



HAL
open science

Analyse de la fonction de deux nouvelles lectines de type C, DCIR et CL-LK, dans l'immunité anti-tuberculeuse

Anthony Troegeler

► To cite this version:

Anthony Troegeler. Analyse de la fonction de deux nouvelles lectines de type C, DCIR et CL-LK, dans l'immunité anti-tuberculeuse. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30116 . tel-01561592

HAL Id: tel-01561592

<https://theses.hal.science/tel-01561592v1>

Submitted on 13 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
TROGELER Anthony

le jeudi 29 septembre 2016

Titre :

Analyse de la fonction de deux nouvelles lectines de type C, DCIR et CL-LK,
dans l'immunité anti-tuberculeuse

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale - CNRS UMR5089

Directeur/trice(s) de Thèse :

HUDRISIER Denis
NEYROLLES Olivier

Jury :

Dr TROTTEIN François, Directeur de recherche, Institut Pasteur Lille
Dr MAJLESSI Laleh, Directrice de recherche, Institut Pasteur Paris
Pr VAN MEERWIJK Joost, Professeur, Université Toulouse III
Pr SCHWARTZ Olivier, Professeur, Institut Pasteur Paris
Dr TAILLEUX Ludovic, Chargé de recherche, Institut Pasteur Paris
Dr BLANCHARD Nicolas, Chargé de recherche, CPTP Toulouse
Pr HUDRISIER Denis, Professeur, IPBS Toulouse
Dr NEYROLLES Olivier, Directeur de recherche, IPBS Toulouse

Rapporteur
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse

REMERCIEMENTS

C'est avec une certaine émotion que j'écris ces remerciements, concluant l'écriture de ce manuscrit et quatre années de travail particulièrement enrichissantes sur tout point de vue. Sur un plan professionnel car cela m'as permis de faire mes premiers pas en tant que « chercheur en herbe » dans le monde de la science. Cela m'a permis d'avoir des expériences variées en terme de gestion de projets, d'encadrement, mais aussi en terme de connaissances scientifiques et compétences techniques. Cependant la thèse ne se résume pas uniquement au travail, car cela a également représenté pour moi une expérience personnelle importante riche en émotions. J'ai eu la chance de côtoyer de magnifiques personnes qui ont partagé avec moi l'aventure, les hauts comme les bas, et qui pour certaines sont devenues bien plus que de simples collègues de travail.

Merci aux membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que du temps passé à la relecture du manuscrit. Merci pour l'ensemble de vos remarques qui ont été très constructives.

Je tiens à remercier infiniment Olivier, qui a supervisé majoritairement ma thèse. Je n'aurais jamais pu sortir la tête haute de ces quatre années, avec une aussi belle thèse sans toi. De par ton encadrement et ton implication importante sur mon travail, cela a permis d'aboutir à quelque chose de fort qui n'aurait certainement pas eu autant d'importance si tu n'avais pas été là. Ce fut un plaisir de travailler sous ta direction durant cette thèse, et je sais que par la suite, je ne rencontrerai probablement jamais un chef comme toi, aussi bien sur le plan personnel que professionnel.

Je remercie chaleureusement Denis, pour m'avoir fait aimer l'immunologie sur les bancs de la fac. C'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui et que j'ai décidé de suivre cette voie. Tu as toujours été là pour moi depuis la L3, notamment dans mes recherches de stages, ou pour répondre à mes diverses interrogations. Merci pour ta supervision durant la thèse, tes conseils, ta disponibilité et ton sourire constant tout au long de ces quatre années.

Merci également à Geanncarlo, qui m'a supervisé personnellement dans mes premiers mois au laboratoire lors de mon stage de M2 et durant la première partie de ma thèse. Merci d'avoir été toujours là et disponible lorsque j'avais besoin de toi. Tu m'as donné les prémices et les bases de ce qu'est concrètement le métier de chercheur et permis de faire mes premiers pas au sein de la team Neyrolles.

Je tiens également à remercier particulièrement les personnes qui ont partagé mon bureau et donc mon espace vital durant ces quatre années. En particulier mes deux sœurs Ingrid et Alexia, mon bro Alex et ma maman de labo Carine, sans oublier les derniers arrivés, la douce et tendre LuB, ma ritale préférée Giulia et Dan (Aueheueheh). Travailler à vos côtés était juste un pur bonheur pour moi. J'ai eu la chance avec vous d'avoir une relation privilégiée, plus que des collègues, vous avez été de véritables amis et un soutien tout au long de ces années. Si je venais avec le sourire tous les matins au labo, c'est en grande partie grâce à vous. Merci d'avoir jalonné cette thèse de rires et de moments merveilleux.

Je n'oublie pas de remercier les autres membres de l'équipe, notamment Yannick et Flo, pour leur bonne humeur et leur humour très fédérateur lors des pauses cafés de bon matin. Commencer une journée en vous voyant était toujours très positif et motivant. Merci également à Claude, pour ta disponibilité, pour nos P3 du vendredi matin, et pour ta magnifique prestation dans ma vidéo de thèse qui restera graver à jamais dans mon esprit. Merci également à Yoann, cela ne fait pas très longtemps que tu es dans l'équipe mais tu as déjà marqué tout le monde avec ton humour « grivois » et tes glycosylations.

Je tiens à remercier fortement André, nos expériences particulières à l'A3, où tu m'as suggéré « monsieur patate », ont été particulièrement intenses. Merci pour ta bonne humeur et toute ton aide avec les souris démoniaques. T'inquiètes pas, ça a toujours été un plaisir de travailler en binôme avec toi ! Merci aussi à mon ami bellâtre italien de l'institut, Danilo. Outre le cœur de toutes les filles du labo que tu as pu subtiliser sans modération, tu as également su ravir mon cœur sur le plan de l'amitié bien sûr (ne te fais pas trop d'idées !). Merci enfin à Yves-Marie, j'ai eu la chance de te côtoyer qu'un seul mois, mais déjà, je reconnais en toi un ami de boisson ayant une certaine tendance à apprécier le berger fou.

Merci à mes amis extérieurs au labo, de longue date, qui ont été un soutien important durant ce temps de labeur. Notamment Clara, Heubeu, Justine, Matthieu, Gilles et Marc.

Enfin je tiens à remercier les membres de ma famille qui ont été prépondérants dans ma vie, mon père, mon oncle Jean-marc, mon frère François, ma sœur Caroline, et enfin ma mère, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, qui je l'espère est fière de moi de là où elle est, et à qui je dédie cette thèse personnellement.

Pour terminer, je remercie du fond du cœur Delphine, pour tous ces moments privilégiés passés à tes côtés. Tu as été une béquille dans ma vie pour m'aider à avancer. De par ton soutien indéfectible et ce bonheur que tu me donnes tous les jours, j'ai vécu une fin de thèse fabuleuse grâce à toi. Merci d'être là et d'être ce que tu es, c'est-à-dire une personne formidable tout simplement. Merci également aux membres de ta famille, Josiane, Jean-Pierre, Camille, Leslie, merci de m'avoir adopté au sein de votre famille. Merci infiniment pour votre présence et votre bienveillance et pour tous ces instants que j'ai la chance de vivre en votre compagnie.

Merci à tous infiniment, pour tous ces merveilleux moments...

ABREVIATIONS

3MC: Carnavale, Mingarelli, Malpuech, et Michels
ADN: Acide désoxyribonucléique
AIM: *absent in melanoma*
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
Asn: Asparagine
Asp: Acide aspartique
ATPase: Adenosine triphosphatase
BAL: Lavage broncho-alvéolaire
BCG: Bacille de Calmette et Guérin
Bcl10: *B-cell lymphoma 10*
BMDC: *Bone marrow-derived dendritic-cell*
BMDM: *Bone marrow-derived macrophage*
CAM: Complexe d'attaque membranaire
CARD9: *Caspase recruitment domain-containing protein 9*
CCL19/21: *Chemokine (C-C motif) ligand 19/21*
CD4/8/36: *Cluster of differentiation 4/8/36*
c-di-AMP: *Cyclic diadenylate monophosphate*
CFP10 : *Culture filtrate protein 10 kDa*
cGAS: *Cyclic GMP-AMP synthase*
CHIKV: *Chikungunya virus*
CLEC4A: *C-type lectin domain family 4 member A*
CLECSF6: *C-type lectin domain superfamily 6*
CL-K1/ CL-11: *Collectin kidney 1/ Collectin 11*
CL-L1: *Collectin liver 1*
CL-LK: *Collectin liver kidney*
CL-P1: *Collectin placenta 1*
CLR: *C-type lectin receptor*
CM: *Cerebral malaria*
CMH-II: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CpG: Cytosine-phosphate-guanine
Cpn60.1/60.2: *Chaperonin family 60.1/60.2*
CRD: *Carbohydrate recognition domain*
CRP: *C-reactive protein*
CTLD: *C-type lectin-like domain*
CXCL: *chemokine (C-X-C motif) ligand*
Cys: Cystéine
DAI: *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors*
DAP12: *DNAX activation protein of 12 kDa*
DC : *Dendritic cell*
DCIR: *Dendritic cell immunoreceptor*
DC-SIGN: *Dendritic cell-specific Intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*
DIM: Dimycocérosate
EAE: Encéphalopathie auto-immune expérimentale
EPN: Acide glutamique-proline-asparagine
ESAT-6 : *Early secretory antigenic target 6 kDa*
ESX-1 : *ESAT-6 secretion system-1*
FcR γ : *fragment crystallizable receptor (FcR) gamma*
Gln : Glutamine
Glu: Acide glutamique

Gly: Glycine
GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
Gp140: *Glycoprotein 140*
HCV: *Hepatitis C virus*
HLA: *Human leukocyte antigen*
HSP65/70: *Heat shock protein 65/70*
HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells*
ICAM1: *Intercellular adhesion molecule 1*
IFN α / β / γ : *Interféron α / β / γ*
IFNAR: *Interferon alpha and beta receptor*
IgG: *Immunoglobuline G*
IKK: *I κ B kinase complex*
IL: *Interleukine*
iNOS: *Inducible nitric oxide synthase*
IRAK: *Interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF: *Interferon regulatory factor*
ISG: *Interferon-stimulated genes*
ISGF3: *Interferon-stimulated gene factor 3*
ISRE: *Interferon-stimulated regulatory element*
ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*
IVIg: *Intravenous immunoglobulin*
JAK: *Janus kinase*
LAM: *Lipoarabinomannan*
LCMV: *Lymphocytic choriomeningitis virus*
LPS: *Lipopolysaccharide*
LRR : *Leucine rich repeat*
LXA4: *Lipoxine A4*
MALT1: *Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*
Man₃: *Mannotriose*
ManLAM: *Mannosylated-lipoarabinomannan*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MARCO: *Macrophage receptor with collagenous structure*
MASP: *Mannose-associated serine protease*
MAVS: *Mitochondrial antiviral-signaling protein*
MBL: *Mannose binding lectin*
MDA5: *Melanoma differentiation-associated protein 5*
MDP: *Mycolylarabinogalactan-peptidoglycan*
MDR: *Multi-drug resistant*
Mincle: *Macrophage inducible Ca²⁺-dependent (C-type) lectin*
MR: *Mannose receptor*
MRC1: *Mannose receptor C-type 1*
Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*
Myd88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide*
NET: *Neutrophil extra-cellular trap*
NF- κ B : *Nuclear factor-kappa B*
NK: *Natural killer*
NKT: *Natural killer T cell*
NLR: *NOD-like receptor*
NO: *Nitric oxide*
NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*

NRAMP1: *Natural resistance-associated macrophage protein 1*
NuoG: *NADH-quinone oxidoreductase subunit G*
PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*
PD-1: *Programmed cell death 1*
PD-L1/2: *Programmed cell death ligand 1/2*
PGE2: *Prostaglandine E2*
PGL: *Phenolic glycolipid*
pH: *Potentiel hydrogène*
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*
PIB : *Produit intérieur brut*
PIM: *Phosphatidyl-myo-inositol mannosides*
PKS: *Polyketide synthase*
PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PRMT1: *Protein arginine N-methyltransferase 1*
Pro: *Proline*
PRR: *Pattern recognition receptor*
QPD: *Glutamine-proline-acide aspartique*
Rag2: *Recombination activating gene 2*
RIG-I: *Retinoic acid-inducible gene 1*
SecA2: *Secretion of superoxide dismutase A2*
SHP-1/2: *SH2-containing tyrosine-specific protein phosphatase 1/2*
SIDA: *Syndrome d'immunodeficiency acquise*
SIGNR1-8: *DC-SIGN-related protein 1-8*
SP-A/D: *Surfactant protein A/D*
SR(A): *Scavenger receptor (A)*
STAT: *Signal transducer and activator of transcription*
STING: *Stimulator of interferon genes*
syk: *Spleen tyrosine kinase*
TAB1/2: *TGF-beta-activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1/2*
TAK1: *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*
TB: *Tuberculose*
TBK1: *Tank-binding kinase 1*
TDM: *Tréhalose-6,6'-dimycolate*
Th1: *T helper 1*
TLR: *Toll-like receptor*
TNF- α : *Tumor necrosis factor α*
TRAF(6): *TNF receptor associated factor (6)*
Treg: *Lymphocyte T régulateur*
TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
Trp: *Tryptophane*
TYK2: *Tyrosine kinase 2*
UBC13: *Ubiquitin containing protein 13*
UEV1: *Ubiquitin-conjugating enzyme variant 1*
VDR: *Vitamin D receptor*
VIH: *Virus de l'immunodéficience humaine*
WND: *Tryptophane-asparagine-acide aspartique*
XDR: *Extreme drug resistant*

Table des matières

INTRODUCTION	8
I/ La tuberculose.....	8
1/ Epidémiologie.....	8
2/ Agent étiologique et traitements.....	9
(A) Mycobacterium tuberculosis	9
(B) Traitements actuels	11
(a) Les antibiotiques.....	11
(b) Les vaccins	12
II/ Mycobacterium tuberculosis et le système immunitaire.....	13
1/ Physiopathologie de l'infection.....	13
(A) Déroulement de l'infection.....	13
(B) La réponse immunitaire innée	14
(a) Les macrophages	14
(b) Les neutrophiles	16
(c) Les facteurs solubles	16
(C) La réponse immunitaire adaptative.....	17
(a) Rôles des lymphocytes et des DCs.....	17
(b) La réponse Th1 : l'axe IL-12/IFN γ	19
(D) La réponse interféron de type I	21
(a) Présentation de la voie interféron de type I.....	21
(b) Rôle dans l'infection à <i>Mtb</i>	23
2/ Reconnaissance de la bactérie par l'hôte	24
(A) Les PRRs.....	24
(a) Les TLRs.....	24
(b) Les récepteurs scavengers (SRs).....	26
(c) Les senseurs intracellulaires	27
(B) Les lectines de type C (CLRs).....	28
(a) Les CLRs solubles	29
(b) Les CLRs membranaires.....	30
III/ CL-K1 et DCIR	35
1/ Découverte de nouvelles collectines	35
(A) CL-P1	35
(B) CL-K1 et CL-L1	35
(a) Caractérisation structurale	35
(b) Distributions tissulaires et reconnaissance	36
(c) Interaction avec MASP-1 et MASP-3.....	37
(d) Le complexe CL-LK	38
2/ DCIR (<i>Dendritic cell immunoreceptor</i>).....	38
(A) Description générale.....	38
(B) Rôle de DCIR dans l'auto-immunité	39
(C) Contribution de DCIR aux pathologies infectieuses.....	41
OBJECTIF	43
RESULTATS	45
1/ CL-K1	45
(A) Etude du rôle de CL-K1 dans l'infection à <i>Mtb</i>	45

<i>(B) Publication</i>	45
<i>(C) Discussion</i>	61
2/ DCIR.....	64
<i>(A) Etude du rôle de DCIR dans l'infection par Mtb</i>	64
<i>(B) Publication (Format de soumission pour The Journal of Experimental Medicine)</i>	65
<i>(C) Discussion</i>	116
CONCLUSION GENERALE	123
ANNEXE I	125
BIBLIOGRAPHIE	136

INTRODUCTION

/ La tuberculose

1/ Epidémiologie

La tuberculose (TB) représente encore de nos jours un problème de santé publique majeur. En 2014, on estime que cette maladie a provoqué le décès d'1,5 million d'individus à travers le monde dont 0,4 million présentant une co-infection avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). On estime qu'il y a eu 9,1 millions de nouveaux cas de TB cette même année, la plupart en Asie (58% des cas totaux recensés) et en Afrique (28%). D'autres endroits du monde sont touchés, de manière moins importante, comme la région Est du bassin méditerranéen (8%), l'Europe (3%) et l'Amérique (3%) (OMS, Rapport 2015) (**Figure 1**). Les 22 pays répertoriés dans le **Tableau 1** représentent à eux seuls 83% de tous les nouveaux cas estimés de TB en 2014. L'incidence de la TB varie fortement selon les régions. Les taux les plus bas sont observés dans les pays développés, incluant la plupart des pays d'Europe de l'ouest, le Canada, les Etats-Unis, l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Dans ces pays, l'incidence est inférieure à 10 cas pour 100 000 individus. En 2014, le Brésil, la Russie et la Chine sont trois pays qui ont vu cette valeur chuter fortement, alors que d'autres pays, notamment en Afrique, ont encore une incidence de plus de 500/100 000 (**Figure 2**). Globalement, l'incidence est restée relativement stable depuis les années 1990 jusqu'aux années 2000 avant de commencer à décliner lentement jusqu'à nos jours (OMS, Rapport 2015)(**Figure 3**). En termes de mortalité, la TB se range au côté du SIDA comme cause principale de décès par un agent infectieux unique (**Figure 4**). Le nombre de décès dus à la TB est de 16/100 000 en 2014. A l'instar de l'incidence, de très fortes variations de la mortalité sont observées entre les différentes régions du monde, allant de moins de 1/100 000 dans les régions développées comme les Etats-Unis, le Canada et l'Europe de l'ouest, jusqu'à plus de 40/100 000 dans certaines régions d'Afrique et d'Asie (**Figure 5A**).Globalement, le taux de mortalité a chuté de 47% entre les années 1990 et 2015 (**Figure 5B**), mais la mortalité due à la TB reste très importante, ce qui nécessite un suivi scientifique et sanitaire important afin de juguler l'infection et de permettre une lutte efficace contre la maladie.

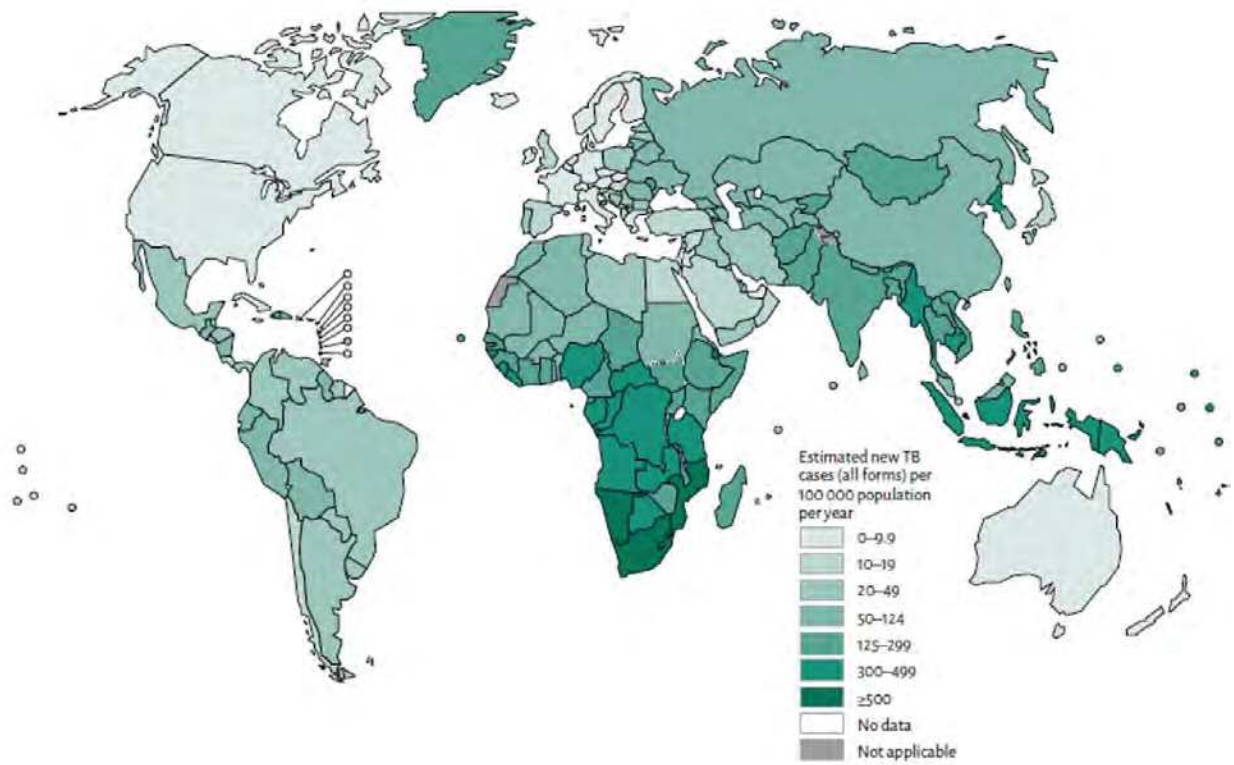


Figure 1/Estimation de l'incidence de la TB dans le monde en 2014 (OMS, Rapport 2015).

	POPULATION	MORTALITY ^b		HIV-POSITIVE TB MORTALITY		PREVALENCE		INCIDENCE		HIV-POSITIVE INCIDENT TB CASES	
Afghanistan	31 628	14	10–18	<0.1	0–0.1	110	56–180	60	53–67	0.3	0.2–0.4
Bangladesh ^c	159 078	81	59–110	0.2	0.1–0.2	640	340–1 000	360	320–410	0.6	0.4–0.7
Brazil	206 078	5.3	4.9–5.7	2.4	1.8–3.2	110	51–180	90	86–95	16	14–17
Cambodia	15 328	8.9	6.3–12	0.8	0.6–1.0	100	87–120	60	54–66	1.8	1.6–2.0
China	1 369 436	38	37–40	0.7	0.5–0.9	1 200	1 100–1 400	930	860–1 000	13	11–16
DR Congo	74 877	52	38–68	6.3	5.0–7.7	400	210–640	240	220–270	34	27–42
Ethiopia	96 959	32	22–43	5.5	4.4–6.8	190	160–240	200	160–240	19	15–23
India	1 295 292	220	150–350	31	25–38	2 500	1 700–3 500	2 200	2 000–2 300	110	96–120
Indonesia	254 455	100	66–150	22	13–32	1 600	1 300–2 000	1 000	700–1 400	63	41–90
Kenya	44 864	9.4	6.7–12	8.1	6.4–10	120	64–190	110	110–110	40	38–42
Mozambique	27 216	18	12–26	37	29–45	150	80–240	150	120–180	85	65–110
Myanmar	53 437	28	20–37	4.1	3.3–5.1	240	190–310	200	180–220	19	15–24
Nigeria	177 476	170	91–280	78	53–110	590	450–740	570	340–870	100	59–160
Pakistan	185 044	48	11–110	1.3	0.8–1.9	630	530–740	500	370–650	6.4	4.4–8.7
Philippines	99 139	10	9.0–11	<0.1	0–0.1	410	360–470	290	250–320	2.5	2.0–3.2
Russian Federation	143 429	16	15–16	1.1	0.8–1.3	160	70–270	120	110–130	5.5	4.5–6.6
South Africa	53 969	24	22–26	72	58–89	380	210–590	450	400–510	270	240–310
Thailand	67 726	7.4	3.9–12	4.5	2.3–7.4	160	110–220	120	61–190	15	7.8–24
Uganda	37 783	4.5	3.2–6.1	6.4	5.0–8.1	60	33–95	61	53–69	28	24–32
UR Tanzania	51 823	30	13–54	28	15–43	270	110–510	170	80–290	62	29–110
Viet Nam	92 423	17	11–23	1.9	1.3–2.5	180	76–330	130	110–150	7	5.7–8.5
Zimbabwe	15 246	2.3	1.4–3.4	5.2	3.2–7.8	44	24–71	42	29–58	25	17–35

Tableau 1/ Les 22 pays les plus touchés par la TB en 2014

En 2014, 83% des cas de TB surviennent dans ces 22 pays, pour la plupart d’Afrique et d’Asie. La mortalité, la prévalence et l’incidence sont indiquées en nombre pour 100 000 habitants. La valeur relative à la mortalité exclue les cas de co-infection avec le VIH (OMS, Rapport 2015).

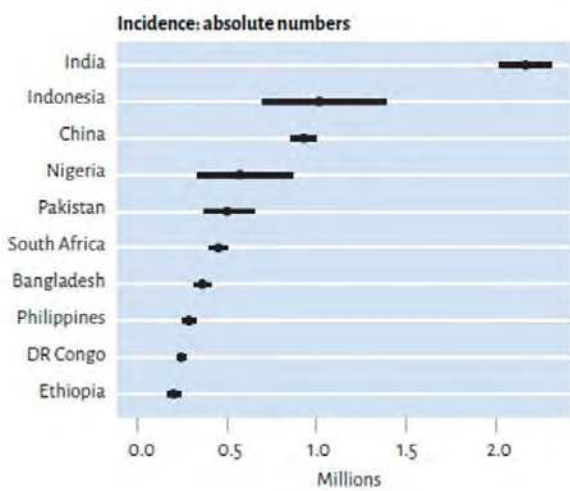
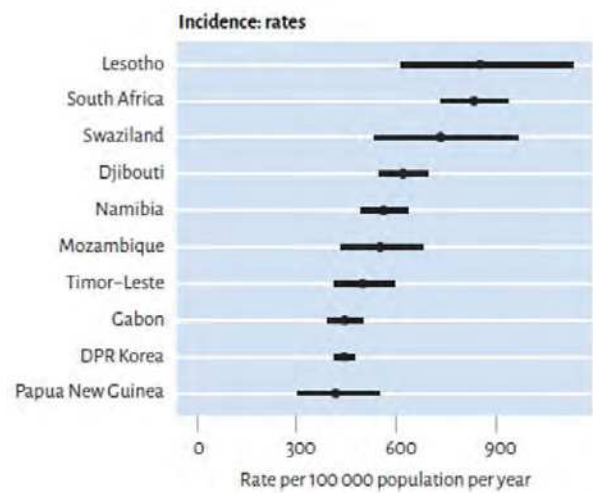
A**B**

Figure 2/ Les dix pays présentant la plus forte incidence de TB en 2014

A) Incidence en nombre absolu faisant apparaître notamment que l'Inde, à elle seule, représente 2 millions de cas. **B)** Représentation moyennée de l'incidence sur 100 000 habitants par année. L'écart représente l'intervalle de confiance de 95% (OMS, Rapport 2015).

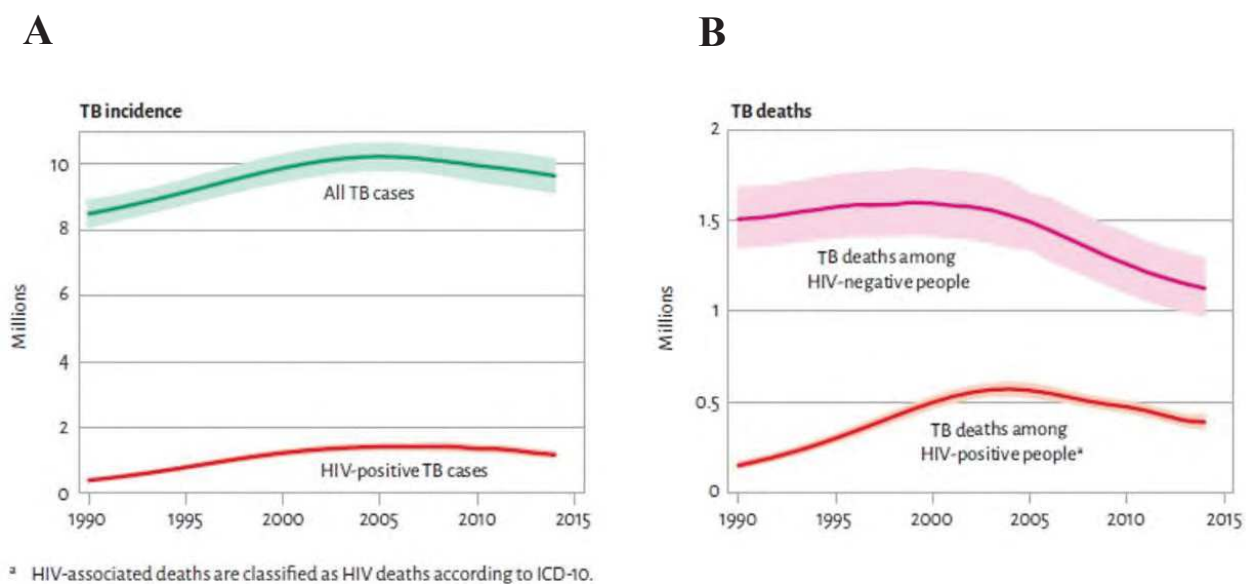


Figure 3/ Estimation absolue du nombre de cas de TB et de décès (en million par an) de 1990 à 2014

A) Incidence de la TB en millions d'individus de 1990 à 2014. La courbe verte indique l'intégralité des cas tuberculeux, celle en rouge indique les cas de patients TB co-infectés avec le VIH. **B)** Mortalité associée à la tuberculose en millions d'individus de 1990 à 2014. La courbe rose indique l'intégralité des cas de décès causés uniquement par la TB, celle en rouge indique les décès dus à la tuberculose chez les sujets co-infectés avec le VIH (OMS, Rapport 2015).

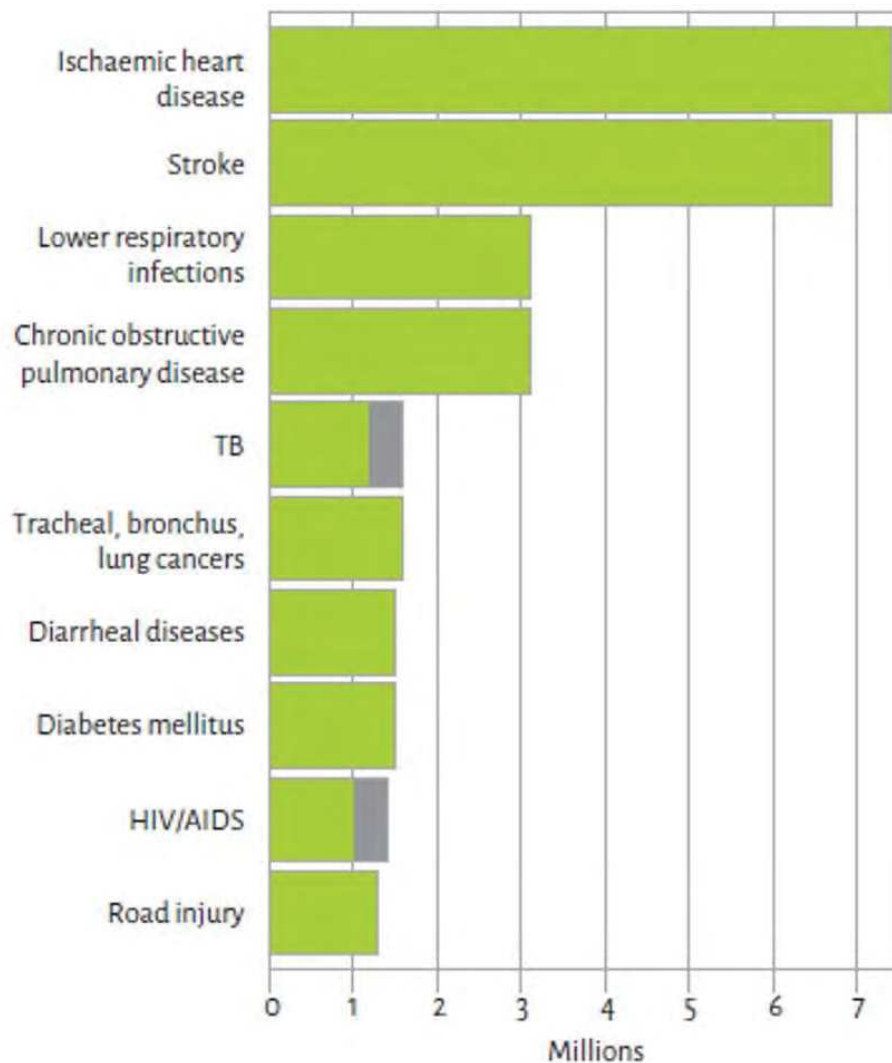
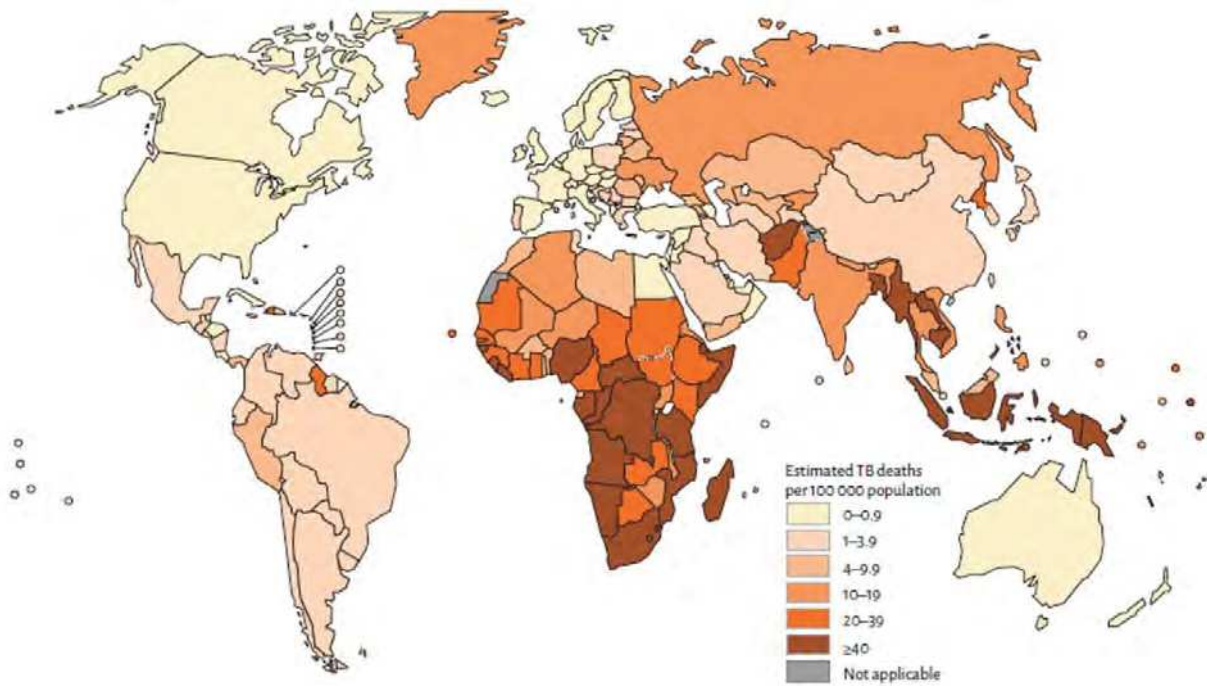


Figure 4/ Les dix plus grandes causes de mortalité à travers le monde en 2012

La TB se positionne en 5^e position en terme de cause de mortalité mondiale en 2012. L'histogramme gris représente les décès dus à la tuberculose chez les patients co-infectés avec le VIH (OMS, Rapport 2015).

A



B

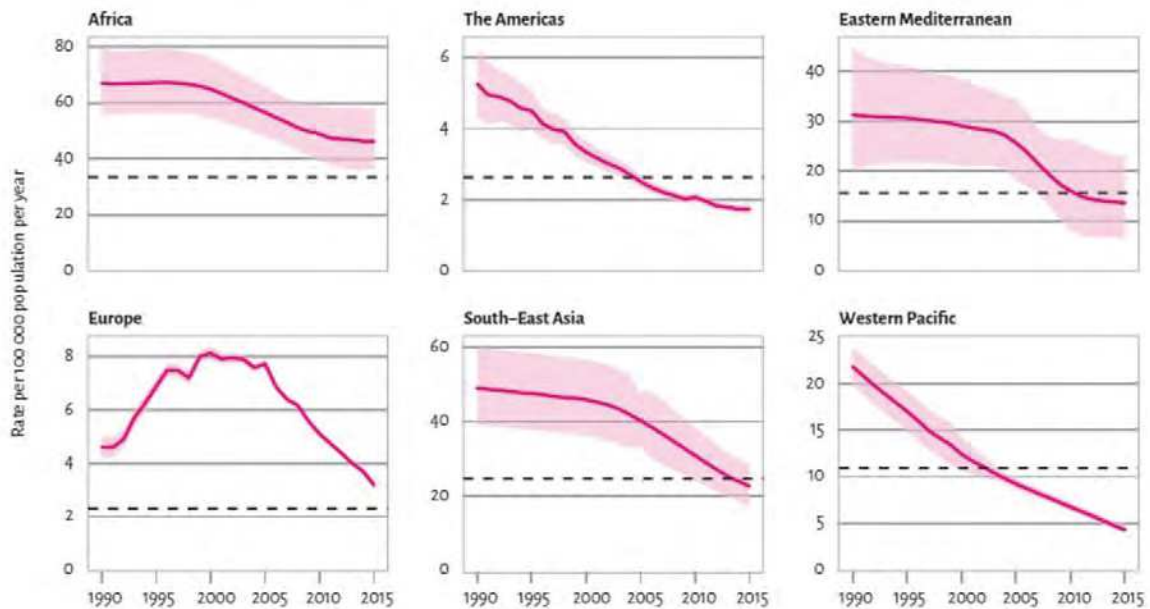


Figure 5/ Mortalité associée à la TB

A) Estimation de la mortalité causée par la TB en 2014 (excluant les individus atteints du VIH). **B)** Evolution de la mortalité causée par la TB entre 1990 et 2015 dans différentes régions du monde (excluant les individus HIV-positif) (OMS, Rapport 2015).

2/ Agent étiologique et traitements

(A) *Mycobacterium tuberculosis*

La TB est une maladie chronique, principalement pulmonaire, causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), également appelé bacille de Koch, dénomination venant directement de son découvreur, l'allemand Robert Koch, en 1882, et dans une moindre mesure d'autres bactéries apparentées du complexe « Tuberculosis ». Les mycobactéries possèdent une paroi particulière, appelée « mycomembrane », les rendant peu sensibles aux colorants ordinaires et au GRAM, utilisés principalement pour classer les bactéries. La mycomembrane confère des propriétés d'acido-alcalo-résistance permettant l'utilisation d'une coloration particulière, dite de Ziehl-Neelsen, afin de révéler le pathogène. La bactérie se présente comme un bacille droit ou légèrement incurvé, de 0,2 à 0,6µm de diamètre sur 1 à 10µm de longueur. Sur le plan structural, la mycomembrane est une paroi riche en lipides (60% des constituants) dont la constitution explique partiellement la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques.

La paroi est constituée de trois couches. La couche intérieure est formée de peptidoglycane sur laquelle viennent se fixer des polymères d'arabinose et de galactose (arabino-galactane) s'attachant à leur tour à des acides mycoliques présents dans la couche intermédiaire. Ces acides mycoliques constituent une des particularités de la mycomembrane de par leur longueur élevée (chaîne d'acides gras composée de 78 à 90 carbones). Enfin, la partie externe est formée d'une surface de phospholipides et de peptidoglycolipides. La paroi comprend des molécules de porine et de lipo-arabinomannane (LAM) qui sont ancrées par leurs partie lipidique dans la membrane cytoplasmique et qui communiquent avec la surface cellulaire par leur partie polysaccharidique (Brown *et al.*, 2015) (**Figure 6**). *Mtb*, contrairement à d'autres mycobactéries non pathogènes, présente une coiffe mannosylée au niveau du LAM (appelé alors ManLAM). Le ManLAM est reconnu par un certain nombre de récepteurs de l'hôte conduisant à une inhibition de la production de médiateurs cytokiniques inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α , favorisant ainsi un environnement moins hostile pour la bactérie lors de l'infection (Knutson *et al.*, 1998). Concernant les glycolipides présents à la surface, on peut les subdiviser en deux familles: les tréhaloses et les phthiocérols. Parmi les tréhaloses, on peut noter la présence de tréhalose-6,6'-dimycolate

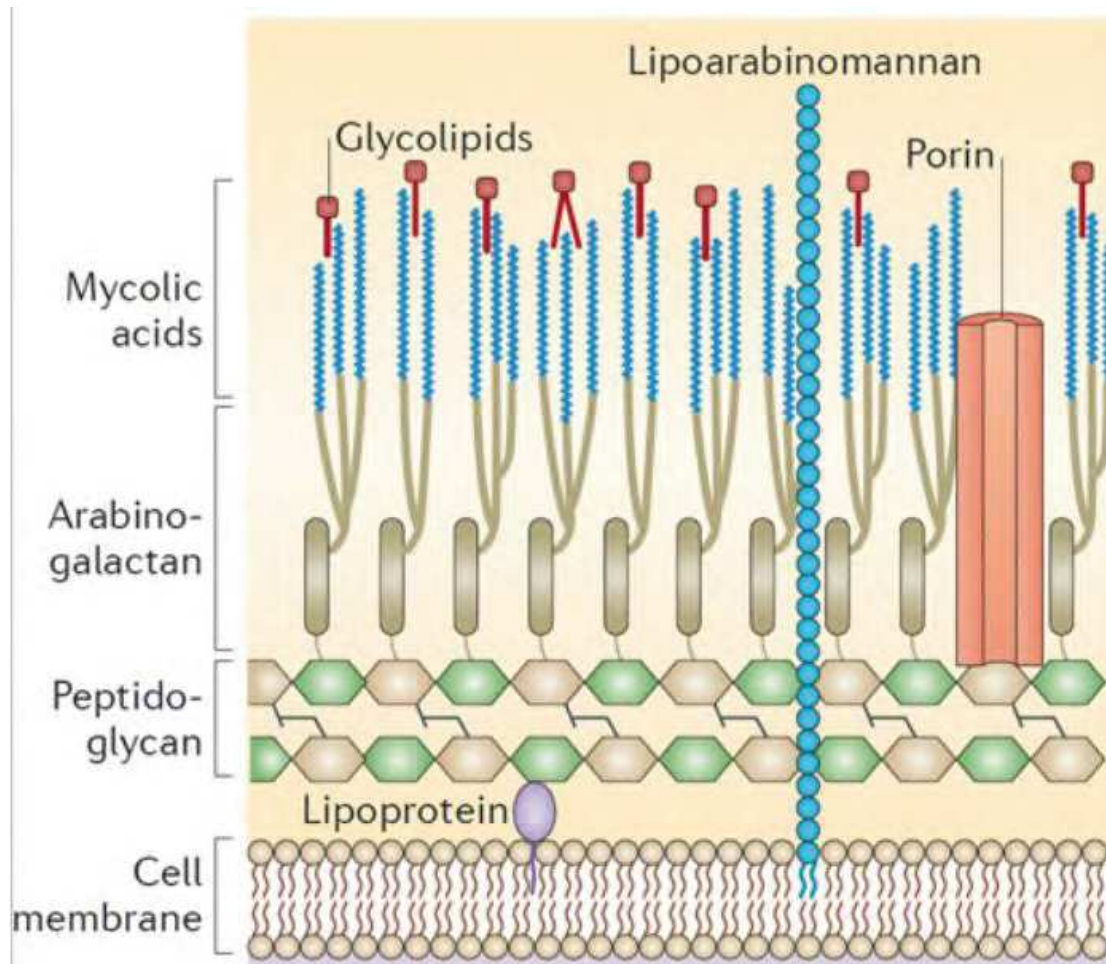


Figure 6/ Structure de l'enveloppe de *Mtb*

La mycomembrane consiste en une couche de peptidoglycane et d'arabinogalactanes superposés à une couche d'acide mycoliques. La paroi est traversée par des molécules de lipoarabinomannane ainsi que des porines. La surface est recouverte de différents glycolipides (Brown et al., 2015).

