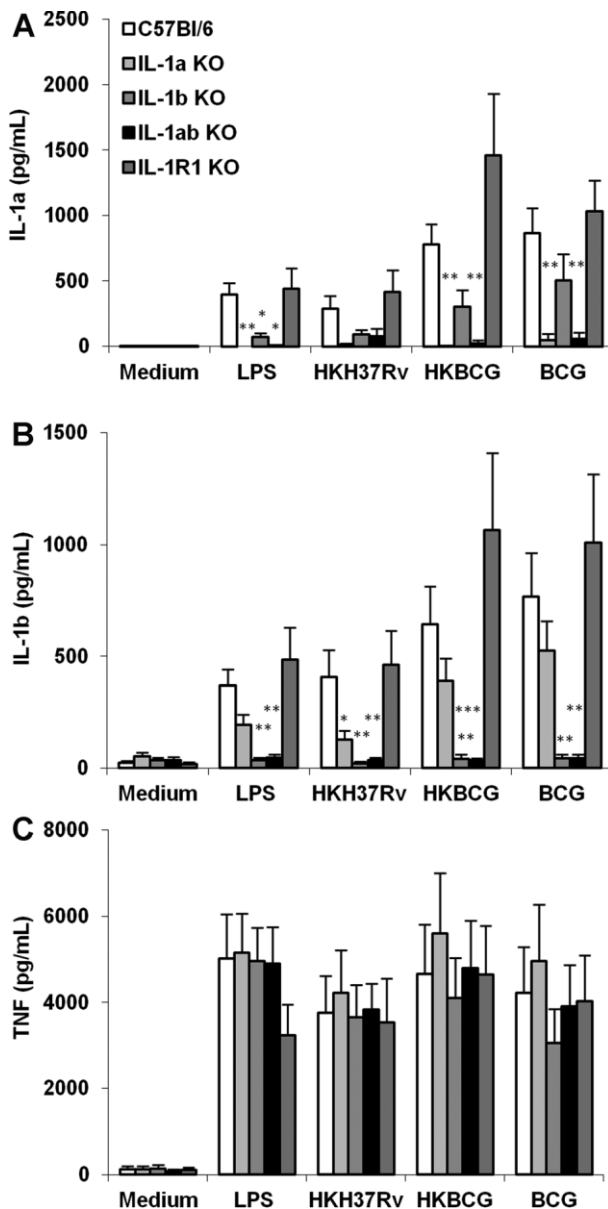


Figure 1. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  cross-regulation in IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  deficient macrophages in response to mycobacteria. BM derived macrophages prepared from IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  deficient, IL-1R1 deficient and wild-type mice were incubated with LPS (100 ng/ml), heat-killed *M. tuberculosis* H37Rv (HKH37Rv) or *M. bovis* BCG (HKBCG), or live BCG (BCG), at a MOI of 2. After 24 h, the production of IL-1 $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) or TNF (C) was determined in the supernatants by ELISA. Data are mean  $\pm$  SEM, with  $n = 7$  mice per group from three independent experiments (\* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001, for each group as compared to the respective wild-type controls).

to the IL-1R1 mediated immune response to acute *M. tuberculosis* infection. Indeed, among the early studies addressing the role of IL-1 in host response to *M. tuberculosis* [10–12], a direct comparison of mice deficient in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , IL-1R1

or TNF was missing. Mayer-Barber et al. [16] recently reported a rapid mortality of mice singly or double deficient for IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$ , within 30–40 days post *M. tuberculosis* infection, although after low dose infection IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  single deficient mice succumbed 3–5 months after IL-1R1-deficient mice. Here, mice singly deficient for IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  survived the acute phase of infection without bodyweight loss, while mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , similar to IL-1R1 deficient mice, rapidly lost weight and succumbed within 5 weeks of infection with *M. tuberculosis* H37Rv, that is, 1 week after TNF deficient mice (Fig. 2A,B). However, mice singly deficient for either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  survived for the duration of the acute *M. tuberculosis* infection study (3 months) without clinical symptoms of infection (Fig. 2A–C). Therefore, presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allows some control of acute *M. tuberculosis* infection.

#### Exacerbated pulmonary inflammation after *M. tuberculosis* infection in the absence of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ or IL-1R1, alike in the absence of TNF

We and others reported earlier a dramatic increase in lung inflammation in IL-1R1, MyD88 or TNF deficient mice early after *M. tuberculosis* infection [10, 11, 13, 43, 44]. Since there seems to be little involvement of the major NLRP3 inflammasome pathway leading to IL-1 $\beta$  maturation [31, 32], we wished to address further the relative contribution of IL-1 $\alpha$  versus IL-1 $\beta$  in the lung inflammation induced during acute *M. tuberculosis* infection. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  double deficient mice exhibited strongly increased lung weights, an indicator of lung inflammation, 5 weeks post-infection, as did IL-1R1 deficient mice (Fig. 2E) and TNF KO mice which succumbed at 4 weeks (Fig. 2D). Mice deficient only for IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  had less pronounced pulmonary inflammation on day 35 post-infection (Fig. 2E). However, IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  deficient mice survived to a more chronic infection and lung inflammation was gradually increased in these animals 2 or 3 months post-infection (Fig. 2F and G). Therefore it seemed that expression of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  helped controlling acute lung inflammation induced by *M. tuberculosis* infection. As this may be a consequence of a better contained infection, we next determined the bacterial loads in these animals. Mice double deficient for IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  could not control the infection, similar to IL-1R1 deficient mice on day 35 post-infection (Fig. 2I), although bacterial burdens were not as high as those reached in TNF KO mice which succumbed at 4 weeks (Fig. 2H). Deficiency in either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allowed some bacterial growth restriction on day 35 post-infection (Fig. 2D), and there was a limited increase in bacterial load at 2–3 months post-infection (Fig. 2J and K). Therefore, mice double deficient in IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  develop a rapid, exacerbated lung inflammation which may be the result

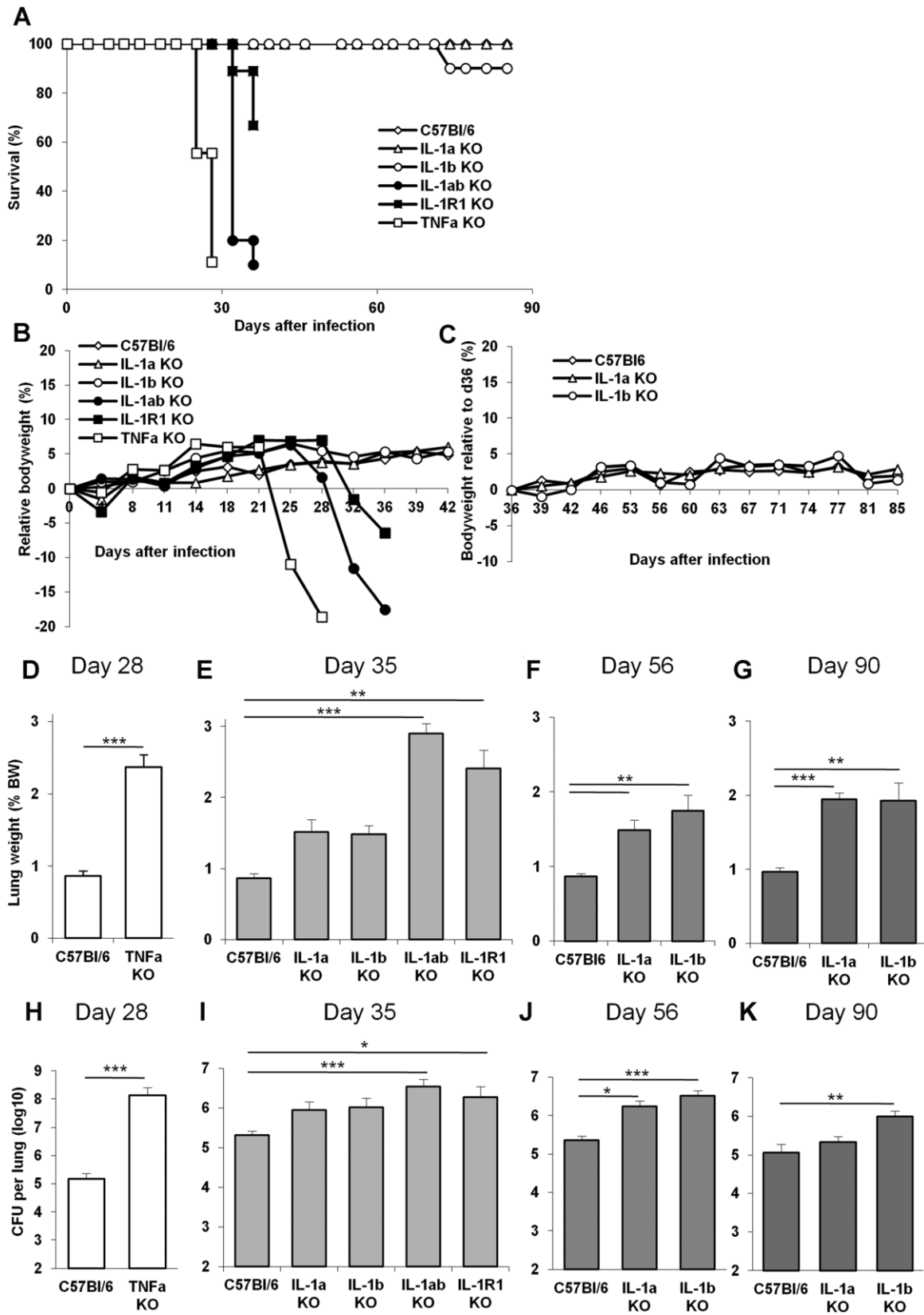


Figure 2.

of uncontrolled bacterial infection, as seen in IL-1R1 or TNF deficient mice, but expression of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  was sufficient to contribute to the host control of bacterial growth and lung inflammation during acute *M. tuberculosis* infection.

**Presence of either IL-1 $\beta$  or IL-1 $\alpha$  prevents the acute necrotic pneumonia seen after *M. tuberculosis* infection in IL-1 pathway defective mice, but do not compensate for lack of TNF**

The establishment of well-defined granuloma, result of a structured cell mediated immune response, is thought to be crucial for inhibiting mycobacteria growth. In view of the increased lung weight indicative of a strong local inflammation in mice lacking IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$ , and of the defective granuloma formation reported in IL-1R1 deficient mice [13], we next addressed the relative contribution of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in granuloma formation upon *M. tuberculosis* infection. Macroscopically, the lungs of mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  displayed pleural adhesions, large confluent nodules, similar to IL-1R1 or TNF deficient mice (Fig. 3A). Microscopic investigation of the lungs of IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  deficient mice revealed severe inflammation with important reduction of ventilated alveolar spaces, massive mononuclear cell and neutrophil infiltrations with extensive confluent necrosis and oedema, in the absence of proper granuloma formation at 35 days (Fig. 3B) and abundant mycobacteria within macrophages and in the extra-cellular space (Fig. 3C). The lung lesions observed in the absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were similar to those seen in mice deficient for IL-1R1 or TNF, although confluent necrosis was more pronounced in the absence of TNF 4 weeks post-infection (Fig. 3B). A strong iNOS staining confined to macrophages residing in well defined granuloma was seen in wild-type mice on day 35 post-infection (Fig. S1). Pulmonary iNOS expression was attenuated in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  single deficient mice, while in IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  double deficient mice and IL-1R1 deficient mice there was a diffuse expression through the inflamed lung at that stage, without strong cell-associated staining as in wild-type mice. Interestingly, mice singly deficient for

IL-1 $\alpha$  or for IL-1 $\beta$  developed some granuloma with limited oedema, no necrosis and free alveolar space, thus a much less severe lung pathology than that seen in the absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  or of IL-1R1 at 5 weeks post-infection. At 2–3 months post-infection lung pathology in mice deficient for IL-1 $\alpha$  or for IL-1 $\beta$  progressed with reduced free alveolar space, increased inflammatory cell infiltration, acid-fast bacilli abundance and oedema, as compared to wild-type mice, but still little necrosis (Fig. 4A and B). Thus, absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recapitulates the acute necrotic pneumonia resulting from defective IL-1R1 or TNF pathways, while the sole presence of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  limits but does not fully prevent lung infiltration of inflammatory cells, oedema and necrosis after acute *M. tuberculosis* infection.

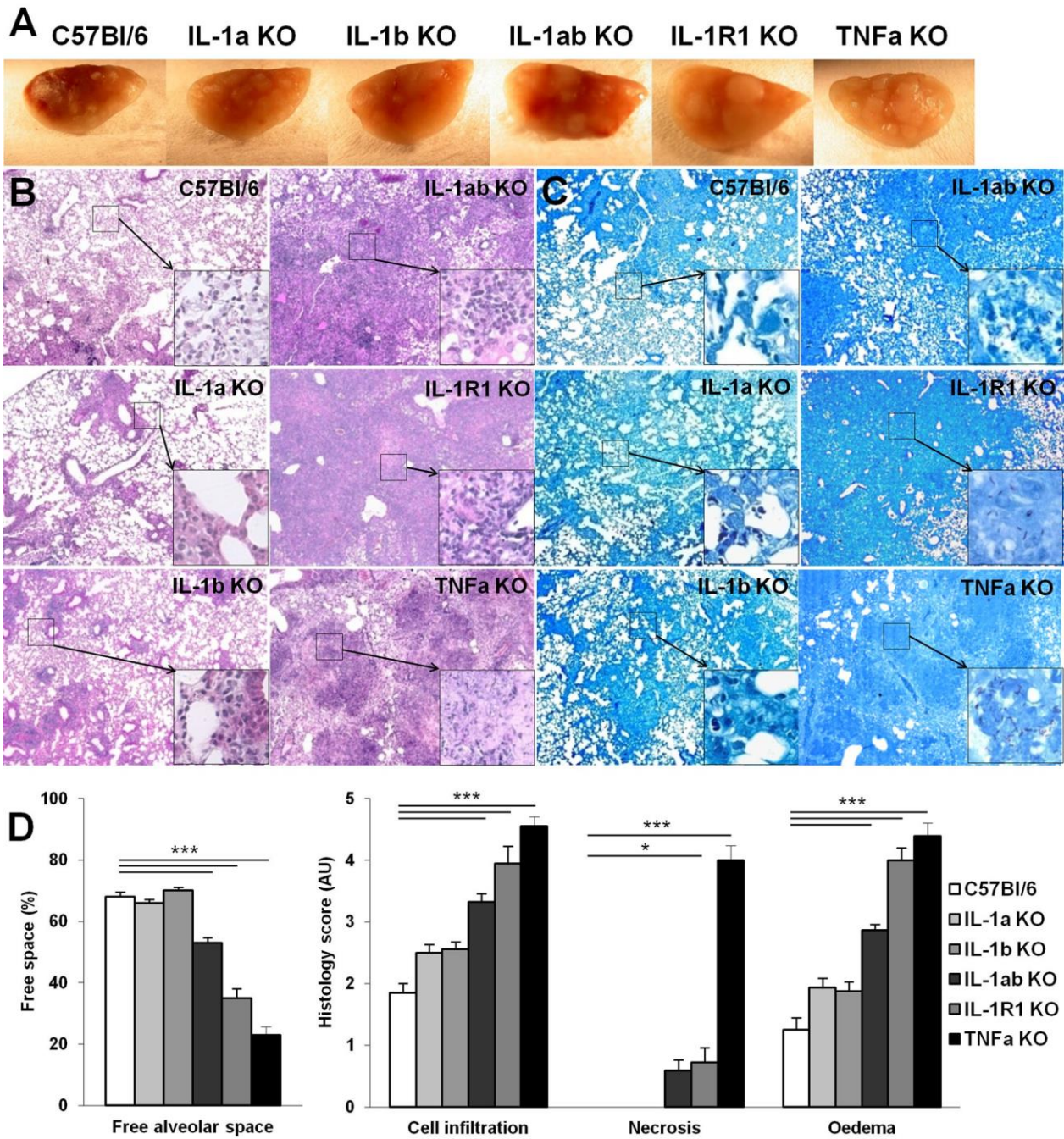
**Regulation of pulmonary cytokine expression by IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  pathway after *M. tuberculosis* infection**

We next assessed the expression of cytokines involved in innate and adaptive immune responses in these mice. Indeed, the uncontrolled bacilli growth and pulmonary inflammation in mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was reminiscent of the high infectious burden in *M. tuberculosis* infected IL-1R1 or MyD88 deficient mice, which was accompanied by increased macrophage and neutrophil recruitment, but a normal adaptive response in terms of recruitment, activation and priming of effector T cells [13, 44]. Further, in view of the persistent lung inflammation in single IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  deficient mice during chronic *M. tuberculosis* infection, we asked how the absence of IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  modulated the immune response in the lung after 1–3 months of infection (Fig. 5). Lung IFN $\gamma$  levels were highly elevated in mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  or for IL-1R1 at 5 weeks after *M. tuberculosis* infection (Fig. 5A), reminiscent of TNF deficient mice at 4 weeks, when they succumb to infection. Interestingly, IFN $\gamma$  levels were also highly elevated in IL-1 $\beta$  deficient mice, but less so in IL-1 $\alpha$  deficient mice, indicating that presence of IL-1 $\beta$  sufficed to control IFN $\gamma$  over-expression. While IL-12/23 p40 levels were reduced in mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and