(TDM), aussi connu sous le nom de "*cord factor*", lequel est l'un des membres les plus abondants et des plus toxiques de cette famille de molécules. A l'instar du ManLAM, le TDM est reconnu par certains récepteurs du système immunitaire de l'hôte, ce qui conduit à perturber la régulation la réponse immune et inflammatoire. Le TDM permet notamment à la bactérie de mieux résister à différents stress à l'intérieur des macrophage, d'inhiber les processus de présentation antigénique ainsi que d'altérer la réponse protectrice des lymphocytes T (Welsh *et al.*, 2013). En ce qui concerne les phthiocérols, ceux-ci comprennent les dimycocérosates (DIM) et les glycolipides phénoliques (PGL). Ils jouent un rôle prépondérant dans la perméabilité membranaire, ainsi que dans la protection contre l'activité microbicide des macrophages (Camacho *et al.*, 2001; Cambier *et al.*, 2014; Rousseau *et al.*, 2004). Les PGL présentent une structure similaire aux DIM avec cependant une chaîne phthiocérol possédant une coiffe glycosylée phénolique (Daffe *et al.*, 1987). L'ensemble de ces composés bactériens est recouvert d'une capsule principalement composée de polysaccharides et de protéines (Daffe and Etienne, 1999). Outre du mannane et de l'arabinomannane, le glucane est identifié comme le polysaccharide le plus abondamment retrouvé dans la capsule de *Mtb* (Lemassu and Daffe, 1994). Parmi les protéines capsulaires, la majeure est la protéine de 19kDaLpqH, qui joue un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire, notamment en inhibant l'expression de nombreux gènes de réponse à l'IFN γ (Pennini *et al.*, 2006). D'autres protéines importantes exprimées au niveau de la capsule sont les protéines du complexe de l'antigène 85, qui sont primordiales dans la formation de la mycomembrane, notamment en permettant la génération du TDM (Belisle *et al.*, 1997). La richesse en sucres et en motifs glycosylés de la mycomembrane représente un élément clé dans le processus de reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire. En effet, ces sucres sont reconnus spécifiquement par une famille importante de récepteurs de l'hôte que sont les lectines de type-C (CLRs), dont le rôle sera plus détaillé dans une partie ultérieure du manuscrit.

La majorité des lipides de l'enveloppe mycobactérienne sont les produits des polyketide synthase (PKS). Ces enzymes multifonctionnelles sont impliquées dans la biosynthèse d'une large gamme de métabolites appelés polykétides. Ce procédé est très similaire à celui de la génération d'acides gras (cycles de condensation d'acides carboxyliques suivi d'élimination de carboxylates)(Walsh *et al.*, 1997). La biosynthèse de ces polykétides faisant intervenir les PKS

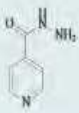
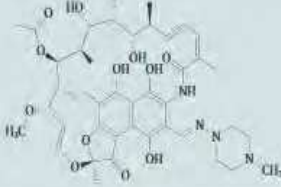


est un facteur de virulence important pour la mycobactérie. Par exemple, la génération d'acides mycoliques, qui sont essentiels à la survie de la bactérie, requiert la polyketide synthase PKS13 (Portevin *et al.*, 2004). Les PKS sont également indispensables à la biosynthèse des DIM et PGL (Dubey *et al.*, 2002; Rainwater and Kolattukudy, 1985). De plus il a été montré que des inactivations de deux gènes exprimant des PKS (*pks5* et *pks7*) conduit à une importante atténuation de la virulence de la bactérie dans des modèles d'infections chez la souris (Rousseau *et al.*, 2003).

(B) Traitements actuels

(a) Les antibiotiques

Le schéma thérapeutique contre la TB est basé sur une antibiothérapie relativement contraignante s'étendant sur 6 mois durant lesquels le patient doit prendre une posologie quotidienne de différents antibiotiques. Le traitement s'articule en deux phases : une phase intensive durant 2 mois pendant laquelle le patient est traité avec une combinaison de quatre antibiotiques : l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'ethambutol. Ce traitement est suivi d'une seconde phase, durant les quatre derniers mois, réduite à la seule prise de deux antibiotiques : l'isoniazide et la rifampicine (**Tableau 2A**). Bien qu'efficace ce traitement pose deux problèmes majeurs: les phénomènes de persistance et de résistance. Le problème de persistance se traduit par le fait qu'environ 1% des bacilles tuberculeux ne sont pas éradiqués par le traitement sans pour autant présenter une quelconque résistance génétique (Gomez and McKinney, 2004). Ce phénomène est sujet à de nombreuses études quant à ses multiples mécanismes. En ce qui concerne le problème de résistance, il est dû au défaut d'observance des patients conduisant à l'apparition de formes résistantes de la bactérie à un (mono-résistance) ou plusieurs antibiotiques : MDR (*Multidrug resistant*) et XDR (*Extreme drug resistant*). Ces formes apparaissent suite à l'acquisition de différentes mutations génétiques conférant une protection du bacille face aux antibiotiques. Les TB MDR sont définies par une résistance à la rifampicine et à l'isoniazide et nécessitent une antibiothérapie de seconde intention pouvant s'étendre sur deux années (**Tableau 2B**). Les souches XDR sont non seulement MDR mais présentent également une résistance à certains antibiotiques de seconde ligne, les rendant particulièrement difficiles à traiter. Ces formes se développent et sont présentes sur l'ensemble de la planète, et ont une incidence particulièrement élevée en Europe de l'Est et en Asie (OMS, Rapport 2015) (**Figure 7**).

A

Antibiotic	Chemical structure	Mechanism and target
Isoniazid		Inhibits mycolic acid synthesis; primary target is <i>InhA</i> and secondary targets are <i>KasA</i> and <i>DfrA</i>
Rifampicin		Inhibits transcription; RNA polymerase β -subunit
Ethambutol		Inhibits arabinogalactan synthesis; possibly <i>EmbB</i>
Pyrazinamide		Unknown (possibly inhibits FAS-I or alters membrane energetics)

B

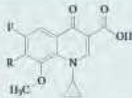



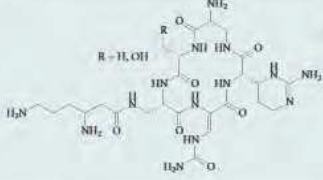
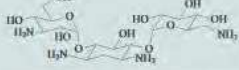
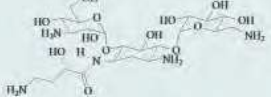
Antibiotic	Chemical structure	Mechanism and target	Mutations associated with resistance
Fluoroquinolones		Inhibits DNA gyrase	<i>gyrB</i>
Ethionamide		Inhibits mycolic acid synthesis; <i>InhA</i>	<i>ethA</i> (required for drug activation) and <i>inhA</i> (promoter mutations)
Cycloserine		Inhibits peptidoglycan synthesis by blocking the synthesis and use of D-alanine (Ala); Ala racemase and D-Ala-D-Ala ligase	<i>alc</i> (overproduction) and <i>ddl</i> (overproduction)
Para-aminosalicylic acid		Inhibits folate metabolism; possibly dihydropteroate synthase	<i>thyA</i>
Capreomycin		Inhibits protein synthesis; methylated nucleotides in both ribosomal subunits	<i>thyA</i> and <i>rrs</i>
Kanamycin		Inhibits protein synthesis	<i>rrs</i>
Amikacin		Inhibits protein synthesis	<i>rrs</i>

Tableau 2/ Les antituberculeux utilisée en antibiothérapie

Tableau référençant les antibiotiques de première ligne (**A**) et de seconde ligne (**B**). Le tableau comprend les noms, les structures chimiques, le mécanisme et la cible de l'antibiotique ainsi que les mutations associées à l'émergence des formes résistantes MDR et XDR (Sacchetti et al., 2008).

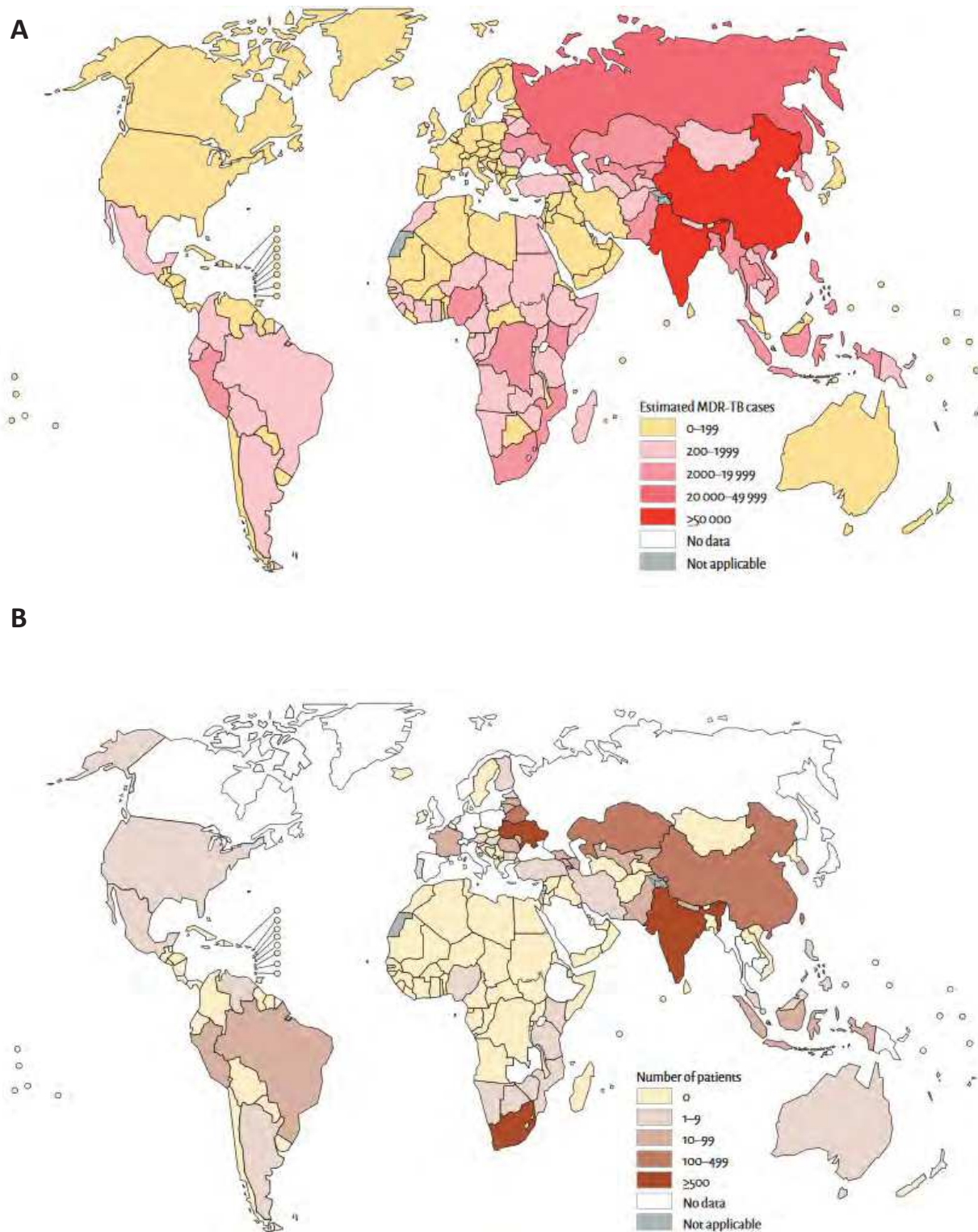


Figure 7/ Prévalence globale des souches multirésistantes de *Mtb*

(A) Carte représentant le nombre de cas MDR estimés en 2014. **(B)** Carte représentant le nombre de patients atteints de TB XDR qui ont commencé un traitement en 2014 (OMS, Rapport 2015).

Plusieurs nouveaux anti-tuberculeux sont en cours de développement ou en essai clinique (Hoagland *et al.*, 2016). Récemment deux nouveaux antibiotiques ont été officiellement approuvés pour mise sur le marché par les agences de santé internationales : la bédaquiline et le delamanide (Cohen, 2013; Gler *et al.*, 2012).

(b) Les vaccins

Le vaccin actuellement utilisé dans la lutte contre la TB est le Bacille de Calmette et Guérin (BCG), originellement isolé à partir d'une souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis* par les deux chercheurs français Albert Calmette et Camille Guérin et inoculé pour la première fois chez l'homme en 1919. Depuis lors, ce vaccin a été globalement utilisé avec une efficacité et une sécurité excellente chez les enfants (Luca and Mihaescu, 2013). Cependant le BCG présente certaines limites, en particulier dans la protection contre les formes adultes de la TB, pour deux raisons. D'une part le BCG n'est pas capable d'induire une réponse mémoire efficace à long terme après la vaccination et perd de son efficacité protectrice au cours du temps (Andersen and Doherty, 2005; Sterne *et al.*, 1998). D'autre part, on observe des variations importantes de son efficacité, qui peut varier de 0% dans la région sud de l'Inde jusqu'à 80% au Royaume-Uni (Poyntz *et al.*, 2014). L'une des hypothèses pour expliquer ces variations serait l'exposition différentielle des individus à d'autres mycobactéries environnementales, exposition pouvant interférer avec l'efficacité induite par le vaccin (Luca and Mihaescu, 2013).

De nouveaux vaccins potentiels font l'objet de nombreuses recherches et sont actuellement en cours de développement ou d'essais cliniques (**Tableau 3**) (Tang *et al.*, 2016). Ces vaccins devront, pour être optimaux, empêcher toute forme de primo-infection tout en visant et en bloquant la réactivation des bacilles latents.

Vaccine name	Composition	Clinical trial status
Preventative vaccines		
<i>Live mycobacterium vaccines</i>		
rBCG30	rBCG over-expressing Ag85B	Phase I completed and stopped
VPM1002 (rBCGΔureC:Hly)	rBCG expressing listeriolysin and lacking urease gene	Phase IIa ongoing
MTBVAC (rMtbΔPhoPΔFadD26)	<i>M. tb</i> MT103 strain with deletions of the <i>phoP</i> and <i>fadD26</i> gene	Phase I ongoing
<i>Subunit vaccines-recombinant fusion protein vaccines</i>		
H1:IC31	Fusion protein Ag85B-ESAT-6 in IC31 adjuvant	Phase IIa ongoing
H1:CAF01	Fusion protein Ag85B-ESAT-6 in CAF01 adjuvant	Phase I completed
HyVac4/AERAS 404	Fusion protein Ag85B-TB10.4 in IC31 adjuvant	Phase IIa ongoing
H56:IC31/AERAS-456	<i>M. tb</i> fusion proteins Ag85B-ESAT-6-Rv2660c in IC31 adjuvant	Phase IIa ongoing
M72F:AS01	Fusion protein Mtb32a-Mtb39a in AS01 adjuvant	Phase IIb ongoing
<i>Subunit vaccines-modified viral vector vaccines</i>		
MVA85A/AERAS-485	Modified vaccinia virus Ankara expressing Ag85A	Phase IIb ongoing
AdHu5Ag85A	Recombinant human adenovirus type 5 expressing Ag85A	Phase I ongoing
AERAS-402	Recombinant human adenovirus type 5 expressing Ag85A, Ag85B and TB10.4	Phase II ongoing
AERAS-402 and MVA85A	AERAS-402 prime followed by MVA85A boost	Phase I ongoing
Therapeutic vaccines		
RUTI	Detoxified fragmented <i>M. tb</i> in liposomes	Phase IIa completed
Mycobacterium vaccae	Heat-killed whole <i>Mycobacterium vaccae</i>	Phase III ongoing
Mycobacterium indicuspranii	Heat-killed whole <i>Mycobacterium indicuspranii</i>	Phase III ongoing

Tableau 3/ Les nouveaux vaccins potentiels contre la TB en cours d'essai clinique.

Le tableau comprend le nom du vaccin, sa composition et son état d'avancement dans son processus de validation cliniques. La Phase I consiste à évaluer l'absence d'effet indésirable chez des sujets, le plus souvent volontaires sains. La phase II, ou "étude pilote", consiste à déterminer la dose optimale du médicament et ses effets indésirables sur une population éligible de malade. Enfin la phase III, ou "étude pivot", correspond à une étude comparative d'efficacité proprement dite, en comparant le traitement test avec un placebo. Cette fois le groupe est souvent de taille conséquente (plusieurs milliers) (Tang et al., 2016).

1/ Physiopathologie de l'infection

(A) Déroulement de l'infection

La TB est transmise par voie aérienne d'un individu malade à un individu sain qui inhale des bactéries contenues dans les gouttelettes présentes dans les aérosols expectorés. Les bactéries une fois inhalées atteignent les poumons et les alvéoles pulmonaires (Russell *et al.*, 2010a). A ce niveau, la bactérie entre en contact avec différents types cellulaires dont les macrophages alvéolaires qui représentent son réservoir principal. Durant les premières étapes de l'infection, la réponse immunitaire innée se développe, notamment par le recrutement de cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques (DCs)) au niveau des poumons (Cooper *et al.*, 2011). Par la suite, les DCs ayant rencontré le pathogène migrent au niveau du ganglion lymphatique drainant (ganglion médiastinal) afin d'initier la réponse immunitaire adaptative (Reiley *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2008). Les DCs présentent les antigènes bactériens permettant l'activation et la prolifération de lymphocytes T spécifiques. Ces cellules T acquièrent ainsi un phénotype effecteur, et migrent au niveau du site infectieux afin d'induire, avec la coopération des autres cellules immunes, la formation de granulomes. Ces granulomes sont des structures particulièrement organisées qui contiennent des macrophages, des neutrophiles, des lymphocytes et des fibroblastes (Flynn *et al.*, 2011; Ramakrishnan, 2012). Cette structure permet dans la plupart des cas de contenir l'infection, notamment par l'action des lymphocytes T CD4+ effecteurs de types Thelper 1(Th1) qui sécrètent l'IFN γ , cytokine clé dans l'activation des macrophages, permettant à ceux-ci de mieux contrôler la dissémination et la prolifération de *Mtb* (Flynn *et al.*, 1993). Bien que dans la plupart des cas l'infection soit contrôlée par le système immunitaire au sein du granulome, la bactérie n'est généralement pas totalement éliminée et persiste sous forme latente dans l'organisme (Horsburgh and Rubin, 2011). On estime que près d'un quart de la population mondiale est infecté de manière latente tout en restant cliniquement asymptomatique (données en cours de publication). Ce réservoir représente une proportion importante d'individus susceptibles de développer la maladie durant leur vie, en cas de réactivation du bacille. Des études épidémiologiques concernant cette problématique ont permis de faire émerger la notion qu'environ 10% des individus ayant

contracté une TB latente subiront une rechute et verront la pathologie s'exprimer de nouveau au cours de leur vie (Barry *et al.*, 2009; Nunes-Alves *et al.*, 2014) (**Figure 8**).

(B) La réponse immunitaire innée

Lorsque *Mtb* parvient au niveau des poumons, il est phagocyté par les macrophages alvéolaires résidents, qui représentent son réservoir principal (Schlesinger, 1996). D'autres cellules du système immunitaire inné peuvent effectuer ce processus de phagocytose, comme les neutrophiles (Eum *et al.*, 2010) et les DCs (Wolf *et al.*, 2007). Les macrophages et les neutrophiles sont des acteurs prépondérants dans la réponse innée contre *Mtb* et constituent une première barrière primordiale dans la réponse précoce à l'infection.

(a) Les macrophages

Une fois la bactérie phagocytée et internalisée au sein des macrophages, le phagosome (vacuole de phagocytose) subit un processus de maturation qui aboutit à sa fusion avec les lysosomes, vésicules intracellulaires acides et riches en hydrolases et catalases qui sont particulièrement délétères pour la survie du bacille (Armstrong and Hart, 1971). Ce processus de fusion est influencé par l'autophagie, un mécanisme par lequel la cellule ingère et recycle ses propres constituants cytoplasmiques, incluant les organelles comme les mitochondries, mais aussi les pathogènes intracellulaires. Ceux-ci se retrouvent séquestrés dans un autophagosome, vacuole qui est également délivrée aux lysosomes pour sa dégradation (Colombo *et al.*, 2006). Un des facteurs qui induit l'autophagie est l'IFN γ . Un excès de cette cytokine provoque une activation plus forte de l'autophagie qui se traduit par une augmentation de la maturation du phagosome ainsi qu'une acidification supérieure de celui-ci, aboutissant à un environnement plus propice à la mort du pathogène (Gutierrez *et al.*, 2004). Comme d'autres pathogènes intracellulaires, *Mtb* a développé des moyens de défense contre les mécanismes bactéricides intracellulaires dans les macrophages. En particulier, *Mtb* a la capacité d'inhiber la fusion du phagosome dans lequel il réside avec les lysosomes des macrophages (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994), créant ainsi un environnement moins agressif. Récemment, il a été montré que la bactérie est également capable de s'échapper de la vacuole phagosomale pour rejoindre le cytosol de la cellule-hôte où elle est moins soumise aux mécanismes microbicides (Simeone *et al.*, 2015; van der Wel *et al.*, 2007). La rupture phagosomale est le produit de l'action de facteurs de virulence sécrétés par la bactérie comme la petite protéine ESAT-6 (*Early secreted antigenic target 6kDa*), qui

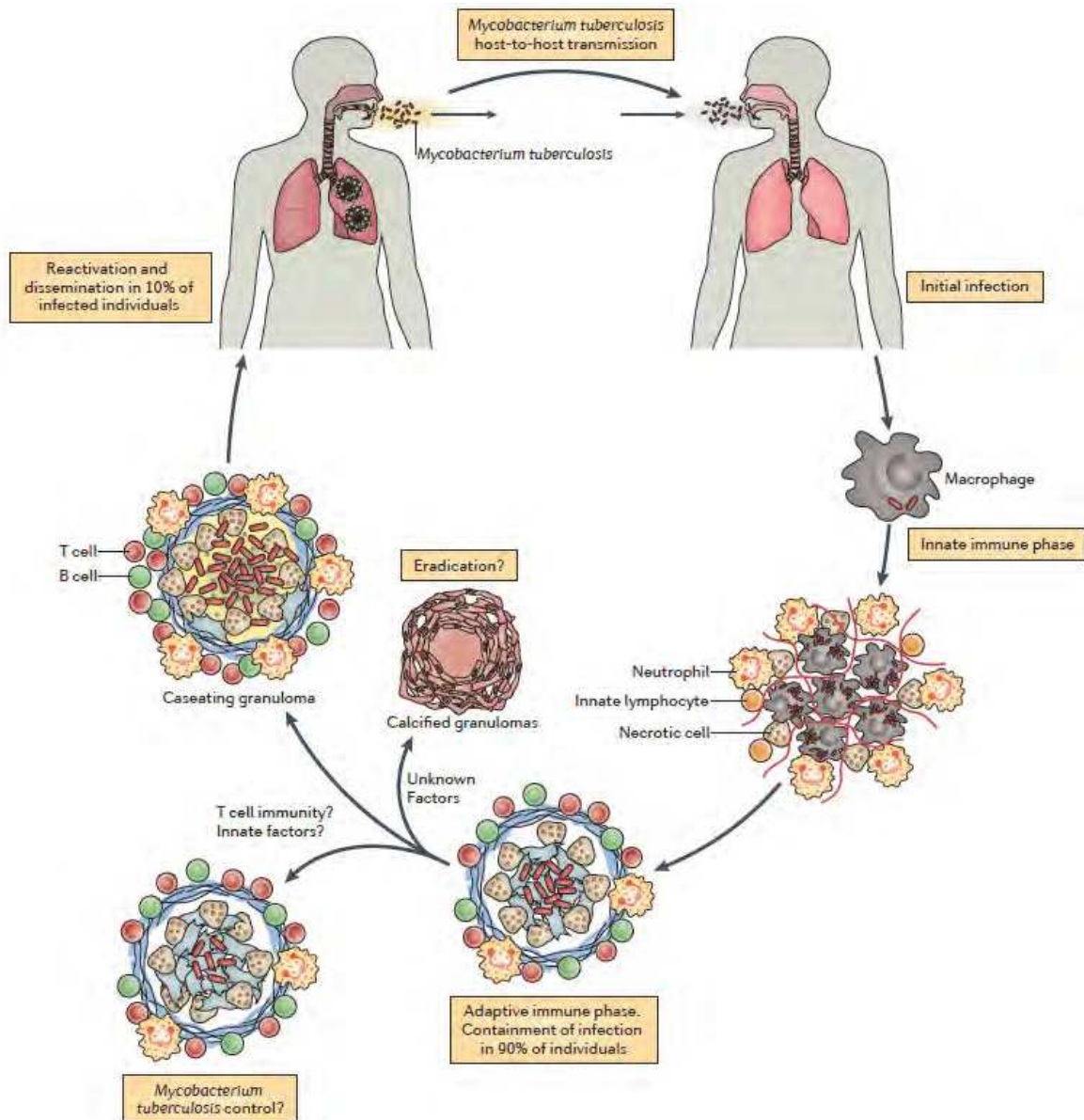


Figure 8/ Physiopathologie de l'infection à *Mtb*.

L'infection est initiée par l'inhalation de gouttelettes aéroportées contenant les bactéries. Les phases initiales de l'infection sont caractérisées par la mise en place de la réponse immunitaire innée qui va induire le recrutement des cellules inflammatoires dans les poumons. Les DCs migrent ensuite dans les ganglions lymphatiques médiastinaux et initient une réponse adaptative, notamment de type Th1. Le recrutement des cellules T, B, macrophages et autres cellules inflammatoires permet la mise en place de la structure granulomateuse, qui contient la bactérie dans la plupart des cas. Cependant 10% des individus infectés développeront une TB active qui peut se traduire par un échappement de *Mtb* hors du granulome et pouvant se retrouver de nouveau dans les gouttelettes expectorées par l'individu et infecter un nouvel hôte (Nunes-Alves et al., 2014).

acquiert une activité de lyse membranaire lorsqu'il est dissocié de sa protéine chaperonne CFP10 (*Culture filtrate protein 10 kDa*) en condition acide (de Jonge *et al.*, 2007). Ces facteurs sont sécrétés par un système de sécrétion de type 7, ESX-1 (*ESAT-6 secretion system-1*). Le BCG, qui n'exprime pas ce système, est incapable de s'échapper du phagosome (Gao *et al.*, 2004; Simeone *et al.*, 2012).

Bien que *Mtb* ait la capacité d'établir une niche permissive ou répliquative au sein de la cellule phagocytaire, cela entraîne dans certains cas un stress cellulaire conduisant à la mort de la cellule infectée. Celle-ci peut prendre deux formes principales : a/ la nécrose, conduisant à la lyse de la cellule-hôte et permettant à la bactérie de s'échapper, de disséminer et d'infecter d'autres cellules avoisinantes, et b/ l'apoptose qui permet d'induire la mort de la cellule sans pour autant altérer l'intégrité des membranes, empêchant donc la bactérie d'être libérée dans le milieu extracellulaire, et inhibant de ce fait sa dissémination dans l'organisme (Behar *et al.*, 2011). Le fait que l'apoptose soit plus favorable que la nécrose pour l'hôte a été rapporté dans de nombreuses études. Il a été montré notamment que l'infection de macrophages alvéolaires par des souches moins virulentes de *Mtb* résulte majoritairement en une mort des macrophages par apoptose, permettant une meilleure prise en charge de l'infection, alors qu'au contraire des souches hyper-virulentes provoquent plutôt une mortalité cellulaire par nécrose (Keane *et al.*, 2000) (**Figure 9**). Une étude ultérieure a pu établir que la nécrose provoquée par les souches hyper-virulentes est due à leurs capacités à rompre la membrane phagosomale, processus qui induit un stress au niveau de la cellule-hôte et qui conduit à la mort de celle-ci (Simeone *et al.*, 2012). Le fait que l'inhibition de l'apoptose constitue un mécanisme de virulence utilisé par *Mtb* est aussi établi depuis plusieurs années maintenant. En particulier, il a été démontré que l'inactivation du gène *secA2* (*Secretion of superoxide dismutase A2*) de *Mtb*, qui code pour un composant associé à la sécrétion de facteurs de virulence, entraîne une augmentation de l'apoptose des macrophages infectés *via* une diminution de la sécrétion de superoxyde dismutase par la bactérie. La vaccination de souris et de cochons d'Inde par un mutant inactivé dans *secA2* se traduit par une plus forte réponse des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que par une plus grande résistance à l'infection (Hinchev *et al.*, 2007). D'autres études ont révélé que l'activité anti-apoptotique exercée par *Mtb* était attribuable, au moins en partie, à une NADH-déshydrogénase de la bactérie codée notamment par le gène *nuoG* (*NADH-quinone*

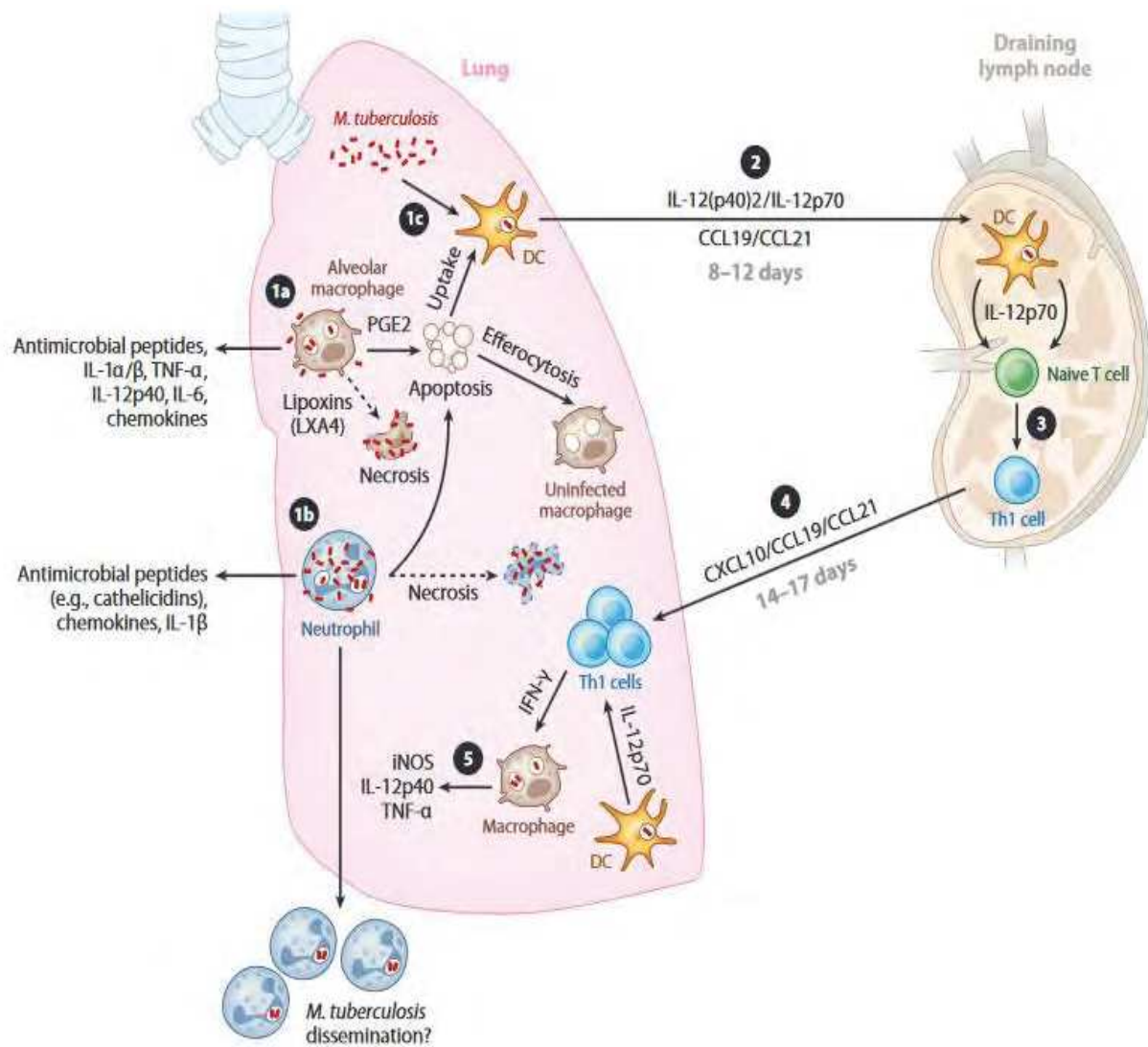


Figure 9/ Réponse immunitaire cellulaire contre *Mtb*.

Après infection, les macrophages alvéolaires (1a), les neutrophiles (1b) et les DCs pulmonaires (1c) sont infectés, conduisant à la production et la sécrétion de peptides antimicrobiens, de cytokines, et de chimiokines. L'expression des médiateurs lipidiques inflammatoires comme la prostaglandine E2 (pro-apoptotique) ou la lipoxine A4 (pro-nécrotique), dans les macrophages infectés joue un rôle prépondérant dans la mise en place du programme de mort cellulaire. Les corps apoptotiques générés sont pris en charge par les DCs résidentes du poumon ou bien internalisés par d'autres macrophages par efferocytose. Les DCs infectées migrent vers les ganglions drainants médiastinaux dans les 8-12 jours suivant l'infection. La migration des DCs se déroule sous l'influence de cytokines comme l'IL-12p40 et IL-12p70 ainsi que des chimiokines CCL19 et CCL21 (2), conduisant à la différenciation des cellules T naïves vers un phénotype de type Th1 (3). Les Th1 vont par la suite, grâce notamment aux chimiokines CXCL10, CCL19 et CCL21, migrer vers les poumons, et ce, à partir de 14 à 17 jours après l'infection (4) et où ils produisent notamment de l'IFN γ . Cytokine clé dans l'activation de macrophages, la production d'IFN γ et l'induction de facteur antimicrobien comme iNOS (5), permet d'aboutir à un contrôle bactérien optimal (O'Garra et al., 2013).

oxidoreductase subunit G). La délétion de ce gène chez la bactérie prive celle-ci de son activité anti-apoptotique, la rendant de ce fait moins virulente chez la souris (Velmurugan *et al.*, 2007). Après apoptose, les corps apoptotiques générés contenant les débris cellulaires et les bactéries sont de nouveau internalisés par d'autres macrophages par un processus dit d'efférocytose. Il a été montré que la bactérie est encore viable lors de l'apoptose et que le processus d'efférocytose est requis pour une activité microbicide optimale (Martin *et al.*, 2012). Enfin, il est important de noter que le type de mort cellulaire est fortement influencé par d'autres facteurs endogènes, notamment les médiateurs lipidiques inflammatoires de type eicosanoïdes, comme la prostaglandine E2 (PGE2), pro-apoptotique, et la lipoxine A4 (LXA4), favorisant la nécrose (Chen *et al.*, 2008) (**Figure 9**).

(b) Les neutrophiles

Le rôle des neutrophiles dans la TB est encore controversé. Certaines études suggèrent un rôle préjudiciable pour l'hôte de ces cellules dans la pathologie tuberculeuse, notamment lorsque l'on compare la réponse des neutrophiles entre des souris génétiquement résistantes ou non à l'infection par *Mtb*. En effet, des souris sensibles à *Mtb* accumulent davantage de neutrophiles dans les poumons que des souris résistantes. Compte tenu de la faible capacité des neutrophiles à contrôler l'infection, cette accumulation entraînerait plutôt un développement de l'infection au détriment de l'hôte (Eruslanov *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que chez des patients ayant une TB active, les difficultés respiratoires et la mortalité sont associés à un excès du taux circulant de neutrophiles dans le sang (Barnes *et al.*, 1988; Lowe *et al.*, 2013). Cependant, d'autres études ont démontré que les neutrophiles présents dans les poumons contribuaient à l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs, conduisant à une meilleure initiation de la réponse Th1, pro-inflammatoire, par les DCs (Blomgran and Ernst, 2011).

(c) Les facteurs solubles

En plus des cellules immunitaires et phagocytaires en particulier, des facteurs solubles contribuent à la mise en place de la réponse innée suite à l'infection par *Mtb*. Parmi ceux-ci, un facteur clé de protection est la cytokine TNF- α . Des études cliniques ont mis en évidence chez des patients qu'il existe une association entre un polymorphisme du gène codant pour le TNF- α et une susceptibilité accrue à la TB (Yi *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que des patients suivant un traitement thérapeutique basé sur l'utilisation d'anticorps anti-TNF-

α , comme ceux utilisés dans le traitement de colites ulcéreuses comme la maladie de Crohn ou d'arthrite rhumatoïde, présentent un risque plus fort de réactiver une TB latente (Lee *et al.*, 2016). Chez la souris, une inactivation génétique ou par le biais d'anticorps du récepteur du TNF- α induit une forte mortalité des animaux après infection par *Mtb*, avec une augmentation de la charge bactérienne ainsi qu'une plus forte nécrose aux niveaux des granulomes (Flynn *et al.*, 1995). Le TNF- α peut être produit par de nombreux types cellulaires, dont les macrophages, les neutrophiles, les DCs et les lymphocytes T, et possède des fonctions multiples (Pasparakis *et al.*, 1996). Hormis ses propriétés pro-inflammatoires et activatrices d'autres cellules immunitaires, comme notamment les macrophages, le TNF- α joue un rôle prépondérant dans la mise en place de la structure granulomateuse, dont il assure la maintenance et l'intégrité (Bean *et al.*, 1999; Chakravarty *et al.*, 2008). Une déficience en production de TNF- α conduit à la formation de granulomes caractérisé par une forte nécrose, faisant perdre son intégrité à la structure et favorisant la dissémination bactérienne dans l'organisme.

La vitamine D est également un facteur important dans la réponse immunitaire anti-tuberculeuse. Avant l'essor des antibiotiques, la vitamine D était utilisée afin de combattre la maladie chez les patients tuberculeux (Martineau *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'une carence en vitamine D est associée avec un risque plus élevé de développer une TB active (Martineau *et al.*, 2011) et qu'un polymorphisme du récepteur de cette vitamine accroît également la prédisposition à la pathologie (Raghavan *et al.*, 2012). On peut attribuer de nombreuses fonctions régulatrices et inflammatoires à la vitamine D, notamment dans son rôle synergique avec l'IFN γ , conduisant à une meilleure activation des macrophages en induisant une maturation phagosomale et une autophagie plus fortes (Fabri *et al.*, 2011). La vitamine D est également nécessaire pour la production de cathélicidine par les macrophages, un peptide antimicrobien contribuant à restreindre la croissance bactérienne en agissant directement sur la bactérie ou par l'intermédiaire de l'induction de l'autophagie (Liu *et al.*, 2006; Yuk *et al.*, 2009).

(C) La réponse immunitaire adaptative

(a) Rôles des lymphocytes et des DCs

La réponse immune protectrice nécessaire au contrôle de l'infection par *Mtb* dépend de l'action des lymphocytes T CD4⁺. Des études réalisées chez la souris ont montré qu'en

absence de lymphocytes T CD4⁺ (par exemple chez des souris déficientes pour la molécule CMH-II), les animaux développent des charges bactériennes plus fortes et succombent à la maladie plus précocement que des animaux contrôles (Orme *et al.*, 1993). Les lymphocytes T CD8⁺ contribuent également à la réponse contre le pathogène, notamment *via* leur production d'IFN γ qui amplifie l'activation des macrophages en renforçant leur activité microbicide. Cependant ces cellules ne peuvent pas compenser une déficience en lymphocytes TCD4⁺ (North and Jung, 2004). Enfin, des cellules T non conventionnelles comme les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les NKT, peuvent reconnaître des antigènes lipidiques de *Mtb* mais leur rôle exact dans l'immunité anti-tuberculeuse reste encore à élucider totalement (Godfrey *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 1995).

De par leurs facultés de présentation antigénique pour l'initiation de la réponse lymphocytaire T dans le ganglion drainant, les DCs ont un rôle prépondérant dans la réponse immune anti-tuberculeuse. L'apprêtement des antigènes mycobactériens sur les molécules de CMH-II par les DCs résulte de l'acquisition des protéines antigéniques *via* différentes sources. D'une part, l'incorporation des corps apoptotiques de macrophages et neutrophiles préalablement infectés constitue une source exogène d'antigènes (Blomgran *et al.*, 2012); d'autre part en phagocytant la bactérie elle-même, les DCs expriment de façon endogène les antigènes mycobactériens (Tailleux *et al.*, 2003). Une fois activées, les DCs migrent vers les ganglions lymphatiques médiastinaux sous l'action de chimiokines, en particulier CCL19 et CCL21. Ces cellules activent alors les lymphocytes T CD4⁺ en les polarisant vers un phénotype pro-inflammatoire Th1 par l'intermédiaire de la sécrétion de l'interleukine (IL)-12p70. Une fois activés, les lymphocytes Th1 migrent vers les poumons afin d'exercer leurs activités protectrices, notamment par la production d'IFN γ . L'ensemble du processus initié par l'entrée du pathogène et conduisant à l'arrivée des lymphocytes Th1 sur le site infectieux dure environ 3 semaines (**Figure 9**). Il n'y a pas encore d'explication établie sur ce délai inhabituel mais plusieurs mécanismes peuvent en être responsables. D'une part les capacités intrinsèques de la bactérie à inhiber l'apoptose des cellules phagocytaires comme les macrophages et les neutrophiles (Blomgran and Ernst, 2011), pourrait induire un moindre apprêtement antigénique par les DCs à partir des corps apoptotiques. D'autre part les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont susceptibles d'inhiber l'activation et la migration des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Shafiani *et al.*, 2010; Urdahl *et al.*, 2011). Enfin des cytokines

immunorégulatrices, telles l'IL-10, peuvent inhiber la production d'IFN γ par les cellules CD4⁺ dans les poumons (Redford *et al.*, 2010; Redford *et al.*, 2011) (**Figure 10**).