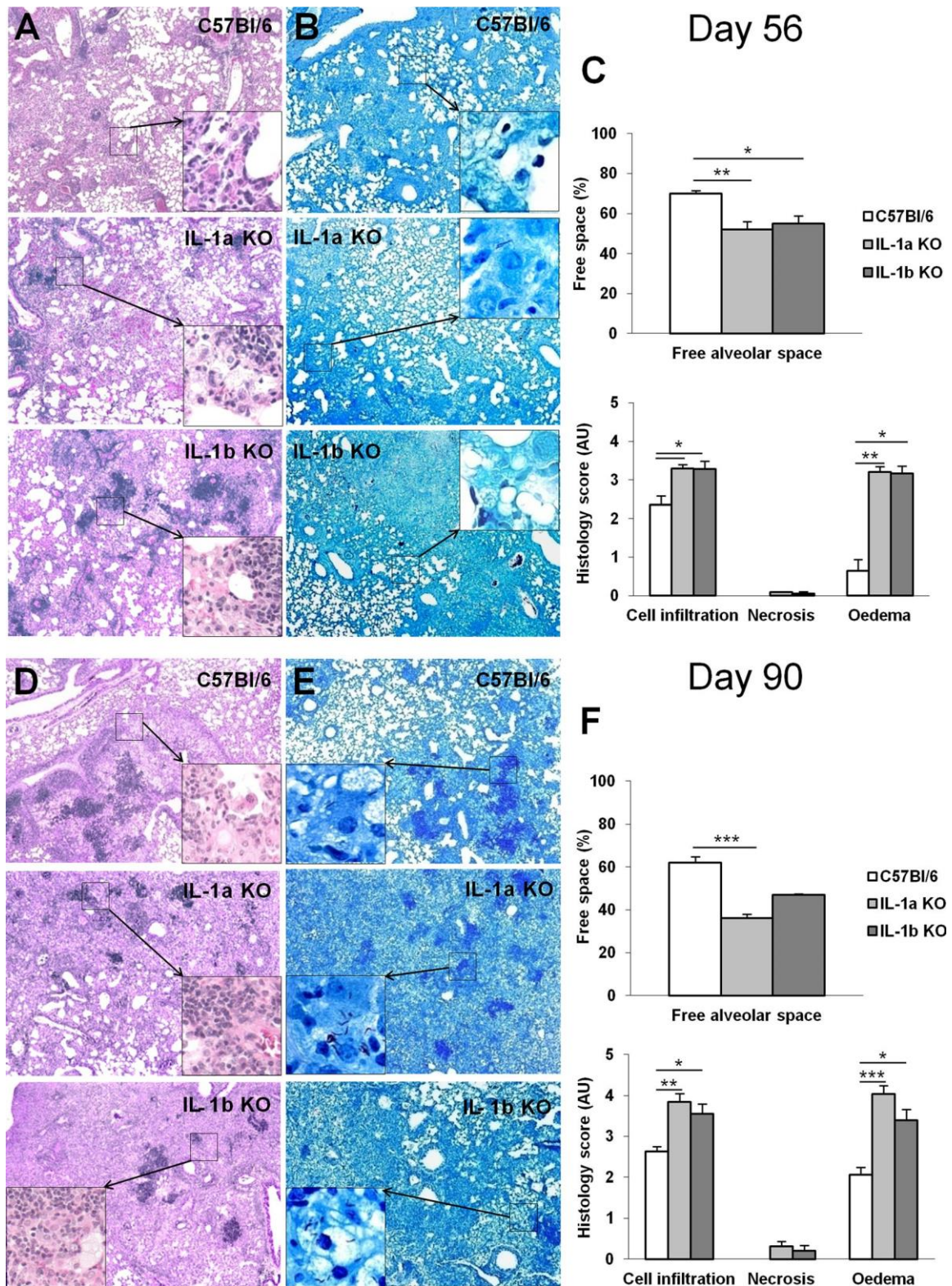
**Figure 2.** Lethal *M. tuberculosis* infection in IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  double deficient mice is partially controlled in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  single deficient mice. A–C: Mice deficient for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 or TNF and wild-type C57Bl/6 mice were exposed to *M. tuberculosis* H37Rv (1600  $\pm$  300 CFU/mouse i.n.) and monitored for survival (A), bodyweight during acute (B) and more chronic (C) infection. Data are from two representative experiments out of three independent experiments (A:  $n = 10$ –13 mice/group; B:  $n = 9$ –11 mice/group for TNF, IL-1R1 and IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  KO mice, 24 for IL-1 $\alpha$  and 20 for IL-1 $\beta$  KO mice/group; C:  $n = 15$ –23 up to day 55 and 8–12 thereafter). D–G: Lung weight of highly sensitive TNF deficient mice is shown on day 28 post-infection when lung inflammation is exacerbated (D), and on day 35 for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 deficient or wild-type mice (E). Lung weight in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  deficient mice surviving the infection on day 56 (F) and day 90 (G) post-infection. H–K: Pulmonary bacterial loads were measured on day 28 for highly sensitive TNF deficient mice (H) and on day 35 post-infection for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 deficient or wild-type mice (I). Lung bacterial loads in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  deficient mice were further assessed on day 56 (J) and day 90 (K) post-infection. Results in D–K are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 8$ –13 mice pooled from two representative experiments out of four independent experiments ( $^*P < 0.05$ ;  $^{**}P < 0.01$ ;  $^{***}P < 0.001$ , as compared to wild-type control).

Day 35



**Figure 3.** Presence of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  prevents acute necrotic pneumonia in response to *M. tuberculosis* infection. Mice deficient for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 or TNF and wild-type C57Bl/6 mice were exposed to *M. tuberculosis* H37Rv as in Figure 2 and macroscopic lung pathology assessed on day 35. Macroscopically, lungs of IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  deficient mice showed large nodules similar to IL-1R1 deficient lungs (A). Lungs of TNF deficient mice with large, confluent nodules on day 28 post-infection are included for comparison. Microscopic examination showing extensive inflammation and necrosis in infected IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , and in IL-1R1 deficient lungs (B; Hematoxylin and Eosin, magnification 50x for low power and 200x for details) with abundant mycobacteria in the extracellular space (C; Ziehl-Neelsen, magnification 50x for low power and 1000x for details). Bar graphs (D) summarise free alveolar space and scores of cell infiltration, necrosis and oedema at this time point ( $n = 8-11$  mice per group from two independent experiments; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , as compared to wild-type control).





**Figure 4.** Progressive pneumonia after 2–3 months *M. tuberculosis* infection in the absence of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . Mice deficient for IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  and wild-type C57Bl/6 mice exposed to *M. tuberculosis* H37Rv as in Figure 2 were followed for 56 (A–C) and 90 (D–F) days and lung pathology assessed. Microscopic examination showing progressive inflammation in infected IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  deficient lungs (A, D; Hematoxylin and Eosin, magnification 50x for low power and 200x for details) with abundant mycobacteria in the extracellular space (B, E; Ziehl–Neelsen, magnification 50x for low power and 1000x for details). Bar graphs (C, F) summarise free alveolar space and scores of cell infiltration, necrosis, and oedema at these time points ( $n=8–11$  mice per group from two independent experiments; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , as compared to wild-type control).

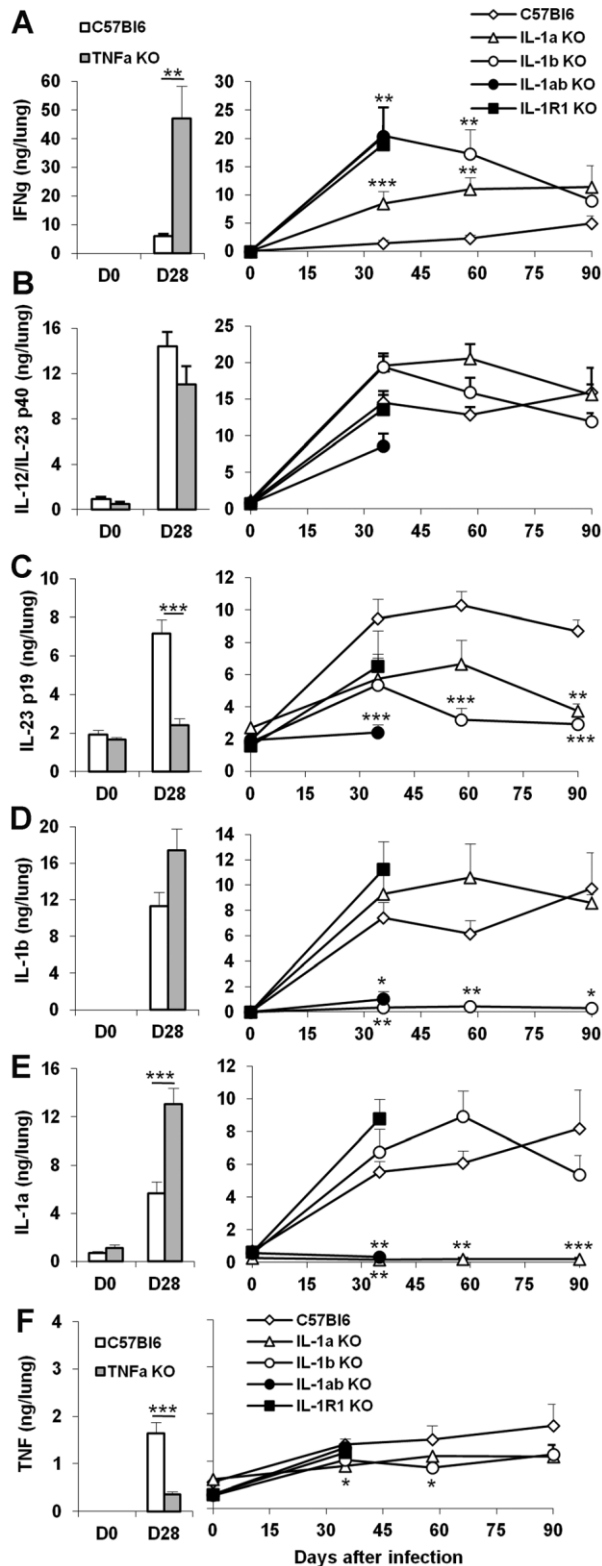


Figure 5.

IL-1 $\beta$  (Fig. 5B), they were essentially normal in IL-1R1 deficient mice or TNF deficient mice and slightly elevated in mice deficient for either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , although this did not reach statistical significance. IL-23 p19 pulmonary levels were reduced in the highly susceptible, TNF-deficient mice at 4 weeks of *M. tuberculosis* infection and IL-23 p19 levels were also clearly lower than wild-type controls in mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Fig. 5C), and partially decreased in IL-1R1 deficient mice or mice deficient for either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , 5 weeks after *M. tuberculosis* infection. The levels of IL-17A were also reduced in mice deficient for both IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  or IL-1R1 at 5 weeks post-infection and in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  single deficient mice at 8 weeks post-infection (Fig. S2). IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  gene deficient mice did not express IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  as expected, while IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  pulmonary levels were elevated in TNF-deficient mice at 4 weeks of *M. tuberculosis* infection, and were also elevated in IL-1R1 deficient mice as compared to wild-type control 5 weeks post infection. IL-1 $\alpha$  levels were slightly increased in IL-1 $\beta$  deficient mice, and conversely, IL-1 $\beta$  levels were slightly increased in IL-1 $\alpha$  deficient mice during the first 2 months of infection (Fig. 5D and E). TNF pulmonary levels were rather modest, as shown previously [44] and were partially reduced in the absence of IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$ , or IL-1R1 (Fig. 5F). Therefore, complete absence of IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  led to increased IFN $\gamma$  pulmonary levels, but decreased IL-12/23 p40 and IL-23 p19 expression, which were partially corrected by the presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . In line with TNF being downstream of IL-1 $\beta$  for restricting *M. tuberculosis* growth in macrophages *in vitro* [38], absence of IL-1 pathway impacted on partial reduction of TNF pulmonary levels after *in vivo* *M. tuberculosis* infection, while there was no reduction of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  lung content in the absence of TNF.

### IL-1 pathway is dispensable for controlling attenuated *M. bovis* BCG infection, while TNF is essential

Mice deficient for TNF are highly susceptible not only to virulent *M. tuberculosis*, but also to attenuated *M. bovis* BCG



**Figure 5.** Cytokine pulmonary levels in *M. tuberculosis* infected TNF or IL-1 deficient mice. Cytokine concentrations were determined in lung homogenates of TNF deficient and wild-type mice 28 days after *M. tuberculosis* infection (left panels). Cytokine lung levels of mice deficient for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , or IL-1R1 and wild-type mice are shown at 0, 35, 56, and 90 days after *M. tuberculosis* infection (right panels). IFN $\gamma$  (A), IL-12/IL-23 p40 (B), IL-23 p19 (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-1 $\alpha$  (E) and TNF $\alpha$  (F) were quantified by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of cytokine levels reported to whole lungs, from  $n = 8-11$  mice per group from two independent experiments (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ , as compared to wild-type control at the respective time point).



(Refs. [39 – 41, 45, 46, 47] and unpublished data). In contrast, mice deficient for MyD88, an essential adaptor of IL-1R1 pathway, were reported as highly susceptible to virulent *M. tuberculosis* infection by us and others [13, 48, 49], while they controlled chronic *M. bovis* BCG infection [50] and were found less susceptible to *M. tuberculosis* by other authors [51]. Our data indicated that although IL-1R1 pathway is essential for controlling acute infection by virulent *M. tuberculosis*, presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allowed to survive acute *M. tuberculosis* infection. In previous reports, deficiency in IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  led to either early death after *M. tuberculosis* infection or survival up to 3 – 6 months at lower dose infection [16]. We next asked how the complete absence of IL-1 pathway affects the control of less virulent mycobacteria.

Mice deficient for IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 or TNF were infected with *M. bovis* BCG (Fig. 6). TNF deficient mice rapidly lost weight and succumbed by 6 weeks of infection (Fig. 6A and B) with highly inflamed lung, spleen and liver, while IL-1R1 and IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  deficient mice survived systemic *M. bovis* BCG infection with lung, spleen and liver weight similar to wild-type mice at 6 and 11 weeks (Fig. 6C and D). Histologically, liver and lung inflammation were exacerbated in TNF deficient mice, with numerous and large, confluent granulomatous structures containing massive cell infiltrates, while the pathology was much less severe in IL-1R1 or IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  deficient mice (Fig. 6E and F). Therefore, the IL-1 pathway which is essential for controlling virulent *M. tuberculosis* infection is dispensable for the early control of attenuated *M. bovis* BCG infection, in sharp contrast with TNF which is essential for both responses.

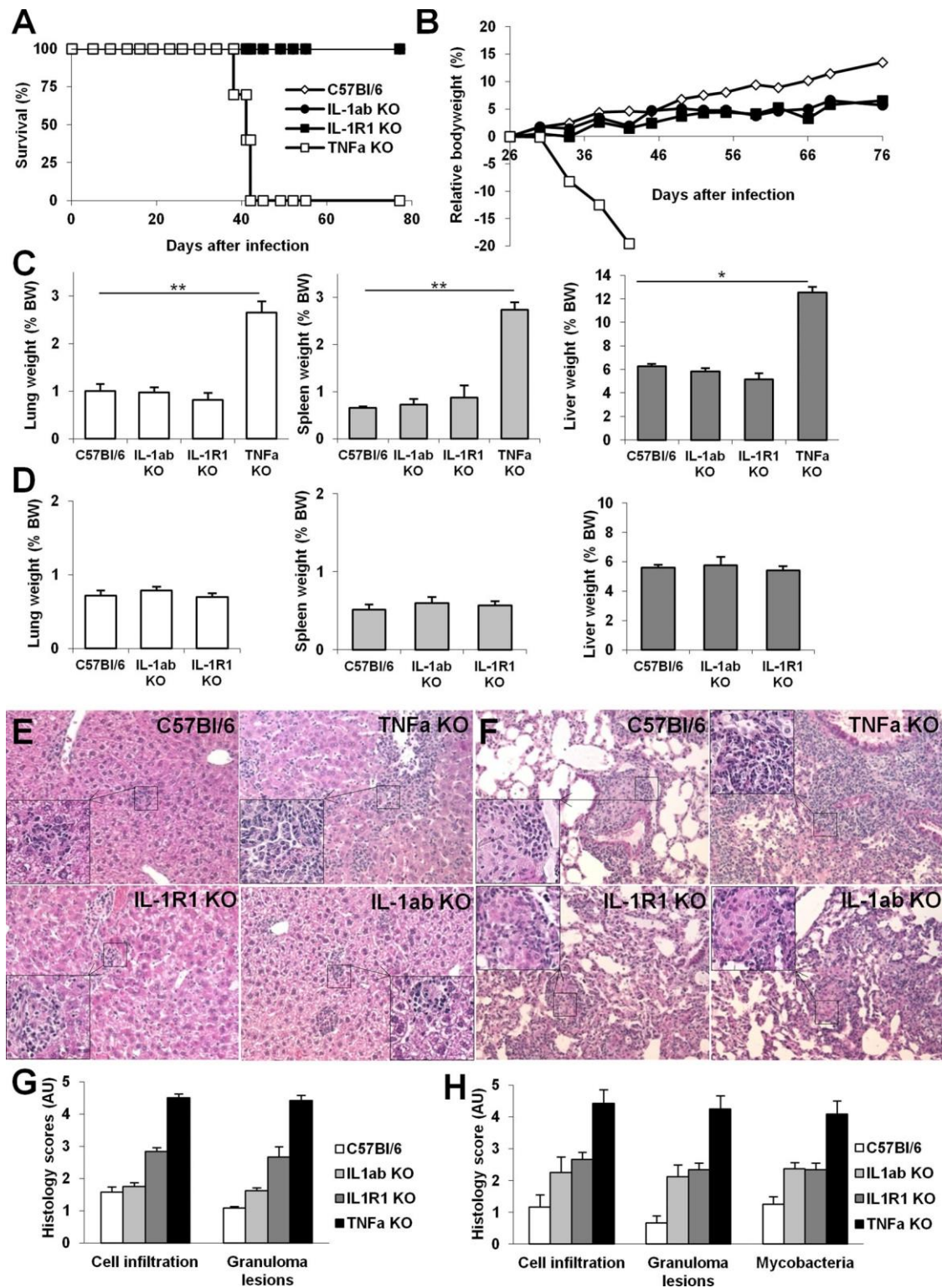
## Discussion

Therapeutical neutralisation of TNF in the treatment of severe inflammatory diseases has been associated with reactivation of latent tuberculosis and increased susceptibility to primary tuberculosis infection [4 – 7], and inhibiting IL-1 might represent an interesting alternative [9]. Indeed IL-1, another potent mediator of inflammation involved in the pathogenesis of severe inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, has been neutralised using the IL-1R antagonist Anakinra with good safety record [52], although occasional tuberculosis reactivation have been reported [22, 23]. Because of its short half-life, Anakinra needs to be administered daily and it is likely that the neutralisation of IL-1R is not complete, allowing some control of infection. However, new generation antibodies in development for autoimmune or auto-inflammatory disease indications, have much longer half-life, typically 2 – 3 weeks, and may fully neutralise IL-1 $\beta$  [24 – 26] or IL-1R1 [9]. We and others showed in mice that the IL-1R pathway is essential for controlling acute