Le rôle des lymphocytes B dans la TB reste encore mal compris (Maglione and Chan, 2009). Il a été montré que des agrégats de cellules B formant des structures folliculaires sont observés dans les poumons de patient tuberculeux (Ulrichs *et al.*, 2004). Ces cellules B peuvent exercer une action inhibitrice sur le système immunitaire notamment par l'engagement de certains récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines, induisant une production d'IL-10 (Maglione *et al.*, 2008; Maglione *et al.*, 2007).

(b) La réponse Th1 : l'axe IL-12/IFN γ

L'induction de la réponse protectrice par les lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN γ contre *Mtb* est dépendante de l'IL-12 qui est principalement sécrétée par les DCs activées (Cooper *et al.*, 2011). Des associations entre des polymorphismes des gènes codant pour l'IL-12 ou l'IFN γ ont été associés avec une susceptibilité accrue à la TB (Boisson-Dupuis *et al.*, 2015; Thada *et al.*, 2016). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique codée par deux gènes, *IL-12A* (p35) et *IL-12B* (p40). Les formes actives générées suite à la synthèse protéique sont l'hétérodimère IL-12p70 et l'homodimère IL-12p40. Il a été montré que des souris qui ne peuvent pas produire d'IL-12p40 ne peuvent pas contrôler l'infection bactérienne (Cooper *et al.*, 1997). De plus, la production d'IL-12p70 est requise pour promouvoir et maintenir une réponse Th1 dans les poumons, et ainsi contenir l'infection (Feng *et al.*, 2005). Des études ont montré que les deux sous-unités p40 et p35 sont requises pour le contrôle de l'infection (Cooper *et al.*, 2002). Des souris déficientes en p40 sont plus susceptibles à l'infection, ce qui se traduit par une plus forte croissance bactérienne, une augmentation de la mortalité et une moindre réponse Th1 productrice d'IFN γ , comparé aux souris qui sont déficientes en p35, prouvant que l'IL-12p40 peut jouer un rôle protecteur tout comme la forme IL-12p70 (Holscher *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que la migration des DCs et l'activation des cellules CD4⁺ nécessitent l'IL-12p40 (Khader *et al.*, 2006). Une explication de ce résultat réside dans le fait que l'IL-12p40 a la capacité de former un complexe avec une autre cytokine, l'IL-23p19, de façon à former l'IL-23, fonctionnelle et impliquée dans la réponse immunitaire. Cependant des souris déficientes en IL-23p19 contrôlent bien l'infection bactérienne et ne présentent pas de réduction significative de la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ pulmonaires. En absence d'IL-12p70, l'IL-23 peut compenser la perte de

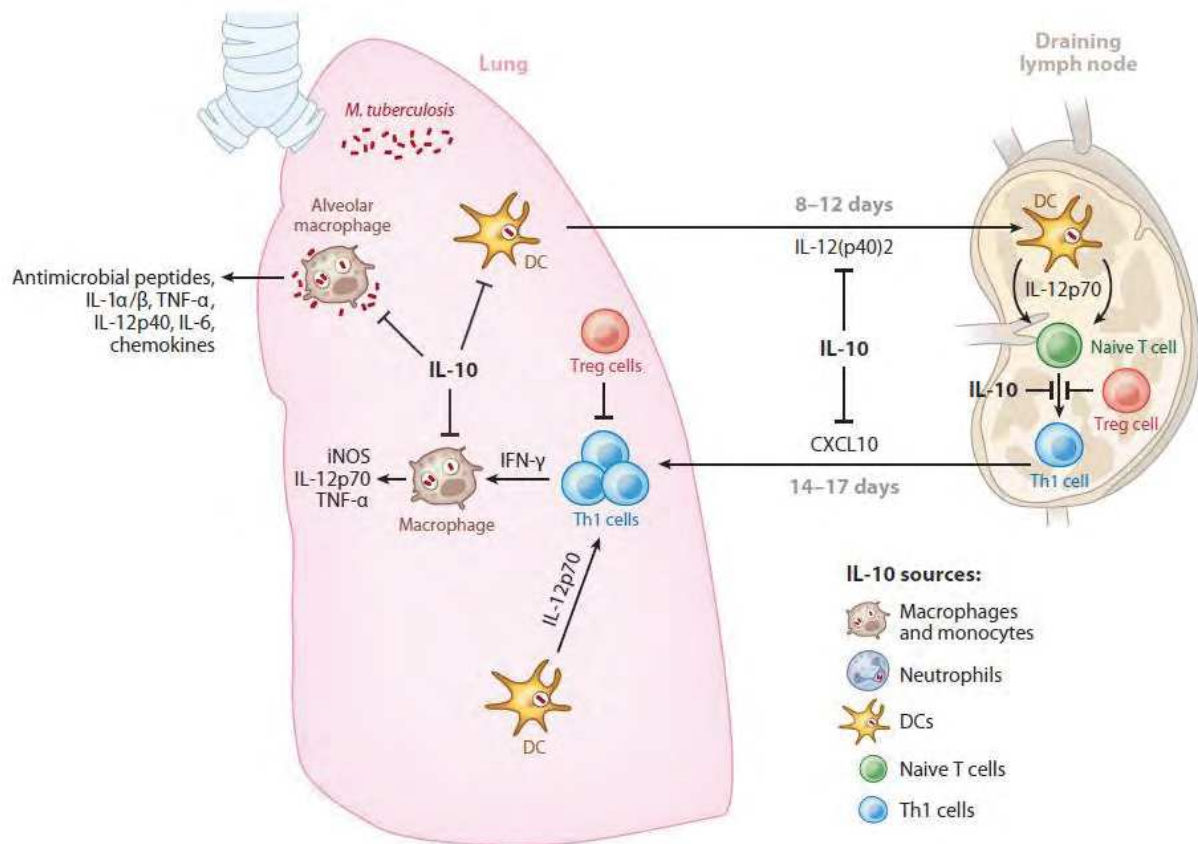


Figure 10/ Régulation de la réponse immunitaire durant l'infection par *Mtb*.

Suite à une infection par *Mtb*, différentes voies de régulations, qui servent normalement à limiter la pathologie chez l'hôte, peuvent de manière inappropriée promouvoir la persistance du pathogène. Deux facteurs prépondérants dans cette régulation sont les lymphocytes T régulateurs (Treg) et la cytokine immunosuppressive IL-10. La production d'IL-10 durant l'infection induit une inhibition des fonctions effectrices des macrophages, en réduisant leurs activités microbicides et en altérant leur sécrétion cytokinique. L'IL-10 peut aussi bloquer l'activité chimiotactique qui contrôle la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques. Au sein des ganglions, l'IL-10 et les Treg peuvent inhiber la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules productrices d'IFN γ Th1, notamment par des effets immunosuppresseurs directement exercés sur les DCs. De plus l'IL-10 peut également bloquer la migration des Th1 vers le poumon en inhibant l'action de CXCL10 (O'Garra et al., 2013).

génération des lymphocytes Th1 producteurs d'IFN γ mais cela reste insuffisant pour contrôler l'infection (Khader *et al.*, 2005). En conclusion, bien que l'IL-23 puisse partiellement compenser un défaut d'IL-12p70, cette cytokine n'apparaît pas essentielle dans le contrôle de la TB.

L'IL-12p70 est la cytokine majeure permettant l'induction de lymphocytes Th1 qui, suite à leur activation, migrent vers les poumons et produisent l'IFN γ . Cette cytokine est critique lors d'une infection à *Mtb*. En effet il a été montré que le niveau d'IFN γ dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) de patients atteints d'une TB sévère est élevé, alors qu'il chute lorsque la maladie a été convenablement traitée (Tsao *et al.*, 2002). L'IFN γ est connu pour agir sur de multiples processus immunitaires et métaboliques, notamment l'activation des macrophages, en induisant chez ces derniers l'expression de protéines comme iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) qui a, au moins chez la souris, une action protectrice forte contre la bactérie. Cette protéine est requise chez l'hôte afin de mieux contrôler le pathogène car elle permet la production d'oxyde nitrique (NO), un composé microbicide (MacMicking *et al.*, 1997). L'IFN γ est aussi crucial dans la maturation des phagosomes au sein des macrophages, en permettant à ceux-ci une acidification marquée jusqu'à un pH inférieur à 5,5, phénomène qui permet d'induire la fusion avec les lysosomes (Russell *et al.*, 2010b).

Si le TNF- α et l'IFN γ sont des cytokines essentielles au contrôle de l'infection par *Mtb*, leur surproduction induit des dommages tissulaires dans les poumons. Ainsi des mécanismes immunitaires permettent de prévenir l'instauration d'un état immunopathologique exacerbé. Ces mécanismes incluent principalement les Treg (Kursar *et al.*, 2007) et l'IL-10 (Redford *et al.*, 2011). Cette cytokine est exprimée par un grand nombre de cellules lors d'une infection à *Mtb*, dont les macrophages, les neutrophiles, les DCs ainsi que les lymphocytes B et T (Saraiva and O'Garra, 2010). C'est la balance entre l'expression de cette cytokine et celle du couple TNF- α /IFN γ qui conditionne pour beaucoup l'évolution de l'infection vers un contrôle du pathogène ou des dommages tissulaires pathologiques, caractéristiques de la TB. L'IL-10 agit en inhibant la présentation antigénique des macrophages et des DCs ainsi qu'en inhibant la production d'IL-12 par ces dernières, ce qui conduit à un défaut de développement de la réponse inflammatoire Th1 (Fiorentino *et al.*,

1991). De plus, l'IL-10 peut agir directement sur les macrophages en inhibant la production de TNF- α et de NO (Bogdan *et al.*, 1991).

Un autre mécanisme conduisant à limiter l'inflammation met en jeu les cellules T elles-mêmes qui peuvent s'autoréguler, notamment par l'expression de PD-1 (programmed cell death 1). PD-1 est un récepteur cellulaire qui s'exprime à la surface des lymphocytes T et B activés, et qui après reconnaissance de son ligand (PD-L1 et PD-L2) délivre un signal négatif en inhibant la prolifération et la production de cytokines (Keir *et al.*, 2008). PD-L1, qui interagit avec PD-1, est abondamment exprimé dans le sang de patient atteint d'une TB active comparé aux individus sains ou présentant une TB latente (McNab *et al.*, 2011).

(D) La réponse interféron de type I

(a) Présentation de la voie interféron de type I

Les interférons (IFN) de type I, comprenant majoritairement les IFN α et IFN β , sont des cytokines particulièrement connues pour leurs capacités antivirales. Cependant, les IFN α/β ont également une forte influence sur les réponses immunitaires innées et adaptatives faisant suite à des infections bactériennes ou d'autres pathogènes non viraux. Les IFN α/β agissent par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques (IFNAR ; *Interferon alpha and beta receptor*), conduisant à la transcription de différents gènes répondant aux IFN communément appelé ISG (*Interferon-stimulated genes*). Cependant la fonction exercée par ceux-ci peut être très variable d'une situation infectieuse à une autre, créant certaines controverses quant à un effet bénéfique ou au contraire délétère pour l'hôte (McNab *et al.*, 2015). Pratiquement toutes les cellules immunitaires sont capables de produire les IFN α/β , et cela fait généralement suite à une stimulation de divers PRR (*Pattern recognition receptors*) par des composants microbiens ou par des alarmines. Ces récepteurs peuvent être solubles ou membranaires. Lorsqu'ils sont membranaires ils sont situés soit à la surface cellulaire, soit dans des compartiments endosomaux. Ils peuvent reconnaître différents PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*), mais également l'ADN qui n'est généralement pas retrouvé au niveau du cytoplasme cellulaire. Parmi les PRR cytosoliques, RIG-I (*Retinoic acid inducible gene 1*) et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*) reconnaissent des ARNs étrangers. D'autres motifs nucléiques dans le cytosol sont reconnus par divers récepteurs comme les DAI (*DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors*) et cGAS (*Cyclic GMP-AMP synthase*) (Goubau *et al.*, 2013; Paijo *et al.*,

2016), mais aussi par les senseurs moléculaires NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain* receptors)¹ et NOD2, exprimés par de nombreux types cellulaires et conduisant à une production d'IFN α/β (Moreira and Zamboni, 2012). En plus de ces senseurs cytosoliques, les récepteurs membranaires comme les TLRs peuvent activer des voies moléculaires conduisant à la production d'IFN de type I. Le TLR4, reconnaissant le lipopolysaccharide des bactéries à Gram-négatif, est un puissant inducteur d'IFN α/β . Au niveau endosomal, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont également impliqués dans la production d'IFN de type I *via* leur reconnaissance des ARNs et d'ADN CpG non méthylé (Moynagh, 2005). Les diverses voies moléculaires induites convergent dans l'activation des IRF (*Interferon regulatory factors*), des facteurs de transcription permettant l'expression des gènes codant les IFN α/β . Les deux principaux IRF sont IRF3 et IRF7 (Tamura *et al.*, 2008). Le facteur NF- κ B est également requis en tant que co-facteur, notamment ses kinases IKK ϵ et TBK1 (*Tank-binding kinase 1*) pour induire la phosphorylation des IRF3 et 7. Les senseurs d'ARNs cytosoliques RIG-I et MDA5 induisent une signalisation par l'intermédiaire des protéines mitochondriales MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) pour activer TBK1, alors que pour la reconnaissance de l'ADN présent dans le cytoplasme, c'est principalement cGAS qui, suite à la reconnaissance de l'ADN, génère du c-di-AMP (*Cyclic diadenylate monophosphate*) qui est reconnu par STING (*Stimulator of interferon genes*), conduisant à l'activation de TBK1 et IRF3 (Watson *et al.*, 2015). En ce qui concerne les TLRs, leur signalisation est médiée par TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) (pour TLR3 et 4) et par Myd88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) pour tous TLR sauf TLR3, ce qui conduit à l'activation des IRF soit directement, ou bien par l'intermédiaire de NF- κ B (McNab *et al.*, 2015) (**Figure 11**).

Les IFN de type I induisent des voies de signalisation *via* leur reconnaissance par les récepteur hétérodimérique composés des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. La reconnaissance par le récepteur induit l'activation des protéines kinases JAK1 (*Janus kinase 1*) et TYK2 (*Tyrosine kinase 2*) qui phosphorylent les protéines STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)¹ et STAT2, conduisant à la dimérisation de ces deux molécules, lesquelles sont transloquées au noyau afin de s'associer à IRF9, formant le complexe ISGF3 (*Interferon-stimulated gene factor 3*). Ce complexe agit en tant que facteur transcriptionnel de nombreux gènes de réponse à l'IFN (ISG) (Ivashkiv and Donlin, 2014). Cette voie dite « canonique » n'est pas la seule par laquelle les IFN α/β peuvent signaler. En effet, ils

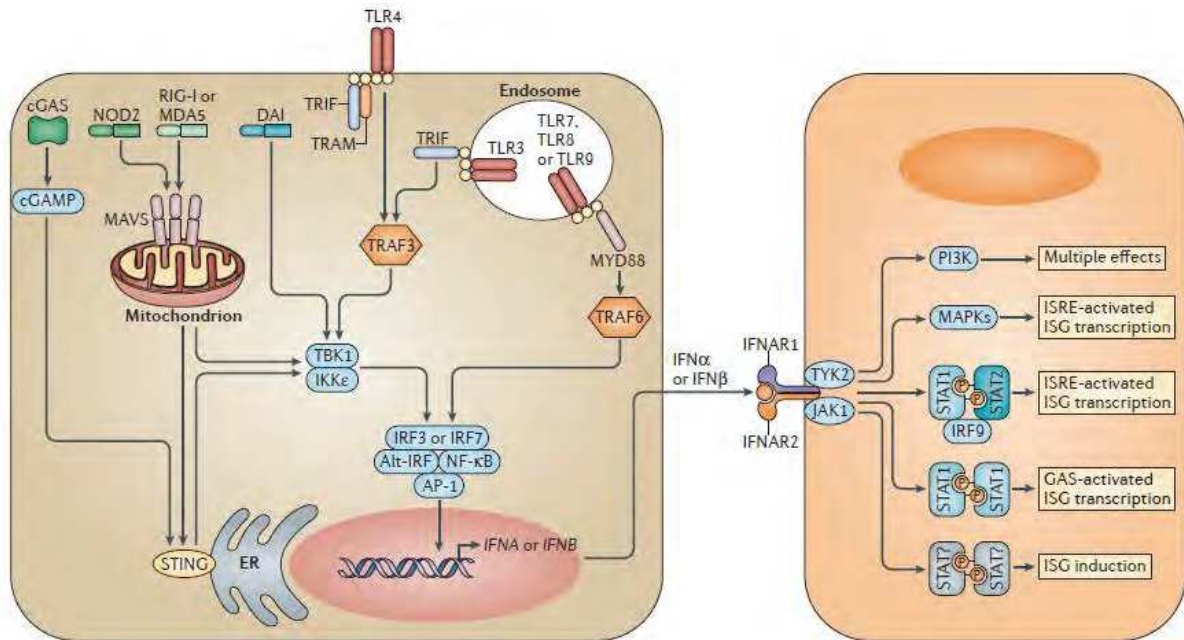


Figure 11/ Voies moléculaires de la réponse aux IFN de type I

La reconnaissance de composés microbiens par des récepteurs solubles ou membranaires, incluant les TLRs et RIG-I, conduit, par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation, à l'induction des gènes codants pour les IFN de type I. Lorsque l'IFN se lie à son récepteur spécifique IFNAR, de multiples voies de signalisation menant à de nombreux effets biologiques sont induites. Une fois dans le noyau, le complexe ISGF3 (STAT1-STAT2-IRF9) se lie à des séquences ISRE au niveau du promoteur des gènes cibles conduisant à la transcription de nombreux gènes de réponse à l'IFN (ISGs). Les IFN de type I peuvent aussi signaler par l'intermédiaire de l'homodimère STAT1, qui est plus généralement associé avec la réponse à l'IFN γ . D'autres hétérodimères de STAT sont également impliqués, comme STAT3, STAT4, et STAT5. D'autres voies moléculaires, n'impliquant pas la voie JAK/STAT peuvent être activés, incluant les MAPK et la PI3K (McNab et al., 2015).

peuvent aussi induire des voies de signalisation alternative *via* l'activation d'un homodimère de STAT1, ou bien par l'intermédiaire d'autres protéines STAT comme STAT3, STAT4, et STAT5. Enfin, cela peut également faire intervenir la kinase PI3K et diverses MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) qui sont activées suite à la reconnaissance de l'IFN par IFNAR. Cette diversité de modes de signalisation permet d'influer sur la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse antivirale, mais également sur la transcription de beaucoup de cytokines, chimiokines, peptides antimicrobiens, et molécules pro- ou anti-apoptotiques, conduisant à des modulations fortes de la réponse immunitaire au sens large (McNab *et al.*, 2015) (**Figure 11**).

(b) Rôle dans l'infection à *Mtb*

Différentes études réalisées chez l'homme et la souris mettent en avant un rôle plutôt délétère des IFN α/β lors d'inflammations chroniques en général, et de la TB en particulier (McNab *et al.*, 2015; O'Garra *et al.*, 2013). Par exemple l'hyper-virulence de certaines souches de *Mtb* est corrélée à une augmentation de la production d'IFN de type I. Une instillation directe d'IFN α/β dans les poumons durant l'infection s'avère aussi délétère pour l'hôte (Manca *et al.*, 2001; Manca *et al.*, 2005; Ordway *et al.*, 2007; Stanley *et al.*, 2007). Ces résultats sont en accord avec des études cliniques qui ont révélé que des patients atteints de TB active présentent une signature transcriptionnelle exacerbée de gènes de réponses à l'IFN de type I (ISG) dans les cellules du sang périphérique, les neutrophiles en particulier (Berry *et al.*, 2010; Ottenhoff *et al.*, 2012). Enfin, chez la souris, la déplétion du gène codant une MAPK (MAPK8), un régulateur négatif de la production d'IFN I, on observe une augmentation de la production d'IFN α/β associée à une plus grande charge bactérienne pulmonaire après infection. Ce phénotype est associé avec une augmentation du niveau d'IL-10 et à une diminution de la production d'IL-12. De façon intéressante, ce phénotype ne se manifeste plus lorsque les souris présentent une double inactivation de MAPK8 et du récepteur à l'interféron IFNAR1 (McNab *et al.*, 2013). Les mécanismes impliqués dans cette exacerbation de la pathologie par l'IFN de type I ne sont pas encore entièrement compris et semblent être multifactoriels. Il a été montré que la signalisation relative à l'IFN de type I peut réguler négativement la production de iNOS par les cellules myéloïdes pulmonaires (Mayer-Barber *et al.*, 2011). De plus, des études ont mis en évidence qu'un des mécanismes d'action immunosuppresseur des IFN α/β durant une infection à *Mtb* serait de

rendre les cellules immunes moins sensibles à l'IFN γ (McNab *et al.*, 2014), phénomène se traduisant, notamment chez les macrophages, par une inhibition de la capacité des cellules à restreindre la croissance bactérienne (Teles *et al.*, 2013). Enfin, le fait que les IFN α/β induisent une augmentation de l'IL-10 tout en inhibant l'IL-12 serait un paramètre qui aurait pour conséquence une inhibition de la réponse CD4⁺ Th1, centrale dans le contrôle de l'infection (Ordway *et al.*, 2007). Au final, bien qu'il ait été montré que la production de cytokines comme l'IL-12p70, est inhibé par l'IFN de type I durant une infection à *Mtb*, le mécanisme de cette suppression n'est pas clair et pourrait impliquer une inhibition résultant de la forte expression d'IL-10, de la moindre sensibilité des cellules à répondre à l'IFN γ ou bien encore de l'action de certains régulateurs négatifs induit par l'IFN de type I comme PRMT1 (*Protein arginine N-methyltransferase 1*) qui module l'action de certaines protéines en induisant la méthylation de résidus arginines présents sur celles-ci.

En conclusion, les IFN de type I peuvent considérablement influencer et moduler la réponse immunitaire induite par l'infection *Mtb* et représentent de ce fait un facteur déterminant dans le contrôle de la pathologie tuberculeuse (**Figure 12**).

2/ Reconnaissance de la bactérie par l'hôte

(A) Les PRRs

Suite à une infection par *Mtb*, la bactérie est reconnue par de nombreux récepteurs exprimés à la fois au niveau des cellules, mais aussi présents en tant que facteurs solubles dans la circulation. Parmi les récepteurs membranaires, les TLRs, les récepteurs scavengers (SR) et les lectines de type-C (CLRs) sont les principales familles de récepteurs impliqués dans la reconnaissance de la bactérie. D'autre part un certain nombre de récepteurs solubles et de senseurs intracellulaires sont également impliqués dans cette reconnaissance.

(a) Les TLRs

Les TLRs représentent une famille de protéines possédant des répétitions riches en leucine, qui reconnaissent des déterminants microbiens, les PAMPs, partagés par de nombreux types d'agents pathogènes. Chaque TLR peut reconnaître spécifiquement un ou plusieurs PAMPs. Suite à la reconnaissance de la bactérie, une cascade de signalisation est déclenchée. Celle-ci est initialement débutée par le recrutement de Myd88 au niveau du domaine intracellulaire du TLR et est commune à tous les TLR (à l'exception de TLR3). Myd88 sert par la suite de

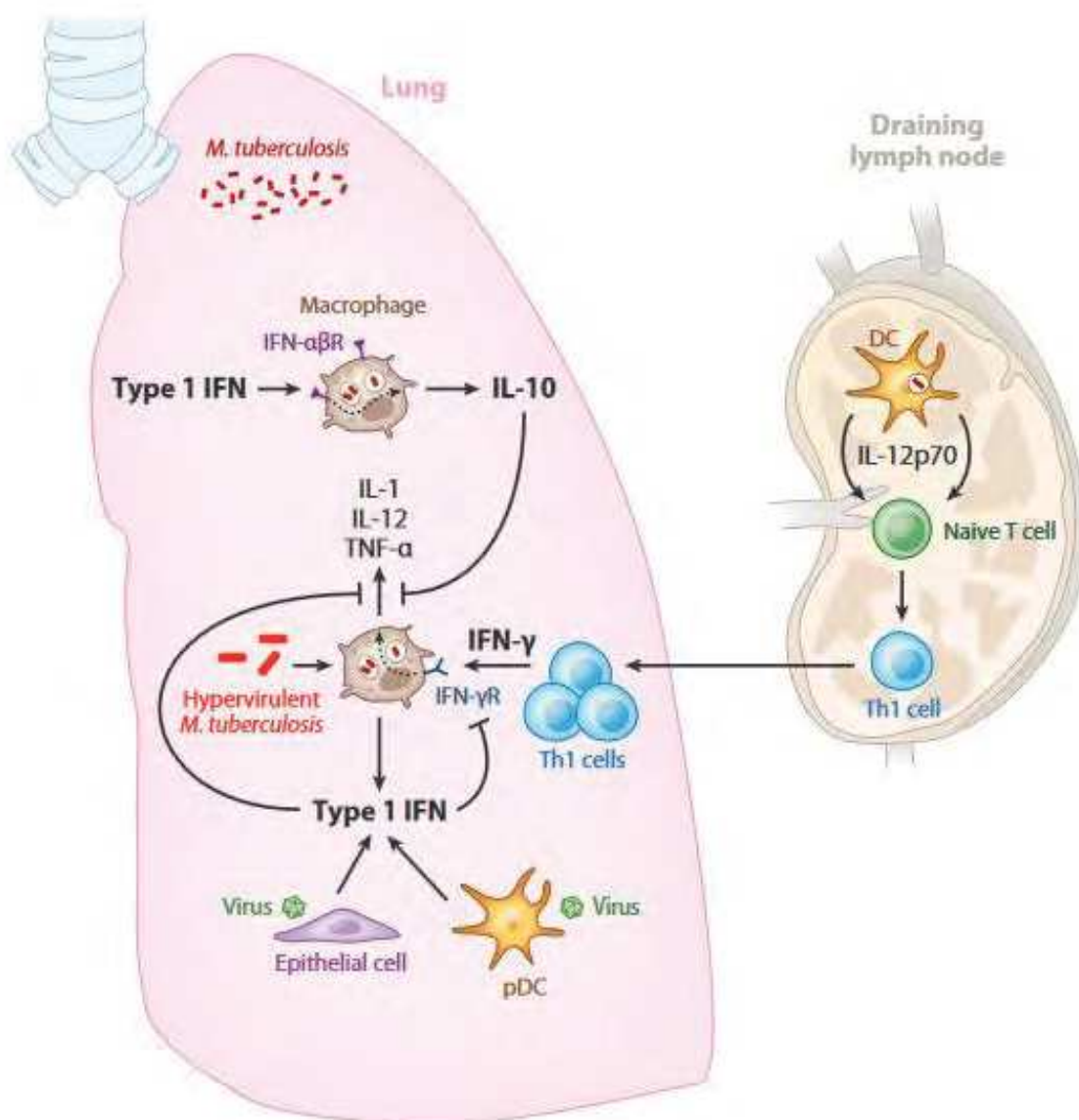


Figure 12/ Influence des IFN de type I sur la réponse à *Mtb*

La production à haute dose d'IFN de type I par les macrophages peut être induite par une infection à *Mtb*, en particulier par certaines souches hypervirulentes. De plus, des infections virales séparées peuvent conduire à la production d'IFN de type I par d'autres cellules comme les DCs plasmacytoides et les cellules épithéliales. Les IFN α/β présents dans le micro-environnement inhibent les macrophages, en particulier leur production de cytokines protectrices de l'hôte comme l'IL-12 et le TNF- α , *via* leur signalisation induite par l'interaction avec leur récepteur IFNAR. Les IFN de type I peuvent aussi induire la production d'IL-10 par les macrophages, ce qui inhibe la production d'IL-12 et de TNF- α . De manière intéressante, les IFN α/β sont capables d'inhiber l'activation des macrophages par les lymphocytes Th1 en diminuant leur capacité à répondre à l'IFN γ (O'Garra et al., 2013).

protéine chaperonne pour le recrutement de IRAK (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*), TRAF (*TNF receptor associated factor*), TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) et MAPK. Cette signalisation aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui est alors transloqué dans le noyau afin d'induire l'expression de ses gènes cibles (Akira and Takeda, 2004) (**Figure 13**). Cette voie de signalisation conduit à la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-12. Dans un contexte tuberculeux, il a été montré que la bactérie est principalement reconnue par le TLR2, bien que les TLR4 et TLR9 pourraient également être impliqués (Basu *et al.*, 2012). *Mtb* exprime de nombreux déterminants pouvant interagir avec le TLR2 et induire la voie de signalisation Myd88. Parmi ceux-ci on compte par exemple les lipoprotéines membranaires et sécrétées par la bactérie LpqH, LprA, et LprG (Brightbill *et al.*, 1999; Gehring *et al.*, 2004; Pecora *et al.*, 2006). Le TLR2 peut aussi interagir avec le lipomannane (Quesniaux *et al.*, 2004) et les PIMs présents sur la mycomembrane (Gilleron *et al.*, 1997). La liaison de ces composés avec le TLR2 induit la production de peptides antimicrobiens comme la cathélicidine par les macrophages ainsi qu'une meilleure résistance à l'infection de manière générale (Liu *et al.*, 2006).

A l'instar du TLR2, le TLR4 induit une signalisation par Myd88 après reconnaissance de PAMPs définis, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le TLR4 peut aussi activer une voie indépendante de Myd88 et utilisant la molécule TRIF. Cette voie induit l'activation d'une série de gènes qui régulent la réponse immunitaire comme l'IFN β (Akira *et al.*, 2001). Dans des études *in vitro*, il a été montré que le TLR4 est susceptible d'interagir avec les protéines HSP65 et HSP70 de *Mtb* (Bulut *et al.*, 2005), ainsi qu'avec des protéines chaperonnes produites par la bactérie comme Cpn (*Chaperonin family*) 60.1 et Cpn60.2 (Cehovin *et al.*, 2010). Bien que plusieurs molécules ont été démontrées comme activatrices du TLR4 *in vitro*, le ligand reconnu durant une infection mycobactérienne *in vivo* reste inconnu. De plus, les études *in vivo* ont abouti à des résultats divergents concernant l'importance de ce récepteur dans le contrôle de l'infection à *Mtb*. Certaines ont pu établir que des souris déficientes en TLR4 ne présentent pas de susceptibilité particulière à l'infection (Reiling *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2003), alors que d'autres ont montré que ce récepteur est nécessaire au contrôle de la bactérie (Abel *et al.*, 2002). Au vu

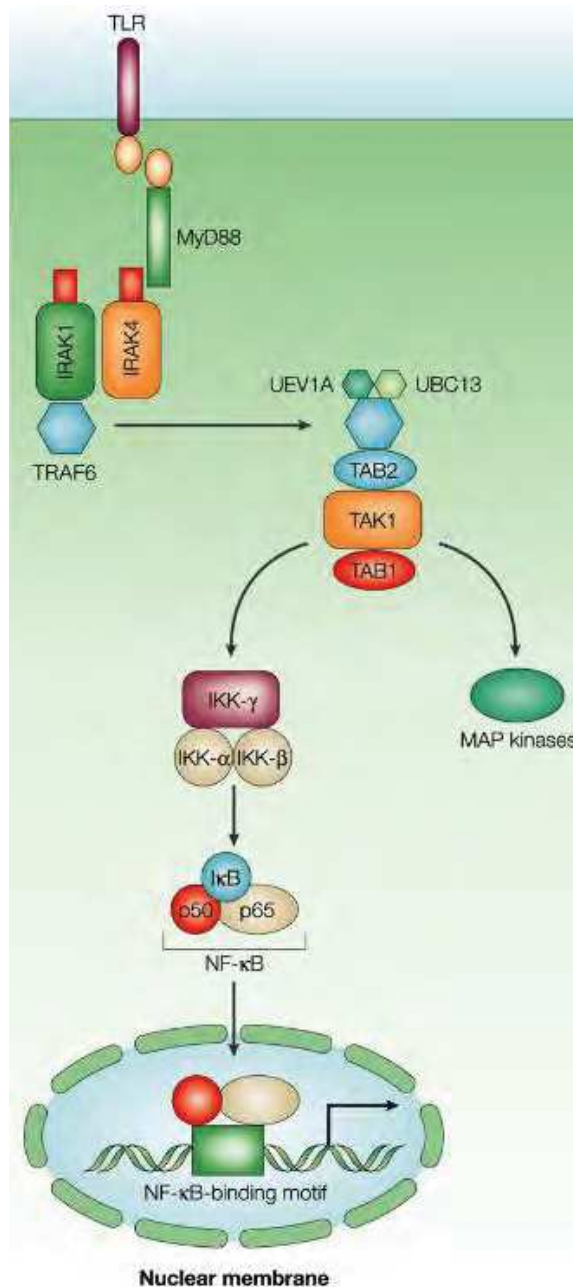


Figure 13/ Voie de signalisation induite après une reconnaissance par un TLR

La stimulation des TLRs permet le recrutement de Myd88, qui à son tour induit le recrutement d'IRAK4 provoquant l'association ultérieure avec IRAK1 et sa phosphorylation. TRAF6 est par la suite recruté par IRAK1 phosphorylé, cela induit son activation, provoquant sa dissociation du complexe avec le récepteur pour former un nouveau complexe avec TAK1, TAB1 et TAB2. Cela conduit à la phosphorylation de TAB2 et TAK1. IRAK1 se retrouve dégradé permettant la libération du complexe (TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2) dans le cytosol de la cellule, où il s'associera avec UBC13 et UEV1A. Suite à cela, TRAF6 est ubiquitinylé, ce qui induit l'activation en aval de TAK1, qui à son tour, phosphoryle à la fois des MAPK et le complexe IKK (IKK α -IKK β -IKK γ). Ce complexe phosphoryle ensuite I κ B, se traduisant par son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Ceci permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B qui induit l'expression de ses gènes cibles (Akira and Takeda, 2004).

des données actuelles il est difficile de se prononcer quant à l'impact réel de ce TLR dans la pathologie tuberculeuse ou l'immunité anti-tuberculeuse.

En ce qui concerne le TLR9, c'est un TLR intracellulaire présent à la membrane endosomale qui est décrit comme un récepteur pour les motifs CpG de l'ADN bactérien, incluant celui de *Mtb*. La reconnaissance de l'ADN de la bactérie par ce TLR induit une production de TNF- α par les macrophages (Kiemer *et al.*, 2009). Les souris déficientes en TLR9 sont plus sensibles à l'infection que les souris sauvages (Kiemer *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que des BMDMs (*Bone marrow derived macrophages*) dépourvus de TLR9 infectés par *Mtb* produisent moins d'IL-12p40 que des BMDMs issus de souris sauvages. Des cellules dépourvues à la fois de TLR9 et TLR2 ne produisent plus d'IL-12p40, renforçant l'idée que ces deux TLRs peuvent agir en coopération dans la génération d'une réponse Th1 optimale nécessaire à un contrôle adéquat d'une infection à *Mtb* (Bafica *et al.*, 2005). Cependant, des souris triplement inactivées pour TLR2, TLR4 et TLR9 ne présentent pas de susceptibilité particulière à l'infection (Holscher *et al.*, 2008). En conclusion, le rôle exact des TLR2, 4 et 9 dans l'immunité anti-tuberculeuse est encore mal compris : des redondances avec d'autres voies de signalisation pourrait expliquer l'absence de phénotype des souris triple-KO ; des différences entre l'homme et la souris pourraient également être invoquées.

(b) Les récepteurs scavengers(SRs)

Les SRs sont exprimés à la surface des cellules phagocytaires, mais peuvent également être sécrétés dans le milieu extérieur pour certains d'entre eux. Les SRs reconnaissent de nombreux ligands et ont des fonctions très diverses au sein du système immunitaire (Canton *et al.*, 2013). Certains sont impliqués dans la reconnaissance de *Mtb*, comme CD36, MARCO (*Macrophage receptor with collagenous structure*), le récepteur scavenger A (SRA), et AIM (*Absent in melanoma*)(Killick *et al.*, 2013).

Le CD36 est exprimé largement par les monocytes, macrophages et DCs. Il reconnaît le ManLAM présent sur la paroi de la bactérie, induisant une augmentation de l'expression de TNF- α par les macrophages (Jozefowski *et al.*, 2011).

MARCO est, quant à lui, exprimé uniquement dans les macrophages et son expression est augmentée suite à une infection bactérienne (Kraal *et al.*, 2000). Il a été suggéré dans une étude que ce récepteur peut lier le TDM présent sur la mycobactérie et agir par la suite en

tant que co-récepteur avec le TLR2 afin de promouvoir la réponse pro-inflammatoire induite par la cellule suite à l'infection (Bowdish *et al.*, 2009).

Concernant SRA, c'est un récepteur scavenger qui est capable de lier et d'internaliser des ligands mycobactériens, il intervient comme pour MARCO dans la reconnaissance du TDM conduisant à une augmentation de la production de TNF- α par les macrophages. Les souris doublement déficientes en MARCO et SRA présentent un défaut élevé de production de TNF- α en réponse au TDM mycobactérien (Bowdish *et al.*, 2009).

Enfin, AIM est quant à lui un récepteur sécrété par les macrophages, originalement décrit comme un facteur de survie cellulaire. Il a été montré récemment qu'il était impliqué dans la reconnaissance bactérienne (Martinez *et al.*, 2014). Le niveau d'AIM dans le sérum est augmenté chez les souris préalablement infectées par *Mtb*. AIM favorise la survie de la cellule et inhibe la croissance bactérienne en promouvant notamment le processus d'autophagie (Sanjurjo *et al.*, 2013).

(c) Les senseurs intracellulaires

Mtb a longtemps été considéré comme un pathogène uniquement vacuolaire. Des études récentes ont cependant pu établir que la bactérie est capable de s'échapper du phagosome pour rejoindre le cytoplasme de la cellule (Simeone *et al.*, 2012) (Simeone *et al.*, 2015). De ce fait, la bactérie peut être reconnue par des senseurs intracellulaires, comme les protéines riches en motif LRR (Leucine rich repeat) telles que NODs et AIM2 (Briken *et al.*, 2013; Killick *et al.*, 2013) ou encore des senseurs cytosoliques important dans l'induction de la réponse aux IFN de type I comme cGAS (Majlessi and Brosch, 2015).

Les NODs représentent une famille de récepteurs cytoplasmiques composée de plus de 20 PRRs différents. Il a été montré que NOD1 et NOD2 peuvent reconnaître le peptidoglycane contenu dans la paroi des bactéries et induire une activation du facteur de transcription NF- κ B, conduisant à une production de cytokines pro-inflammatoires (Kanneganti *et al.*, 2007). Dans un contexte d'infection à *Mtb*, il a été montré que NOD2 peut reconnaître le mycolylarabinogalactane-peptidoglycane (MDP) de la mycomembrane, et que des macrophages issus de souris déficientes en NOD2 produisent moins de TNF- α , d'IL-12p40 et de NO que des macrophages issus de souris sauvages après une infection par *Mtb* (Gandotra *et al.*, 2007). De plus, une étude a montré que le traitement de macrophages alvéolaires

humains avec du MDP leurs permet de mieux contrôler une infection à *Mtb*, notamment grâce à une augmentation de la production de TNF- α mais aussi en induisant plus fortement l'autophagie (Juarez *et al.*, 2012).

Lors de l'infection, il a été montré que l'ADN de *Mtb* co-localise avec le senseur d'ADN double brin AIM2 dans les cellules ayant internalisé la bactérie (Saiga *et al.*, 2012). AIM2 est connue pour être un fort inducteur de l'inflammasome. Celui-ci est un complexe protéique important dans l'immunité innée car il peut, suite à la reconnaissance de divers signaux de dangers, promouvoir et renforcer l'état inflammatoire global par la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18. Ce processus induit une plus forte activation des cellules immunitaires, notamment en renforçant les fonctions microbicides du système immunitaire (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009). Il a été montré que des souris déficientes en AIM2 présentent un défaut de production d'IL-1 β et d'IL-18 associé à une augmentation de la charge bactérienne ainsi qu'à une moindre survie de l'animal suite à l'infection par *Mtb* en comparaison aux souris sauvages (Saiga *et al.*, 2012).

Des études récentes ont mis en évidence que le senseur cytosolique cGAS est capable de reconnaître l'ADN mycobactérien, conduisant à une induction d'IFN- β et de l'autophagie dans des macrophages infectés par *Mtb in vitro*. De plus lorsque des souris déficientes en cGAS sont infectées par des souches virulentes de *Mtb*, il en résulte une réduction du taux sérique d'IFN- β (Collins *et al.*, 2015) par rapport aux souris sauvages. Cependant, bien qu'il n'y a pas de différence de charge bactérienne aux niveaux des poumons, ces souris présentent une plus forte mortalité dans des phases d'infections longues comparé aux souris sauvages (Collins *et al.*, 2015). Un point intéressant à soulever est que la bactérie a besoin d'un système de sécrétion ESX-1 actif pour pouvoir se retrouver dans le cytosol, ce qui implique que l'ADN mycobactérien qui est reconnu par cGAS est issu de bacilles vivants. Comment l'ADN bactérien se retrouve dans le cytosol au contact de cGAS, et par quel moyen la bactérie va pouvoir excréter cet ADN sans pour autant en mourir, sont des questions qui nécessitent plus amples investigations dans le futur (Majlessi and Brosch, 2015).

(B) Les lectines de type C (CLRs)

Les CLRs sont des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de ligand glycosylés, faisant de ceux-ci une famille de récepteur centrale dans la reconnaissance microbienne incluant

Mtb dont la paroi est riche en motif glycosylés. Les CLR sont des protéines composées de motifs structuraux conservés dit CTLD (*C-type lectin-like domain*), formés de deux ou plusieurs protéines s'agencant en boucle, reliées entre elles par des ponts disulfure (Drickamer, 1999; Zelensky and Gready, 2005). Les CLR possèdent un domaine de reconnaissance des sucres (CRD; *Carbohydrate recognition domain*), conférant les propriétés de liaisons aux ligands et nécessitant la présence d'ions Ca^{2+} pour pouvoir être fonctionnels (d'où la terminologie "type C" de ces récepteurs). Les CRD contiennent 4 sites de liaisons au calcium. Les sites contiennent 3 acides aminés composés de deux acides aminés chargés de chaque côté séparé par un acide aminé simple de type proline. En présence de calcium, les acides aminés chargés interagissent avec le calcium, conduisant à la génération de liaison hydrogène avec les motifs glycosylés. La spécificité de la liaison est déterminée par les deux acides aminés entourant la proline. Par exemple un site EPN (Glu-Pro-Asn) conduit plutôt à une reconnaissance de ligands mannosylés, alors qu'un site QPD (Gln-Pro-Asp) est un motif conférant plus d'affinité pour les ligands galactosylés (Zelensky and Gready, 2005).