tuberculosis infection [10, 11, 13, 14, 16]. Therefore, efficient and persistent IL-1 neutralisation with long-lasting anti-IL-1 antibodies may result in reduced host resistance and flare-up of *M. tuberculosis* infection. Since IL-1 $\alpha$  might compensate for IL-1 $\beta$  in host response to *M. tuberculosis*, it is critical to determine the respective role and potential redundancy of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in this response.

The relative contribution of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the control of *M. tuberculosis* infection is however still unset. Indeed, a role for IL-1 $\beta$  in tuberculosis was inferred from human IL-1B gene polymorphism [27 – 29] and experimental studies in IL-1 $\beta$  deficient mice [15], although specific immunisation with virus-like particles leading to neutralisation of IL-1 $\alpha$  was shown to increase mice susceptibility to *M. tuberculosis*, while neutralisation of IL-1 $\beta$  did not [30]. Mayer-Barber *et al.* [16] showed recently that both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are critically required for host resistance and that absence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  severely compromised host response to *M. tuberculosis*, although IL-1 single deficient mice succumb 3 – 5 months after IL-1R1 deficient mice at low dose infection. Here, we further analysed the respective roles of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as compared with TNF in host response to infection by virulent *M. tuberculosis* but also attenuated *M. bovis* BCG. We show that absence of both IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  recapitulated the overwhelming infection and acute necrotic pneumonia seen in IL-1R1 deficient mice, while presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allowed to control acute *M. tuberculosis* infection and pulmonary inflammation, with limited lung infiltration of inflammatory cells, oedema and necrosis. This may be attributed to a purely quantitative effect, or to non-redundant functions of the individual cytokines that have additive or synergistic effects. However, the compensation of IL-1 $\alpha$  by IL-1 $\beta$ , and conversely, was not complete since absence of one IL-1 led to development of increased pathology as compared to wild-type mice, even in the presence of the other IL-1. We thus propose that the presence of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  is sufficient to trigger IL-1R pathway, an essential component in the development of innate response to acute *M. tuberculosis* infection, but may not be sufficient for full control of the infection.

Inter-dependence of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression and/or release was long recognised [35], and recently ascribed to IL-1 $\beta$  acting as a shuttle for secretion of mature IL-1 $\alpha$  [37]. Here, we show that bone marrow-derived macrophages deficient for IL-1 $\alpha$  are somewhat defective in IL-1 $\beta$  production *in vitro*, and conversely, that macrophages deficient for IL-1 $\alpha$  exhibit a reduction in IL-1 $\beta$  release in response to mycobacterial antigen stimulation. This reduction was less seen after infection with live *M. bovis* BCG. A difference in the TLR usage of heat-killed versus viable *M. bovis* BCG was reported earlier [53], indicating that live mycobacteria activate other pathways [54]. An indirect IL-1 amplification loop is unlikely since absence of functional



**Figure 6.** TNF is crucial, but IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  pathway is dispensable for controlling *M. bovis* BCG infection. Mice deficient for IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 or TNF and wild-type C57Bl/6 mice were infected with *M. bovis* BCG ( $10^6$  CFU/mouse, iv) and monitored for survival (A) and bodyweight (B). Lung, spleen and liver weights, surrogate markers of inflammation, were highly increased in sensitive TNF deficient mice, as compared to wild-type mice or mice deficient for IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  or IL-1R1 at 6 weeks (C) or 11 weeks (D) post-infection. Data are pooled from two independent experiments with  $n = 10-15$  mice/group up to day 41 and  $n = 7-8$  mice/group thereafter ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ , as compared to wild-type control). Microscopic examination of liver (E) and lung (F) at 6 weeks showed extensive inflammatory cell infiltration, granulomatous lesions and oedema in TNF deficient mice while this was much less pronounced in mice deficient for IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , or IL-1R1 (Hematoxylin and Eosin, magnification 50x for low power and 200x for details). Bar graphs (G, H) summarise scores of cell infiltration, extent of granulomatous lesions, and presence of visible mycobacteria in liver (G) and lung (H), respectively ( $n = 3-6$  mice per group from one experiment representative of two independent experiments).

IL-1R1 did not hamper the release of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . The inter-dependence of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression or release is more difficult to assess *in vivo*, where cytokine levels are the results of multiple regulations and indirect effector mechanisms. Coproduction of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  at the single cell level was recently documented in distinct myeloid cell populations in the lung of *M. tuberculosis* infected mice [16]. Here, we report slightly increased pulmonary IL-1 $\alpha$  levels in IL-1 $\beta$  deficient mice, and conversely, slightly increased pulmonary IL-1 $\beta$  levels in IL-1 $\alpha$  deficient mice during acute

*M. tuberculosis* infection. This was in line with increased concentrations of IL-1 $\alpha$  reported in BAL and lungs of IL-1 $\beta$  deficient mice [15]. In a more recent study, BAL IL-1 $\alpha$  levels seemed unaffected in IL-1 $\beta$  deficient mice, and conversely, BAL IL-1 $\beta$  levels were unaffected in IL-1 $\alpha$  deficient mice 4 weeks after *M. tuberculosis* infection, while Ly6G<sup>neg</sup>CD11b<sup>pos</sup> myeloid cells producing IL-1 $\alpha$  and/or IL-1 $\beta$  were halved in these mice [16]. We show that absence of both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  led to increased pulmonary levels of IFN $\gamma$  as reported earlier for IL-1R1-deficient mice [13], in line with the increased IFN $\gamma$  levels reported in the BAL of these mice 4 weeks post-*M. tuberculosis* infection [16]. The increased IFN $\gamma$  levels, also seen in the single absence of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , or of TNF, might be a consequence of the failure of the innate immune response to control the high bacilli burden seen in these mice after acute *M. tuberculosis* infection and were associated with a strong lung inflammation. Indeed, in a model of *M. tuberculosis* infection controlling bacterial burden with streptomycin-dependent strain 18b, neutrophil recruitment to the lung was reduced in IL-1R1 deficient mice [21]. However, not all pro-inflammatory, Th1 promoting cytokines were upregulated in the absence of IL-1 or TNF pathways in our model, since there was little effect on IL-12/23 p40 and rather a decrease in IL-23 p19 expression. The slightly increased IL-1 $\beta$  levels in single IL-1 $\alpha$  deficient mice were associated with a partial correction of IFN $\gamma$  and IL-23 p19 levels during acute *M. tuberculosis* infection. Further, IL-17 was strongly reduced in the lung of *M. tuberculosis* infected IL-1 deficient mice, which may contribute to the enhanced susceptibility of these mice.

The high bacterial burden associated with acute *M. tuberculosis* infection in mice lacking either TNF or functional IL-1 pathway may provide abundant PAMPs to trigger cytokine release directly. We showed earlier that mice deficient for MyD88 expressed high levels of IL-1 $\beta$ , TNF, IFN $\gamma$  and chemokines MCP1 and MIP1 $\alpha$  5 weeks after *M. tuberculosis* infection [44], indicating that TLR, MyD88-dependent pathways were not essential for this strong release of cytokines and chemokines, as confirmed in [15]. Specific PAMPs associated with live bacteria, vitaPAMPs, that are not activating TLR2 and TLR4 but signal through TRIF [54], might play a role during acute, exacerbated *M. tuberculosis* infection. However, high levels of IL-1 $\beta$  and TNF were

reported in the BAL and lung of TRIF/MyD88 double deficient mice [15], indicating that neither classical TLR agonists, nor TRIF-dependent vitaPAMPs are essential for the increase in cytokine release seen during acute *M. tuberculosis* infection. A high redundancy between different classes of host pattern recognition receptors susceptible of interacting with mycobacterial motives is likely, including Dectin-1 which induces caspase-1 or non-canonical caspase-8 in response to *M. tuberculosis* or *M. bovis* BCG [55, 56]. Clearly, DAMPs, danger associated molecular patterns, released by dying or necrotic cells could contribute to entertain the inflammatory context in highly infected lungs. However, DAMPs activated inflammasomes do not seem essential for *in vivo* host response to *M. tuberculosis*, since mice deficient for NLRP3, ASC or caspase-1 [15, 31–34], or for NLRP2, AIM2 or purinergic receptor P2X7 control acute *M. tuberculosis* infection (data not shown). Therefore, while the control by NO of *M. tuberculosis* induced immunopathology and IL-1 $\beta$  production was recently ascribed to NLRP3 thiol nitrosylation and inhibition of NLRP3 inflammasome assembly by NO [21], IL-1 $\beta$  maturation during *M. tuberculosis* infection seems largely independent of the classical inflammasomes. Here, we show a reduced expression of iNOS in the lungs of IL-1 defective mice 5 weeks post-infection, which may contribute to their susceptibility to *M. tuberculosis* infection. Molecular mechanisms by which IL-1 $\beta$  directly activates host resistance to *M. tuberculosis* were recently addressed in macrophages *in vitro* [38]. Similar to Tim3, the ligand of Galectin-9 expressed on *M. tuberculosis* infected macrophages, IL-1 $\beta$  inhibited the replication of *M. tuberculosis* in infected macrophages. IL-1 $\beta$  increased TNF release and TNFR1 cell surface expression in *M. tuberculosis* infected macrophages, which led to caspase-3 activation, apoptosis, and restriction of *M. tuberculosis* growth by efferocytosis. In contrast, IL-1 $\alpha$  was less effective. IL-1 $\beta$  autocrine action on macrophages is however not believed to be the sole source of TNF *in vivo*, and the antimicrobial effect of TNF was independent of IL-1 $\beta$  [38]. Here, although absence of functional IL-1 pathway had little effect on TNF response to mycobacteria in macrophages *in vitro*, the pulmonary TNF levels were partially reduced *in vivo* in *M. tuberculosis* infected IL-1 deficient mice.

Various results on the importance of IL-1 pathways for controlling mycobacterial infections were obtained using mice with defective IL-1-related genes [10–13]. We hypothesised that the requirement for IL-1 responses depends on the virulence of the mycobacteria. Indeed, although MyD88 deficient mice were reported as highly susceptible to virulent *M. tuberculosis* infection [13, 48, 49], they control chronic *M. bovis* BCG infection [50], and were found less susceptible to *M. tuberculosis* by others using a different *M. tuberculosis* strain [51]. This was in contrast to TNF deficient mice, which are highly susceptible not only

to virulent *M. tuberculosis*, but also to attenuated *M. bovis* BCG [39–41, 45, 46, 47]. Different regulation of caspase-1 dependent IL-1 $\beta$  release by type I IFNs was reported in response to *M. tuberculosis* or *M. bovis* BCG infection in human macrophages [57]. We thus assessed how mice deficient for IL-1R1, or IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , could control attenuated mycobacterial infection. We showed that absence of IL-1R1, or IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , did not compromise the control of a *M. bovis* BCG infection that was fatal for TNF deficient mice within 4–5 weeks. The different results obtained on the importance of IL-1 pathways for controlling mycobacterial infections might thus be at least in part explained by difference in virulence of the mycobacteria strains used. Therefore, the IL-1 pathway is dispensable for the immediate, innate response to control *M. bovis* BCG infection while TNF is essential for the early control of mycobacterial infection even by attenuated *M. bovis* BCG. This is in line with the fact that IL-1 $\beta$  requires TNF pathway to inhibit *M. tuberculosis* replication in infected macrophages, while TNF antimicrobial effects are independent of IL-1 $\beta$  [38]. This may also be related to the multifold source of TNF, the TNF of macrophage/neutrophil origin being crucial for the immediate response, while T-cell derived TNF is important at later stages of the infection [58]. Indeed, mice deficient for TNF expression in macrophages/neutrophils displayed early, transient susceptibility to *M. tuberculosis* but recruited activated TNF-producing T-cells and controlled chronic infection, whereas deficient TNF expression specifically in T-cells resulted in early control but enhanced susceptibility during chronic infection with increased pulmonary pathology, and TNF inactivation in both myeloid and T-cells rendered mice critically susceptible to infection, similar to TNF deficient mice [58]. We propose that TNF from innate, macrophage/neutrophil source is sufficient to keep an infection by attenuated *M. bovis* BCG under control until adaptive response with TNF from T cell origin comes in play. However, to control an acute infection by virulent *M. tuberculosis* the amplification loop provided by IL-1 $\beta$  through upregulation of TNF in infected macrophages *in vitro* [38] and here *in vivo*, seems to be necessary.

Thus, in contrast to TNF, which is essential for the early control of infection by either virulent or attenuated mycobacteria, IL-1 pathway is not central for controlling less virulent mycobacteria such as *M. bovis* BCG. Presence of either IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  allows some control of acute *M. tuberculosis* infection. For pharmacological blockade by long-lasting neutralizing monoclonal antibodies it might thus be preferable to target specifically IL-1 $\beta$ , or IL-1 $\alpha$ , rather than broadly neutralizing both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  or IL-1R itself, to retain some host immune control of *M. tuberculosis* infection.

## Materials and Methods

### Mice

Mice deficient for IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  [35], or both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [12], IL1-R1 [59], or TNF [60] were bred in the Transgenose Institute animal facility (CNRS UPS44, Orleans). All mice were backcrossed at least 7–10 times on C57BL/6 genetic background. For experiments, adult (8–12 weeks old) animals were kept in isolators in a biohazard animal unit. The infected mice were monitored regularly for clinical status and weighed twice weekly. All animal experiments complied with the French Government's animal experiment regulations and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans (CCO; N8CLE CCO 2011-026).

### Bacteria and infection

*M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) aliquots kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  were thawed, diluted in sterile saline containing 0.05% Tween 20 and clumping was disrupted by 30 repeated aspirations through a 26 gauge needle (Omnican, Braun, Germany). Pulmonary infection with *M. tuberculosis* H37Rv was performed by delivering  $1600 \pm 300$  CFU/lung into the nasal cavities (20 ml each) under xylazine-ketamine anaesthesia, and the inoculum size was verified 24 h after infection by determining bacterial load in the lungs. Alternatively, *M. bovis* BCG (Pasteur strain 1173P2) or fluorescent GFP-expressing *M. bovis* BCG (gift from Dr. V. Snewin, Wellcome Trust London, UK) was grown to mid-log phase in Middlebrook 7H9 liquid medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10% oleic acid/albumin/dextrose/catalase (OADC, Difco Laboratories) and 0.05% Hygromycin (Invivogen, San Diego, CA) at  $37^{\circ}\text{C}$ , stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 10% glycerol (Sigma, St Louis, MO), and injected intravenously at  $10^6$  CFU/mouse.

### Bacterial load in tissues

Bacterial loads in the lung of infected mice were evaluated at different time points after infection with *M. tuberculosis* H37Rv as described [46]. Organs were weighed and defined aliquots were homogenised in PBS in a Dispomix homogeniser (Medic Tools, Axonlab, Baden-Daettwil, Switzerland). Tenfold serial dilutions of organ homogenates in 0.05% Tween 20 containing 0.9% NaCl were plated in duplicates onto Middlebrook 7H11 (Difco) agar plates containing 10% OADC and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . Colonies were enumerated at 3 weeks and results are expressed as  $\log_{10}$  CFU per organ.

### Pulmonary cytokine determination

Lung homogenates were centrifuged (3 min at 14,500 rpm), the supernatants sterilised by centrifugation through

0.22 mm filter (3 min at 14,500 rpm; Costar-Corning, Badhoevedorp, The Netherlands), immediately frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12/IL-23p40, IL-23p19, TNF and IFN $\gamma$  levels by ELISA (Duoset R&D Systems, Abingdon, UK).

### Histopathological analysis

For histological analysis left lobe of lungs from *M. tuberculosis* infected mice were fixed in 4% phosphate buffered formalin and paraffin-embedded. Two to 3-mm sections were stained with Hematoxylin and Eosin and a modified Ziehl-Neelsen method. The latter involved staining in a prewarmed (60 $^{\circ}\text{C}$ ) carbol-fuchsin solution for 10 min followed by destaining in 20% sulphuric acid and 90% ethanol before counterstaining with methylene blue. Free alveolar space, lung cellular infiltration, oedema and necrosis were quantified using a semi-quantitative score with increasing severity of changes (0–5) by two independent observers including a trained pathologist (BR). Liver and lung from *M. bovis* BCG infected mice were assessed histologically by H&E staining and the slides scored for inflammatory cell infiltration and granuloma lesions as above.