Mtb peut interagir avec un nombre important de lectines exprimées de manière préférentielle à la membrane des cellules immunitaires comme DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), le récepteur au mannose (MR), Dectin-1, et Mincle (*Macrophage inducible Ca^{2+} -dependent (C-type) lectin*). De plus *Mtb* peut être reconnu par des CLR solubles comme MBL (*Mannose binding lectin*), la ficoline-2, les protéines du surfactants SP-A et SP-D, ainsi qu'une nouvelle lectine CL-LK (*Collectin liver kidney*), faisant l'objet de cette étude et qui sera plus détaillée dans la suite du manuscrit.

(a) Les CLR solubles

Les CLR solubles exercent deux grands types de fonctions. D'une part, ils peuvent opsoniser les pathogènes de façon à faciliter leur phagocytose par les cellules immunitaires. D'autre part ils permettent l'activation de la cascade du complément. Contrairement à la voie classique d'activation de cette cascade qui dépend de la présence d'anticorps, la voie dite des lectines fait intervenir des CLR solubles qui reconnaissent des sucres à la surface des pathogènes. Cette interaction initiale conduit à une reconnaissance par les molécules MASP (*Mannose-associated serine protease*)¹ et MASP2, responsables de l'activation de la cascade du complément (Bajic *et al.*, 2015; Ricklin *et al.*, 2016). Plusieurs études suggèrent fortement

que MBL et la ficoline-2 ont une action dans la TB par l'intermédiaire de l'activation de cette cascade du complément. Il a été montré qu'un polymorphisme des gènes codants pour MBL et la ficoline-2 représente un facteur de susceptibilité à la TB (Chen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). La MBL et la ficoline-2 peuvent reconnaître directement *Mtb*, induisant l'activation du complément par la voie des lectines, mais également se traduisant par une agglutination de la bactérie favorisant sa phagocytose par les macrophages (Bartłomiejczyk *et al.*, 2014). Ce processus de phagocytose améliorée chez le macrophage par la ficoline-2 permet de promouvoir son activation, conduisant à une plus grande production de TNF- α et de NO (Koral *et al.*, 1990).

En ce qui concerne les protéines du surfactant, un polymorphisme des gènes codants pour SP-A et SP-D est également associé à une susceptibilité accrue à la TB (Azad *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). SP-A joue un rôle direct dans le contrôle de la bactérie. Il a été montré que SP-A peut, une fois fixée sur la paroi de *Mtb*, induire une meilleure reconnaissance de la bactérie par les macrophages alvéolaires (Pasula *et al.*, 1997), conduisant à une phagocytose accrue du pathogène (Gaynor *et al.*, 1995), ainsi qu'à une plus grande production de NO et de médiateurs inflammatoires par la cellule (Weikert *et al.*, 2000). La SP-A a aussi un rôle dans l'expression d'autres CLR's importants dans la réponse à *Mtb*, comme notamment le MR, dont l'expression est significativement augmentée à la surface des macrophages de souris sauvages en comparaison aux macrophages issus de souris déficientes en SP-A (Beharka *et al.*, 2002). SP-D, quant à elle, se lie à *Mtb* via le ManLAM, conduisant à une agglutination du pathogène. Il a été montré que suite à cette interaction, les macrophages contrôlent plus efficacement la croissance du bacille en favorisant la maturation des phagosomes et la fusion de ceux-ci avec les lysosomes (Ferguson *et al.*, 2006). Cependant ce rôle est controversé car d'autres études ont pu mettre en évidence que SP-D induit également une inhibition de la phagocytose des macrophages (Ferguson *et al.*, 1999).

(b) Les CLR's membranaires

Les CLR's membranaires peuvent être subdivisés en 17 groupes classés sur des bases phylogénétiques et structurelles (Kharchenko *et al.*, 2005). Les lectines décrites dans la littérature comme pouvant interagir avec *Mtb* appartiennent au groupe II (liaison calcium-dépendante et comportant un seul CRD), au groupe V (liaison calcium-indépendante ne

comportant pas de CRD) et au groupe VI (liaison calcium-dépendante avec une multitude de CRDs) (**Tableau 4**). En se basant sur ce qui est connu de leur signalisation, ces CLR peuvent de nouveaux être subdivisés en 3 types. Certains signalisent *via* un motif ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) activateur connu pour induire une signalisation activatrice *via* la kinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*). D'autres utilisent un motif ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) inhibiteur connu pour permettre le recrutement de phosphatases comme SHP(*SH2-containing tyrosine-specific protein phosphatase*)1 et SHP2. Enfin, une dernière catégorie de CLR n'a pas de domaine caractéristique de type ITAM ou ITIM : c'est le cas du MR et de DC-SIGN (Sancho and Reis e Sousa, 2012). Les ITAM utilisés peuvent être localisés directement dans la partie cytoplasmique de ces récepteurs (comme Dectin-1) (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Rogers *et al.*, 2005), ou être apportés *via* l'interaction du CLR avec des molécules adaptatrices contenant l'ITAM comme le récepteur FcR γ ou DAP12 (*DNAX activation protein of 12 kDa*) (Hoving *et al.*, 2014) (**Figure 14**). L'activation des ITAM conduit dans les deux cas à l'activation de la tyrosine kinase Syk, laquelle peut phosphoryler et activer le complexe CARD9-Bcl10-MALT1 (*Caspase recruitment domain-containing protein 9-B-cell lymphoma 10-Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*). La signalisation de Dectin-1 et de certaines autres lectines fait également intervenir Raf-1, une voie moléculaire additionnelle qui est indépendante de Syk (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Dans tous les cas, ces voies de signalisations induisent l'activation de plusieurs molécules en aval incluant les MAPK et NF- κ B, ce qui se traduit par une activation de réponses cellulaires telles que la phagocytose, la maturation des DCs, et la production de médiateurs inflammatoires et cytokiniques (Drummond *et al.*, 2011; Strasser *et al.*, 2012). De plus, ces récepteurs peuvent également faciliter le développement de l'immunité adaptative, en particulier la réponse Th1 des cellules T CD4⁺ productrice d'IFN γ (Kerrigan and Brown, 2011). Alors que la signalisation *via* l'ITAM induit principalement une activation cellulaire, celle induite par les ITIM conduit plutôt à des fonctions inhibitrices. Par exemple DCIR, qui contient un ITIM dans sa queue cytoplasmique, peut recruter les phosphatase SHP1 et SHP2 qui, une fois phosphorylées et activées, inhibent d'autres voies cellulaires activatrices comme celles initiées en aval de l'activation des TLR8 et TLR9 par exemple (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Cependant le rôle et le mode de fonctionnement de ce récepteur

	CLR	Ligands	Ligand origin
Group II: Calcium-dependent CRD	Dectin-2	α -mannans O-linked mannobiose-rich glycoprotein	<i>M. tuberculosis</i> <i>S. mansoni</i> SEA <i>C. albicans</i> <i>Malassezia</i> spp. HDM allergens
	CLECSF8	TDM	<i>M. bovis</i> <i>K. pneumonia</i>
	Mincle	α -mannose mannitol-linked glyceroglycolipid mannosyl fatty acids TDM	<i>M. tuberculosis</i> <i>C. albicans</i> <i>Malassezia</i> spp.
	DC-SIGN	High mannose SlpA	HIV-1 Measles Dengue <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Influenza A</i> SEA <i>Leishmania</i> spp. <i>Helicobacter pylori</i> <i>Lactobacillus</i> spp.
	SIGNR3	High mannose and fucose	<i>L. infantum</i> SEA
	SIGNR1	High mannose and fucose	SEA
	MGL	Lewis X	SEA
	DCIR	unknown	HIV-1
Group V: Calcium-independent non-CRD	Dectin-1	β -glucans	<i>L. infantum</i> <i>C. albicans</i> <i>Mycobacterium</i> spp.
	CLECSA	Unknown	Dengue virus JEV
	DNGR-1 (CLEC9A)	F-actin	Vaccinia virus Herpes simplex virus
Group VI: Calcium-dependent multiple CRD	Mannose Receptor (MR)	High mannose Omega-1 ManLam	SEA <i>Trichuris muris</i> <i>Mesocostoides corti</i> HDM allergens <i>Mycobacterium</i> spp. <i>K. pneumonia</i> <i>S. pneumonia</i>
	DEC-205 (CD205)	PLA	<i>F. tularensis</i> <i>Y. pestis</i>

Tableau 4/ Composition des groupes I, V, et VI des CLR

Le tableau répertorie les membres principaux des trois familles de CLR I, V et VI, en faisant apparaître le nom des CLR, leurs ligands, ainsi que les pathogènes reconnus (Hoving et al., 2014).

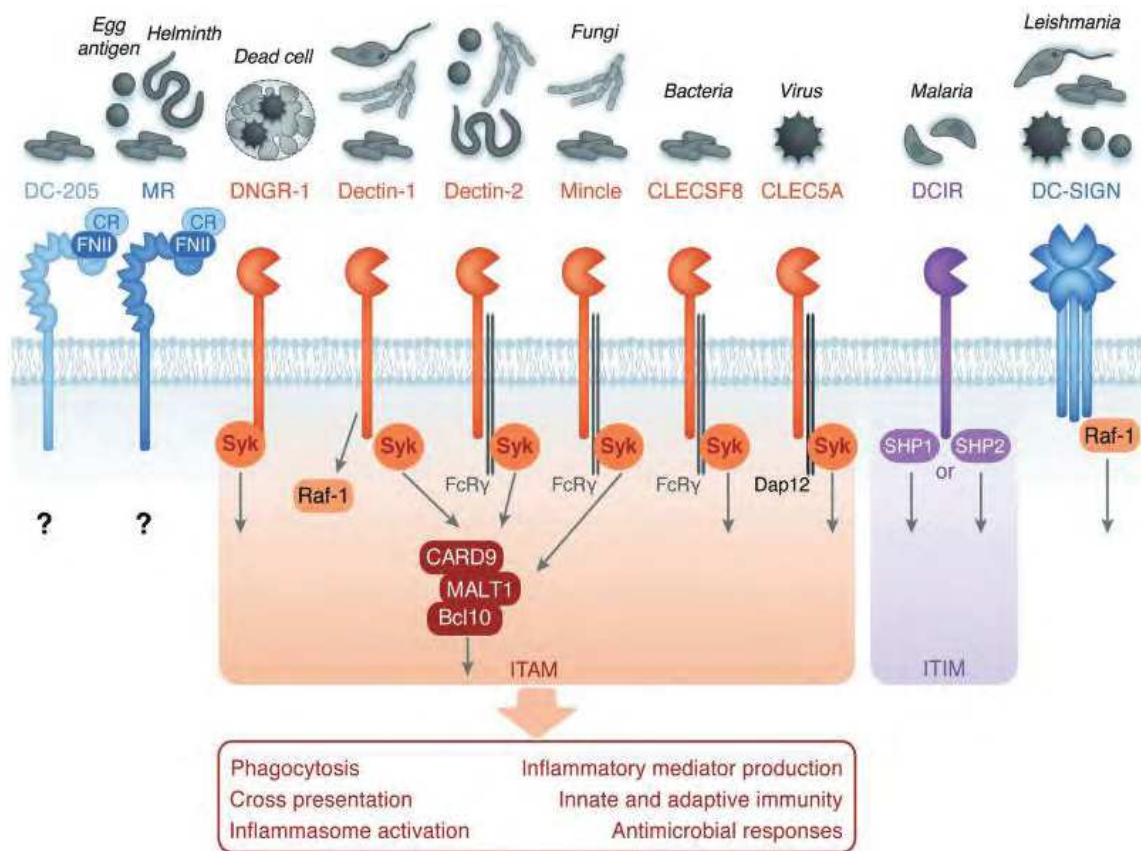


Figure 14/ Reconnaissance de différents micro-organismes par des CLR et leur signalisation

Description non exhaustive de pathogènes reconnus par différents CLR membranaires. Ces CLR peuvent être divisés en 3 types. Ceux qui présentent un motif ITAM activateur dans leur partie cytoplasmique induisant une signalisation *via* la kinase Syk. D'autres présentent un motif ITIM inhibiteur induisant le recrutement de phosphatases comme SHP1 et SHP2. Enfin, d'autres n'ont pas de domaine caractéristique ITAM ou ITIM. L'activation des CLR à ITAM peut se dérouler de différentes façons : soit directement par l'intermédiaire de l'ITAM localisé dans la partie cytoplasmique de ces récepteurs, soit indirectement en s'associant avec des molécules adaptatrices contenant l'ITAM comme le récepteur FcRγ ou DAP12. L'activation des ITAM par ces deux moyens conduit dans les deux cas à l'activation de la tyrosine kinase Syk, qui peut phosphoryler et activer le complexe CARD9-Bcl10-MALT1. La signalisation de Dectin-1 et d'autres lectines fait également intervenir une activation de Raf-1. Dans tous les cas, ces voies de signalisation induisent l'activation de plusieurs molécules en aval incluant les MAPK et NF-κB, ce qui se traduit par une activation des réponses cellulaires, incluant la phagocytose, la maturation des DCs, l'activation de l'inflammasome, la production de médiateurs inflammatoires, la promotion de la réponse immunitaire innée et adaptative, et la génération d'une réponse antimicrobienne (Hoving et al., 2014).

inhibiteur ne sont pas très clairs et seront discutés plus en détail plus loin dans ce manuscrit **(Figure 15)**.

De nombreux constituants de la paroi de *Mtb* peuvent être reconnus par les CLR membranaires DC-SIGN, MR, Dectin-1, et Mincle.

DC-SIGN est un récepteur membranaire retrouvé à la surface des DCs et d'une sous-population de macrophages (Soilleux *et al.*, 2002). DC-SIGN est le principal récepteur de *Mtb* (sur lequel il reconnaît le ManLAM) au niveau des DCs humaines (Tailleux *et al.*, 2003). L'engagement de DC-SIGN présent sur les DCs avec le ManLAM provoque une inhibition de la production d'IL-12 associée à une augmentation de l'expression de la cytokine immunosuppressive IL-10 (Wu *et al.*, 2011). En conséquence, cette réponse induit un défaut de maturation des DCs associé à une plus faible réponse immunitaire adaptative (Wu *et al.*, 2011). Il existe 8 homologues à ce récepteur chez la souris (SIGNR1-8), rendant difficile l'étude de ce récepteur dans le modèle murin. Parmi ces homologues murins, SIGNR3 reconnaît lui aussi le ManLAM, et les souris déficientes en SIGNR3 contrôlent moins bien l'infection et présentent plus de charges bactériennes au niveau des poumons 21 jours après l'infection comparé aux souris sauvages (Tanne *et al.*, 2009) montrant donc que SIGNR3 est associé à une meilleure protection chez la souris. Chez l'homme, un polymorphisme du promoteur de DC-SIGN a été associé avec un risque plus élevé de développer la pathologie dans des cohortes de patients d'Afrique du Sud (Barreiro *et al.*, 2006; Vannberg *et al.*, 2008).

La phagocytose de *Mtb* par les macrophages humains est induite principalement par le MR (Schlesinger, 1993), suggérant un rôle important de ce récepteur dans l'initiation de l'infection et dans l'entrée cellulaire de *Mtb*. Le ManLAM est un ligand prépondérant de ce récepteur (Martinez-Pomares, 2012). L'engagement du MR induit un signal inhibiteur, conduisant à la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et à l'inhibition de la production d'IL-12 (Chieppa *et al.*, 2003; Nigou *et al.*, 2001). Cela induit également l'activation du facteur de transcription PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), impliqué dans les processus de résolution de l'inflammation (Rajaram *et al.*, 2010). De plus, la liaison entre le MR et la bactérie induit une inhibition de la fusion phagosome-lysosome au sein des macrophages, permettant de promouvoir le processus infectieux (Kang *et al.*, 2005). En conclusion, le MR apparaît comme un récepteur dont la fonction a été détournée par la bactérie à son avantage. Cependant des études réalisées *in vivo* chez la

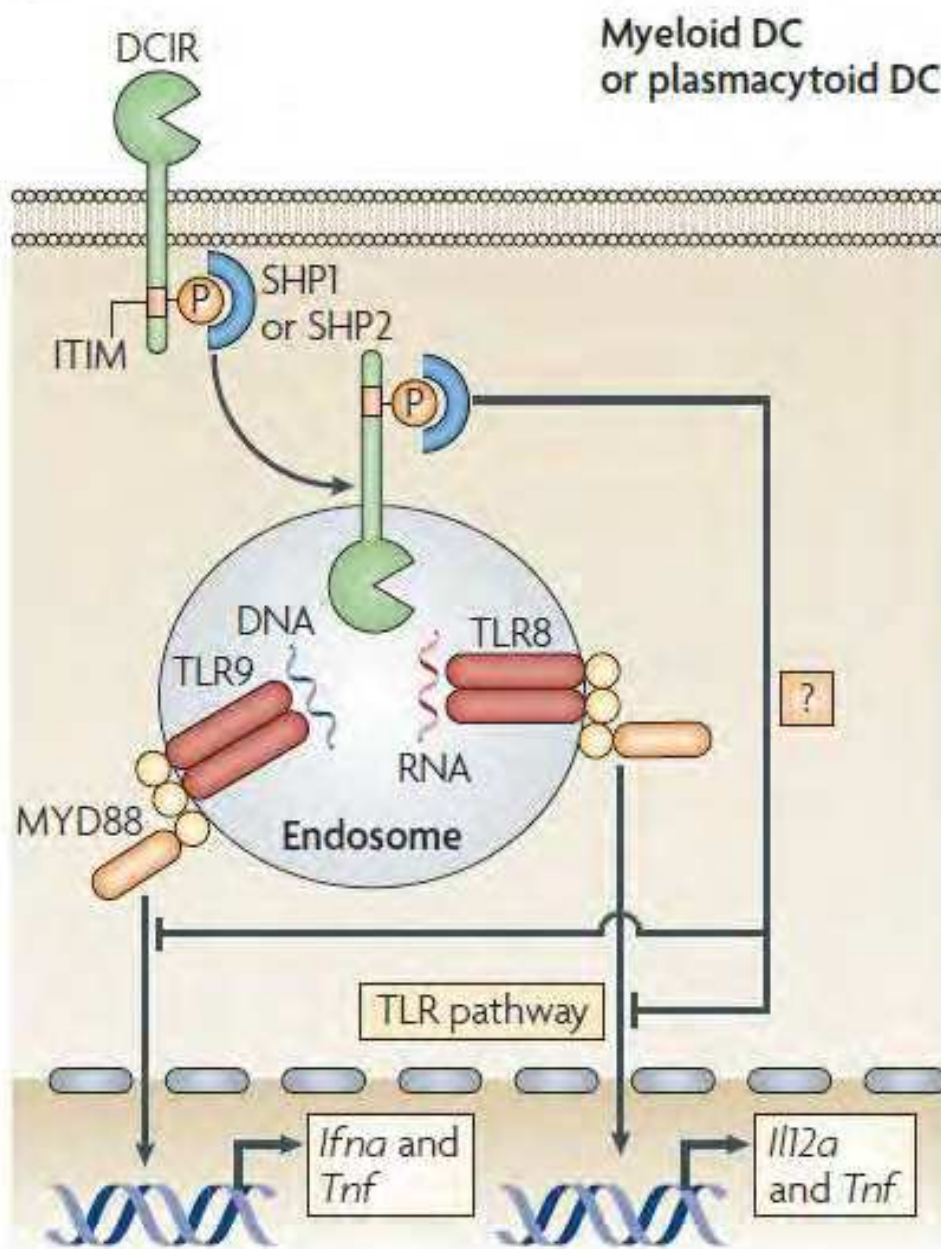


Figure 15/ Interaction entre DCIR et la signalisation TLR

L'activation de DCIR, présent à la surface des DCs, conduit à son internalisation dans les compartiments endosomaux dans lequel résident les TLR8 et 9. La phosphorylation du motif inhibiteur ITIM présent dans la queue cytoplasmique de DCIR permet le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui induisent une inhibition de la signalisation induite par les TLRs. Cela se traduit par une inhibition de la production d'IL-12 induite par le TLR8, ainsi qu'une diminution de la production de TNF et d'IFN induite par le TLR9 (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009).

souris n'ont pas démontré de différences phénotypiques suite à l'infection par *Mtb* entre des souris sauvages et déficientes pour MR (Court *et al.*, 2010). Chez l'homme en revanche un polymorphisme du gène *Mrc1* (*Mannose receptor C-type 1*) codant le MR confère une plus grande résistance à la TB (Zhang *et al.*, 2012).

Dectin-1 est un CLR membranaire exprimé à la surface des macrophages, des DCs et des neutrophiles. Alors que le rôle de ce récepteur dans la réponse antifongique est très bien caractérisé (Ohman *et al.*, 2014), des études récentes ont montré qu'il avait également un rôle dans la réponse anti-bactérienne, notamment dans le contexte de l'infection par *Mtb*. A ce jour, le ligand mycobactérien reconnu par Dectin-1 n'est pas encore identifié. Une infection par le bacille entraîne une augmentation de l'expression de Dectin-1 au niveau des cellules épithéliales pulmonaires de façon TLR2-dépendante (Lee *et al.*, 2009). De plus, la production de TNF- α induite par la signalisation TLR2 par des BMDMs de souris nécessite l'expression de Dectin-1 pour être optimale (Yadav and Schorey, 2006). D'autres études ont également fait ressortir l'importance de ce récepteur dans la production de cytokines pro-inflammatoires par les DCs. En effet, lors d'une infection par *Mtb* de DCs spléniques murines, la production d'IL-12p40 et d'IL-12p70 nécessite la présence de Dectin-1 (Rothfuchs *et al.*, 2007). Cependant, les études *in vivo* d'infection réalisées chez la souris n'ont pas été concluantes, car bien que les souris déficientes en Dectin-1 présentent des charges bactériennes plus faibles au niveau des poumons par rapport aux souris sauvages, il n'a été observé aucune différence en terme de survie et de production cytokinique chez ces animaux, ce qui est probablement due à un effet redondant de l'action de Dectin-1 avec d'autres PRRs (Marakalala *et al.*, 2011).

Mincle est un CLR inductible exprimé préférentiellement à la surface des macrophages, qui reconnaît le TDM, le glycolipide le plus abondant de la paroi mycobactérienne (Ishikawa *et al.*, 2009). Le TDM induit la production de NO et de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages *in vitro* (Schoenen *et al.*, 2010). Cependant, le rôle de Mincle est controversé dans les études menées *in vivo*. Une étude a montré que les BMDMs issus de souris déficientes en Mincle produisent moins de TNF- α en réponse à une infection par BCG ou *Mtb*, en revanche aucun défaut de contrôle de l'infection n'est observé chez ces souris par rapport à des souris sauvages (Heitmann *et al.*, 2013). Dans une autre étude, il a été montré que le taux de cytokines pro-inflammatoires présentes dans les lavages broncho-alvéolaires

de souris déficientes en Mincle est supérieur à celui observé dans les BAL de souris sauvages. De plus, il a été observé que, suite à une infection, ces souris présentent une augmentation de la charge bactérienne au niveau des poumons, des ganglions drainants, et de la rate, en comparaison aux souris sauvages (Behler *et al.*, 2012).

III/ CL-K1 et DCIR

1/ Découverte de nouvelles collectines

Les collectines représentent un groupe de CLR s solubles qui sont également caractérisées par la présence d'un domaine de reconnaissance aux carbohydrates et une région riche en collagène. Récemment, trois nouvelles collectines ont été identifiées : *Collectin liver 1* (CL-L1) (Ohtani *et al.*, 1999), *Collectin placenta 1* (CL-P1) (Ohtani *et al.*, 2001), et enfin *Collectin kidney 1* (CL-K1 ou CL-11) (Keshi *et al.*, 2006).

(A) CL-P1

CL-P1 a été originellement découverte dans les cellules endothéliales placentaires. Elle reconnaît des glycoprotéines contenant des motifs de Lewis déacylés et est capable de faciliter l'internalisation de son ligand dans les cellules de l'hôte (Jang *et al.*, 2009). Par l'intermédiaire de résidus chargés positivement présents dans sa région riche en collagène, elle interagit avec les composés chargés négativement présents dans les membranes microbiennes. Il a été proposé que CL-P1 joue un rôle au sein du système immunitaire de l'hôte et facilite la clairance des glycoprotéines de la circulation sanguine (Yoshida *et al.*, 2003). Des études *in vitro* sur des cellules endothéliales HUVEC ont permis de démontrer que CL-P1 n'est pas membranaire mais se localise principalement dans le cytoplasme de ces cellules (Selman *et al.*, 2008). De manière intéressante, il a été montré que CL-P1 peut se retrouver sous forme soluble et activer la voie « classique » du complément plutôt que la voie des lectines comme c'est le cas pour les autres CLR s. En effet, une étude a montré que lors d'infections ou de dommages tissulaires, la protéine C-réactive CRP est fortement induite, et se lie à CL-P1 *via* des interactions électrostatiques. La CRP recrute alors la molécule C1q pour activer la cascade du complément par la voie classique (Roy *et al.*, 2016).

(B) CL-K1 et CL-L1

(a) Caractérisation structurale

CL-K1 s'organise en un complexe homotrimérique formé de trois sous-unités polypeptidiques comprenant chacune un segment N-terminal, une région dite *collagen-like* constitués de 24 répétitions de Gly-Xaa-Yaa, une région charnière et un domaine de reconnaissance aux carbohydrate CRD (Selman and Hansen, 2012) (**Figure 16**). Des ponts disulfure dans la région charnière et dans la région *collagen-like* stabilisent le trimère une

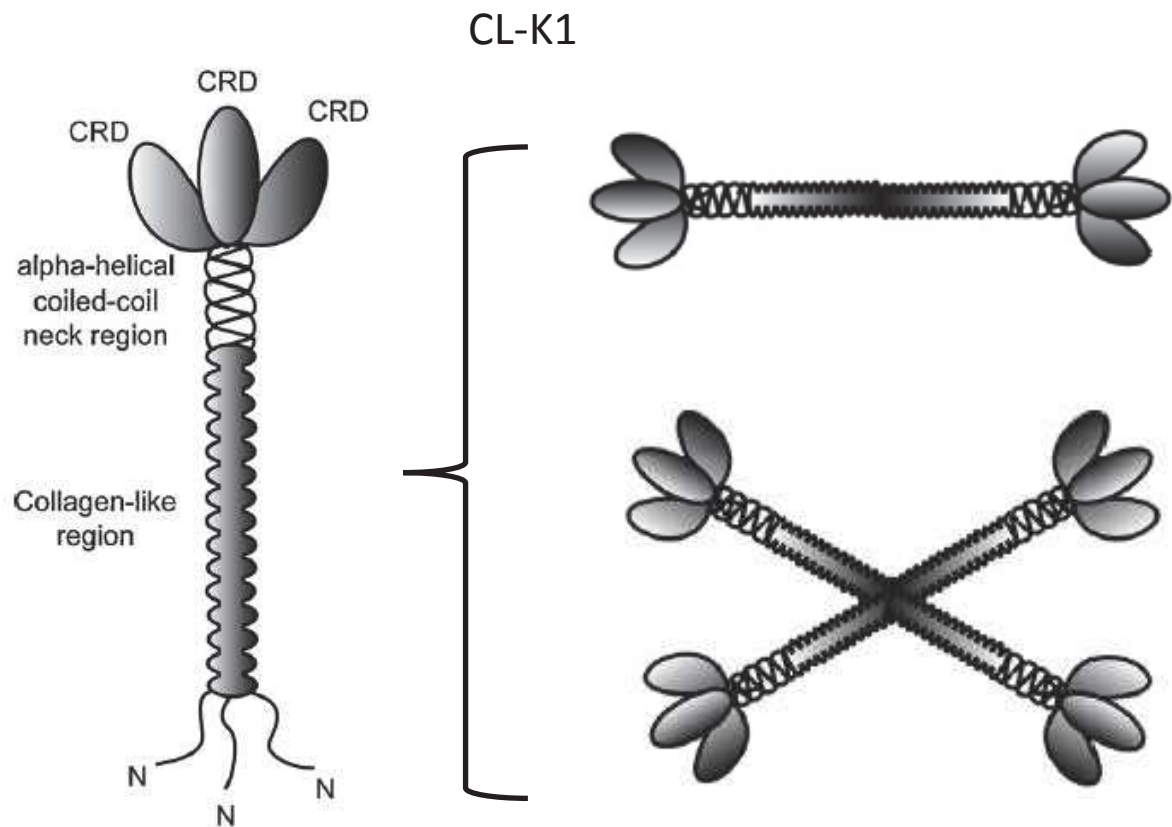


Figure 16/ Structure schématique du CLR CL-K1

CL-K1 est une protéine homotrimérique composée de trois sous-unités polypeptidiques contenant chacune un segment N-terminal, une région « *collagen-like* », une région charnière et un domaine de reconnaissance aux carbohydrates CRD. Cette protéine s'oligomérisse et se présente sous forme de dimère, de trimère ou de tétramère (Selman and Hansen, 2012).

fois assemblé (Holmskov *et al.*, 2003). CL-K1 est composé également d'un peptide signal de 25 acides aminés dans sa partie N-terminale, ce qui permet après clivage de sécréter la protéine de 246 acides aminés sous forme mature dans l'organisme. Un résidu cystéine unique est retrouvé dans la partie N-terminale (Cys⁸), alors que deux autres sont retrouvés à la jonction entre le domaine *collagen-like* et la région charnière (Cys⁸⁸ et Cys⁹⁰). Ce sont ces résidus qui sont impliqués dans la formation des ponts disulfure permettant de stabiliser la protéine trimérique mature CL-K1 (Hansen *et al.*, 2010). Ces résidus forment le motif CXC caractéristique également de la famille CXC des chimiokines (Zlotnik and Yoshie, 2000). Ce motif est présent sur CL-K1 et CL-L1 mais n'est pas retrouvé sur les autres CLR. Le domaine de reconnaissance CRD de CL-K1 contient les motifs EPN (Glu-Pro-Asn) et WND (Trp-Asn-Asp), impliqués dans la liaison avec les ligands de façon dépendante du calcium (Zelensky and Gready, 2005). CL-K1 est une protéine hautement conservée parmi les différentes espèces, du poisson à l'humain, avec un pourcentage d'identité en séquence d'acides aminés compris entre 68 et 92% (**Tableau 5A**). La structure générale de CL-L1 est relativement similaire à celle de CL-K1 sauf au niveau du CRD où CL-L1 présente un motif EPS et non EPN (asparagine substituée par une sérine) (Selman and Hansen, 2012). La partie C-terminale des CRD de CL-L1 comporte 4 résidus lysines consécutifs qui ne sont pas retrouvés dans les autres collectines. Ces résidus sont également retrouvés chez la levure au niveau de l'aminocyl-tRNA synthetase et chez l'homme sur la methionyl-tRNA synthetase, où ils forment une séquence de signal pour la translocation du cytoplasme au noyau (Lage and Dietel, 1996; Schimmel and Wang, 1999). De manière similaire à CL-K1, CL-L1 est aussi très conservé entre les différentes espèces animales, avec un pourcentage allant de 62% jusqu'à 98% de la grenouille à l'homme (**Tableau 5B**).

(b) Distributions tissulaires et reconnaissance

En terme de distribution tissulaire, CL-K1 a été identifié dans de nombreux tissus dont le système nerveux central, les glandes surrénales, le foie, les reins, l'intestin, le thymus, les poumons, le cœur, le pancréas, et, en plus faible proportion, dans les organes génitaux et la rétine (Keshi *et al.*, 2006). CL-L1 est fortement exprimée dans le foie et, sur la base d'analyses transcriptionnelles, pourrait également être exprimée au niveau des glandes surrénales, de l'intestin, des organes génitaux ainsi que du poumon, du cœur et du thymus (**Tableau 6**). En terme de concentration sérique, une étude a été réalisée sur 100 patients

A

Mouse	92%				
Cow	86%	87%			
Chicken	83%	84%	81%		
Frog	77%	78%	77%	83%	
Fish	69%	69%	69%	72%	68%
	Human	Mouse	Cow	Chicken	Frog

B

Mouse	89%			
Rat	88%	95%		
Chicken	68%	66%	67%	
Frog	62%	64%	64%	67%
	Human	Mouse	Rat	Chicken

Tableau 5/ Comparaison de l'identité de CL-K1 (A) et de CL-L1 (B) avec la protéine homologue chez différentes espèces animales (Selman and Hansen, 2012).

CL-K1

CL-L1

	Human		Mouse		Human		Mouse	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Adrenal glands	++/+ ^a	++			++		-	
Kidney	++/+ ^a	++	++	++	-		-	
Liver	++/+ ^a	++	++	++	++	++	++	
Pancreas	++/+ ^a		+	++	-			
CNS	+/- ^a		++	+				
Gastrointestinal tract								
Stomach	+/- ^a		+	++	+		++	
Small intestine	++/+ ^a		+	++	+		+	
Colon	+/- ^a		+	++	+			
Reproductive system								
Testis	+/+ ^a		++	++	-		+	
Ovaries	+						-	
Prostate	-				+		-	
Placenta	+/- ^a				++			
Embryonic tissue				++			++	
Lung	+/+ ^a		+	+	+		-	
Heart	+/+ ^a		++	+	+		-	
Thymus	++/+ ^a						-	
Spleen			+	+	+		-	
White adipose tissue			++	++				
Skeletal muscle	-/- ^a		+	+	-		+	

Tableau 6/ Distribution tissulaire de CL-K1 et CL-L1

Le tableau indique l'expression tissulaire (en ARNm et en protéine) relative de CL-K1 et CL-L1. Les signes (+) et (++) indiquent une expression relative. Le signe (-) indique que le tissu a été analysé mais qu'aucune expression n'a été détectée. Le signe (^a) indique que les résultats sont caractéristiques de 2 études séparées (Selman and Hansen, 2012).

Danois, permettant d'établir que la concentration moyenne de CL-K1 dans le sérum est de 284ng/ml avec une variation individuelle allant de 146 à 497 ng/ml (Selman *et al.*, 2012). Pour CL-L1, seule une étude large sur 75 patients américains a été réalisée dans laquelle il apparaît que le taux sérique de cette collectine est de 2 à 3µg/ml (Laursen *et al.*, 2015). En terme de ligands, des études ont montré que CL-K1 a une affinité pour des motifs de type mannose et fucose (Farrar *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2010). Dans le cas de CL-L1, il a été montré une liaison aux résidus de type mannose et fucose, mais également galactose (Kawai *et al.*, 2002). CL-K1 est capable de lier le LPS (lipopolysacchride) de *Escherischia coli* ainsi que le mannane présent à la surface de *Saccharomyces cerevisiae*, et ce de manière partiellement dépendante du calcium (Keshi *et al.*, 2006). L'interaction de CL-K1 avec des pathogènes entiers a également été analysée dans une étude qui a révélé que CL-K1 a la capacité de lier *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*, et que cette interaction est inhibée en présence de mannose et de glucose (Hansen *et al.*, 2010). En conclusion, CL-K1 peut se lier à différents types de micro-organismes, notamment les bactéries et les champignons, de par leurs résidus glycosylés spécifiques. Aucune étude n'a été réalisée concernant une éventuelle interaction de CL-L1 avec des micro-organismes.

(c) Interaction avec MASP-1 et MASP-3

De manière intéressante, il a été montré que CL-K1 se lie aux protéines MASP-1 et MASP-3 (Hansen *et al.*, 2010). De plus, il a été montré qu'une mutation dans les gènes codants pour CL-K1 et MASP-1 conduisent toutes deux au syndrome de Carnavale, Mingarelli, Malpuech, et Michels (3MC) (Rooryck *et al.*, 2011), ce qui suggère qu'il existe une interaction forte entre ces deux protéines de manière physiologique. MASP-1 est décrite comme une molécule importante dans l'activation de la cascade du complément par la voie des lectines, notamment par la liaison avec la MBL (Takahashi *et al.*, 2008). La fonction de MASP-3 n'est pas bien caractérisée à l'heure actuelle, cependant des études suggèrent qu'il est capable d'agir en tant qu'inhibiteur de l'activation du complément en entrant en compétition avec d'autres lectines solubles comme MBL et les ficolines (Skjoedt *et al.*, 2010). Chez l'homme, il a été montré que MASP-1 s'exprime uniquement au niveau du foie alors que MASP-3 a plutôt une expression ubiquitaire et est retrouvée au niveau du foie, de la rate, du cerveau, des tissus gastro-intestinaux, du thymus, de la prostate et du placenta (Degn *et al.*, 2009).

Comme évoqué précédemment, une mutation des gènes codant pour MASP-1 ou CL-K1 induit le syndrome 3MC, qui est une maladie rare autosomale récessive caractérisée par de graves troubles développementaux, incluant un dimorphisme facial, des troubles cognitifs et une surdité (Rooryck *et al.*, 2011). Dans des études réalisées chez le poisson zèbre, il a été démontré que ces troubles sont dus   un défaut d'organisation et de migration des cellules formant la crête neurale durant les phases d'embryog nese précoces. Des expériences *in vitro* ont établi le fait que CL-K1 est primordiale à cette organisation par le fait qu'elle possède des propriétés ch mo-attractantes servant de guide pour la migration des cellules de la crête neurale (Rooryck *et al.*, 2011). L'ensemble de ces études montre que CL-K1 pourrait avoir un rôle important dans des processus immunologiques et développementaux.

(d) Le complexe CL-LK

Récemment, il a été démontré que CL-K1 et CL-L1 n'agissent pas de manière isolée mais se retrouvent sous forme de complexe dans la circulation (CL-LK). En effet la majorité du CL-K1 présent dans le sérum est en fait associé à CL-L1. Ce complexe présente une capacité d'oligomérisation beaucoup plus grande que lorsque ces collectines sont isolées, ainsi qu'une affinité pour MASP-1 et MASP-3 fortement augmentée. Le partenariat entre les deux protéines les rend donc plus efficaces dans l'activation de la cascade du complément par l'intermédiaire de la voie des lectines (Henriksen *et al.*, 2013). Un défaut d'activation du complément par CL-LK favorise l'apparition de maladies immunopathologiques comme le lupus (Trolborg *et al.*, 2015).

2/ DCIR (*Dendritic cell immunoreceptor*)

(A) Description générale

En 1999, un nouveau membre de la famille des CLR s a été identifié. Cette molécule appelée DCIR est une glycoprotéine transmembranaire de 237 acides aminés possédant un seul site de reconnaissance au carbohydrate (CRD). L'étude a révélé que cette lectine possède un motif inhibiteur de type ITIM dans sa queue cytoplasmique. Le gène codant cette protéine est localisé sur le chromosome 12p13. Son expression est limitée au tissu h matopo i tique et est retrouvée sur de nombreuses cellules immunitaires telles que les macrophages, les neutrophiles, les monocytes, les neutrophiles, les lymphocytes B et, de façon très forte, sur les DCs (Bates *et al.*, 1999). DCIR (CLEC4A ou CLECSF6) possède 4 homologues murins

(DCIR1-4). Le plus proche de ces homologues a été défini comme étant DCIR1 (aussi appelé CLEC4A2). Cependant, le pourcentage d'identité ne se situe qu'autour de 50%. De plus, seules DCIR1 et DCIR2 possèdent un motif ITIM dans leurs parties cytoplasmiques. Le motif ITIM est associé à une signalisation négative. En effet, beaucoup de récepteurs anti-inflammatoires dépendent de la présence de ce motif afin d'induire un signal négatif, notamment par l'intermédiaire du recrutement de phosphatases comme SHP-1 et SHP-2 (Isakov, 1997; Scharenberg and Kinet, 1996; Unkeless and Jin, 1997; Vely and Vivier, 1997). Par le biais de leur activité enzymatique, ces phosphatases dé-phosphorylent des protéines importantes des voies de signalisation pro-inflammatoires comme celles médiées par les TLRs. Une étude a montré dans ces DCs humaines que suite à la liaison d'un anticorps anti-DCIR considéré comme activateur, le récepteur est internalisé et s'en suit une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α induite par la stimulation de TLR8 par son ligand synthétique R848 (Meyer-Wentrup *et al.*, 2009). Une approche similaire a conclu que la stimulation de DCIR induit une inhibition de la production d'IFN α après stimulation du TLR9 avec du CpG. Il a également été montré dans cette étude que la signalisation par le TLR9 induit la maturation des DCs plasmacytoïdes et que ce phénomène s'accompagne d'une diminution de l'expression de DCIR à la surface des cellules (Meyer-Wentrup *et al.*, 2008) **(Figure 15)**.

En terme de ligands, une étude a montré que DCIR peut reconnaître des motifs glycosylés de type Lewis^b et Man₃ dans certaines conditions. En effet, cette interaction ne peut avoir lieu lorsque DCIR est exprimé à la surface cellulaire, car son motif de N-glycosylation présent dans le domaine de reconnaissance CRD est alors glycosylé, ce qui bloque toute autre interaction. Cette étude met à jour que le mode de liaison de DCIR est probablement complexe et que l'état de glycosylation de la partie CRD du récepteur peut jouer un rôle clé dans la reconnaissance de ligands (Bloem *et al.*, 2013).

(B) Rôle de DCIR dans l'auto-immunité

DCIR inhibe l'action du facteur de croissance GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) par un mécanisme impliquant la séquestration de SHP-2. En effet, des études réalisées *in vitro* sur des neutrophiles ont montré que l'administration de GM-CSF réduit fortement l'affinité de SHP-2 pour l'ITIM de DCIR tout en augmentant son niveau de phosphorylation (Richard *et al.*, 2006), or SHP-2 une fois présente dans sa forme active dans

le cytoplasme peut se lier au récepteur du GM-CSF à la surface cellulaire permettant une amplification de la signalisation relative à celui-ci, notamment par le recrutement de STAT5 (Fujikado *et al.*, 2008). Le GM-CSF étant un facteur important dans la croissance des DCs, il a été montré que DCIR a un impact dans ce processus. En effet, une étude a montré que des souris déficientes en DCIR (DCIR1/CLEC4A2) développent spontanément une auto-immunité causée par un excès de prolifération des DCs et d'activation de cellules T (Fujikado *et al.*, 2008). Dans cette même étude, il a été montré que le facteur de transcription STAT5, recruté au niveau du récepteur au GM-CSF lors de son activation, est dans un état plus phosphorylé et donc plus activé dans les souris déficientes en DCIR en comparaison aux souris contrôles (**Figure 17**). Ces souris développent avec l'âge des lésions au niveau des articulations ainsi qu'une ankylose. Une étude a montré que DCIR contribue à maintenir l'homéostasie osseuse en régulant le niveau de production d'IFN γ . Une déficience en DCIR induit par ailleurs une augmentation du volume des fémurs et une ossification aberrante aux niveaux des articulations. Cependant ces symptômes sont abolis dans les souris doublement déficientes en DCIR et Rag2, suggérant un rôle des cellules T dans la survenue des signes pathologiques. En effet, il a pu être montré que les souris déficientes pour DCIR présentent une accumulation de cellules T productrices d'IFN γ (Th1) dans les ganglions lymphatiques drainant les articulations, et que les DCs issues de ces souris induisent une plus forte différenciation des CD4 $^{+}$ naïfs en Th1 (Maruhashi *et al.*, 2015).