### Primary macrophage cultures

Murine bone marrow cells were isolated from femurs and differentiated into macrophages after culturing at  $10^6$  cells/ml for 7 days in DMEM (Sigma) supplemented with 10 mM L-glutamine, 25 mM Hepes, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin, plus 20% horse serum and 30% L929 cell-conditioned medium as a source of M-CSF [43]. Three days after washing and re-culturing in fresh medium, the cell preparation contained a homogenous population of macrophages. Macrophages were plated in 96 well micro-culture plates (at  $10^5$  cells/well in supplemented DMEM as above), and stimulated with LPS (*Escherichia coli*, serotype O111:B4, Invivogen, Saint Louis, MO at 100 ng/ml), heat-killed *M. tuberculosis* H37Rv (heat-killed 90 min at  $80^{\circ}\text{C}$ ; 2 bacteria per cell), live or heat-killed *M. bovis* BCG (HKBCG; from Pasteur Institute, Paris, both at a MOI of 2 bacteria per cell). Cell supernatants were harvested after 24 h of stimulation for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF quantification by ELISA (R&D Duoset).

### Statistical analysis

Statistical significance was determined with Graph Pad Prism (version 5.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences between multiple *in vivo* groups were analysed by means of one-way non-parametric ANOVA test (Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparison test) and values of  $P \leq 0.05$  were considered significant.

Two-tailed, non-parametric Mann–Whitney *t*-test was used for analyzing *in vitro* results in Figure 1.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the support from CNRS through International Associated Laboratory TB IMMUNITY (LIA N8236), and from Le Studium (Research fellowship to I.G.).

### Conflict of Interest

None declared.

### References

1. Dye, C. C. J. Watt, D. M. Bleed, S. M. Hosseini, and M. C. Raviglione. 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA* 293:2767–2775.
2. Dye C. and B. G. Williams. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328:856–861.
3. Gill, W. P. N. S. Harik, M. R. Whiddon, R. P. Liao, J. E. Mittler, and D. R. Sherman. 2009. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 15:211–214.
4. Keane. J. 2005. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* 44:714–720.
5. Keane, J. S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345:1098–1104.
6. Mohan, A. K. T. R. Cote, J. N. Siegel, and M. M. Braun. 2003. Infectious complications of biologic treatments of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:179–184.
7. Mohan, V. P. C. A. Scanga, K. Yu, H. M. Scott, K. E. Tanaka, E. Tsang, M. M. Tsai, J. L. Flynn, and J. Chan. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect. Immun.* 69:1847–1855.
8. Tubach, F. D. Salmon, P. Ravaud, Y. Allanore, P. Goupille, M. Breban, B. Pallot-Prades, S. Pouplin, A. Sacchi, R. M. Chichemanian, et al. 2009. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum.* 60:1884–1894.
9. Dinarello, C. A. A. Simon, and J. W. van der Meer. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11:633–652.
10. Sugawara, I. H. Yamada, S. Hua, and S. Mizuno. 2001. Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.* 45:743–750.
11. Juffermans, N. P. S. Florquin, L. Camoglio, A. Verbon, A. H. Kolk, P. Speelman, S. J. van Deventer, and T. van Der Poll.

2000. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 182:902 – 908.
12. Yamada, H. S. Mizumo, R. Horai, Y. Iwakura, and I. Sugawara. 2000. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest.* 80:759 – 767.
  13. Fremont, C. M. D. Togbe, E. Doz, S. Rose, V. Vasseur, I. Mailliet, M. Jacobs, B. Ryffel, and V. F. Quesniaux. 2007. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 179:1178 – 1189.
  14. Master, S. S. S. K. Rampini, A. S. Davis, C. Keller, S. Ehlers, B. Springer, G. S. Timmins, P. Sander, and V. Deretic. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe.* 3:224 – 232.
  15. Mayer-Barber, K. D. D. L. Barber, K. Shenderov, S. D. White, M. S. Wilson, A. Cheever, D. Kugler, S. Hieny, P. Caspar, G. Nunez, et al. 2010. Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling *in vivo*. *J. Immunol.* 184:3326 – 3330.
  16. Mayer-Barber, K. D. B. B. Andrade, D. L. Barber, S. Hieny, C. G. Feng, P. Caspar, S. Oland, S. Gordon, and A. Sher. 2011. Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* 35:1023 – 1034.
  17. Flynn J. L. and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19:93 – 129.
  18. Flynn. J. L. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84:93 – 101.
  19. North R. J. and Y. J. Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22:599 – 623.
  20. Korbel, D. S. B. E. Schneider, and U. E. Schaible. 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect.* 10:995 – 1004.
  21. Mishra, B. B. V. A. Rathinam, G. W. Martens, A. J. Martinot, H. Kornfeld, K. A. Fitzgerald, and C. M. Sasseti. 2013. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat. Immunol.* 14:52 – 60.
  22. Settas, L. D. G. Tsimirikas, G. Vosvotekas, E. Triantafyllidou, and P. Nicolaides. 2007. Reactivation of pulmonary tuberculosis in a patient with rheumatoid arthritis during treatment with IL-1 receptor antagonists (anakinra). *J. Clin. Rheumatol.* 13:219 – 220.
  23. Botsios, C. P. Sfriso, A. Furlan, P. Ostuni, M. Biscaro, U. Fiocco, S. Todesco, and L. Punzi. 2007. Anakinra, a recombinant human IL-1 receptor antagonist, in clinical practice. Outcome in 60 patients with severe rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 59:32 – 37.
  24. Alten, R. H. Gram, L. A. Joosten, W. B. van den Berg, J. Sieper, S. Wassenberg, G. Burmester, P. van Riel, M. Diaz-Lorente, G. J. Bruin, et al. 2008. The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R67.
  25. Lachmann, H. J. I. Kone-Paut, J. B. Kuemmerle-Deschner, K. S. Leslie, E. Hachulla, P. Quartier, X. Gitton, A. Widmer, N. Patel, and P. N. Hawkins. 2009. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 360:2416 – 2425.
  26. Owyang, A. M. H. Issafras, J. Corbin, K. Ahluwalia, P. Larsen, E. Pongo, M. Handa, A. H. Horwitz, M. K. Roell, M. Haak-Frendscho, et al. 2011. XOMA 052, a potent, high-affinity monoclonal antibody for the treatment of IL-1beta-mediated diseases. *MAbs.* 3:49 – 60.
  27. Wilkinson, R. J. P. Patel, M. Llewelyn, C. S. Hirsch, G. Pasvol, G. Snounou, R. N. Davidson, and Z. Toossi. 1999. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1beta on tuberculosis. *J. Exp. Med.* 189:1863 – 1874.
  28. Gomez, L. M. J. F. Camargo, J. Castiblanco, E. A. Ruiz-Narvaez, J. Cadena, and J. M. Anaya. 2006. Analysis of IL1B, TAP1, TAP2 and IKBL polymorphisms on susceptibility to tuberculosis. *Tissue Antigens* 67:290 – 296.
  29. Motsinger-Reif, A. A. P. R. Antas, N. O. Oki, S. Levy, S. M. Holland, and T. R. Sterling. 2010. Polymorphisms in IL-1beta, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. *BMC Med. Genet.* 11:37.
  30. Guler, R. S. P. Parihar, G. Spohn, P. Johansen, F. Brombacher, and M. F. Bachmann. 2011. Blocking IL-1alpha but not IL-1beta increases susceptibility to chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine* 29:1339 – 1346.
  31. McElvania Tekippe, E. I. C. Allen, P. D. Hulseberg, J. T. Sullivan, J. R. McCann, M. Sandor, M. Braunstein, and J. P. Ting. 2010. Granuloma formation and host defense in chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1. *PLoS ONE* 5: e12320.
  32. Walter, K. C. Holscher, J. Tschopp, and S. Ehlers. 2010. NALP3 is not necessary for early protection against experimental tuberculosis. *Immunobiology* 215:804 – 811.
  33. Mishra, B. B. P. Moura-Alves, A. Sonawane, N. Hacoheh, G. Griffiths, L. F. Moita, and E. Anes. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.* 12:1046 – 1063.
  34. Abdalla, H. L. Srinivasan, S. Shah, K. D. Mayer-Barber, A. Sher, F. S. Sutterwala, and V. Briken. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1beta and IL-18 secretion but not to pyroptosis. *PLoS ONE* 7:e40722.