Les immunoglobulines intraveineuses (IVIg), une préparation d'IgG polyclonales humaines, sont largement utilisées dans les traitements de patients souffrants de maladies auto-immunes ou inflammatoires. Les IVIg induisent un environnement tolérogène par l'intermédiaire de la génération de lymphocytes Treg. Une étude a montré que DCIR, en reconnaissant les IVIg, s'avère indispensable pour induire la génération des Treg dans ce modèle. En effet, l'inhibition de DCIR ou bien de la phosphatase SHP-2 qui lui est associée, conduit à une inhibition de la génération de Treg et rend le traitement aux IVIg inefficace (Massoud *et al.*, 2014).

Ces études suggèrent que DCIR joue un rôle important dans la maintenance du système immunitaire et, de fait, se trouve directement impliqué dans la survenue de maladies auto-immunes. De façon intéressante, une étude récente a montré que l'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE) (un modèle murin de sclérose en plaque) est exacerbée dans

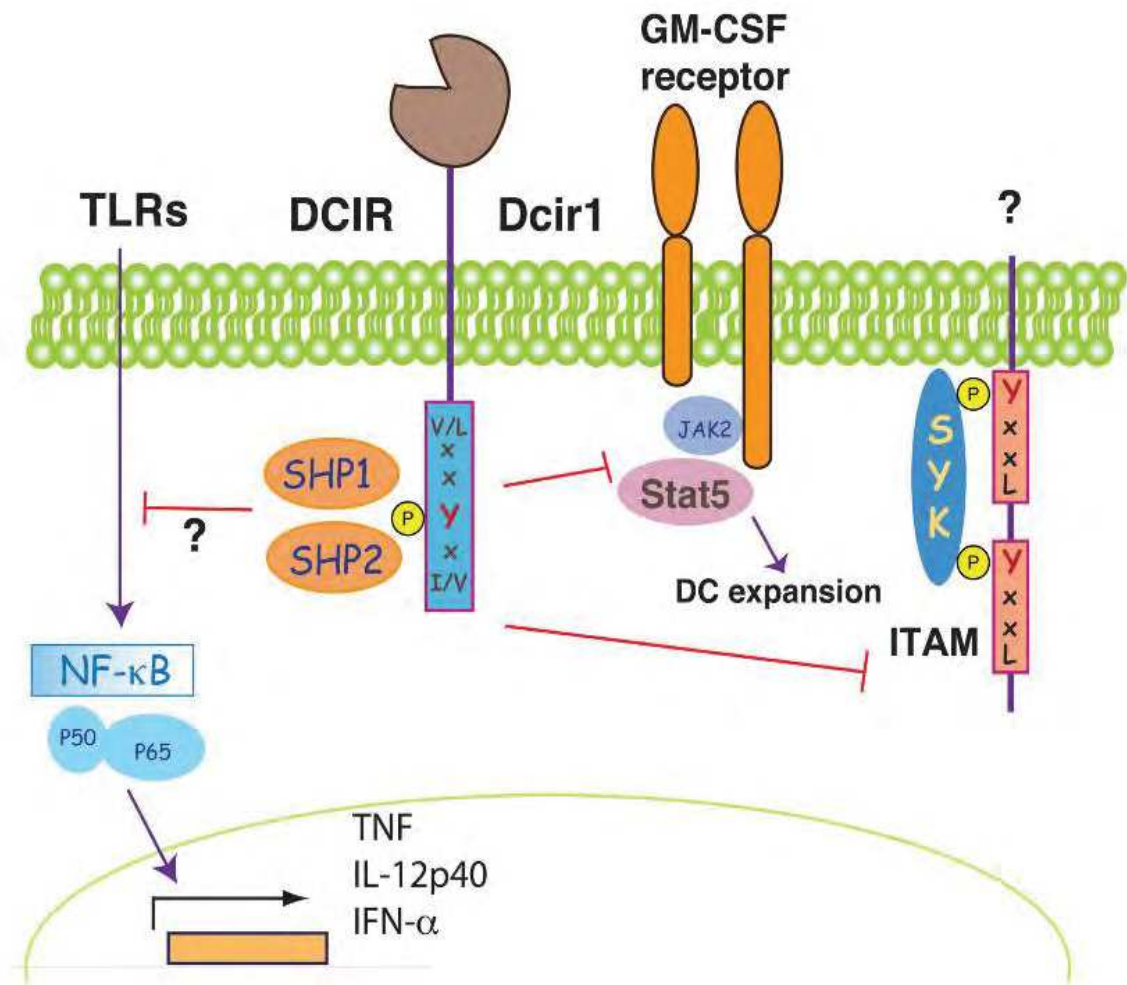


Figure 17/ DCIR et sa signalisation

La phosphorylation de la tyrosine du domaine ITIM de DCIR induit le recrutement et la liaison des phosphatases SHP-1 et SHP-2. DCIR inhibe différentes voies par l'intermédiaire de ces phosphatases, notamment la signalisation NF-κB induite après la stimulation des TLRs. DCIR peut également inhiber la signalisation dépendante d'ITAMs *via* des récepteurs encore indéfinis, et peut aussi altérer le recrutement et l'activation de STAT5 par le récepteur au GM-CSF, limitant ainsi la prolifération des DCs (Sancho and Reis e Sousa, 2012).

les souris déficientes en DCIR se traduisant par une très forte démyélinisation dans la moelle épinière, ainsi qu'à une augmentation massive du nombre de DCs et de TCD4+ retrouvés au niveau de celle-ci. Enfin, les auteurs ont montré que la prolifération cellulaire est accrue au niveau des ganglions lymphatiques chez les souris déficientes en DCIR en comparaison aux souris sauvages (Seno *et al.*, 2015).

Finalement, des études cliniques ont révélé une association entre un polymorphisme du gène codant pour DCIR et la survenue de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (Guo *et al.*, 2012), le lupus érythémateux et le syndrome de Sjögren primaire (maladie auto-immune caractérisée par une atteinte des glandes exocrines, en particulier lacrymales et salivaires) (Liu *et al.*, 2015).

(C) Contribution de DCIR aux pathologies infectieuses

Des études ont également mis en évidence un rôle de DCIR dans des pathologies infectieuses comme le SIDA. En effet, à l'instar de DC-SIGN (Jin *et al.*, 2014), DCIR peut lier le VIH, et notamment la glycoprotéine gp140 (Bloem *et al.*, 2014), afin de participer à la capture et l'internalisation du virus. Cette étude a mis en évidence que la région charnière de DCIR est importante pour l'attachement du virus et l'infection (Lambert *et al.*, 2008). De plus, suite à une infection par le VIH, DCIR est fortement exprimé au niveau de la membrane des lymphocytes T CD4+, conduisant donc à la création d'une nouvelle porte d'entrée pour le virus, facilitant sa dissémination et sa propagation dans l'organisme (Lambert *et al.*, 2010). Suite à des expériences de mutagenèse dirigée, les auteurs ont pu démontrer que l'activation de DCIR par sa liaison au VIH induit une cascade de signalisation dépendante du motif ITIM et conduisant au recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Lambert *et al.*, 2011). Ces études suggèrent que DCIR serait un récepteur utilisé par le pathogène afin de pouvoir se multiplier et se propager plus efficacement dans l'organisme. DCIR représente donc une cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapies antivirales. Des études sont menées dans ce sens, notamment pour l'identification d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs d'entrée du VIH dans ses cellules cibles (Lambert *et al.*, 2013).

DCIR a également été décrit comme ayant un impact dans des pathologies virales autres que le SIDA. En effet, une étude a montré que lors d'une infection avec le HCV, la glycoprotéine d'enveloppe E2 peut être reconnu par DCIR, induisant un défaut de production d'IFN α par

les DCs plasmacytoides (Florentin *et al.*, 2012). Une autre étude réalisée chez la souris dans un modèle d'infection par le virus du Chikungunya (CHIKV), a montré que 24 à 36h après infection, temps auquel la densité de DC au site d'infection est la plus forte, ces cellules présentent une diminution de l'expression de DCIR à leur surface, ce qui suggère une internalisation de DCIR. De plus, ces BMDMs issus de souris déficientes en DCIR produisent davantage d'IL-12, de TNF- α , et d'IL-10 que des souris sauvages. Enfin, les souris déficientes en DCIR présentent des signes pathologiques plus sévères que les souris sauvages suite à une infection par le CHIKV, comme une présence plus forte d'œdèmes et une perte de poids plus importante. Des analyses histologiques ont révélé que les souris déficientes en DCIR présentent un excès d'inflammation tissulaire et d'infiltrats cellulaires au niveau du site infectieux (Long *et al.*, 2013).

L'action de DCIR s'étend également à des pathogènes non viraux. En effet il a été montré que DCIR est critique pour le développement de la malaria cérébrale (CM) expérimentale induite avec le parasite *Plasmodium berghei* dans un modèle murin. L'infection de souris sauvage par le parasite conduit à une CM chez 80% des animaux infectés, alors que lors d'infection de souris déficientes en DCIR, seul 15% des souris infectés développent la pathologie. En accord avec cette observation, les souris n'exprimant pas le récepteur présentent beaucoup moins de lymphocytes T CD8+ au niveau du cerveau, ce qui s'accompagne d'une inflammation réduite. De plus, cette étude a montré que ce défaut de migration des T CD8+ est causé par une diminution du niveau de TNF- α dans le sérum ainsi qu'à une moindre activation des cellules T CD4+ et CD8+ au niveau de la rate chez les souris dépourvues de DCIR (Maglinao *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces résultats identifie DCIR comme étant un régulateur négatif important de la réponse immunitaire de l'hôte.

OBJECTIF

Dans un contexte où la tuberculose représente un problème de santé publique majeure provoquant le décès de plus d'un millions d'individus chaque année, il apparaît essentiel de comprendre plus en détails la relation entre l'agent étiologique de la maladie, *Mtb*, et le système immunitaire de l'hôte, afin de pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les mycobactéries sont recouvertes de structures glycolipidiques qui peuvent être reconnues par une famille de récepteurs spécifiques que sont les CLR. Comme décrit précédemment, il existe un certains nombres de CLR qui ont été plus ou moins caractérisés dans le contexte de l'infection tuberculeuse. Bien qu'il ait déjà été montré préalablement que certains CLR exercent une action déterminante dans le contrôle de la pathologie, notamment des CLR membranaires comme DC-SIGN (Tailleux *et al.*, 2003), MR (Schlesinger, 1993), Dectin-1 (Rothfuchs *et al.*, 2007) ou Mincle (Ishikawa *et al.*, 2009), mais également des CLR solubles comme SP-A (Pasula *et al.*, 1997) et SP-D (Ferguson *et al.*, 2006), il n'est pas à exclure que d'autres CLR puissent jouer un rôle dans ce contexte. En effet, les CLR présentés précédemment ne représentent qu'une parcelle limitée, loin d'être exhaustive, du panel de récepteurs présents chez l'hôte et susceptibles d'interagir avec la bactérie. L'objectif de ma thèse s'inscrit dans ce contexte et vise à caractériser l'action de nouveaux CLR dont le rôle dans la réponse anti-tuberculeuse est encore inconnu.

Notre étude s'est focalisée sur les deux CLR décrits dans la partie précédente. Le CLR soluble récemment identifié, CL-K1 (Keshi *et al.*, 2006), et le CLR membranaire possédant un motif ITIM, DCIR (Bates *et al.*, 1999). Grâce à diverses approches détaillées dans la partie résultats ci-après, nous avons cherché à déterminer si ces récepteurs jouent un rôle ou non dans la réponse immunitaire antituberculeuse. Des modèles d'infection *in vivo* utilisant des souris déficientes en ces récepteurs, complémentées par des approches *in vitro* visant à caractériser plus en détails le comportement de ceux-ci dans la réponse antituberculeuse, nous ont permis d'apprécier leurs rôles dans la survie bactérienne et dans la réponse immunitaire induite. Ces récepteurs participent-ils à la réponse bactéricide directe de l'hôte? Permettent-ils de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en induisant une réponse cellulaire et une production de médiateurs inflammatoires spécifiques? Qu'en est-il de la reconnaissance et de la signalisation induite par le récepteur concerné, et quels motifs vont

être impliqués lors de l'interaction? L'objectif de ma thèse est d'apporter des réponses à ces questions afin de caractériser de manière globale l'action de ces deux nouveaux CLR dans un contexte tuberculeux.

Cela permettra d'une part d'apporter de nouvelles connaissances fondamentales concernant les interactions hôtes pathogènes dans la tuberculose et le comportement des CLR dans la réponse immunitaire au sens large. D'autre part, cela pourrait potentiellement permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux marqueurs de la pathologie afin de développer des approches complémentaires aux stratégies de thérapie et de prévention actuelles.

RESULTATS

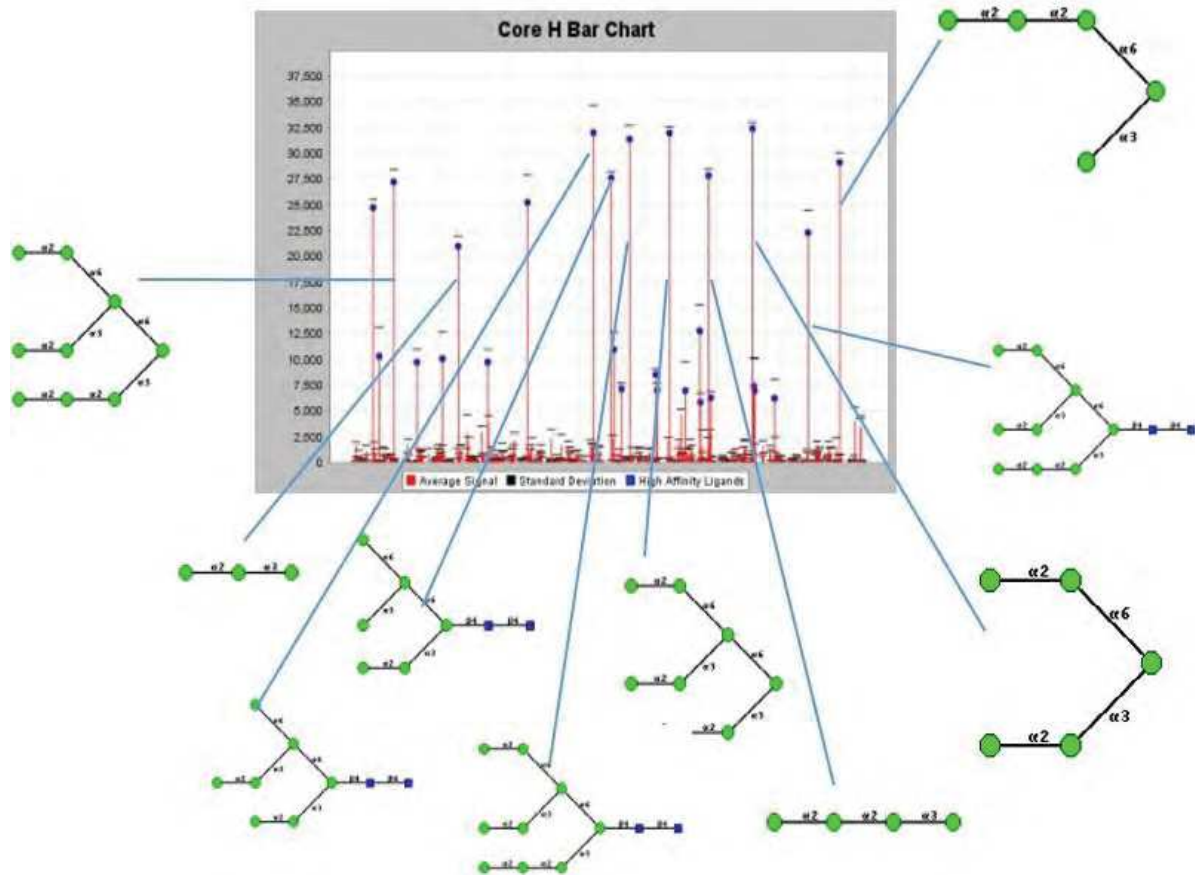
1/ CL-K1

(A) Etude du rôle de CL-K1 dans l'infection à *Mtb*

Comme décrit précédemment, CL-K1 a la capacité de lier des motifs glycosylés exprimés par divers pathogènes dont les bactéries. La liaison à CL-K1 induit l'activation du complément par la voie des lectines en se liant à MASP1 (Henriksen *et al.*, 2013), et participe, de ce fait, à la mise en place de l'immunité innée. A l'instar d'autres lectines solubles comme SP-A et SP-D, CL-K1 pourrait également être capable d'exercer un rôle dans un contexte tuberculeux. Un criblage de ligands glycosylés a révélé que CL-K1 pourrait lier des composants de la paroi de *Mtb*, en particulier le ManLAM, l'un des constituants majeurs de la mycomembrane (**Figure 18**). Nous nous sommes donc demandés si CL-K1, seul ou dans sa forme native liée à la collectine CL-L1 (CL-LK), pouvait reconnaître *Mtb* et influencer directement l'immunité anti-tuberculeuse. Pour cela, nous avons procédé, en plus d'expériences *in vitro*, à des études *in vivo* d'infection de souris déficientes en CL-K1. Comme chez l'homme, chez qui une mutation du gène codant CL-K1 entraîne un syndrome de 3MC, se traduisant par des troubles développementaux sévères, les souris déficientes en CL-K1 présentent, elles aussi, certains troubles développementaux. En effet, ces souris ont une mortalité embryonnaire plus élevée que les souris sauvages. De plus, ces souris sont stériles (mâles uniquement), ont une prise poids réduite et peuvent présenter des défauts de morphogénèse se traduisant par une légère déviation de la colonne vertébrale et des difficultés articulaires (**Figure 19**). Ainsi nous avons dû croiser des souris hétérozygotes afin d'obtenir des individus homozygotes pour l'inactivation de CL-K1. Enfin, dans l'optique de placer nos études dans un contexte plus physiologique, nous avons également pu analyser le taux de CL-LK dans le sérum de patient atteints de TB et de sujets sains afin de le relier à la sévérité de la pathologie.

(B) Publication

A



B

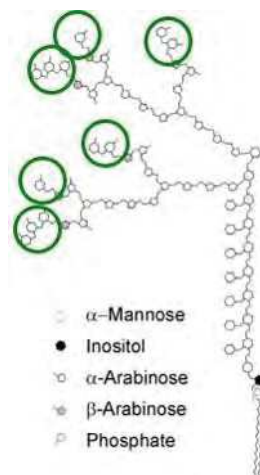


Figure 18/ Ligands mycobactériens potentiels de CL-K1

A) *Glycan-array* illustrant les groupements glycosylés capables de liaison à CL-K1. Les structures correspondantes sont représentées pour les pics principaux. B) Structure des groupements mannosylés qui coiffent le lipoarabinommanane de la paroi mycobactérienne prédits pour se lier à CL-K1 (Consortium for Functional Glycomics).

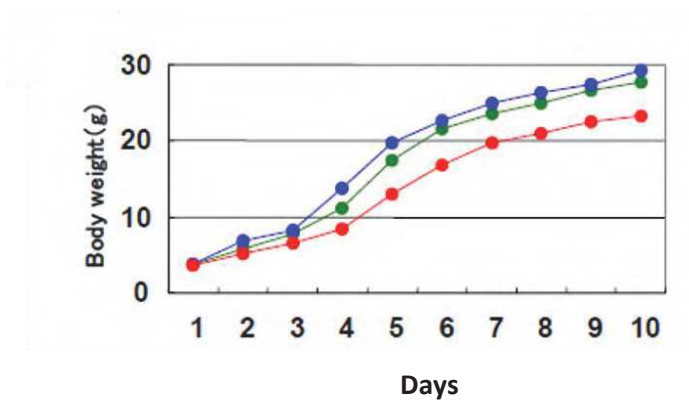
A**B**

Figure 19/ Phénotype des souris déficientes en CL-K1

A) Aspect général des souris CL-K1^{-/-} en comparaison aux souris CL-K1^{+/+} et ^{+/-}. Les souris CL-K1^{-/-} présentent une taille réduite. **B)** Courbe de prise de poids des souris CL-K1^{-/-} au cours du temps.

RESEARCH ARTICLE

Collectin CL-LK Is a Novel Soluble Pattern Recognition Receptor for *Mycobacterium tuberculosis*

Anthony Troegeler^{1,2}✉, Geanncarlo Lugo-Villarino^{1,2}✉, Søren Hansen³, Voahangy Rasolofo⁴, Maiken Lumby Henriksen³, Kenichiro Mori⁵, Katsuki Ohtani⁵, Carine Duval^{1,2}, Ingrid Mercier^{1,2}, Alan Bénard^{1,2}, Jérôme Nigou^{1,2}, Denis Hudrisier^{1,2}, Nobutaka Wakamiya⁵, Olivier Neyrolles^{1,2}*

1 Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France, **2** Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France, **3** Department of Cancer and Inflammation Research, Institute of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark, **4** Mycobacteria Unit, Pasteur Institute in Antananarivo, Antananarivo, Madagascar, **5** Department of Microbiology & Immunochemistry, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan

✉ These authors contributed equally to this work.

* olivier.neyrolles@ipbs.fr



OPEN ACCESS

Citation: Troegeler A, Lugo-Villarino G, Hansen S, Rasolofo V, Henriksen ML, Mori K, et al. (2015) Collectin CL-LK Is a Novel Soluble Pattern Recognition Receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE 10(7): e0132692. doi:10.1371/journal.pone.0132692

Editor: Jordi B Torrelles, The Ohio State University, UNITED STATES

Received: February 3, 2015

Accepted: June 18, 2015

Published: July 14, 2015

Copyright: © 2015 Troegeler et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Toulouse, Agence Nationale de la Recherche (ANR)/Programme d'Investissements d'Avenir (PIA grant number ANR-11-EQUIPEX-0003) and ANR-12-BSV3-0002 B-TB grant, French Ministry of Higher Education and Research (fellowship to A. T.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM fellowships to G.L.V., A.B. and C.D.), European Union (NEWTBAC project, project n° 241745), and

Abstract

Understanding the molecular components of immune recognition of the tuberculosis (TB) bacillus, *Mycobacterium tuberculosis*, can help designing novel strategies to combat TB. Here, we identify collectin CL-LK as a novel soluble C-type lectin able to bind *M. tuberculosis*, and characterize mycobacterial mannose-capped lipoarabinomannan as a primary ligand for CL-LK. Mice deficient in CL-K1, one of the CL-LK subunits, do not display altered susceptibility to *M. tuberculosis*. However, we found that the amount of CL-LK in the serum of patients with active TB is reduced, compared to that in controls, and correlates inversely to the magnitude of the immune response to the pathogen. These findings indicate that CL-LK might be of interest for future diagnostic and treatment monitoring purposes.

Introduction

Mycobacterium tuberculosis, the agent of tuberculosis (TB) in humans, is still responsible for nearly 1.5 million deaths and over 8 million new cases every year in the world [1]. Control and possible eradication of TB in the decades to come will require shorter and more effective treatments, a vaccine better than BCG, together with improved tools for diagnostic and treatment monitoring. A better understanding of the immune pathways involved in host defense against *M. tuberculosis* might help design better vaccination strategies, and identify novel biomarkers.

Early recognition of *M. tuberculosis* and mounting of an appropriate response by the immune system relies on a range of membrane-bound and soluble receptors, the so-called pattern recognition receptors, including Toll-like receptors (e.g. TLR-2) and C-type lectins (e.g. DC-SIGN) [2]. Soluble immune receptors for *M. tuberculosis* include surfactant proteins A

Fondation Bettencourt-Schueller. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

(SP-A) and D (SP-D), and other collectins, such as the mannose-binding lectin (MBL) [3,4]. Collectins are homomeric or heteromeric proteins containing a collagen-like region and a C-type lectin domain separated by an α -helical coiled-coil region [5]. In *M. tuberculosis*, SP-A and SP-D bind various glycoconjugates, including cell envelope mannose-capped lipoarabino-mannan (ManLAM) [6,7]. Several *in vitro* studies showed that SP-A and-D modulate immune response to the TB bacillus, including binding and phagocytosis by host macrophages and epithelial cells, intracellular trafficking and phagosome-lysosome fusion within infected host cells, cytokine production and T cell activation [3,4]. However, SP-A-, SP-D and SP-A/D-deficient mice are not more susceptible to *M. tuberculosis* than their wild-type counterparts [8].

Collectin-11 (CL-11, alias CL-K1) is a soluble protein expressed primarily in the adrenal gland, kidney, and liver, as well as in other organs, such as the lung, although to a lesser extent [9,10]. It binds to apoptotic cells and distinct pathogen species (e.g. *Escherichia coli*, *Candida albicans*, influenza virus, but not *Listeria monocytogenes* or *Pseudomonas aeruginosa*), leading to complement activation via mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) [11,12]. Recombinant CL-K1 mostly forms monomers and dimers of subunits composed of three polypeptide chains; however, *in vivo*, native CL-K1 forms more complex heteromeric structures, ranging from dimers to hexamers of subunits in tight association with another structurally-related collectin, collectin L1 (CL-L1) [13], forming what is now designated CL-LK [14].

Since CL-K1 recognizes mannose [11], and given that the mycobacterial cell envelope is rich in mannose-containing glycoconjugates, including glycoproteins, glycolipids and lipoglycans, we asked whether CL-K1, either in recombinant or native CL-LK form, could recognize *M. tuberculosis* and influence immunity to *M. tuberculosis*. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, here we report that, while CL-K1 binds to the bacillus through its ManLAM component, mice deficient for this collectin do not display any increased susceptibility or altered immunopathology related to *M. tuberculosis* infection. Notwithstanding, an assessment of the amount of circulating CL-LK in patients with TB, as compared to in healthy infected and non-infected control individuals, revealed an inverse correlation to the magnitude of the immune response to *M. tuberculosis*, suggesting that CL-LK might be used as a novel biomarker for TB.

Materials and Methods

Bacteria, macrophages and infection

Human monocytes were obtained from healthy blood donors (*Etablissement Français du Sang*, EFS, Toulouse, France) with written informed consent (under EFS Contract n°121/PVNT/TOU/IPBS01/2009-0052, which was approved by the French Ministry of Science and Technology, agreement n°AC2009-921, following articles L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code). Monocytes were prepared following a previously published procedure [15]. For differentiation in macrophages, monocytes were allowed to adhere to the microscope cover glasses (VWR international) in 6-well or 24-well plates (Thermo Scientific), at 1.5×10^6 cells per well and 3×10^5 cells per well, respectively, for 2 h at 37°C in warm RPMI 1640 medium (GIBCO). The medium was then supplemented with 10% FCS (PAN-BIOTECH), 1% sodium pyruvate (GIBCO) and 0.1% β -mercaptoethanol (GIBCO), considered from here as 'complete' RPMI, and human M-CSF (Miltenyi Biotec) at 20 ng/mL. Cells were allowed to differentiate for 5–7 days. The cell medium was renewed every third or fourth day of culture. Mouse bone marrow macrophages were prepared as described previously [16].

M. tuberculosis (H37Rv strain) was grown in Middlebrook 7H9 culture medium (Difco) supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase (ADC, Difco), 0.05% Tween-80 (Sigma), or

on Middlebrook 7H11 agar (Difco) supplemented with 10% oleic acid-ADC (OADC, Difco). GFP-expressing *M. tuberculosis* was generated and cultivated as previously described [15]. For *in vitro* infection experiments, bacterial clumps were disaggregated after at least 20 passages through a 25G needle. Macrophages were infected with *M. tuberculosis* at a multiplicity of infection of 1 bacterium/10 macrophages in complete RPMI medium for 4 h at 37°C. Cells were then washed in RPMI and further incubated at 37°C for the indicated time periods. For bacterial counting, cells were lysed and cell lysates were plated onto 7H11 agar medium for CFU scoring.

Binding and opsonization experiments

All binding experiments were performed in TBS buffer (20 mM Tris, 125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) containing 0.5 mg/mL BSA (Sigma). Non-specific binding to *M. tuberculosis* was prevented by incubating the bacteria for 30 min at room temperature in TBS buffer containing 2 mg/mL BSA. Bacteria were then incubated with native CL-LK (5 µg/mL, prepared as in [17]) at 37°C for 1 h in the presence or absence of 20 mM EDTA (Euromedex) or 50 mg/mL purified mannan. After washing in TBS, bacteria were incubated with a biotinylated monoclonal anti-CL-K1 antibody (HYB14-29 [18]) at 2 µg/ml for 1 h at room temperature. Secondary detection was achieved using APC-coupled Streptavidin (eBioscience) (for 20min at room temperature). Bacteria were then washed and fixed for 2 h at room temperature in PBS containing 4% paraformaldehyde (Polyscience)

FACS & ELISA analysis

For lipoarabinomannan binding experiments, ManLAM or demannosylated ManLAM (α ManLAM, prepared as previously described [19]) were coated in 96-well plates (Nunc Immuno-plates Maxisorp, Sigma) in water:ethanol (1:1, v/v) at 100 ng/well. The plates were dried and incubated with TBS buffer containing 2 mg/ml BSA at room temperature for 2 h (saturation step). The plates were then incubated with different concentration of native CL-LK at room temperature during 2 h, in the presence or absence of EDTA or mannan, as described above. After washing, CL-LK was detected using the biotinylated monoclonal anti-CL-K1 antibody at 0.5 µg/mL (1 h at room temperature) and streptavidin-HRP at 100 ng/mL (30 min at room temperature). After washing, substrate solution (TMB substrate reagent set, BD Biosciences) was added for 30 minutes at room temperature and the reaction was stopped with H₂SO₄. Colorimetric analysis was performed using a spectrophotometer at an OD of 450nm-570nm. For opsonization experiments, GFP-expressing *M. tuberculosis* H37Rv was incubated with native CL-LK (10 µg/ml) at 37°C for 1 h in presence or absence of 10% AB human serum (Sigma). Human macrophages were then infected at a multiplicity of infection of 5 bacteria/macrophage for 4 h at 37°C under 5% CO₂ in complete RPMI. Cells were then washed, fixed and analyzed by flow cytometry (LSRII, BD Biosciences).

Mouse, infection and RT-qPCR

CL-K1^{-/-} mice were generated as described elsewhere (Wakamiya *et al.* Manuscript in preparation). Gene inactivation was verified by PCR after tail DNA extraction using the Fast Tissue-to-PCR kit (Fermentas) following the manufacturer's instructions. PCR was performed using primers P1 (5'-CTGCTTCAAGCCATGAATCTCTGTTTGTA-3'), P2 (5'-CAGCAGGGAC AGGAAAGCCAGGCTAATCAG-3') and P3 (5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTAT GACT-3') and using the PCR mastermix kit (Fermentas) following the manufacturer's recommendations. Cycling conditions consisted in 10 min at 95°C, followed by 30 cycles of (0.5 min at 94°C, 1 min at 65°C, 1 min at 72°C), followed by 7 min at 72°C. A typical PCR result is

displayed in [S1 Fig](#). All mouse experiments were performed in animal facilities that meet all legal requirements in France and by qualified personnel in such a way to minimize discomfort for the animals. All procedures including mouse studies were conducted in strict accordance with French laws and regulations, in compliance with the European community council directive 68/609/EEC guidelines and its implementation in France. All protocols were reviewed and approved by the Regional Ethical Committee (reference MP/ 04/26/07/03). All efforts were made to minimize suffering. The study did not involve humane endpoints. For colony forming unit (CFU) counts of lungs and spleens and RNA collection, mice were euthanized by cervical dislocation. Six-to-twelve-week-old female C57BL/6 mice (CL-K1^{-/-} and WT) were anesthetized with a cocktail of ketamine (60 mg/kg; Merial) and xylazine (10 mg/kg; Bayer) and infected intranasally with 1,000 mycobacteria. At different time points, mice were sacrificed, and lungs and spleen were collected, lysed and bacterial CFUs were scored after plating onto agar 7H11 medium. RNA from lungs was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen). The amount and purity of RNA was measured using a NanoDrop ND-1000 apparatus (Thermo Scientific) by measuring absorbance at 260/280nm. Double-stranded cDNA was reverse-transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Specific PCR primers ([S1 Table](#)) were designed using QuantPrime. Real time quantitative PCR was performed with gene targeted primers using qPCR Mastermix plus SYBR Green (Eurogentec), according to the manufacturer's protocol. All real-time qPCR reactions were carried out using a 7500 Real-Time PCR System and data were analyzed using the 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems). PCR array data were calculated by the comparative cycle threshold method, normalized with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) housekeeping gene, and expressed as mean fold change in experimental samples relative to control samples.

Patients

Human plasmas were obtained from participants with informed consent of the study that was approved by the national ethics committee to the Ministry of Health in Madagascar (Agreement N°033-SANPF/CAB of the 20 February 2004). TB patients over 15 years of age were recruited at the principal TB health centre in Antananarivo, Madagascar. The household contacts of the included TB patients were visited at home by the study physicians and invited to join the study if they were ≥ 1 year old, living in the same house as the TB patient. The healthy controls were selected among the healthy consulting individuals at the anti-rabies centre at the Institute Pasteur of Madagascar. Subjects were invited by the physicians to give informed consent, interviewed and examined. Only subjects who gave informed consent were included. Participants underwent a PPD skin test (10 units; Tuberculin Purified Protein Derivative, Aventis Pasteur). Induration was recorded after 72 hours. A venous blood sample was drawn into a Vacutainer tube containing heparin for ELISPOT-Interferon-Gamma Release Assay (IGRA). PBMC were separated from heparinized whole blood and plasmas were stored at -80°C for further analysis. PBMC were purified as described elsewhere [20]. ELISPOT-IGRA was performed as previously described [21]. Wells were counted and the mean number of spot-forming cell (SFC) per well for each antigen was calculated. The mean number of SFC of the negative control was subtracted and transformed to the number of SFC per 2×10^5 cells. The cut-off point for IGRA-positivity was taken as 1.64 standard deviations of the negative control for the whole cohort. Patients were treated according to the National TB Control Program strategy, *i.e.* 8-month therapy including 2 months with isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide, followed by 6 months with isoniazid and ethambutol.

CL-LK (CL-K1) quantification

The concentration of CL-LK was quantified by assessment of the concentration of CL-K1 by ELISA, as previously described [18]. This sandwich ELISA based on two different MAbs anti-CL-K1 gives parallel curves between measurements of CL-K1 and CL-LK [14].

Statistical analysis

Data were analyzed using the Student's *t* test. Correlations were evaluated using the Pearson's test. ROC analysis was performed using the Prism software package.

Results and Discussion

In order to evaluate whether CL-LK binds to *M. tuberculosis in vitro*, we conducted a binding experiment where bacteria were incubated with serum-purified human CL-LK for 1 h at 37°C. CL-LK was subsequently detected using secondary fluorescent staining and bacteria were analyzed by flow cytometry. Our gating criteria for flow cytometry analysis are detailed in S2 Fig. Our data (Fig 1A & S2 Fig) indicate that CL-LK is able to bind *M. tuberculosis* in a dose-dependent manner, and that this binding is Ca²⁺- and mannose-dependent, as EDTA and mannan could inhibit this process. By contrast *M. tuberculosis* binding by commercially available recombinant CL-K1 was inefficient (data not shown), most likely because of perturbed oligomerization, compared to the native form. The lipoglycan mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM) is one of the major constituents of the mycobacterial cell envelope, and is recognized by several C-type lectins, such as SP-A, SP-D, MR and DC-SIGN [15,22]. *In vitro* binding experiments indicated that ManLAM is recognized by CL-LK, in a Ca²⁺- and mannose-dependent manner (Fig 1B). Moreover ManLAM recognition by CL-LK relies on mannose caps in ManLAM, as their removal upon treatment with an α -mannosidase resulted in severe reduction in lipoglycan binding by CL-LK (Fig 1B). Interestingly, we found that CL-LK does not bind to the fast growing mycobacterial species *Mycobacterium smegmatis*, in which the LAM molecule is devoid of mannose caps (data not shown).

M. tuberculosis has been reported to activate the complement cascade through the classical, lectin and alternative pathways, which was shown to promote mycobacterial opsonization with complement components, and to enhance mycobacterial phagocytosis by host macrophages [23,24]. Various collectins are able to inhibit bacterial growth through binding and subsequent triggering of the complement activation cascade, leading to the formation of the membrane attack complex (MAC). Whether this holds true for *M. tuberculosis* is still unknown [25]. Nevertheless we decided to assess whether MAC activation and mycobacterial killing could be a functional consequence of CL-LK recognition of *M. tuberculosis*. However, the *M. tuberculosis* growth *in vitro* was not affected by incubation with CL-LK in the presence of 10% complete complement-containing human serum (Fig 1C). Another function for collectins, such as SP-A and -D, is to modulate the bacterial binding, phagocytosis and trafficking in host macrophages [3]. Yet, the infection of human macrophages by CL-LK-opsonized *M. tuberculosis* did not result in altered phagocytosis and intracellular survival of the pathogen (Fig 1D and 1E). In order to evaluate whether CL-LK has an impact on *M. tuberculosis* virulence and immune response to infection *in vivo*, CL-K1-deficient mice and their wild-type counterparts were infected intranasally with 10³ CFUs *M. tuberculosis*, and infection was monitored in the lungs and spleen of the infected animals. Our data indicate that CL-K1 (and thus CL-LK) deficiency has no impact on organ colonization by the pathogen (Fig 1F and 1G), which correlated with similar inflammatory response in the lung, as measured by IFN γ , TNF- α , IL-10 and IL-17 transcripts (Fig 1H). In addition, *in vitro* we found that TNF- α , IL-10 and IL-6 production by *M. tuberculosis*-infected wild-type or CL-K1-deficient mouse bone marrow-derived macrophages

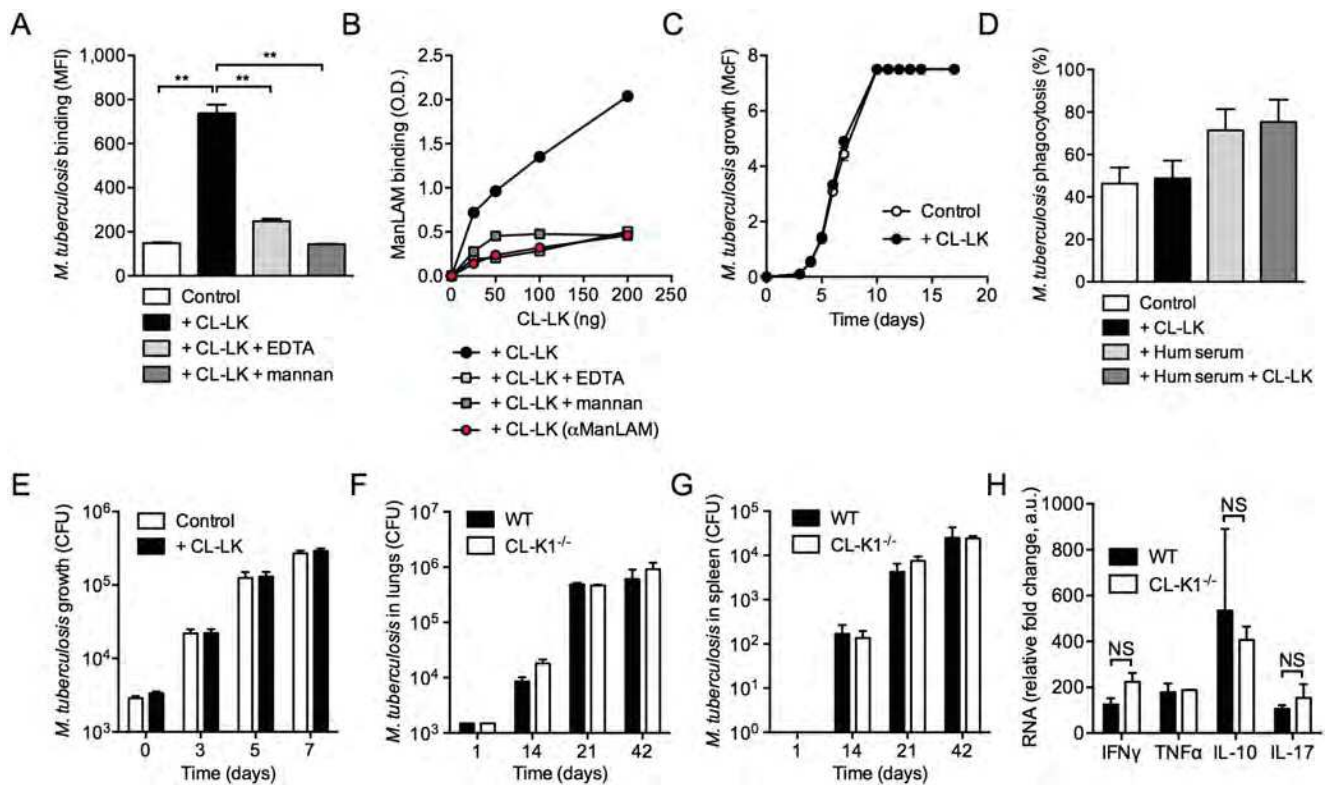


Fig 1. CL-LK recognizes ManLAM in *M. tuberculosis*. (A) *M. tuberculosis* H37Rv was incubated with (+CL-LK) or without (Control) native CL-LK (5 µg/mL) at 37°C for 1 h in the presence or absence of 20 mM EDTA, or 50 mg/mL purified mannan. Bacteria were washed and further incubated with a biotinylated monoclonal anti-CL-LK antibody that was subsequently labeled with APC-coupled streptavidin. Bacteria were analyzed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity (MFI) of a triplicate experiment is reported (±s.d.). Data were analyzed using the Student's *t* test; **, *P*<0.01; ***, *P*<0.001. A representative experiment, out of three independent experiments, is displayed. (B) Plastic plates were coated with 100 ng ManLAM or demannosylated ManLAM (αManLAM) per well, and incubated with the indicated concentration of native CL-LK at room temperature for 2 h, in the presence or absence of EDTA or mannan, as in (A). After washing, CL-LK was detected using the biotinylated monoclonal antibody and HRP-coupled streptavidin. Results are obtained by reading OD (450 nm-570 nm) with a spectrophotometer. A representative experiment, out of three independent experiments, is displayed. (C) *M. tuberculosis* H37Rv was cultured in 7H9 medium enriched with 10% complete human serum, in the presence (+CL-LK) or absence (Control) of 2 µg/mL native CL-LK. Bacterial growth was monitored by turbidity measurement (McFarland units, McF); a representative experiment, out of three independent experiments, is displayed. (D) Human monocyte-derived M-CSF-differentiated macrophages were incubated with GFP-expressing *M. tuberculosis* H37Rv at a multiplicity of infection of 5 bacteria/cell for 4 h at 37°C under 5% CO₂ in RPMI containing 10% FCS. Cells were washed and analyzed by flow cytometry. Phagocytosis % represents mean±s.d. of GFP⁺ cells of a triplicate experiment. A representative experiment, out of two independent experiments, is displayed. (E) Human macrophages were infected with *M. tuberculosis* at a multiplicity of infection of 0.1 bacteria/cell. After 4 h (time-point 0), cells were washed and further incubated in complete medium. At the indicated time-points, cells were lysed in water and bacterial CFUs were scored after plating onto agar 7H11 medium and incubation for three weeks at 37°C. Data show mean±s.d. mycobacterial growth (in CFUs) of three independent experiments. (F & G) CL-K1-deficient (CL-K1^{-/-}) mice and their wild-type (WT) littermates were infected intranasally with 10³ *M. tuberculosis* CFUs. At the indicated time-points, lungs (F) and spleen (G) were collected, lysed and bacterial CFUs were scored after plating onto agar. Data show mean±s.d. mycobacterial growth (in CFUs) of one experiment (n = 5) representative of two independent experiments. (H) Relative RNA expression for the indicated cytokines were quantified from the lungs of infected mice 21 days after infection, compared to infected WT mice from 14 days. Data show mean±s.d. ΔΔC_T, compared to HPRT housekeeping gene. The reported experiment is representative of two independent experiments. Data were analyzed using the Student's *t* test; NS, not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0132692.g001

was similar, and that *M. tuberculosis* multiplies equally well in wild-type and CL-K1-KO macrophages (data not shown). Altogether, these data indicate that although CL-LK can recognize *M. tuberculosis* *in vitro*, it does not appear to have an *in vitro* functional consequence nor does it play a major *in vivo* role in immune defense against the bacillus, at least in the mouse model.