35. Horai, R. M. Asano, K. Sudo, H. Kanuka, M. Suzuki, M. Nishihara, M. Takahashi, and Y. Iwakura. 1998. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 $\beta$  is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J. Exp. Med.* 187:1463 – 1475.
36. Gross, O. C. J. Thomas, G. Guarda, and J. Tschopp. 2011. The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* 243:136 – 151.
37. Fettelschoss, A. M. Kistowska, S. LeibundGut-Landmann, G. D. Beer, P. Johansen, G. Senti, E. Contassot, M. F. Bachmann, L. E. French, A. Oxenius, et al. 2011. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:18055 – 18060.
38. Jayaraman, P. I. Sada-Ovalle, T. Nishimura, A. C. Anderson, V. K. Kuchroo, H. G. Remold, and S. M. Behar. 2013. IL-1 $\beta$  promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. *J. Immunol.* 190:4196 – 4204.
39. Bean, A. G. D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162:3504 – 3511.
40. Kaneko, H. H. Yamada, S. Mizuno, T. Udagawa, Y. Kazumi, K. Sekikawa, and I. Sugawara. 1999. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor- $\alpha$ -deficient mice. *Lab Invest.* 79:379 – 386.
41. Roach, D. R. A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* 168:4620 – 4627.
42. Fremond, C. N. Allie, I. Dambuza, S. I. Grivnennikov, V. Yermeev, V. F. Quesniaux, M. Jacobs, and B. Ryffel. 2005. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir. Res.* 6:136.
43. Muller, M. H. P. Eugster, M. Le Hir, A. Shakhov, F. Di Padova, C. Maurer, V. F. Quesniaux, and B. Ryffel. 1996. Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT  $\alpha$  deletion by bone marrow transplantation. *Mol. Med.* 2:247 – 255.
44. Fremond, C. M. V. Yermeev, D. M. Nicolle, M. Jacobs, V. F. Quesniaux, and B. Ryffel. 2004. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J. Clin. Invest.* 114:1790 – 1799.
45. Olleros, M. L. D. Vesin, R. Bisig, M. L. Santiago-Raber, S. Schuepbach-Mallepell, G. Kollias, O. Gaide, and I. Garcia. 2012. Membrane-bound TNF induces protective immune responses to *M. bovis* BCG infection: regulation of memTNF and TNF receptors comparing two memTNF molecules. *PLoS ONE* 7:e31469.
46. Jacobs, M. N. Brown, N. Allie, and B. Ryffel. 2000. Fatal *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-LT- $\alpha$ -deficient mice. *Clin. Immunol.* 94:192 – 199.
47. Jacobs, M. M. W. Marino, N. Brown, B. Abel, L. G. Bekker, V. J. Quesniaux, L. Fick, and B. Ryffel. 2000. Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest.* 80:901 – 914.
48. Feng, C. G. C. A. Scanga, C. M. Collazo-Custodio, A. W. Cheever, S. Hieny, P. Caspar, and A. Sher. 2003. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J. Immunol.* 171:4758 – 4764.
49. Holscher, C. N. Reiling, U. E. Schaible, A. Holscher, C. Bathmann, D. Korbel, I. Lenz, T. Sonntag, S. Kroger, S. Akira, et al. 2008. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur. J. Immunol.* 38:680 – 694.
50. Nicolle, D. M. X. Pichon, A. Bouchot, I. Maillet, F. Erard, S. Akira, B. Ryffel, and V. F. Quesniaux. 2004. Chronic pneumonia despite adaptive immune response to *Mycobacterium bovis* BCG in MyD88-deficient mice. *Lab Invest.* 84:1305 – 1321.
51. Sugawara, I. H. Yamada, S. Mizuno, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice. *Microbiol. Immunol.* 47:841 – 847.
52. Fleischmann, R. M. J. Tesser, M. H. Schiff, J. Schechtman, G. R. Burmester, R. Bennett, D. Modafferi, L. Zhou, D. Bell, and B. Appleton. 2006. Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 65:1006 – 1012.
53. Nicolle, D. C. Fremond, X. Pichon, A. Bouchot, I. Maillet, B. Ryffel, and V. J. Quesniaux. 2004. Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. *Infect. Immun.* 72:6994 – 7004.
54. Sander, L. E. M. J. Davis, M. V. Boekschoten, D. Amsen, C. C. Dascher, B. Ryffel, J. A. Swanson, M. Muller, and J. M. Blander. 2011. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* 474:385 – 389.
55. Court, N. V. Vasseur, R. Vacher, C. Fremond, Y. Shebzukhov, V. V. Yermeev, I. Maillet, S. A. Nedospasov, S. Gordon, P. G. Fallon, et al. 2010. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 184:7057 – 7070.

56. Gringhuis, S. I. T. M. Kaptein, B. A. Wevers, B. Theelen, M. van der Vlist, T. Boekhout, and T. B. Geijtenbeek. 2012. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat. Immunol.* 13:246 – 254.
57. Novikov, A. M. Cardone, R. Thompson, K. Shenderov, K. D. Kirschman, K. D. Mayer-Barber, T. G. Myers, R. L. Rabin, G. Trinchieri, A. Sher, et al. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. *J. Immunol.* 187:2540 – 2547.
58. Allie, N. S. I. Grivennikov, R. Keeton, N.-J. Hsu, M.-L. Bourigault, N. Court, C. Fremont, V. Yermeev, Y. Shebzukhov, B. Ryffel, et al. 2013. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci. Rep.* 3:1809.
59. Labow, M. D. Shuster, M. Zetterstrom, P. Nunes, R. Terry, E. B. Cullinan, T. Bartfai, C. Solorzano, L. L. Moldawer, R. Chizzonite, et al. 1997. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 159:2452 – 2461.
60. Marino, M. W. A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, et al. 1997. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8093 – 8098.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

**Figure S1.** Expression of iNOS in lung tissues of *M. tuberculosis* infected IL-1 deficient mice. Mice deficient for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 or wild-type C57Bl/6 mice were exposed to *M. tuberculosis* H37Rv as in Figure 2 and the expression of iNOS in lung tissue assessed by immunostaining on day 35 post-infection (Magnification 100 $\times$ ; representative sections of  $n = 5$  mice per group are shown).

**Figure S2.** Pulmonary levels of IL-17A in *M. tuberculosis* infected IL-1 deficient mice. IL-17A concentrations in lung homogenates of mice deficient for IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  plus IL-1 $\beta$ , or IL-1R1 and of wild-type mice were quantified by ELISA (Duoset R&D Systems) at 35 days after *M. tuberculosis* infection (left panel) or 56 days after *M. tuberculosis* infection (right panel). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of cytokine levels reported to whole lungs, and are from  $n = 5$  mice per group, except for two controls at day 56 (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , as compared to wild-type controls).



# Noria SEGUENI

## **Etude des relations hôte-pathogène lors de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* : implication des voies de signalisation IL-36, TNF et IL-17/IL-22**

### Résumé

La tuberculose est encore aujourd'hui un problème de santé majeur et l'augmentation des cas de tuberculoses résistantes au niveau mondial, associé au dépistage et diagnostic insuffisants, suggère une éradication totale encore lointaine. La compréhension des relations hôte-pathogène est essentielle pour permettre d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces travaux de thèse ont mis en exergue la contribution limitée de la voie de signalisation IL-36, cytokine de la famille de l'IL-1, au cours de l'infection mycobactérienne. Ces données permettent d'envisager sérieusement l'IL-36 en tant que cible thérapeutique pour le psoriasis sans risquer la réactivation de tuberculose latente chez les patients. De plus, nous avons également démontré le rôle différentiel de la voie de signalisation TNF au sein de populations cellulaires spécifiques lors de l'infection par *M. tuberculosis*, et nos résultats apportent des connaissances solides pour envisager des stratégies immuno-modulatoires qui pourraient constituer l'avenir des traitements antituberculeux. D'autre part, nous avons caractérisé un modèle murin humanisé pour une étude facilitée des anticorps anti-TNF humains actuels. L'utilisation de ce modèle pourrait permettre, à termes, d'identifier et de valider de nouveaux candidats d'anticorps anti-TNF de deuxième génération. Enfin, nous avons montré que des anticorps neutralisants l'IL-17 ne perturbent pas la réponse immunitaire à la tuberculose, contrairement aux anticorps anti-TNF, et que l'absence de l'IL-17 n'est pas compensée par l'IL-22 puisque des animaux déficients pour ces deux voies de signalisation sont capables de contrôler l'infection.

Mots clés : *Mycobacterium tuberculosis*, IL-36, TNF, anticorps, IL-17, IL-22

## **Host-pathogen interactions during *Mycobacterium tuberculosis* infection : role of IL-36, TNF and IL-17/IL-22 pathways**

### Abstract

Tuberculosis remains a major health problem in the world nowadays. The increasing incidence of resistant tuberculosis is associated with a poor diagnosis, reflecting important difficulties for total eradication. Understand host-pathogen interactions is crucial to establish new therapeutic strategies. This work first shows the limited contribution of IL-36 pathway during mycobacterial infection. These results suggest that IL-36 could be targeted for the treatment of psoriasis without a high risk of tuberculosis reactivation. We then demonstrate the differential role of TNF pathway among myeloid or lymphoid cells during *M. tuberculosis* infection, and our data support the development of immunomodulatory strategies to boost host immune response, thus helping to clear the infection. Moreover, we characterize a humanized murine model allowing the study of new anti-TNF candidates in the context of *M. tuberculosis* infection. Finally, we show that antibodies targeting IL-17 does not dampen host control of *M. tuberculosis* infection, unlike anti-TNF, and that IL-22 does not compensate absence of IL-17 for this control.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis*, IL-36, TNF, antibodies, IL-17, IL-22

inem