We next decided to quantify CL-LK (CL-K1 subunit) concentration in the serum of HIV-negative patients with TB, as well as in the serum of healthy contacts and control individuals. The whole set of data is available in [S2 Table](#). CL-LK concentration in the serum was correlated neither to gender (356.3±99.09 ng/mL in healthy control males vs. 379.7±124.4 ng/mL in

healthy control females), nor to age (Pearson $r^2 = 0.03$, $P = 0.19$, in healthy controls), in agreement with our previous report [26]. Surprisingly, the amount of CL-LK in the serum of patients with active TB was found significantly reduced (278.8 ± 103.4 ng/mL), compared to that of healthy controls (374.6 ± 101.7 ng/mL, $P = 0.0008$) and healthy TB contacts (363.7 ± 122.7 ng/mL, $P = 0.0039$) (Fig 2A). Interferon-gamma release assay (IGRA) positivity reflects previous exposure and immune response to *M. tuberculosis* specifically, as the test quantifies T cell response against the *M. tuberculosis*-specific antigen ESAT-6, which is present neither in the BCG vaccine strain nor in environmental mycobacteria. IGRA-positive healthy controls and TB contacts are thus considered subjects with latent TB infection, while IGRA-negative healthy controls and TB contacts are both considered non-infected. When we distinguished individuals according to their IGRA status, only IGRA-positive TB patients were at strong variance with all other healthy individuals regarding CL-LK concentration in the serum (Fig 2B). Receiver operating characteristic (ROC) curve was generated (Fig 2C). The area under the curve was 0.722 ($P < 0.001$), with an optimal cut point providing a sensitivity of 76%, a specificity of 60%, a positive predictive value (PPV) of 54%, and a negative predictive value (NPV) of 80% at a threshold of 334 ng/mL (red circle in Fig 2C). In TB patients only, CL-LK concentration correlated inversely to the size of intradermal reaction (IDR), which reflects delayed hypersensitivity to mycobacterial antigens (Fig 2D, left panel); this was not observed in healthy contacts and control individuals (Fig 2D, middle and right panels). Finally, CL-LK concentration was partially restored in TB patients after treatment (256.4 ± 75.4 ng/mL before treatment vs. 303.2 ± 110.8 ng/mL after treatment, $P < 0.05$, Fig 2E). From this analysis, we conclude that CL-LK concentration in the serum is diminished in patients with active TB, and inversely correlates to the strength of anti-mycobacterial immune response.

All aspects considered, we believe this study makes two major contributions to the TB field. The first is the identification of a novel soluble immune receptor, CL-LK, for *M. tuberculosis*. Native CL-LK purified from human serum recognizes mannose caps in the mycobacterial ManLAM molecule; it might also recognize other mannosylated motifs in the *M. tuberculosis* cell envelope, which will need to be explored. Although we could not evidence a role for CL-LK in mycobacterial phagocytosis and intracellular survival of the bacillus in macrophages, and although CL-K1-deficient mice do not display any obvious susceptibility phenotype upon *M. tuberculosis* challenge, this does not rule out a role for CL-LK in immunity to *M. tuberculosis* in man. These findings are reminiscent of previous results obtained with other pulmonary collectins, namely SP-A and SP-D. While these two collectins were shown to influence, to some extent, mycobacterial interactions with host cells *in vitro*, mice deficient for one or both of these molecules were not more susceptible to *M. tuberculosis* infection [8]. This is likely explained by i/ potential functional redundancy between collectins and other C-type lectins, such as the MR and DC-SIGN [15,24,27], in immunity to TB; ii/ in particular, the presence and potential functional redundancy of CL-L1 in CL-K1 deficient mice might account for the lack of manifestation of phenotypic changes after *M. tuberculosis* infections; iii/ sequence and structural differences between human and mouse collectins (*e.g.* although human and mouse CL-K1 sequences share 90% identity on the primary amino acid sequence level, important amino acid differences exist in their collagen-like and C-type lectin domains); iv/ the profoundly different clinical manifestation of *M. tuberculosis* infection in mice and human. One way to evaluate whether CL-LK plays a role in TB in human would be to assess whether genetic mutations and splicing variants of CL-K1 [28] are associated to susceptibility to TB.

The second contribution of our study is the newly identification of a novel biomarker, CL-LK concentration in the serum, for TB disease. Our analysis provides unequivocal evidence that CL-LK amount is reduced in the blood of patients with active TB, as compared to healthy controls, and that this CL-LK concentration is inversely correlated to IDR size, which reflects

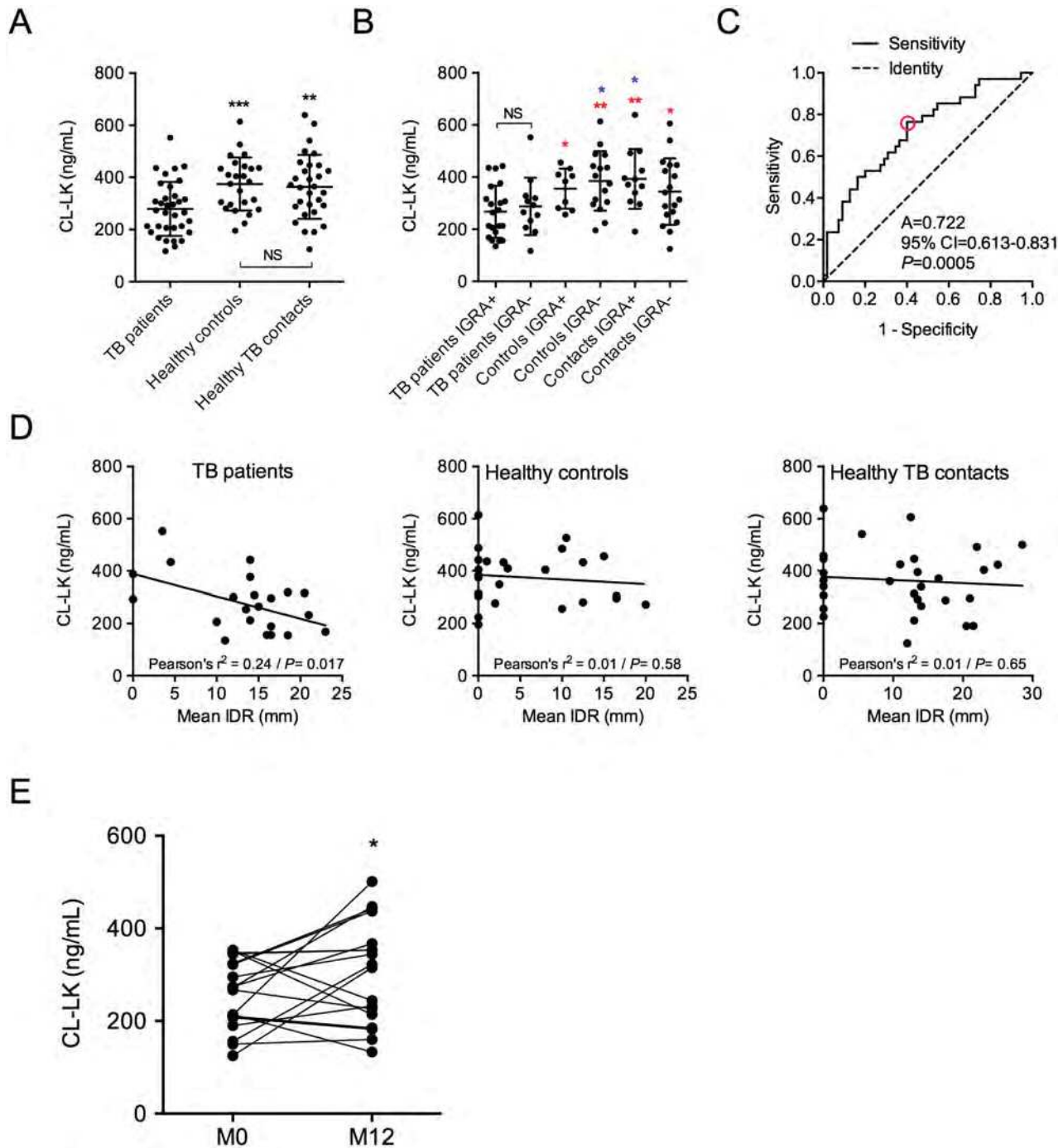


Fig 2. CL-LK is diminished in the serum of patients with TB. CL-LK was quantified by ELISA in the serum of TB patients ($n = 34$), healthy controls ($n = 25$) and healthy TB patients' contacts ($n = 30$). **(A)** CL-LK concentration according to health status. **(B)** CL-LK concentration according to health status and IGRA status. **(C)** ROC curves of CL-LK concentration in TB patients and healthy individuals. The red circle indicates best detection threshold (334 ng/mL) with a sensitivity of 0.76 and a specificity of 0.6. A, area under the curve; CI, confidence interval. **(D)** Correlation analysis between CL-LK concentration in the serum and mean IDR size (mm) in TB patients (left), healthy controls (center) and healthy TB patients' contact individuals (right). **(E)** CL-LK concentration in TB patients before (M0) and after (M12) 12 months of treatment. In (A), (B) and (E), data were analyzed using the Student's t test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant. In (B) red stars indicate comparison with IGRA+ TB patients, blue stars indicate comparison with IGRA- TB Patients.

doi:10.1371/journal.pone.0132692.g002

the strength of anti-mycobacterial immune response. Although the predictive value of CL-LK alone is clearly insufficient, it might be worth evaluating whether CL-LK measurement might be part of a biological signature that is indicative for disease severity and useful to monitor treatment efficacy for TB disease. In addition, whether the CL-LK marker is specific to TB should be assessed using cohorts of patients with other diseases, including pulmonary inflammatory disorders.

Supporting Information

S1 Fig. CL-K1^{+/+} and CL-K1^{-/-} mouse genotyping. The KO allele is visualized after amplification with primers P2 and P3. The WT allele is visualized after amplification with primers P1 and P2. The Het allele (+/-) is visualized after amplification with both primer pairs. (JPG)

S2 Fig. CL-LK binding analysis by flow cytometry. (A) Bacteria are first gated based on FSC and SSC. (B) Bacteria (gate 1, as shown in (A)) are incubated with mock (none), streptavidin-FITC (control), or CL-LK + biotin-conjugated anti-CL-LK antibody + streptavidin-FITC in the presence or not of EDTA or mannan. (C) The percentage of FITC-positive bacteria (gate 2 in (B)) is scored. (D) Mean fluorescence intensity (MFI) at different CL-LK concentrations. (TIFF)

S1 Table. Primers used for RT-qPCR. The table indicates the sequences for the different forward and reverse primers used in RT-qPCR experiments (HPRT, IFN γ , IL-10, IL-17a, TNF- α). (XLS)

S2 Table. Patients and controls characteristics. The table indicates health status, age, sex, IGRA status, mean IDR size and CL-LK concentration in all analyzed individuals. (XLS)

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the participants who gave up their time and provided samples for this study. We also thank Flavie Moreau and Laurence Lepourry for technical help with animal studies.

Author Contributions

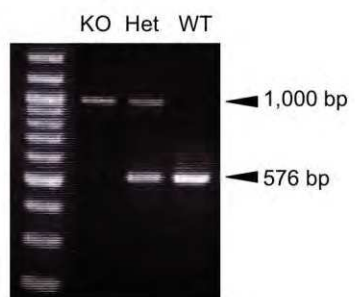
Conceived and designed the experiments: AT GLV SH DH ON. Performed the experiments: AT GLV MLH CD IM AB. Analyzed the data: AT GLV SH ON. Contributed reagents/materials/analysis tools: SH VR KM KO JN NW. Wrote the paper: AT GLV SH DH ON.

References

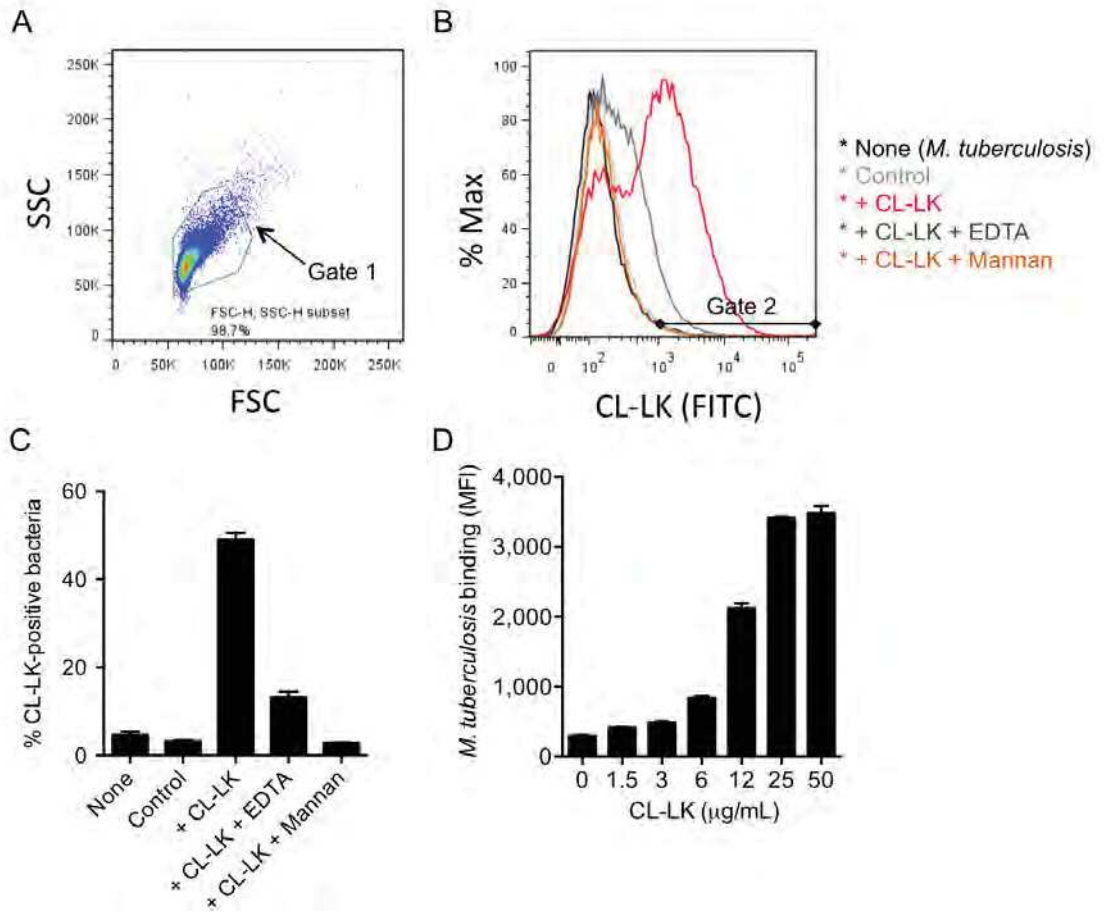
1. Zumla A, George A, Sharma V, Herbert N, Baroness Masham of Ilton (2013) WHO's 2013 global report on tuberculosis: successes, threats, and opportunities. *Lancet* 382: 1765–1767. doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)62078-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62078-4) PMID: [24269294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24269294/)
2. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP (2013) The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 31: 475–527. doi: [10.1146/annurev-immunol-032712-095939](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939) PMID: [23516984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23516984/)
3. Torrelles JB, Azad AK, Henning LN, Carlson TK, Schlesinger LS (2008) Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Curr Drug Targets* 9: 102–112. PMID: [18288961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18288961/)
4. Wright JR (2005) Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5: 58–68. PMID: [15630429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15630429/)
5. Hakansson K, Reid KB (2000) Collectin structure: a review. *Protein Sci* 9: 1607–1617. PMID: [11045608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11045608/)

6. Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS (1999) Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol* 163: 312–321. PMID: [10384130](#)
7. Sidobre S, Nigou J, Puzo G, Riviere M (2000) Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem* 275: 2415–2422. PMID: [10644694](#)
8. Lemos MP, McKinney J, Rhee KY (2011) Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of *Mycobacterium tuberculosis* infection following aerosol challenge of mice. *Infect Immun* 79: 1077–1085. doi: [10.1128/IAI.00286-10](#) PMID: [21199913](#)
9. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ et al. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol* 50: 1001–1013. PMID: [17179669](#)
10. Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, Okumura T, Fukuda M, Fukuzawa J et al. (2008) Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J Histochem Cytochem* 56: 243–252. PMID: [18040075](#)
11. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A et al. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol* 185: 6096–6104. doi: [10.4049/jimmunol.1002185](#) PMID: [20956340](#)
12. Henriksen ML, Brandt J, Iyer SS, Thielens NM, Hansen S (2013) Characterization of the interaction between collectin 11 (CL-11, CL-K1) and nucleic acids. *Mol Immunol* 56: 757–767. doi: [10.1016/j.molimm.2013.07.011](#) PMID: [23954398](#)
13. Selman L, Hansen S (2012) Structure and function of collectin liver 1 (CL-L1) and collectin 11 (CL-11, CL-K1). *Immunobiology* 217: 851–863. doi: [10.1016/j.imbio.2011.12.008](#) PMID: [22475410](#)
14. Henriksen ML, Brandt J, Andrieu JP, Nielsen C, Jensen PH, Holmskov U et al. (2013) Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin liver 1 are found in the circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol* 191:6117–27. doi: [10.4049/jimmunol.1302121](#) PMID: [24174618](#)
15. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A et al. (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197: 121–127. PMID: [12515819](#)
16. Gouzy A, Larrouy-Maumus G, Bottai D, Levillain F, Dumas A, Wallach JB et al. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* exploits asparagine to assimilate nitrogen and resist acid stress during infection. *PLoS Pathog* 10: e1003928. doi: [10.1371/journal.ppat.1003928](#) PMID: [24586151](#)
17. Henriksen ML, Madsen KL, Skjoedt K, Hansen S (2014) Calcium-sensitive immunoaffinity chromatography: Gentle and highly specific retrieval of a scarce plasma antigen, collectin-LK (CL-LK). *J Immunol Methods* 413: 25–31. doi: [10.1016/j.jim.2014.07.006](#) PMID: [25064149](#)
18. Selman L, Henriksen ML, Brandt J, Palarasah Y, Waters A, Beales PL et al. (2012) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of human collectin 11 (CL-11, CL-K1). *J Immunol Methods* 375: 182–188. doi: [10.1016/j.jim.2011.10.010](#) PMID: [22301270](#)
19. Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 166: 7477–7485. PMID: [11390501](#)
20. Doherty TM, Demissie A, Menzies D, Andersen P, Rook G, Zumla A et al. (2005) Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods* 298: 129–141. PMID: [15847803](#)
21. Rakotosamimanana N, Raharimanga V, Andriamandimby SF, Soares JL, Doherty TM, Ratsitorahina M et al. (2010) Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of *Mycobacterium tuberculosis* in acid-fast bacillus smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1094–1103. doi: [10.1128/CVI.00049-10](#) PMID: [20463103](#)
22. Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM (1994) Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 152: 4070–4079. PMID: [8144972](#)
23. Ferguson JS, Weis JJ, Martin JL, Schlesinger LS (2004) Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun* 72: 2564–2573. PMID: [15102764](#)
24. Schlesinger LS (1993) Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150: 2920–2930. PMID: [8454864](#)

25. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S (2012) *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 217: 363–374. doi: [10.1016/j.imbio.2011.07.008](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.008) PMID: [21813205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21813205/)
26. Yoshizaki T, Ohtani K, Motomura W, Jang SJ, Mori K, Kitamoto N et al. (2012) Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. *J Biochem* 151: 57–64. doi: [10.1093/jb/mvr114](https://doi.org/10.1093/jb/mvr114) PMID: [21893516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21893516/)
27. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek B et al. (2003) Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197: 7–17. PMID: [12515809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12515809/)
28. Degn SE, Jensenius JC, Thiel S (2011) Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* 88: 689–705. doi: [10.1016/j.ajhg.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.05.011) PMID: [21664996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21664996/)



Troegeler et al. Fig. S1



Troegeler *et al.* FIG.S2

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
HPRT	GTTCTTTGCTGACCTGCT-GGAT	CCCCGTTGACTGATCATTACAG
IFNg	CAGCAACAGCAAGGCGAA	GGACCTGTGGGTTGTTGACCT
IL10	TCTTTCAAACAAAGGACCAGCTG	TGGCAACCCAAGTAACCCTTA
IL17a	CCTGGACTCTCCACCGCA	CTCCGCATTGACACAGCG
TNF alpha	CAAAATTCGAGTGACAAGCCTGTA	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA

Troegeler *et al.* FIG.S3

Patient ID	Status	Age (years)	Sex (1, males; 2, females)		IGRA	Mean IDR (mm); ND, not done		CL-LK (ng/mL)
02 5075	Healthy contact	46	1	NEG		0	256,03	
02 5212	Healthy contact	5	2	NEG		0	446,24	
02 5086	Healthy contact	11	1	NEG		0	341,22	
02 5088	Healthy contact	6	2	NEG		0	226,56	
02 5213	Healthy contact	40	2	NEG		0	458,14	
02 5210	Healthy contact	13	1	NEG		5,5	540,68	
02 5087	Healthy contact	15	1	NEG		9,5	360,72	
02 5071	Healthy contact	65	2	NEG		12	124,37	
02 5233	Healthy contact	41	2	NEG		12,5	605,83	
02 5097	Healthy contact	18	1	NEG		13	446,12	
02 5072	Healthy contact	15	2	NEG		13	313,37	
02 5089	Healthy contact	39	2	NEG		13	211,37	
02 5067	Healthy contact	33	2	NEG		13,5	292,50	
02 5069	Healthy contact	25	1	NEG		14	266,84	
02 5062	Healthy contact	25	1	NEG		17,5	288,35	
02 5238	Healthy contact	22	2	NEG		20,5	190,33	
02 5230	Healthy contact	10	1	NEG		23	403,58	
02 5240	Healthy contact	5	2	NEG		25	423,68	
02 5056	Healthy contact	39	1	POS		0	307,14	
02 5204	Healthy contact	11	1	POS		0	392,33	
02 5207	Healthy contact	17	1	POS		0	364,93	
02 5211	Healthy contact	7	2	POS		0	639,05	
02 5096	Healthy contact	18	1	POS		11	424,84	
02 5059	Healthy contact	79	2	POS		13,5	395,90	
02 5229	Healthy contact	15	2	POS		14	339,57	
02 5228	Healthy contact	20	1	POS		16,5	370,87	
02 5095	Healthy contact	47	1	POS		21	296,65	
02 5203	Healthy contact	15	1	POS		21,5	190,89	
02 5231	Healthy contact	8	1	POS		22	491,44	
02 5218	Healthy contact	16	1	POS		28,5	500,17	
02 5261	Healthy control	9	1	NEG		0	195,73	
02 5343	Healthy control	15	2	NEG		0	314,60	
02 5344	Healthy control	21	2	NEG		0	488,57	
02 5492	Healthy control	8	2	NEG		0	442,56	
02 5605	Healthy control	15	2	NEG		0	223,91	
02 5640	Healthy control	12	2	NEG		0	613,95	
02 5053	Healthy control	12	1	NEG		0	304,08	
02 5490	Healthy control	11	2	NEG		0	404,67	
02 5608	Healthy control	32	2	NEG		0	374,74	
02 5615	Healthy control	17	2	NEG		1	436,13	
02 5462	Healthy control	27	2	NEG		2	276,77	
02 5613	Healthy control	27	2	NEG		2,5	348,21	
02 5642	Healthy control	30	1	NEG		3	433,05	
02 5055	Healthy control	41	2	NEG		10	484,90	
02 5466	Healthy control	21	1	NEG		10,5	526,33	
02 5052	Healthy control	14	1	NEG		16,5	295,66	
02 5260	Healthy control	6	2	POS		0	383,68	
02 5061	Healthy control	23	2	POS		3,5	409,88	
02 5639	Healthy control	22	2	POS		8	404,43	
02 5491	Healthy control	40	1	POS		10	256,04	
02 5637	Healthy control	19	1	POS		12,5	281,28	
02 5643	Healthy control	55	2	POS		12,5	432,81	
02 5614	Healthy control	40	1	POS		15	455,90	
02 5489	Healthy control	41	1	POS		20	272,11	
02 5645	TB patient	25	2	POS		16,5	305,12	
02 5237	TB patient	22	2	NEG		0	292,71	
02 5300	TB patient	51	2	NEG		0	387,45	
02 5070	TB patient	48	2	NEG		3,5	552,47	
02 5522	TB patient	36	2	NEG		10	206,12	
02 5241	TB patient	30	1	NEG		13,5	254,51	
02 5570	TB patient	39	1	NEG		14,5	307,62	
02 5085	TB patient	47	1	NEG		15	265,20	
02 5232	TB patient	5	1	NEG		15,5	413,90	
02 5877	TB patient	47	2	NEG		16	189,86	
02 5235	TB patient	20	2	NEG		18,5	319,02	
02 5895	TB patient	14	2	NEG		21	117,13	
02 5064	TB patient	25	2	NEG		21	232,05	
02 5427	TB patient	38	2	NEG		ND	328,27	
02 5519	TB patient	30	2	POS		4,5	433,64	
02 5526	TB patient	23	2	POS		10	206,01	
02 5254	TB patient	55	1	POS		11	134,98	
02 5304	TB patient	65	1	POS		12	300,63	
02 5060	TB patient	40	2	POS		14	376,98	
02 5094	TB patient	35	2	POS		14	442,38	
02 5310	TB patient	20	2	POS		14	212,12	
02 5298	TB patient	37	1	POS		16	156,20	
02 5202	TB patient	17	2	POS		16,5	156,49	
02 5234	TB patient	70	1	POS		16,5	188,99	
02 5279	TB patient	34	1	POS		16,5	296,17	
02 5206	TB patient	35	1	POS		18,5	154,93	
02 5236	TB patient	2	2	POS		20	435,84	
02 5239	TB patient	33	1	POS		20,5	315,83	
02 5205	TB patient	47	1	POS		22	273,61	
02 5065	TB patient	34	1	POS		23	168,09	
02 5796	TB patient	11	1	POS		32,5	213,15	
02 5382	TB patient	23	2	POS		ND	306,77	
02 5386	TB patient	28	1	POS		ND	264,08	
02 5412	TB patient	49	1	POS		ND	213,13	
02 5429	TB patient	23	1	POS		ND	364,24	

(C) Discussion

Cette étude permet d'apporter principalement deux contributions dans le domaine de la recherche sur la TB.

La première de ces contributions est l'identification d'un nouveau récepteur soluble pour la bactérie. Nous avons mis en évidence que CL-LK peut reconnaître directement *Mtb* grâce à une liaison directe au ManLAM (Figure 1 de la publication). De plus, comme montré dans des études précédentes (Henriksen *et al.*, 2013), nous avons confirmé que le complexe CL-LK est beaucoup plus efficace en termes de liaison que CL-K1 seul, que ce soit dans la liaison au ManLAM ou à la bactérie entière (**Figure 20**). Cependant il n'est pas connu si CL-LK pourrait lier d'autres constituants mannosylés de la mycomembrane et il serait intéressant, de ce fait, d'effectuer une recherche plus large des ligands mycobactériens de CL-LK. Dans notre étude, nous n'avons pas pu observer de contribution de CL-LK ni sur la phagocytose de la bactérie par les macrophages ni sur la survie intracellulaire du bacille (Figure 1 de la publication). De plus nous n'avons pas observé de phénotype particulier chez les souris déficientes en CL-K1 suite à une infection par *Mtb* en comparaison aux souris sauvages. En effet, les souris présentent approximativement la même charge bactérienne au niveau des poumons et des rates (Figure 1 de la publication), et ne présentent pas de différences significatives en termes de production cytokinique (Figure 1 de la publication). Cependant ces observations n'excluent pas un rôle de CL-LK dans d'autres aspects de l'immunité anti-tuberculeuse et des pistes restent à explorer.

Pour d'autres lectines solubles comme SP-A et SP-D, les souris déficientes en ces lectines ne présentent pas non plus de phénotype particulier suite à une infection par *Mtb* (Lemos *et al.*, 2011), mais on observe néanmoins une augmentation de la production de NO et de médiateurs inflammatoires chez les macrophages (Weikert *et al.*, 2000). Le fait que l'infection de souris déficientes pour des lectines données ne montrent pas de phénotype particulier peut être expliqué de plusieurs façons. D'une part, par le phénomène de redondance entre les différentes lectines qui peut compenser et masquer l'effet de la perte d'un membre de cette famille comme il est observé pour des CLR's DC-SIGN et MR (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Schlesinger, 1993; Tailleux *et al.*, 2003). D'autre part, des différences importantes existent entre le modèle murin de TB et la pathologie humaine. En particulier il existe des différences de séquence peptidique importantes entre les formes

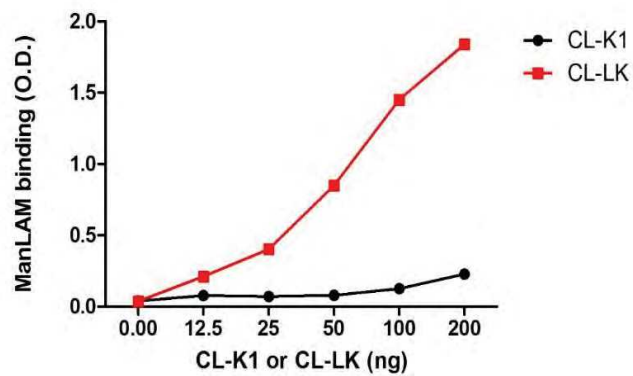
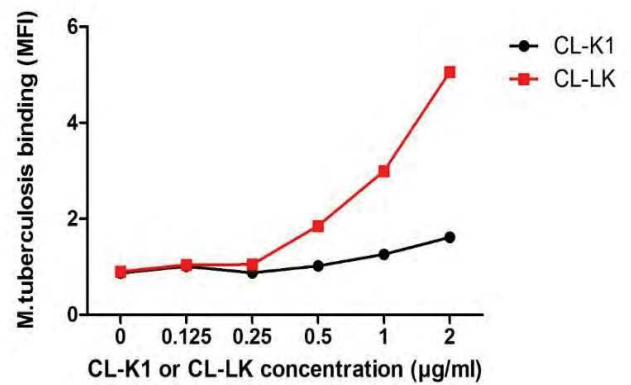
A**B**

Figure 20/ CL-LK présente une capacité de liaison plus forte que CL-K1 seule

A) Liaison dose-dépendante de CL-K1 (recombinante) ou CL-LK (purifiée du sérum) à du ManLAM immobilisé et détecté par un anti-CLR. **B)** Liaison de *Mtb* en présence de différentes concentrations de CL-LK ou CL-K1, détectée grâce à un anticorps couplé à l'allophycocyanine.

murine et humaine de la protéine (domaine CTLD) qui peuvent conduire à des différences de fonction. Il serait donc intéressant d'évaluer des modes d'action préalablement décrits pour CL-LK, notamment dans sa liaison avec MASP-1 et l'activation de la cascade du complément. Nous avons envisagé un éventuel effet direct de CL-LK sur la croissance de la bactérie en présence de sérum humain, mais les expériences n'ont pas été concluantes, et la bactérie prolifère de la même façon en présence de CL-LK ou non (Figure 1 de la publication). Cependant, seule la fonction lytique du complément *via* la formation du complexe d'attaque membranaire a été analysée. Or la cascade du complément génère également des fragments comme C3b et C5b qui peuvent avoir une action sur d'autres cellules en augmentant les mécanismes bactéricides ou en amplifiant la production de médiateurs pro-inflammatoires (Bajic *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant de regarder plus en détails cette activation du complément, à la fois d'un côté moléculaire en déterminant les interactions avec MASP1 ou MBL, mais aussi en identifiant et en quantifiant la production des fragments clivables effecteurs du complément (C3b et C5b). Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'analyser l'effet de la mobilisation de la cascade du complément sur des cellules immunitaires comme les macrophages et les DCs afin de déterminer leur degré d'activation et leur production cytokinique. Des études ont également montré que dans le cadre de processus développementaux, CL-K1 peut exercer un rôle chimio-attractant, en particulier en permettant la migration appropriée des cellules de la crête neurale (Rooryck *et al.*, 2011). Il serait intéressant de déterminer si CL-K1 peut agir sur la migration d'autres types cellulaires, comme notamment les macrophages et les DCs, acteurs très importants dans la réponse immunitaire de l'hôte (Sokol and Luster, 2015).

La seconde contribution apportée par notre étude est l'identification de CL-LK en tant que nouveau biomarqueur de la TB. Nos résultats mettent en évidence que la concentration en CL-LK dans le sang de patients atteints d'une TB active est significativement plus faible en comparaison à celui de sujets sains (Figure 2 de la publication). De plus, la concentration en CL-LK est inversement corrélée au degré d'activation de la réponse immune anti-mycobactérienne (Figure 2 de la publication). De manière intéressante, nous avons également pu montrer que le taux de CL-LK plus faible dans le sang observé chez les patients atteints de TB est rétabli 12 mois après la prise d'un traitement antituberculeux (Figure 2 de la publication). Bien que la prise en compte de CL-LK seule soit insuffisante pour constituer

un biomarqueur prédictif de la pathologie, sa combinaison avec d'autres marqueurs pourrait offrir une puissance prédictive plus grande en lien avec la sévérité de la pathologie ou l'efficacité d'un traitement.

Dans ce contexte, il serait intéressant de comprendre les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la production de CL-K1 lors d'une infection par *Mtb*. Les hépatocytes étant les principales cellules productrices de CL-K1, nous avons effectué des expériences de culture de la lignée hépatocytaires humaine HepG2 en présence de sérum de sujets atteints de TB ou non. Suite à cela, nous avons déterminé par RT-qPCR si le sérum de patient avec une TB pouvait influencer directement sur la production de CL-K1 par ces cellules. Malheureusement nous n'avons observé aucune altération significative en terme de production de cette collectine entre nos différentes conditions (**Figure 21**).

Enfin, afin de valider l'intérêt de CL-K1 comme biomarqueur de la pathologie, il serait intéressant de déterminer si un polymorphisme du gène codant pour CL-K1 est associé ou pas avec une susceptibilité accrue à développer la TB, comme il a été montré pour SP-A et SP-D (Azad *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

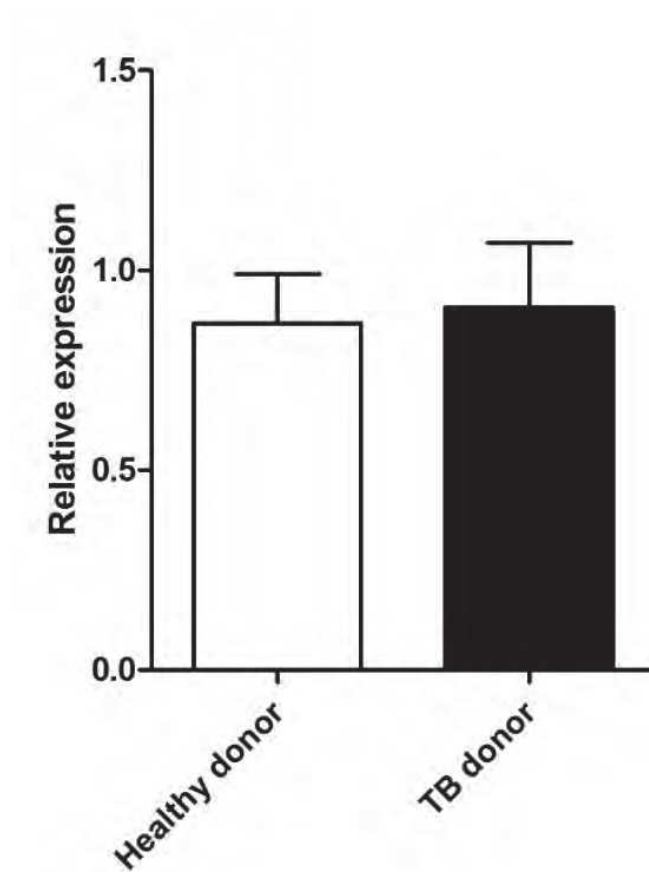


Figure 21/ Production de CL-K1 par des hépatocytes

Expression par RT-qPCR de CL-K1 dans les cellules hépatocytaires HepG2 cultivées avec du sérum de sujets sains ou de patients TB. L'histogramme est représentatif de 6 expériences indépendantes.

(A) Etude du rôle de DCIR dans l'infection par *Mtb*

La TB étant une immunopathologie d'origine infectieuse, la réponse immune de l'hôte doit être finement régulée afin de pouvoir contenir l'infection sans provoquer de dommages tissulaires. Un état inflammatoire suffisamment fort est nécessaire pour permettre une réponse immune limitant la dissémination bactérienne, notamment l'activation des macrophages (maturation phagosomale, production de cytokine inflammatoires TNF- α et NO, ...) et celle des lymphocytes Th1 producteurs d'IFN γ par l'entremise de DC productrices d'IL-12. Cependant l'activité inflammatoire non contrôlée du TNF- α et de l'IFN γ peut conduire à des manifestations immunopathologiques à l'origine de la TB. Le système immunitaire de l'hôte doit donc maintenir une balance entre l'induction de l'inflammation et des mécanismes de résolution de celle-ci, comme par exemple par l'intermédiaire de l'IL-10 ou des Treg.

DCIR apparaît comme un acteur central dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, DCIR inhibe l'activation de TLRs impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α (Meyer-Wentrup *et al.*, 2009). De plus, l'expression de surface de DCIR exerce un rôle majeur dans la régulation de la mise en place de la réponse Th1 en inhibant les capacités de prolifération et d'activation des cellules dendritiques (Fujikado *et al.*, 2008). Un défaut d'expression de DCIR conduit, de ce fait, à une plus grande génération de lymphocytes T CD4 $^{+}$ producteurs d'IFN γ se traduisant par la survenue de manifestations immunopathologiques comme le lupus érythémateux (Liu *et al.*, 2015) et la polyarthrite rhumatoïde (Guo *et al.*, 2012).

DCIR pourrait donc jouer un rôle inhibiteur de l'axe IL-12/IFN γ , un composant indispensable de la réponse immune de l'hôte pour le contrôle de l'infection par *Mtb*. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle de DCIR dans la réponse anti-*Mtb*. Bien qu'il ait déjà été montré que DCIR possède un rôle dans des réponses antivirales dans les contextes de l'infection par CHICKV (Long *et al.*, 2013) ou HIV (Lambert *et al.*, 2010), aucune étude n'a abordé le rôle de DCIR dans une infection bactérienne. Notre étude vise donc pour la première fois à comprendre l'implication de DCIR dans le contexte de l'infection par *Mtb*. Nous avons entrepris cette étude en utilisant une approche globale exploitant des modèles

cellulaires compétents ou déficients pour DCIR *in vitro* afin de définir plus précisément les réponses moléculaires et transcriptionnelles liées à DCIR, et l'avons complétée par des études *in vivo* chez le macaque et la souris.

(B) Publication (Format de soumission pour *The Journal of Experimental Medicine*)

C-type lectin receptor DCIR modulates immunity to tuberculosis by sustaining type I interferon signaling in dendritic cells

Anthony Troegeler¹, Ingrid Mercier¹, Céline Cougoule¹, André Colom¹, Carine Duval¹, Thien-Phong Vu Manh³, Florence Capilla², Renaud Poincloux¹, Karine Pingris¹, Jérôme Nigou¹, Jörg Rademann⁴, Marc Dalod³, Frank AW Verreck⁵, Talal Al Saati², Geanncarlo Lugo-Villarino¹, Bernd Lepenies⁶, Denis Hudrisier^{1#}, Olivier Neyrolles^{1#*}

¹Institute of Pharmacology & Structural Biology, CNRS-University of Toulouse, France.

²INSERM/UPS-US006/CREFRE, Service d'Histopathologie, CHU Purpan, Toulouse, France.

³Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université UM2, Inserm, U1104, CNRS UMR7280, F-13288 Marseille Cedex 09, France.

⁴Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Freie Universität Berlin, Germany.

⁵Department of Parasitology, Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, the Netherlands.

⁶Immunology Unit & Research Center for Emerging Infections and Zoonoses, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany.

#These authors contributed equally to the work.

*To whom correspondence should be addressed: olivier.neyrolles@ipbs.fr

1 **Abstract**

2 Immune response against pathogens is a tightly regulated process that must ensure microbial
3 control while preserving integrity of the infected organs. Tuberculosis (TB) is a paramount
4 example of a chronic infection in which antimicrobial immunity is protective in the vast
5 majority of infected individuals, but can become detrimental if not finely tuned. Here, we
6 show that C-type lectin dendritic cell (DC) immunoreceptor (DCIR), a key component in DC
7 homeostasis, is required to modulate lung inflammation and bacterial burden in TB. DCIR is
8 expressed in pulmonary lesions in *Mycobacterium tuberculosis*-infected non-human primates
9 during both asymptomatic infection and active TB disease. In mice, we found that DCIR
10 deficiency impairs STAT1-mediated type I interferon (IFN) signaling in DCs, leading to
11 increased production of interleukin-12 (IL-12) and increased differentiation of T helper-1
12 (Th1) cells during infection. As a consequence, while DCIR-deficient mice control *M.*
13 *tuberculosis* better than wild-type animals, they also develop more inflammation
14 characterized by an increased production of tumor necrosis factor (TNF) and inducible nitric
15 oxide synthase (iNOS) in the lungs. Altogether, our study reveals a novel pathway by which a
16 C-type lectin modulates the equilibrium between infection-driven inflammation and
17 pathogen's control by sustaining type I IFN signaling in DCs.

18

19

20 **Introduction**

21 Interleukin (IL)-12, interferon (IFN) γ -producing CD4⁺ T helper-1 (Th1) cells and tumor
22 necrosis factor (TNF) are well recognized key players in immunity against *Mycobacterium*
23 *tuberculosis*, and yet, their uncontrolled production can result in progressive lung tissue
24 destruction and tuberculosis (TB) disease (Cooper, 2009; O'Garra *et al.*, 2013). Several host
25 factors, including IL-10 and regulatory T cells, have been implicated in immune modulation
26 in TB (O'Garra *et al.*, 2013). Nevertheless, the balance between pro- and anti-inflammatory
27 reactions that dictates the magnitude of TB disease, from early bacterial clearance or latent
28 infection to severe lung injury, remains incompletely understood (Ernst, 2012).

29 In addition to T cells, dendritic cells (DCs) play a key part in anti-mycobacterial immunity,
30 mostly through antigen processing and presentation, which together with the production of IL-
31 12 drive the expansion of *M. tuberculosis*-specific Th1 cells (O'Garra *et al.*, 2013). DCs
32 express a wide range of so-called pattern-recognition receptors, including Toll-like receptors
33 (TLRs), NOD-like receptors and C-type lectin receptors (CLRs) (Sancho and Reis e Sousa,
34 2012), which are involved in recognition of exogenous or endogenous ligands, in antigen
35 presentation and T cell stimulation, as well as in gene expression rewiring and production of
36 inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines.

37 Among these CLRs, DC immunoreceptor (DCIR) (Bates *et al.*, 1999) belongs to the Dectin 2
38 family (Kerscher *et al.*, 2013). This lectin is mainly expressed by DCs and has a broad
39 specificity for sugars, including mannose and fucose (Nagae *et al.*, 2016), of endogenous and
40 exogenous origins (Bloem *et al.*, 2014; Lambert *et al.*, 2008). DCIR is a rare case of a CLR
41 that contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) in its cytoplasmic tail
42 and as such is generally believed to mediate inhibitory signals in DCs. In line with this
43 concept, antibody-mediated DCIR triggering in human DCs inhibits TLR-mediated
44 production of IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 and IFN α (Meyer-Wentrup *et al.*, 2008; Meyer-

45 Wentrup *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2015), and mice deficient in the DCIR homologue Dcir1
46 (also known as Clec4a2) show an over exuberant expansion of DCs and develop more aging-
47 associated or experimentally induced antibody- and T cell-mediated autoimmune disorders
48 than their wild-type counterpart (Fujikado *et al.*, 2008; Maruhashi *et al.*, 2015; Seno *et al.*,
49 2015). Intriguingly, the mechanisms responsible for these phenotypes still remain poorly
50 understood.

51 Here, using a combination of transcriptomic analysis and biochemical assays, we found that
52 DCIR sustains type I IFN signaling by ensuring proper STAT1 phosphorylation in DCs.
53 Infection of DCIR-knock out (KO) mice along with *in vitro* assays revealed that DCIR
54 impairs anti-mycobacterial Th1 response through type I IFN-mediated down-modulation of
55 IL-12. These findings were validated beyond TB, using an *in vivo* antigen presentation assay
56 based on the adoptive transfer of peptide-loaded DCs from wild type and KO mice. In the
57 case of TB, increased IL-12 production in DCIR-KO animals translates into reduced bacterial
58 burden in the lungs of infected animals along with immunopathology. Considering that type I
59 IFNs are generally believed to play a detrimental role during TB (McNab *et al.*, 2015), our
60 findings are in agreement that these cytokines lead towards susceptibility to *M. tuberculosis*
61 infection, as evidenced by the lung bacterial burden in DCIR-KO animals. Nonetheless, we
62 also show that DCIR, through supporting type I IFN signaling, may play a key role in the
63 protection of host tissue integrity during a pertinent inflammatory infectious context.

64

65 **Results and Discussion**

66 **DCIR expression enables sustained type I IFN signaling in DCs**

67 Because DCIR polymorphisms were associated to several non-infectious inflammatory
68 disorders in human (Guo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Lorentzen *et al.*, 2007), we asked
69 whether DCIR could play a part in modulating immunity in the context of a chronic
70 inflammation of infectious nature, namely TB. We first found that DCIR is expressed at the
71 periphery of lung granulomas in *M. tuberculosis*-infected non-human primates (NHPs), a
72 model that closely mimics TB in human, during both asymptomatic infection and active TB
73 disease (Fig. S1). In order to functionally explore the role of DCIR in anti-mycobacterial
74 immunity, we sought to exploit a previously reported mouse model of DCIR (*Dcir1/Clec4a2*)
75 deficiency (Fujikado *et al.*, 2008; Maglinao *et al.*, 2013). Because DCIR is primarily
76 expressed in DCs (Bates *et al.*, 1999), in particular those from lungs and in bone marrow-
77 derived DCs (Fig. S2A and S2B), we first evaluated the impact of this CLR in a global and
78 unbiased manner through genome-wide transcriptome analysis of bone marrow-derived DCs
79 from wild-type (WT) and DCIR-KO animals before and during *M. tuberculosis* infection.
80 Functional geneset enrichment analysis and interrogation of the Interferome database
81 (Rusinova *et al.*, 2013) revealed that a significant fraction of genes, which were down-
82 regulated in DCIR-KO DCs compared to WT cells, was dependent on type I IFN and/or
83 included genes involved in defense to viruses (Fig. S3; Fig. 1A and 1B). Surprisingly, IFN-
84 stimulated genes (ISGs) modulated in KO DCs were already detected before infection, *i.e.* in
85 resting cells (Fig. 1C and 1D). This strongly suggested that DCIR recognizes host endogenous
86 ligand(s), which was already proposed in other contexts (Maglinao *et al.*, 2013). In line with
87 this, we could not evidence any binding of DCIR to either whole mycobacterial cells (Fig.
88 S4A) or purified mycobacterial surface glycosylated components (Fig. S4B), inferring that

89 DCIR-mediated signaling likely relies on recognition of one or more, yet to be identified,
90 endogenous ligand(s).

91 **Sustained STAT1 phosphorylation requires DCIR expression in DCs**

92 We next explored if DCIR deficiency resulted in the impairment of production and/or of
93 signaling of type I IFN. First, blocking ligand recognition by the type I IFN receptor subunit
94 IFNAR1 using the monoclonal antibody MAR1-5A3 resulted in a complete shut-down of ISG
95 expression (Fig. 2A), confirming that induction of these genes in infected DCs was solely due
96 to type I IFN signaling. Second, the expression of mycobacterial receptors, type I IFN
97 production or IFNAR expression in *M. tuberculosis*-infected DCs was unaltered in DCIR-
98 deficient DC (Fig. 2B-D, and Fig. S5). Third, further analysis of components of the JAK-
99 STAT pathway, which mediates type I IFN signaling, revealed that JAK1 phosphorylation
100 was unaffected in DCIR-deficient DCs, compared to in WT cells (Fig. 2E). By contrast, even
101 though there was no difference in protein levels, we found that STAT1 phosphorylation at
102 Ser₇₂₇ was diminished in KO DCs (Fig. 2F), implying a role for DCIR in regulating the
103 activity of this transcription factor. For this reason, we analyzed the phosphorylation status of
104 Src homology 2 domain tyrosine phosphatase (SHP)1 and SHP2, known to be involved in
105 dephosphorylation of STATs (Wu *et al.*, 2002; You *et al.*, 1999). We found that SHP2
106 phosphorylation was increased in DCIR-deficient cells (Fig. 2G). This suggested that the
107 increase in the phosphorylated, active form of SHP2 might be responsible for STAT1
108 dephosphorylation. Noteworthy, *M. tuberculosis* is known to stimulate TLR2, and our results
109 could be recapitulated in DCs co-stimulated with a TLR2 agonist and IFN β (Fig. 2E-G). In
110 this condition, we found that neither STAT1 phosphorylation at Tyr₇₀₁ (Fig. S6A) nor SHP1
111 phosphorylation (Fig. S6B) were modified in DCIR-KO cells compared to WT cells. Lastly,
112 treatment of the cells with the recently reported highly specific SHP2 inhibitor GS-493
113 (Grosskopf *et al.*, 2015) resulted in restored STAT1 phosphorylation in DCIR-KO cells (Fig.

114 2H), thus demonstrating that impaired STAT1 phosphorylation in DCIR-KO DCs was due to
115 SHP2. Altogether, these findings are consistent with a scenario whereby DCIR deficiency
116 leads to an increased phosphorylation of SHP2, which in turn decreases STAT1
117 phosphorylation and consequently type I IFN signaling.

118 **DCIR deficiency results in enhanced anti-mycobacterial Th1 immunity**

119 In order to explore the role of DCIR in immunity to *M. tuberculosis in vivo*, we infected
120 DCIR-KO mice and found that they harbored significantly less bacteria in their lungs and
121 spleen than WT animals (Fig. 3A). Indeed, this was associated to an increased cell infiltration
122 in the lungs of KO mice (Fig. 3B), in particular with an increased influx of T cells (Fig. 3B
123 and 3C; Fig. S7). Th1 cells are critical in immunity to TB (O'Garra *et al.*, 2013). Analysis of
124 lung T cells from *M. tuberculosis*-infected animals revealed an increased proportion of IFN γ -
125 producing Th1 cells in the lungs of DCIR-KO mice, compared to WT animals (Fig. 4A and
126 4B). Moreover, the overall production of IFN γ was increased in the lungs of KO mice (Fig.
127 4C). *Ex vivo* restimulation of lung cells with purified protein derivative (PPD), a cocktail of
128 mycobacterial antigens, indicated that at least a fraction of these Th1 cells were *M.*
129 *tuberculosis*-specific because they overproduced IFN γ in a PPD-specific manner (Fig. 4D). In
130 line with these results, given the role of the master regulator T-bet in IFN γ production and
131 Th1 lineage commitment (Szabo *et al.*, 2000), we confirmed an increase in CD3⁺T-bet⁺ Th1
132 cells in pulmonary cell infiltrates of infected DCIR-KO mice (Fig. 4E). One of the functions
133 of Th1 lymphocytes is to drive macrophage polarization towards a pro-inflammatory,
134 antimicrobial M1-like profile (Murray *et al.*, 2014). Gene expression analysis in the lungs of
135 infected KO mice revealed a decreased expression of the M2 markers *Arg1*, *Ym1* and *Mrc1*,
136 and an increased expression of the M1 markers *Nos2* and *Tnf*, compared to WT mice (Fig.
137 4F). Finally, IL-12-p70, which drives Th1 differentiation, was also produced more abundantly

138 in the lungs of infected KO mice (Fig. 4G). Collectively, these findings indicated that
139 inflammation and anti-mycobacterial Th1 response are augmented in DCIR-deficient animal.
140 In the TB context, Th1 priming occurs in the lung-draining, mediastinal lymph nodes (LNs).
141 Similar to the lungs, an increase in Th1 cells, IFN γ and IL-12 profiles was observed in the
142 mediastinal LNs from KO mice compared to those from WT mice (Fig. S8A-D). Of note, IL-
143 12p70 overproduction in DCIR-deficient DCs was recapitulated in DCs stimulated with a
144 TLR2 agonist (Fig. S8E). Type I IFNs are known to inhibit IL-12p70 in myeloid cells,
145 including DCs (McRae *et al.*, 1998), and in particular in *M. tuberculosis*-infected monocytes
146 and macrophages (de Paus *et al.*, 2013; McNab *et al.*, 2014). Accordingly, stimulation by
147 IFN β resulted in a strong suppression of IL-12p70 production by TLR2-activated DCs (Fig.
148 S8F). Unlike that recently reported in *M. tuberculosis*-infected macrophages (McNab *et al.*,
149 2014), IL-10 was not involved in IFN β /DCIR-mediated IL-12 suppression since the
150 expression of this cytokine was not modulated in DCIR-deficient DCs compared to WT cells
151 (Fig. S8G). Strikingly, treatment of TLR2-stimulated DCs with the SHP2 inhibitor GS-493
152 reduced IL-12p70 production by DCIR-KO cells to WT levels (Fig. S8H). All things
153 considered, these findings indicated that overproduction of IL-12p70, and consequently
154 increased Th1 priming, by DCIR-KO DCs during *M. tuberculosis* infection *in vivo* is likely
155 due to an impairment of type I IFN signaling, which was also observed in the LNs of infected
156 animals (Fig. S8I).

157 **DCIR expression results in impaired Th1 priming by DCs**

158 In order to generalize our findings beyond TB, we performed an *in vivo* antigen presentation
159 assay based on adoptive transfer, as described previously (Lugo-Villarino *et al.*, 2003).
160 Briefly, OT-II antigen receptor transgenic T cells were purified and injected intravenously
161 into C57BL/6J recipients. Two days later, mice were challenged in the hind footpads with
162 ovalbumin (OVA) peptide-pulsed (or unpulsed) WT or DCIR-KO DCs. After 5 days of

163 priming, popliteal LN cells were harvested from recipients, and cytokine secretion was
164 assessed. In line with our findings in *M. tuberculosis*-infected mice, the OVA-specific Th1
165 response tended to increase in the recipients animals challenged with DCIR-KO DCs (Fig.
166 5A). More markedly, the production of IFN γ and IL-12p70 was strongly increased in animals
167 challenged with DCIR-KO DCs, compared to WT DCs (Fig. 5B and 5C), which correlated
168 with a decreased expression of several ISGs (Fig. 5D).

169

170 Since DCIR contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) in its
171 cytoplasmic tail, it is thought to act as negative regulator of immune cell signaling (Sancho
172 and Reis e Sousa, 2012). However our data clearly show that DCIR deficiency results in
173 impaired type I IFN signaling in DCs, suggesting that this receptor activates, rather than
174 inhibits, the IFNAR-associated JAK-STAT pathway. Based on these findings, we propose
175 that one physiological role of DCIR is to sustain type I IFN signaling in DCs through
176 interactions with self-glycosylated ligands that remain yet to be identified. The DCIR ITIM
177 was shown to bind to unphosphorylated, but not phosphorylated SHP2 (Richard *et al.*, 2006).
178 DCIR may therefore function as a molecular sink for unphosphorylated, inactive SHP2, thus
179 limiting its capacity to deactivate STAT1; this will need to be further dissected on the
180 molecular level.

181 Another critical aspect worth highlighting is the notion that the levels of type I IFN produced
182 during *M. tuberculosis* infection have important consequences to the host. Our results support
183 the notion that type I IFNs are detrimental in TB (O'Garra *et al.*, 2013) if one considers the
184 lung bacterial burden as the main sign of TB disease. Nevertheless, we also show that DCIR,
185 through sustaining type I IFN signaling, modulates lung immunopathology, which is a
186 hallmark of TB in human, and therefore also contributes to protection. Further work is needed
187 to understand the many roles of type I IFNs in TB, as suggested by a recent study showing

188 that these cytokines can be protective or detrimental depending on the stage of *M.*
189 *tuberculosis* infection (Desvignes *et al.*, 2012). Interestingly, previous studies reported that
190 DCIR-KO animals tend to develop more autoimmune CD4⁺ T cell (Th1 or Th17)-associated
191 pathologies (Maruhashi *et al.*, 2015; Seno *et al.*, 2015). Based on our findings, it is likely that
192 these phenotypes rely on an increased IL-12 production through impaired type I IFN
193 signaling, which was not investigated in these cases.

194 In conclusion, our study identifies DCIR as a key molecular player not only in immunity to
195 TB but more generally in tuning the balance between type I and type II interferon responses,
196 which might be relevant in the context of a number of inflammatory diseases of non-
197 infectious (e.g. autoimmune) or infectious (e.g. viral) nature. Identifying DCIR ligands with
198 various pharmacological properties (agonist or antagonist) might help developing type I IFN-
199 targeting therapies for a range of inflammatory disorders, beyond TB.

200

201

202 **Materials and Methods**

203 **Ethic statements for non-human primate samples**

204 The non-human primate (NHP) study protocol was in compliance with the EC Directive 86/609/EEC,
205 approved by the local independent ethical committee prior to the start of the study, and executed under
206 Dutch law on animal experiments (agreement number DEC#579). For any particular animal, endpoint
207 was defined either by signs of severe disease (human endpoint criteria, referring to animal condition
208 by adverse body weight development, respiratory capacity and animal behavior) or by protocol, which
209 limited the follow-up time to 1 year post-infection.

210 **Non-human primate handling and vaccination**

211 NHP materials were derived from animals that were used for vaccine research and development
212 purposes. Specifically, healthy young adult female rhesus macaques (*Macaca mulatta*), all captive-
213 bred for research purposes and of homogeneous breeding background, were vaccinated (or not) with a
214 standard human dose of *M. bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) Danish 1331 (SSI, Copenhagen)
215 by intradermal injection. Nine months later they were challenged with 500 Colony Forming Units
216 (CFU) of *M. tuberculosis* strain Erdman K01 (prepared and provided under an agreement between
217 WHO and CBER/FDA with assistance of Aeras), which was administered by intra-bronchial
218 instillation under sedation. At endpoint animals were sedated, euthanized and submitted to
219 macroscopic lung pathology scoring as previously described (Lin *et al.*, 2009). Gross pathological
220 findings were assessed and described by an experienced veterinary pathologist while blinded for
221 treatment. Representative lung samples were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin and
222 embedded in paraffin for long-term storage. A blind analysis was performed to quantify
223 immunohistochemical stainings of fixed samples.

224 **Mice, cells and bacteria**

225 *Dcir1(Clec4a2)^{-/-}* mice (Maglinao *et al.*, 2013) were provided by the National Institutes of Health-
226 sponsored Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC). (See Supplemental material for
227 ethical statement and housing conditions). KO and WT (C57BL/6J) mice were housed and bred in a

228 specific pathogen-free environment at the animal facility of the Transgenèse et archivage d'animaux
229 modèle (TAAM) facility, Orléans, France. Animal care and experimentation were consistent with the
230 French guidelines and were approved by the Ministry of higher education and research (Agreement
231 number APAFIS#1269). In particular all efforts were made to minimize animals discomfort and
232 suffering.

233 Bone marrow-derived dendritic cells (DCs) were prepared from murine hind legs by flushing the
234 uncovered and opened femurs and tibiae with DPBS (Gibco). Red blood cells were lysed by addition
235 of red blood cell lysis buffer (Sigma) for 2 minutes. Subsequently, cells were separated with a cell
236 strainer and cultivated in 6- or 24-well plates (Thermo Scientific) at 2×10^6 or 5×10^5 cells per well,
237 respectively, in complete RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum
238 (PAN-Biotech), 1% sodium pyruvate (Gibco), 0.1% β -mercaptoethanol (Gibco), and 20 ng/ml
239 recombinant murine GM-CSF (Peprotech). Cells were allowed to differentiate for 5–7 days. The
240 culture medium was replaced every two to three days, and the cells were used for stimulation studies
241 between day 7 and day 9 after the start of differentiation.

242 *M. tuberculosis* (H37Rv strain) was grown in Middlebrook 7H9 culture medium (Difco) supplemented
243 with 10% albumin-dextrose-catalase (ADC, Difco), 0.05% Tween-80 (Sigma), or on Middlebrook
244 7H11 agar medium (Difco) supplemented with 10% oleic acid-ADC (OADC, Difco).

245 **Mouse infection and cell stimulation**

246 6–10-week-old female C57BL/6J or *Dcir1*^{-/-} mice were anesthetized in gaz chambers containing
247 isofluorane. Mice were infected intranasally with 1,000-1,500 CFUs of *M. tuberculosis* in 25 μ l of
248 DPBS (Gibco). Mice were killed by cervical dislocation after 21 or 42 days. Lungs and spleens were
249 harvested, homogenized, and plated onto 7H11 agar for colony counts. Bone marrow-derived DCs
250 were stimulated at 37°C for various periods of time with *M. tuberculosis* at a multiplicity of infection
251 of 3 bacteria per cell or 1 μ g/ml PAM₃CSK₄ (Invivogen), 1,000 U/ml recombinant murine IFN β
252 (Biolegend), with or without prior incubation with 1 μ g/ml of an IFNAR1 blocking antibody (clone
253 MAR1-5A3, Biolegend) for 2 hours at 37°C, or with the SHP2 inhibitor GS-493 (ref. (Grosskopf *et*
254 *al.*, 2015)) at 25 μ M for 20 hours at 37°C.

255 **Micro-array analysis**

256 RNA from lungs, mediastinal or popliteal lymph nodes, or from mouse bone marrow-derived DCs
257 were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen). The amount and purity of RNA were quantified
258 using a NanoDrop ND-1000 apparatus (Thermo Scientific) by measuring absorbance at 260/280 nm.
259 Double-stranded cDNA was reverse-transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase kit
260 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. For microarray analysis, cDNA was labelled
261 with Cy3-dCTP using the One-Color DNA labelling kit (Roche NimbleGen). Gene expression was
262 analysed using SurePrint G3 Mouse gene expression 8*60K microarray kit (Agilent). Hybridization
263 was performed using 2 µg Cy3-cDNA and the hybridization kit (Roche NimbleGen). Samples were
264 incubated for 5 min at 65°C, and 5 min at 42°C prior to loading for 17 h at 42°C according to
265 manufacturer's protocol. Microarrays were washed and scanned using an MS200 microarray scanner
266 (Roche NimbleGen). Microarrays were washed and scanned using an MS200 microarray scanner
267 (Roche NimbleGen).

268 Agilent raw files extracted by using Feature Extraction software were processed through Bioconductor
269 (version 3.1) in the R statistical environment (version 3.2.0) via the limma package (Ritchie *et al.*,
270 2015). Raw expression values were background corrected in a "normexp" fashion and then quantile
271 normalized (Bolstad *et al.*, 2003). Quality of the hybridizations and evaluation of the sampling method
272 were assessed by density plots, boxplots, principal component analyses and hierarchical clusterings
273 using the ade4 and cluster packages (Suzuki and Shimodaira, 2006). Normalized expression values
274 were then corrected for batch effects due to the cell sorts at different days, using the ComBat
275 algorithm (Johnson *et al.*, 2007) through the sva package (Leek *et al.*, 2012) and declaring 2 batches (2
276 sorting days) and the genotype and post-infection time as covariates.

277 The ComBat-corrected expression values were then used to extract, via the limma package, the genes
278 differentially expressed (FDR<0.05) between DCs from WT and *Dcir1*^{-/-} mice at each time point after
279 *M. tuberculosis* infection. The JVenn plug-in (Bardou *et al.*, 2014) was used to draw Venn diagrams
280 showing the overlaps between lists of up- or down-regulated genes in the DCs from *Dcir1*^{-/-} as
281 compared to WT mice.

282 To assess the statistical enrichment of genesets of interest in the pairwise comparisons between DCs
283 from WT and *Dcir1*^{-/-} mice at each time point after *M. tuberculosis* infection, we used BubbleMap

284 (Spinelli *et al.*, 2015), a high-throughput extension of gene set enrichment analysis (GSEA)
285 methodology (Subramanian *et al.*, 2007). BubbleMap analysis was performed with 1,000 geneset-
286 based permutations, and with “difference of classes” as a metric for ranking the genes since the data
287 were expressed in Log2 scale. The results are displayed as a BubbleMap, where each bubble is a
288 GSEA result and summarizes the information from the corresponding enrichment plot. The color of
289 the Bubble corresponds to the condition from the pairwise comparison in which the geneset is
290 enriched. The bubble area is proportional to the GSEA normalized enrichment score (NES). The
291 intensity of the color corresponds to the statistical significance of the enrichment, derived by
292 computing the multiple testing-adjusted permutation-based P-value using the Benjamini–Yekutieli
293 correction. Enrichments with a statistical significance above 0.05 are represented by empty circles.

294 **Generation of the type I interferon stimulated (ISG) and inhibited (IIG) genesets**

295 In order to generate a list of genes directly activated or inhibited by type I interferon, we used data of
296 one of our previous studies (Baranek *et al.*, 2012) where we compared the transcriptomic profiles of
297 WT *vs.* *Ifnar1*^{-/-} DC subsets coming from mixed bone marrow chimera mice, lethally irradiated and
298 reconstituted with a mixture of CD45.1 WT and CD45.2 IFNAR^{-/-} bone marrow, infected with murine
299 cytomegalovirus (MCMV). More specifically, we extracted, using the GeneSign module of the
300 BubbleGUM software (Spinelli *et al.*, 2015), the genes that were up- or down- regulated at least 2
301 folds in *Ifnar1*^{-/-} as compared to WT CD8α⁺ or CD11b⁺ conventional DCs (cDCs) from infected mice.
302 We then selected the genes commonly found up- or down-regulated in both cDC subsets to generate
303 the type I IFN inhibited or stimulated genes, respectively (Table S1). We then added hundreds of
304 public genesets downloaded from MSigDB (Subramanian *et al.*, 2005) in order to assess statistical
305 enrichments of our genesets of interest through BubbleMap (Spinelli *et al.*, 2015).

306 The heatmap was performed with Gene-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>),
307 using the ComBat-corrected expression values of the genes belonging to the ISG or IIG genesets that
308 were found regulated in DCs from DCIR-KO mice upon *M. tuberculosis* infection. Specifically, using
309 GSEA, we extracted the leading edges of the ISG geneset enriched in WT DCs at the three time
310 points, selected the genes found in the overlap of the three leading edges to display their expression

311 profiles in the heatmap. For the IIGs, we focused on the leading edge of the IIG geneset enriched in
312 DCIR-KO DCs at 4 h after *M. tuberculosis* infection.

313 **RT-qPCR**

314 For RT-qPCR, specific PCR primers (Table S2) were designed using QuantPrime. Real-time
315 quantitative PCR was performed with gene targeted primers using qPCR Mastermix plus SYBR[®]
316 Green (Eurogentec), according to the manufacturer's protocol. All real-time qPCR reactions were
317 carried out using a 7500 Real-Time PCR System and data were analyzed using the 7500 Software
318 v2.0.6 (Applied Biosystems). PCR array data were calculated by the comparative cycle threshold
319 method, normalized with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) housekeeping
320 gene, and expressed as mean fold change in experimental samples relative to control samples.

321 **ELISA and ISG reporter cell line**

322 After stimulation, supernatants from lungs, mediastinal or popliteal lymph nodes, or from bone
323 marrow-derived DCs were harvested and IFN α and IFN β (VeriKine ELISA kit), IL-12p70, IFN γ and
324 IL-10 (OptEIA kit, BD Biosciences) were detected by ELISA according to the manufacturer's
325 instructions.

326 For IFN activity measurement, supernatants from DCs were added in 6-well plates containing the B16
327 Blue IFN α /b reporter cell line (Invivogen) for 24 hours at 37°C. This reporter cell line expresses the
328 SEAP reporter gene under the control of the IFN- α / β -inducible ISG54 promoter enhanced by a
329 multimeric ISRE. Levels of SEAP were monitored using the detection medium QUANTI-Blue
330 (Invivogen) according to the manufacturer's instructions. For phosphorylation detection, DCs were
331 lysed after stimulation in buffer containing phosphatase and protease inhibitors (ThermoFisher). JAK1,
332 phospho-JAK1, STAT1, phospho-STAT1 (Ser727), and phospho-STAT1 (Tyr701) were detected by
333 ELISA (Raybiotech) according to the manufacturer's instructions. Colorimetric cell-based assays were
334 performed for detection of SHP1, phospho-SHP1 (Tyr536), SHP2, and phospho-SHP2 (Tyr542)
335 (AssaybioTech) according to the manufacturer's instructions.

336 **Binding experiments**

337 All binding experiments were performed in lectin buffer (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂)
338 containing 0.5 mg/ml BSA (Sigma). Non-specific binding to *M. tuberculosis* was prevented by
339 incubating the bacteria for 30 min at room temperature in lectin buffer containing 2 mg/ml BSA.
340 Bacteria were then incubated with 10 µg/ml of chimeric Dcir1-hIgG1 Fc(Maglinao *et al.*, 2013) at
341 37°C for 1 h in the presence or absence of 20 mM EDTA (Euromedex). After washing in lectin buffer,
342 bacteria were incubated with a PE-coupled polyclonal anti-human IgG (Fcγ-specific, eBiosciences) at
343 5 µg/ml for 1 h at room temperature. Bacteria were then washed and fixed for 2 h at room temperature
344 in PBS containing 4% paraformaldehyde (Polyscience) and analysed by flow cytometry. For ligand
345 binding experiments, different constituent of the mycomembrane, namely phosphatidylinositol
346 dimannosides (PIM₂), arabinosylated lipoarabinoamannan (AraLAM), mannosylated
347 lipoarabinomannan (ManLAM), lipomannan (LM), arabinogalactan (AG), and trehalose dimycolate
348 (TDM) were coated onto 96-well plates (Nunc Immuno-plates Maxisorp, Sigma) in water:ethanol (1:1,
349 v/v) at different concentrations. The plates were dried and incubated with lectin buffer containing 2
350 mg/ml BSA at room temperature for 2 h (saturation step). The plates were then incubated with 10
351 µg/ml of chimeric DCIR-hFc at room temperature during 2 h. After washing, binding was detected
352 using a biotinylated polyclonal anti-human IgG (Fcγ-specific, eBioscience) at 5 µg/ml for 1 h at room
353 temperature, and streptavidin-HRP at 100 ng/ml for 30 min at room temperature. After washing,
354 substrate solution (TMB substrate reagent set, BD Biosciences) was added for 30 minutes at room
355 temperature and the reaction was stopped with H₂SO₄. Colorimetric analysis was performed at 450 -
356 570 nm using a spectrophotometer.

357 **FACS Analysis**

358 Mouse DCs or primary cells obtained from homogenized lungs or mediastinal or popliteal lymph
359 nodes were stained with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies (1:100) directed against mouse
360 Clec4a2 (320507; LS-Bio), CD11b (M1/70; eBiosciences), CD11c (N418; Biolegend), TLR-2 (6C2;
361 eBiosciences), SIGNR1 (22D1; eBiosciences), Dectin 1 (bg1fpj; eBiosciences) CD86 (GL1;
362 eBiosciences), I-A/I-E (M5/114.15.2; Biolegend), PD-L1 (10F.9G2; Biolegend), IFNAR1 (MAR1-
363 5A3; eBiosciences), CD3 (17A2; Biolegend), CD4 (RM4-5; BD Biosciences), or F4/80 (BM8;
364 Biolegend). For intracellular cell staining, cells from homogenized lung or mediastinal lymph node

365 were stimulated during 4 hours at 37°C with a mix of purified anti-mouse CD3 (17A2; Biolegend) and
366 CD28 (37.51; Biolegend) at 5µg/ml or with PPD (Purified Protein Derivative) at 10µg/ml. Cells were
367 incubated in GolgiPlug (BD Biosciences) overnight. Subsequently, cells were resuspended in
368 Fixation-Permeabilization solution (BD Cytotfix/Cytoperm kit; BD Biosciences) and intracellular
369 cytokine staining was carried out according to the manufacturer's protocol. Cells were stained with
370 fluorescein-conjugated monoclonal antibodies (1:100) directed against mouse CD4 (RM4-5; BD
371 Biosciences) and IFN γ (XMG1.2; BD Biosciences). For mortality assessment, cells were stained with
372 Annexin V (BD Biosciences) according to manufacturer's instruction.

373 **Histological analysis**

374 Paraffin embedded tissue samples were sectioned and stained with hematoxylin and eosin for
375 histomorphological analysis. Histopathological scoring of TB lesions in non-human primates (NHPs)
376 (Table S3) was determined using a worksheet in which TB disease from lung biopsies was
377 described(Lin *et al.*, 2009). Histopathological scoring of TB lesions in WT and DCIR-KO mice was
378 determined by measuring area of infiltrated lung tissue using the Panoramic viewer software
379 (3DHISTECH). Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded tissue sections,
380 using polyclonal and monoclonal primary antibodies summarized in Table S4. Immunostaining of
381 paraffin sections was preceded by different antigen unmasking methods. After incubation with
382 primary antibodies, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal anti-mouse, anti-rat or
383 anti-rabbit immunoglobulin antibodies followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (ABC)
384 method (Vector Laboratories) and then were counter-stained with hematoxylin. Slides were scanned
385 with the Panoramic 250 Flash II (3DHISTECH). Virtual slides were automatically quantified for B
386 and T lymphocytes, and macrophages distributions as previously described(Verollet *et al.*, 2015). For
387 confocal microscopy, samples were stained with primary antibodies as described above and followed
388 by anti-mouse IgG isotype specific, anti-rat or anti-rabbit IgG antibodies labeled with Alexa488 and
389 Alexa555 (Molecular Probes). Samples were mounted with Prolong® Antifade reagent (Molecular
390 Probes) and examined using a 60x/1.4N.A. objective of an Olympus FV1000 confocal microscope.

391 ***In vivo* antigen presentation assays**

392 The assay was based on adoptive transfer, as described previously (Lugo-Villarino *et al.*, 2003). OT-II
393 T cells were purified from the spleen of C57BL/6J OT-II mice (a kind gift from S. Guerder, CPTP,
394 Toulouse, France) using mouse anti-CD4 microbeads (L3T4) positive selection and MACS separation
395 columns (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. Purified T cells were injected
396 intravenously into C57BL/6J mouse recipients. Two days later, ovalbumin peptide
397 (ISQAHAHAHAEINEAGR)-pulsed-bone marrow DCs from C57BL/6J or *Dcir1*^{-/-} mice were washed at
398 least three times in RPMI-1640 and administered in DPBS at a dose of $3 \cdot 10^5$ cells in a volume of 25-
399 40 μ l into the fore or hind footpads. The antigen-pulsed DCs were administered on one side, and the
400 contralateral footpad served as the control. The control footpads were injected with DCs that had not
401 been antigen-pulsed. At day 5, the draining popliteal lymph nodes were removed and teased into a cell
402 suspension. RNA was extracted to performed RT-qPCR as described in the experimental procedures
403 of the manuscript. In parallel, cells were cultured and stimulated with antigens for 4 hours in pre-
404 warmed RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 1% sodium pyruvate and 0.1% β -
405 mercaptoethanol. Supernatants were collected to perform ELISA analysis and intracellular cell
406 staining was performed.

407 **Statistics**

408 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software). Data are presented
409 as mean \pm s.e.m. of at least three independent experiments; *P*-values (paired or unpaired Student's *t*-
410 test) are relative to the indicated control. Statistical significance was assumed when $P < 0.05$.

411

412 **Author Contributions**

413 A.T., D.H. and O.N. conceived and designed all experiments, and wrote the manuscript. A.T.
414 performed all *in vivo* and *in vitro* experiments, with help from A.C. for *in vivo* experiments.
415 I.M performed and analyzed transcriptome analyses, with help from T.-P.VM and M.D. C.C.,
416 F.C. and T.A.S. performed histological staining and analysis, with help from A.C. and R.P.
417 for analysis. C.D. and K.P. provided support for *in vitro* experiments. J.N. prepared and
418 provided mycobacterial ligands. F.A.W.V. performed NHP experiments and analysis, and
419 provided material. G.L.-V. provided conceptual advise and helped writing the manuscript.
420 B.L. and J.R. provided material/reagents. All authors analyzed the data.

421

422 **Acknowledgments**

423 We acknowledge the National Institutes of Health–sponsored MMRRC National System for
424 supply of the *Dcir1*^{-/-} mice. These mice were produced and deposited to the MMRRC by the
425 Consortium for Functional Glycomics (CFG). We thank A. Bénard for conceptual advice and
426 Maha Maglinao, Julia Hütter, and Susanne Eisenschmidt for help in the production of DCIR-
427 Fc and breeding and backcrossing of the DCIR-KO mice. We thank Eric Nawrotzky for the
428 synthesis of inhibitor GS-493. This work was supported by Centre National de la Recherche
429 Scientifique (CNRS), University of Toulouse, Agence Nationale de la Recherche
430 (ANR)/Programme d’Investissements d’Avenir (PIA grant number ANR-11-EQUIPEX-0003)
431 and ANR-12-BSV3-0002 B-TB grant, French Ministry of Higher Education and Research
432 (fellowship to A.T.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM fellowships to C.D.),
433 European Union (TBVAC2020 project n° 643381), and the Bettencourt-Schueller
434 Foundation. B.L. acknowledges funding from the European Union’s Horizon 2020 research
435 and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 642870
436 (ETN-Immunoshape). T.P.V.M. was funded by the European Research Council under the

437 European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013 Grant Agreement
438 number 281225 to M.D. for the SystemsDendritic project). The funders had no role in study
439 design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

440 **Accession Number**

441 Files associated to microarray analyses have been deposited into Gene Expression
442 Omnibus under accession number GSE83271.

443 **Competing Financial Interest**

444 The authors declare no competing financial interests.

445

- 447 Baranek, T., T.P. Manh, Y. Alexandre, M.A. Maqbool, J.Z. Cabeza, E. Tomasello, K. Crozat, G.
448 Bessou, N. Zucchini, S.H. Robbins, E. Vivier, U. Kalinke, P. Ferrier, and M. Dalod. 2012.
449 Differential responses of immune cells to type I interferon contribute to host resistance to viral
450 infection. *Cell host & microbe* 12:571-584.
- 451 Bardou, P., J. Mariette, F. Escudie, C. Djemiel, and C. Klopp. 2014. jvenn: an interactive Venn
452 diagram viewer. *BMC bioinformatics* 15:293.
- 453 Bates, E.E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J.J. Pin, S.M. Zurawski, S. Patel, J.S.
454 Abrams, S. Lebecque, P. Garrone, and S. Saeland. 1999. APCs express DCIR, a novel C-type
455 lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal*
456 *of immunology* 163:1973-1983.
- 457 Bloem, K., I.M. Vuist, M. van den Berk, E.J. Klaver, I. van Die, L.M. Knippels, J. Garssen, J.J.
458 Garcia-Vallejo, S.J. van Vliet, and Y. van Kooyk. 2014. DCIR interacts with ligands from
459 both endogenous and pathogenic origin. *Immunology letters* 158:33-41.
- 460 Bolstad, B.M., R.A. Irizarry, M. Astrand, and T.P. Speed. 2003. A comparison of normalization
461 methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.
462 *Bioinformatics* 19:185-193.
- 463 Cooper, A.M. 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*
464 27:393-422.
- 465 de Paus, R.A., A. van Wengen, I. Schmidt, M. Visser, E.M. Verdegaal, J.T. van Dissel, and E. van de
466 Vosse. 2013. Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN-alpha
467 and IFN-beta. *Cytokine* 61:645-655.
- 468 Desvignes, L., A.J. Wolf, and J.D. Ernst. 2012. Dynamic roles of type I and type II IFNs in early
469 infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology* 188:6205-6215.
- 470 Ernst, J.D. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology* 12:581-
471 591.
- 472 Fujikado, N., S. Saijo, T. Yonezawa, K. Shimamori, A. Ishii, S. Sugai, H. Kotaki, K. Sudo, M. Nose,
473 and Y. Iwakura. 2008. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice
474 due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine* 14:176-180.
- 475 Grosskopf, S., C. Eckert, C. Arkona, S. Radetzki, K. Bohm, U. Heinemann, G. Wolber, J.P. von Kries,
476 W. Birchmeier, and J. Rademann. 2015. Selective inhibitors of the protein tyrosine
477 phosphatase SHP2 block cellular motility and growth of cancer cells in vitro and in vivo.
478 *ChemMedChem* 10:815-826.
- 479 Guo, J., X. Wu, C.L. Too, F. Yin, X. Lu, J. He, R. Li, X. Liu, S. Murad, L. Padyukov, and Z. Li. 2012.
480 A replication study confirms the association of dendritic cell immunoreceptor (DCIR)
481 polymorphisms with ACPA - negative RA in a large Asian cohort. *PloS one* 7:e41228.
- 482 Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic. 2007. Adjusting batch effects in microarray expression data
483 using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 8:118-127.
- 484 Kerscher, B., J.A. Willment, and G.D. Brown. 2013. The Dectin-2 family of C-type lectin-like
485 receptors: an update. *International immunology* 25:271-277.
- 486 Lambert, A.A., C. Gilbert, M. Richard, A.D. Beaulieu, and M.J. Tremblay. 2008. The C-type lectin
487 surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and
488 contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112:1299-1307.
- 489 Leek, J.T., W.E. Johnson, H.S. Parker, A.E. Jaffe, and J.D. Storey. 2012. The sva package for
490 removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments.
491 *Bioinformatics* 28:882-883.
- 492 Lin, P.L., M. Rodgers, L. Smith, M. Bigbee, A. Myers, C. Bigbee, I. Chiosea, S.V. Capuano, C.
493 Fuhrman, E. Klein, and J.L. Flynn. 2009. Quantitative comparison of active and latent
494 tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infection and immunity* 77:4631-4642.
- 495 Liu, M., X. Wu, X. Liu, J. He, Y. Su, J. Guo, and Z. Li. 2015. Contribution of dendritic cell
496 immunoreceptor (DCIR) polymorphisms in susceptibility of systemic lupus erythematosus
497 and primary Sjogren's syndrome. *Human immunology* 76:808-811.

498 Lorentzen, J.C., L. Flornes, C. Eklow, L. Backdahl, U. Ribbhammar, J.P. Guo, M. Smolnikova, E.
499 Disсен, M. Seddighzadeh, A.J. Brookes, L. Alfredsson, L. Klareskog, L. Padyukov, and S.
500 Fossum. 2007. Association of arthritis with a gene complex encoding C-type lectin-like
501 receptors. *Arthritis and rheumatism* 56:2620-2632.

502 Lugo-Villarino, G., R. Maldonado-Lopez, R. Possemato, C. Penaranda, and L.H. Glimcher. 2003. T-
503 bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by
504 dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
505 *America* 100:7749-7754.

506 Maglinao, M., R. Klopffleisch, P.H. Seeberger, and B. Lepenies. 2013. The C-type lectin receptor
507 DCIR is crucial for the development of experimental cerebral malaria. *Journal of immunology*
508 191:2551-2559.

509 Maruhashi, T., T. Kaifu, R. Yabe, A. Seno, S.H. Chung, N. Fujikado, and Y. Iwakura. 2015. DCIR
510 maintains bone homeostasis by regulating IFN-gamma production in T cells. *Journal of*
511 *immunology* 194:5681-5691.

512 McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O'Garra. 2015. Type I interferons in
513 infectious disease. *Nature reviews. Immunology* 15:87-103.

514 McNab, F.W., J. Ewbank, A. Howes, L. Moreira-Teixeira, A. Martirosyan, N. Ghilardi, M. Saraiva,
515 and A. O'Garra. 2014. Type I IFN induces IL-10 production in an IL-27-independent manner
516 and blocks responsiveness to IFN-gamma for production of IL-12 and bacterial killing in
517 *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Journal of immunology* 193:3600-3612.

518 McRae, B.L., R.T. Semnani, M.P. Hayes, and G.A. van Seventer. 1998. Type I IFNs inhibit human
519 dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *Journal of immunology* 160:4298-
520 4304.

521 Meyer-Wentrup, F., D. Benitez-Ribas, P.J. Tacke, C.J. Punt, C.G. Figdor, I.J. de Vries, and G.J.
522 Adema. 2008. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen
523 presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 111:4245-4253.

524 Meyer-Wentrup, F., A. Cambi, B. Joosten, M.W. Looman, I.J. de Vries, C.G. Figdor, and G.J. Adema.
525 2009. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine
526 production. *Journal of leukocyte biology* 85:518-525.

527 Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton,
528 L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.L. Mege, D.M.
529 Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A.
530 van Ginderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn. 2014. Macrophage activation and polarization:
531 nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14-20.

532 Nagae, M., A. Ikeda, S. Hanashima, T. Kojima, N. Matsumoto, K. Yamamoto, and Y. Yamaguchi.
533 2016. Crystal structure of human dendritic cell inhibitory receptor (DCIR) C-type lectin
534 domain reveals the binding mode with N-glycan. *FEBS letters*

535 O'Garra, A., P.S. Redford, F.W. McNab, C.I. Bloom, R.J. Wilkinson, and M.P. Berry. 2013. The
536 immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology* 31:475-527.

537 Richard, M., N. Thibault, P. Veilleux, G. Gareau-Page, and A.D. Beaulieu. 2006. Granulocyte
538 macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of
539 CLECSF6 in neutrophils: a new mechanism of action for SHP-2. *Molecular immunology*
540 43:1716-1721.

541 Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, and G.K. Smyth. 2015. limma powers
542 differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids*
543 *research* 43:e47.

544 Rusinova, I., S. Forster, S. Yu, A. Kannan, M. Masse, H. Cumming, R. Chapman, and P.J. Hertzog.
545 2013. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic*
546 *acids research* 41:D1040-1046.

547 Sancho, D., and C. Reis e Sousa. 2012. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and
548 homeostasis. *Annual review of immunology* 30:491-529.

549 Seno, A., T. Maruhashi, T. Kaifu, R. Yabe, N. Fujikado, G. Ma, T. Ikarashi, S. Kakuta, and Y.
550 Iwakura. 2015. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice deficient
551 for DCIR, an inhibitory C-type lectin receptor. *Experimental animals / Japanese Association*
552 *for Laboratory Animal Science* 64:109-119.

553 Spinelli, L., S. Carpentier, F. Montanana Sanchis, M. Dalod, and T.P. Vu Manh. 2015. BubbleGUM:
554 automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of
555 multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC genomics* 16:814.

556 Subramanian, A., H. Kuehn, J. Gould, P. Tamayo, and J.P. Mesirov. 2007. GSEA-P: a desktop
557 application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 23:3251-3253.

558 Subramanian, A., P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich,
559 S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, and J.P. Mesirov. 2005. Gene set enrichment
560 analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.
561 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:15545-
562 15550.

563 Suzuki, R., and H. Shimodaira. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in
564 hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22:1540-1542.

565 Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel
566 transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.

567 Verollet, C., S. Souriant, E. Bonnaud, P. Jolicoeur, B. Raynaud-Messina, C. Kinnaer, I. Fourquaux, A.
568 Imle, S. Benichou, O.T. Fackler, R. Poincloux, and I. Maridonneau-Parini. 2015. HIV-1
569 reprograms the migration of macrophages. *Blood* 125:1611-1622.

570 Wu, T.R., Y.K. Hong, X.D. Wang, M.Y. Ling, A.M. Dragoi, A.S. Chung, A.G. Campbell, Z.Y. Han,
571 G.S. Feng, and Y.E. Chin. 2002. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1
572 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *The Journal of biological*
573 *chemistry* 277:47572-47580.

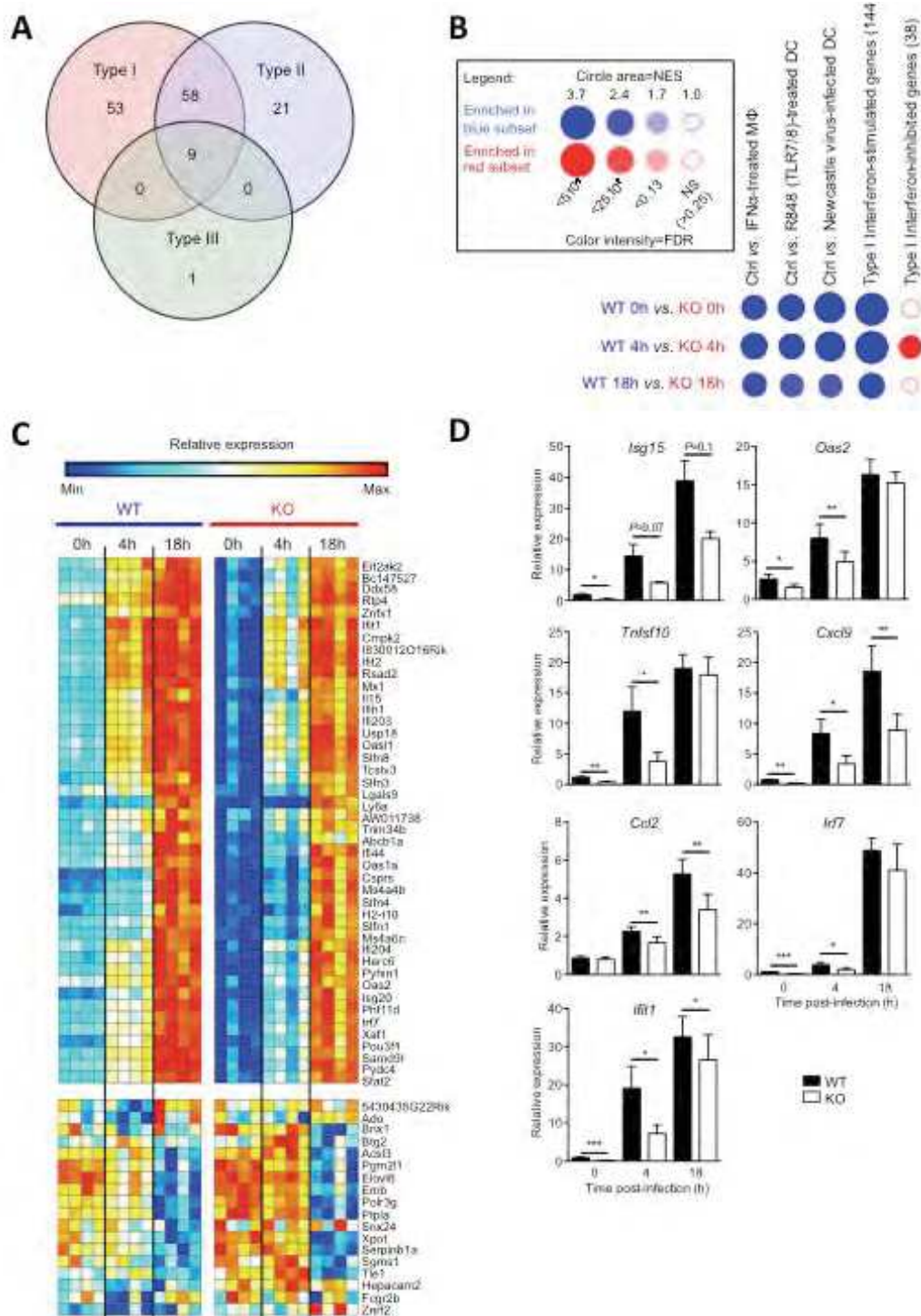
574 You, M., D.H. Yu, and G.S. Feng. 1999. Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator
575 of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Molecular and cellular biology* 19:2416-
576 2424.

577 Zhao, X., Y. Shen, W. Hu, J. Chen, T. Wu, X. Sun, J. Yu, T. Wu, and W. Chen. 2015. DCIR
578 negatively regulates CpG-ODN-induced IL-1beta and IL-6 production. *Molecular*
579 *immunology* 68:641-647.

580

581

582

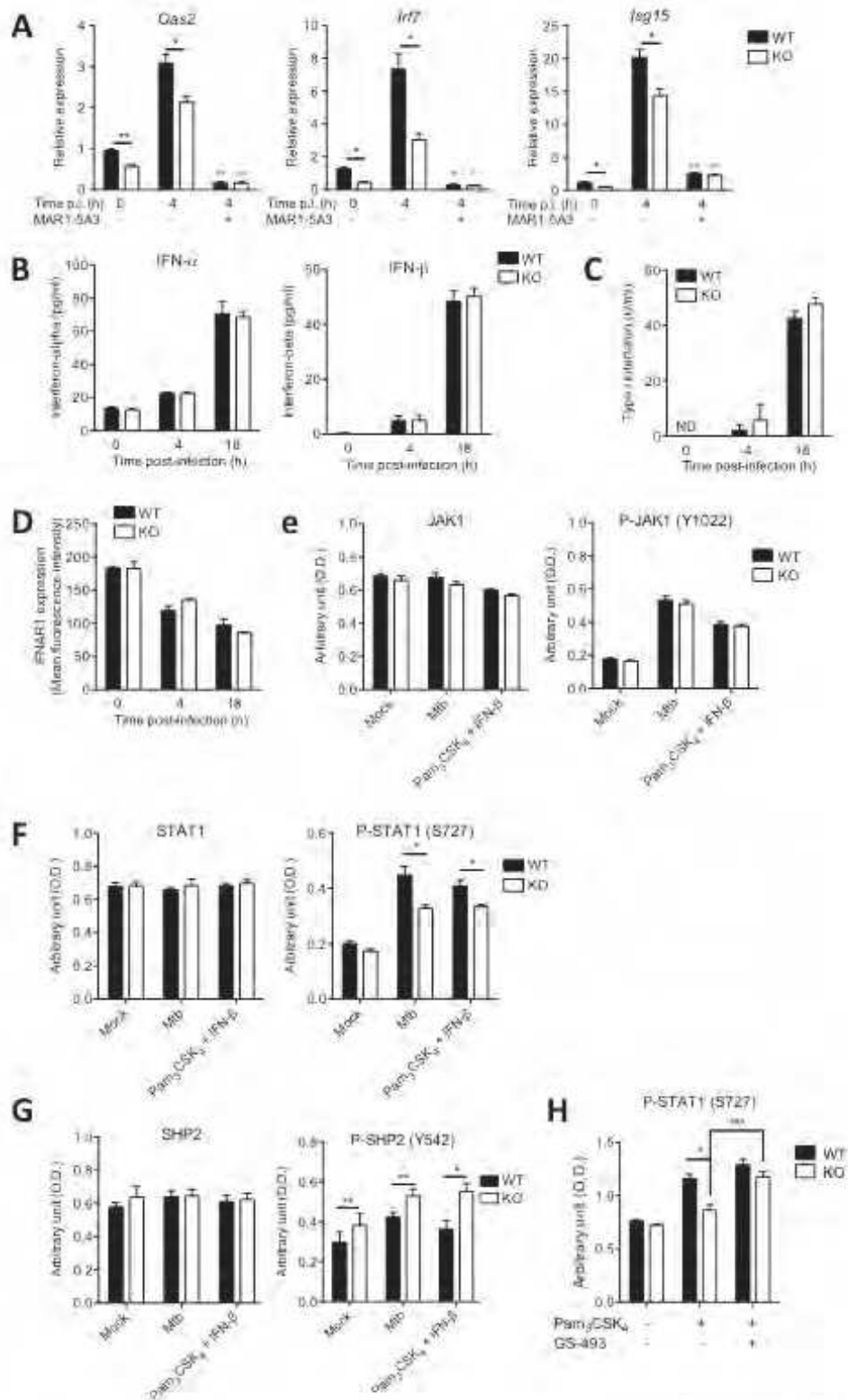


584

585 **Fig. 1** DCIR expression results in sustained expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in
 586 murine DCs. (A) Venn diagram of ISGs down-modulated in DCIR-deficient DCs, compared to in WT
 587 cells, at 0 or 4 h after *M. tuberculosis* infection. Data were generated using the Interferome online
 588 interface (Rusinova *et al.*, 2013). (B) BubbleMap analysis, a high-throughput extension of GSEA, on

589 the pairwise comparisons of DCs from WT vs. DCIR-deficient mice at different time points after *M.*
590 *tuberculosis* infection. The genesets shown, coming from independent experiments, include direct
591 ISGs either up- or down-regulated in conventional DC subsets, and genes regulated by type I IFN, or
592 by a TLR7/8 ligand known to induce type I IFN, or by a viral infection, in macrophages or DCs. (C)
593 Heatmap of the genes belonging to the ISG geneset and found down-regulated in DCs from DCIR-KO
594 as compared to WT mice (top panel), or belonging to the IFN-inhibited genes geneset and found up-
595 regulated in DCs from DCIR-deficient as compared to WT mice (bottom panel) upon *M. tuberculosis*
596 infection. For each gene, relative gene expression values across DCs from WT and DCIR-KO mice
597 infected with *M. tuberculosis* at 0, 4 and 18 h is shown and varies from low (blue) to high (red). (D)
598 Expression profiles of selected genes from the geneset of down-modulated genes in DCIR-deficient
599 DCs, and other ISGs. Data are presented as mean±s.e.m. of 4 biological replicates. Statistical analysis
600 was performed using Student's *t*-test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

601

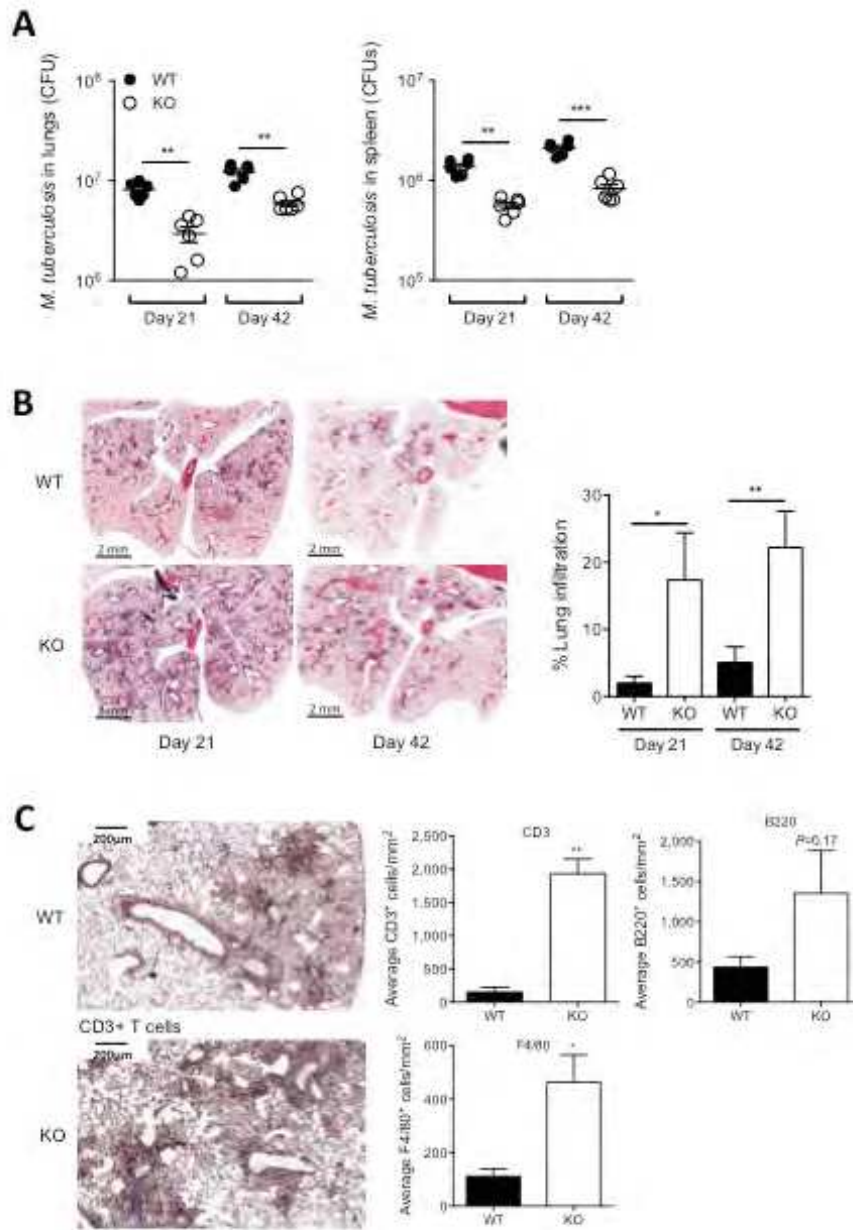


602

603 **Fig. 2** DCIR expression leads to sustained type I IFN signaling in DCs. (A) Bone marrow-derived DCs
 604 from WT or KO mice were either left uninfected or infected (4 h) with *M. tuberculosis* H37Rv in the
 605 presence or absence of the IFNAR1-blocking monoclonal antibody MAR1-5A3, as indicated. Relative
 606 expression of the ISGs *Oas2*, *Irf7* and *Isg15* was quantified by RT-qPCR. Red stars correspond to

607 comparison analysis between MAR1-5A3-treated and -untreated cells. **(B-D)** WT or KO DCs were
608 either left uninfected (0 h) or infected for 4 or 18 h with *M. tuberculosis*. IFN α and IFN β (B) were
609 quantified in the cell supernatants by ELISA, or using the type I IFN activity reporter cell line B16
610 Blue IFN α /b (C). The expression of IFNAR1 was quantified by FACS (D). **(E-H)** WT or KO DCs
611 were left unstimulated (Mock), or infected with *M. tuberculosis* for 4 h, or co-stimulated with the
612 TLR2 agonist lipopeptide Pam₃CSK₄ and IFN β for 4 h, as indicated. In (G) cells were left untreated or
613 were treated with the SHP2 inhibitor GS-493 (Grosskopf *et al.*, 2015). JAK1 (E), STAT1 (F,H) and
614 SHP-2 (G), and their phosphorylated forms were quantified in cell lysates by ELISA. In all panels,
615 data are presented as mean \pm s.e.m. of at least 3 biological replicates, and are representative of at least 2
616 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05,
617 ***P*<0.01.

618

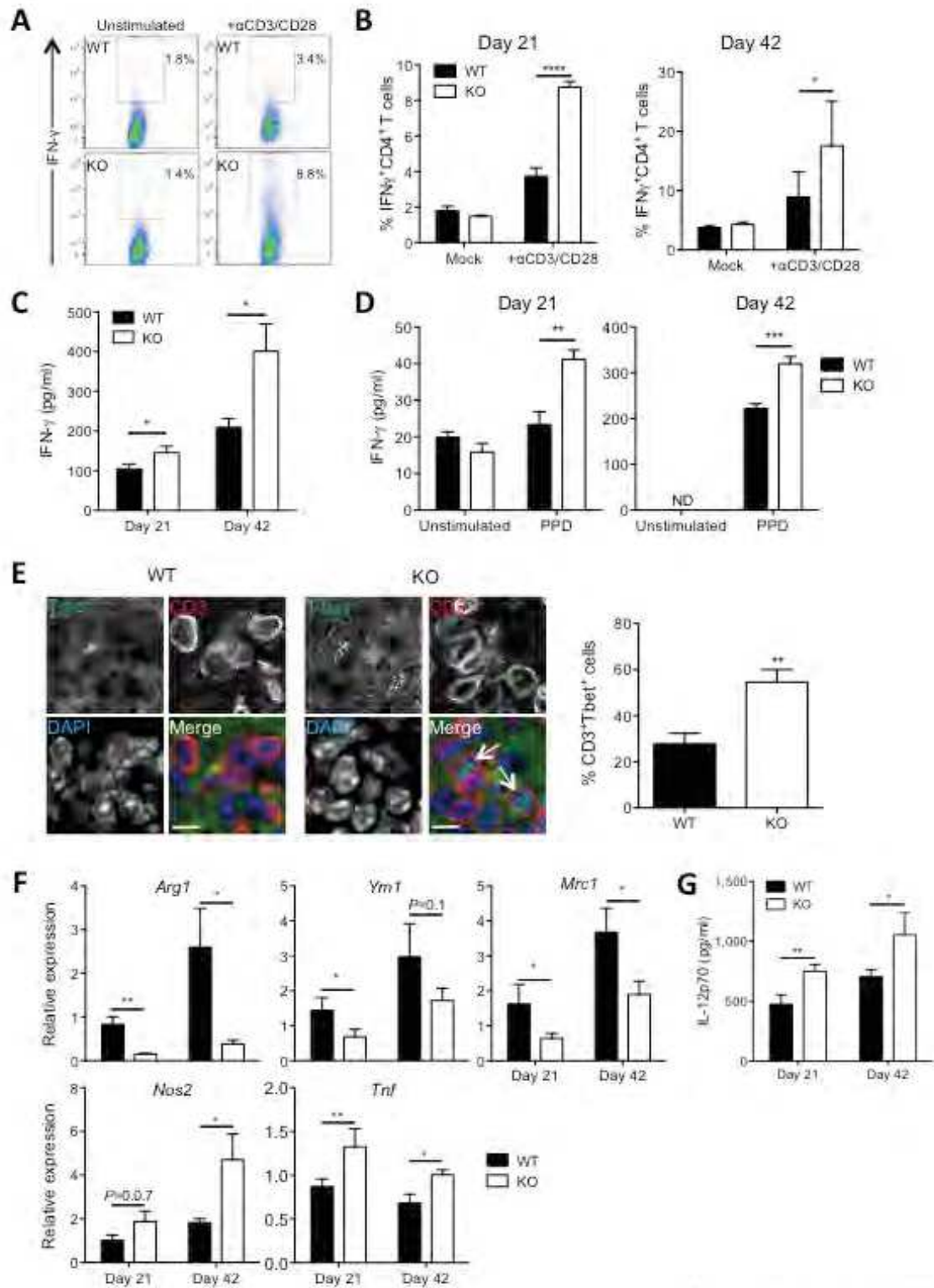


619

620 **Fig. 3** DCIR expression results in impaired bacterial clearance and controls pathology in *M.*
 621 *tuberculosis*-infected mice. (A-C) WT or KO mice were infected intranasally with \approx 1,000 CFUs of *M.*
 622 *tuberculosis* H37Rv. Lungs and spleen were collected after 21 or 42 days of infection and analyzed for
 623 CFU content (A), cell infiltration (B) and immune cell subsets at 42 days (C). In (A), each symbol
 624 represents CFUs from one animal. Data are representative of 3 independent experiments. In (B) and
 625 (C), data are presented as mean \pm s.e.m. of at least 25 fields chosen from at least 3 independent tissue
 626 slices, and are representative of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using
 627 Student's *t*-test; **P*<0.05, ***P*<0.01. In (C), left panels show CD3⁺ T cells. Other cell types (F4/80-

628 expressing macrophages and B220-expressing B lymphocytes) are quantified in the right panels and
629 pictures are displayed in Fig. S7.

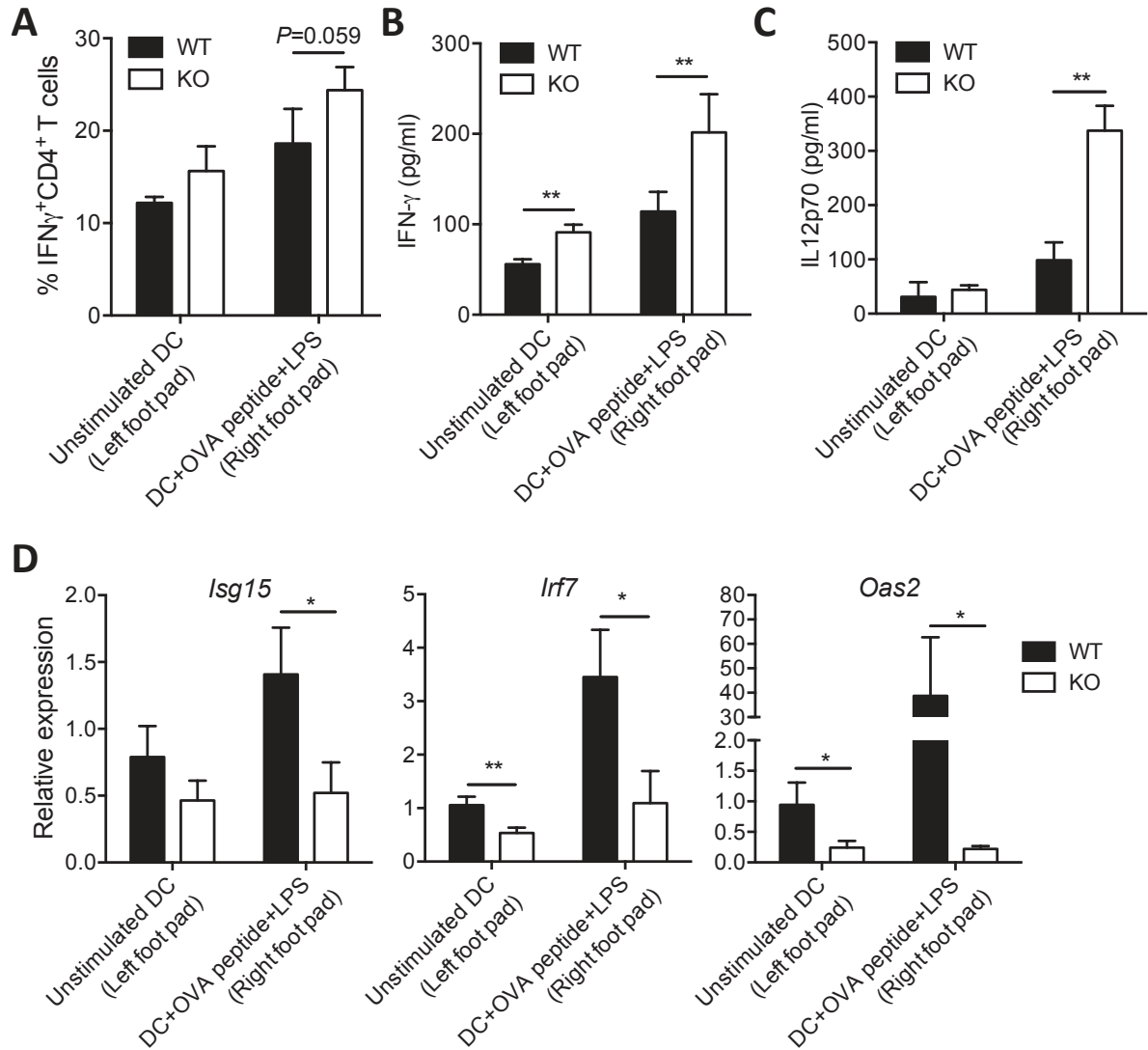
630



631

632 **Fig. 4** DCIR expression leads to impaired Th1 immunity and M1-like macrophage polarization in *M.*
 633 *tuberculosis*-infected mice. Mice were infected as in Fig. 3. (A,B) IFN γ -producing CD4⁺ Th1 cells
 634 were quantified by intracellular cytokine FACS staining after either stimulation with a cocktail of anti-

635 CD3 and -CD28 antibodies or in the absence of stimulation (Mock), as indicated. A representative
636 experiment among 3 at day 21 is depicted in (A). (B) represents mean \pm s.e.m. of 6 biological replicates.
637 (C,D) ELISA quantification of total IFN γ in lung lysates of infected mice (C) or after *ex vivo*
638 restimulation of total lung cells with PPD (D). ND, not detected. (E) Immuno-histological analysis of
639 expression of CD3 and the Th1-driving transcription factor T-bet in lungs of infected WT or KO mice.
640 Right panel presents quantification of 404 and 313 WT or KO CD3⁺ cells, respectively, and are
641 representative of n=2 mice. Arrows show the presence of T-bet in the cell nuclei. Bars represent 10
642 μ m. (F) RT-qPCR quantification of expression of macrophage M2 (*Arg1*, *Ym1*, *Mrc1*) and M1 (*Nos2*,
643 *Tnf*) polarization gene markers in the lungs of infected mice. (G) ELISA quantification of IL-12p70 in
644 lung lysates of infected mice. In (B-D, F and G), data are presented as mean \pm s.e.m. of at least 3
645 replicates, and are representative of at least 2 independent experiments. Statistical analysis was
646 performed using Student's *t*-test; **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.
647



648

649 **Fig. 5** *In vivo* function of DCIR in Th1 immunity. OT-II T-cell receptor transgenic T cells were
 650 purified and injected into C57BL/6J recipients. Two days later, mice were challenged in the footpads
 651 with ovalbumin (OVA) peptide-pulsed or unpulsed WT or DCIR-deficient DCs. After 5 days of
 652 priming, popliteal LN cells were harvested from recipients. (A) Percentage of IFN γ -producing CD4⁺
 653 OVA-specific (OT-II) Th1 cells adoptively transferred into C57BL/6J recipients and primed *in vivo*
 654 with peptide-pulsed or unpulsed DCs. (B,C) ELISA quantification of IFN γ (B) and IL-12p70 (C) in
 655 LN lysates from recipient mice. (D) RT-qPCR quantification of gene expression of the ISGs *Isg15*,
 656 *Irf7* and *Oas2* in LN lysates from recipient mice. Data are presented as mean \pm s.e.m. of 5 biological
 657 replicates. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05, ***P*<0.01.

658

Supplementary Figures

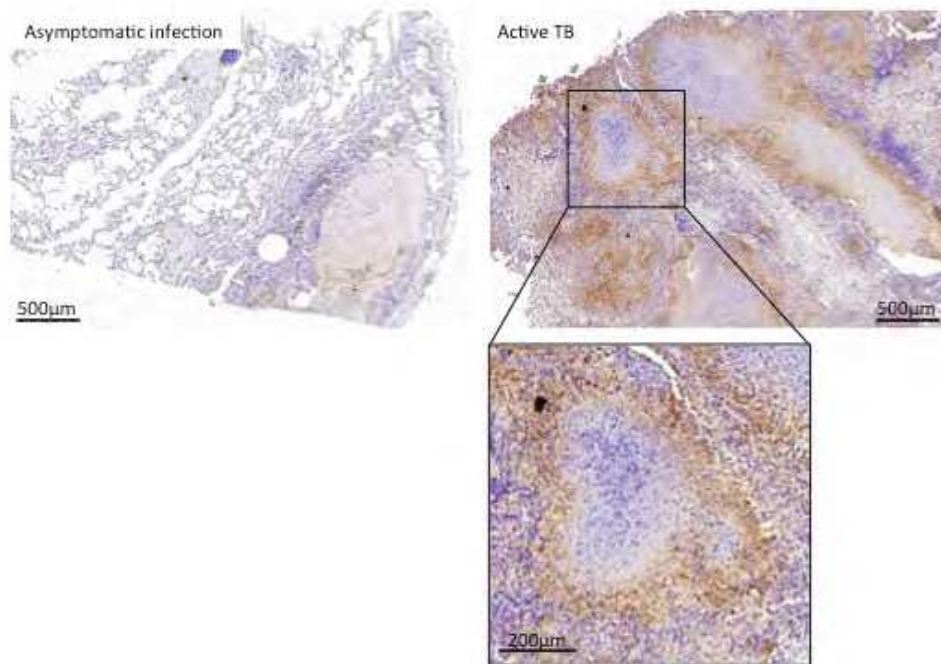


Fig. S1 Immuno-histological analysis of DCIR expression in the lungs of *M. tuberculosis*-infected non-human primates (macaques) during asymptomatic infection (left panel) or active TB disease (right panels).

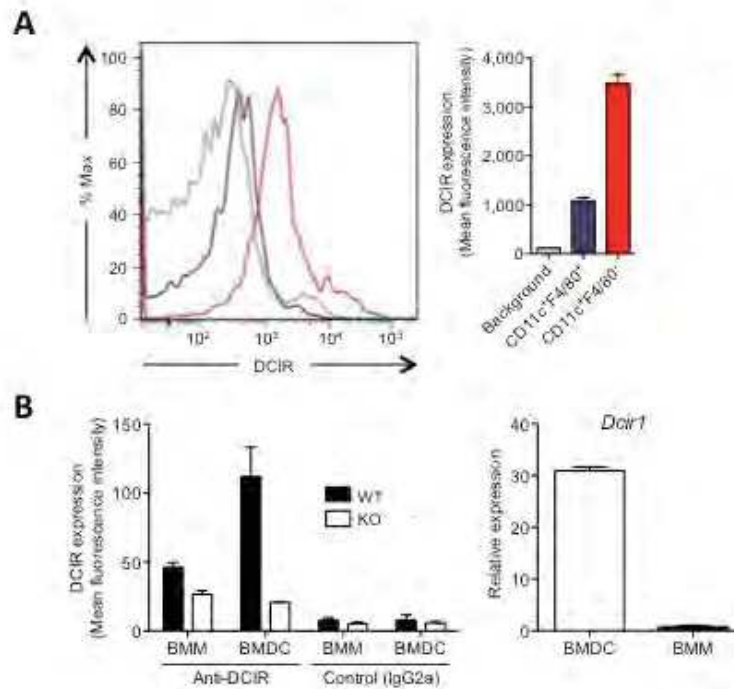
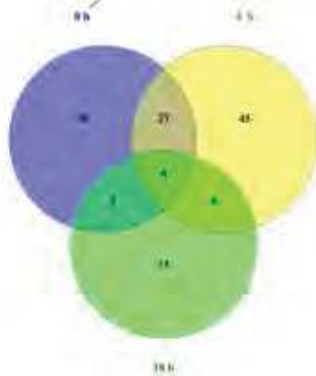


Fig. S2 DCIR (Dcir1/Clec4a2) expression in mouse macrophages and DCs, and phenotypic characterization of DCIR-KO and WT DCs. **(A)** FACS analysis of DCIR expression in CD11c⁺F4/80⁺ macrophages and CD11c⁺F4/80⁻ DCs in the lungs of naïve mice. Left panel shows a representative FACS analysis (grey line, control isotype; dark line, macrophages; red line, DCs). Right panel shows DCIR mean fluorescence intensity as mean±s.e.m. of 4 biological replicates. **(B)** DCIR expression in mouse bone marrow-derived macrophages (BMM) or DCs (BMDC). Left panel shows DCIR mean fluorescence intensity in cells from WT or KO mice as mean±s.e.m. of 3 biological replicates. Right panel shows RT-qPCR quantification of the DCIR mRNA in BMDC and BMM as mean±s.e.m. of 3 biological replicates and is representative of 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05.

A

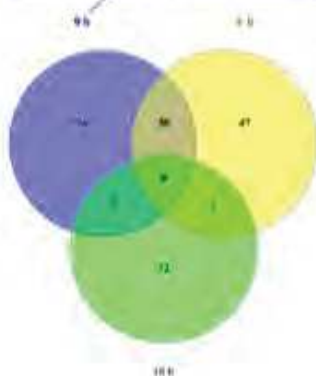
GO biological process complete	Reference list	Experiment	Expected	Fold enrichment	P-value
positive regulation of phosphorylation (GO:0042327)	899	15	3.26	4.60	6.12E-03
positive regulation of protein phosphorylation (GO:0001934)	857	14	3.11	4.50	1.92E-02
positive regulation of phosphorus metabolic process (GO:0010562)	1017	15	3.69	4.06	2.78E-02
positive regulation of phosphate metabolic process (GO:0045937)	1017	15	3.69	4.06	2.78E-02
locomotion (GO:0040011)	1027	15	3.73	4.02	3.13E-02
regulation of multicellular organismal process (GO:0091239)	2621	25	9.51	2.63	2.93E-02
positive regulation of biological process (GO:0048518)	5093	37	18.48	2.00	3.82E-02



UP-regulated in DCIR-KO as compared to WT

B

GO biological process complete	Reference list	Experiment	Expected	Fold enrichment	P-value
response to interferon alpha (GO:0035435)	20	5	0.08	63.41	1.68E-04
negative regulation of viral genome replication (GO:0045071)	41	7	1.15	43.30	3.10E-06
response to interferon-beta (GO:0035456)	36	6	1.14	42.27	6.72E-05
defense response to virus (GO:0051607)	130	14	5.1	27.31	1.75E-12
regulation of viral genome replication (GO:0045069)	66	7	2.6	26.90	8.03E-05
negative regulation of viral process (GO:0048525)	81	8	3.2	25.05	1.18E-05
negative regulation of viral life cycle (GO:1903901)	77	7	3.0	23.06	2.28E-04
response to virus (GO:0009615)	173	15	6.8	21.99	3.22E-12
negative regulation of multi-organism process (GO:0043901)	159	9	6.3	14.36	1.28E-04
regulation of viral process (GO:0050792)	146	8	5.8	13.90	1.07E-03
regulation of viral life cycle (GO:1903900)	135	7	5.3	13.15	9.67E-03
regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism (GO:0043903)	177	8	7.0	11.46	4.51E-03
innate immune response (GO:0045087)	458	20	1.81	11.08	1.11E-11
immune effector process (GO:0002252)	388	15	1.53	9.81	3.03E-07
defense response to other organism (GO:0098542)	487	15	1.92	7.81	6.73E-06
regulation of multi-organism process (GO:0043900)	419	11	1.65	6.66	6.82E-03
response to other organism (GO:0051707)	737	17	2.91	5.85	3.39E-05
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	737	17	2.91	5.85	3.39E-05
immune response (GO:0006955)	873	20	3.44	5.81	1.30E-06
response to biotic stimulus (GO:0009607)	765	17	3.02	5.84	5.87E-05
defense response (GO:0006952)	1060	20	4.18	4.79	3.60E-05
immune system process (GO:0002376)	1674	27	6.60	4.09	1.17E-06
response to external stimulus (GO:0009605)	1559	22	6.15	3.58	9.51E-04
multi-organism process (GO:0051704)	1641	22	6.47	3.40	2.30E-03



DOWN-regulated in DCIR-KO as compared to WT

GO biological process complete	Reference list	Experiment	Expected	Fold enrichment	P-value
defense response to virus (GO:0051607)	130	6	3.5	17.17	1.18E-02
response to virus (GO:0009615)	173	7	4.7	15.05	3.57E-03
immune system process (GO:0002376)	1674	17	4.50	3.78	9.93E-03

Fig. S3 Venn diagram of genes up (A)- or down (B)-modulated in DCIR-deficient DCs, compared to in WT cells, at 0, 4 or 18 h after *M. tuberculosis* infection. The boxes show functional gene set enrichment analysis using Gene Ontology.

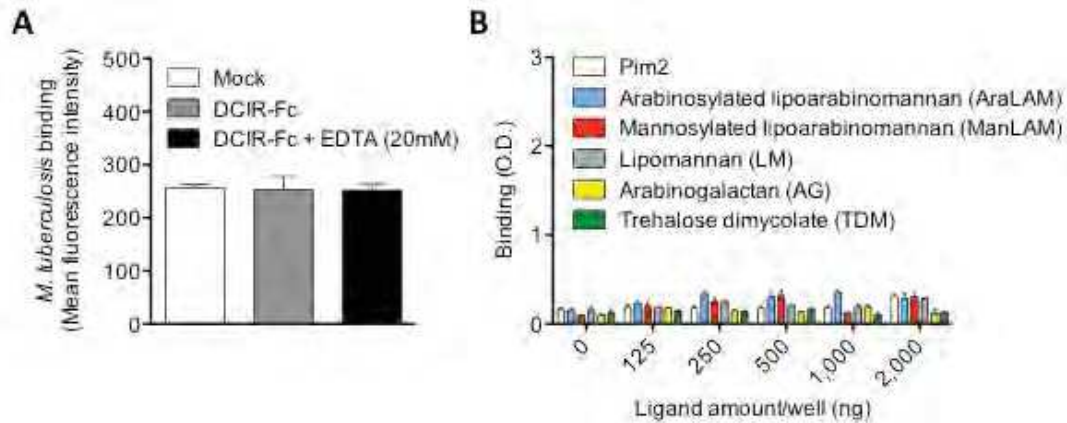


Fig. S4 DCIR does not recognize *M. tuberculosis* or mycobacterial surface glycosylated ligands. **(A)** *M. tuberculosis* bacteria were incubated for 1 h at 37°C with DCIR-Fc (10µg/ml) in the presence or absence of EDTA, or in Lectin buffer (Mock). DCIR-Fc was immune-detected with a PE-coupled anti-human IgG antibody and binding was analyzed by FACS. **(B)** Different constituents of the mycomembrane, PIM₂, AraLAM, ManLAM, LM, AG, and TDM were coated onto 96-well plates at different concentrations. The plates were then incubated with 10 µg/ml of chimeric DCIR-hFc at room temperature during 2 h. Binding was detected using a biotinylated polyclonal anti-human IgG and streptavidin-HRP. Colorimetry analysis was analyzed at 450 -570 nm using a spectrophotometer. Data are presented as mean±s.e.m. of at least 3 replicates, and are representative of at least 2 independent experiments.

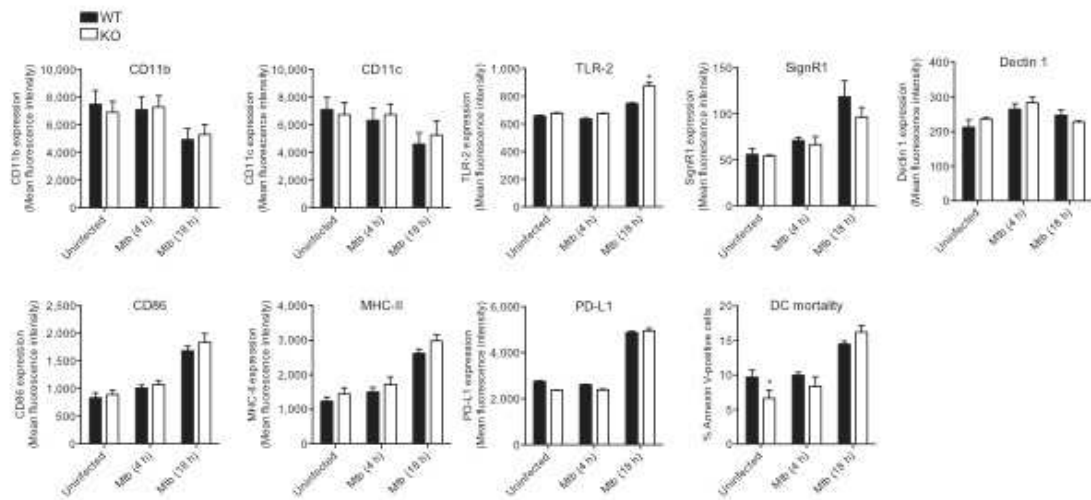


Fig. S5 FACS quantification of receptors (CD11b, CD11c, TLR-2, SignR1, Dectin 1), molecules involved in T cell stimulation or inhibition (CD86, MHC-II, PDL-1), and mortality in BMDC during *M. tuberculosis* infection. Data are presented as mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05.

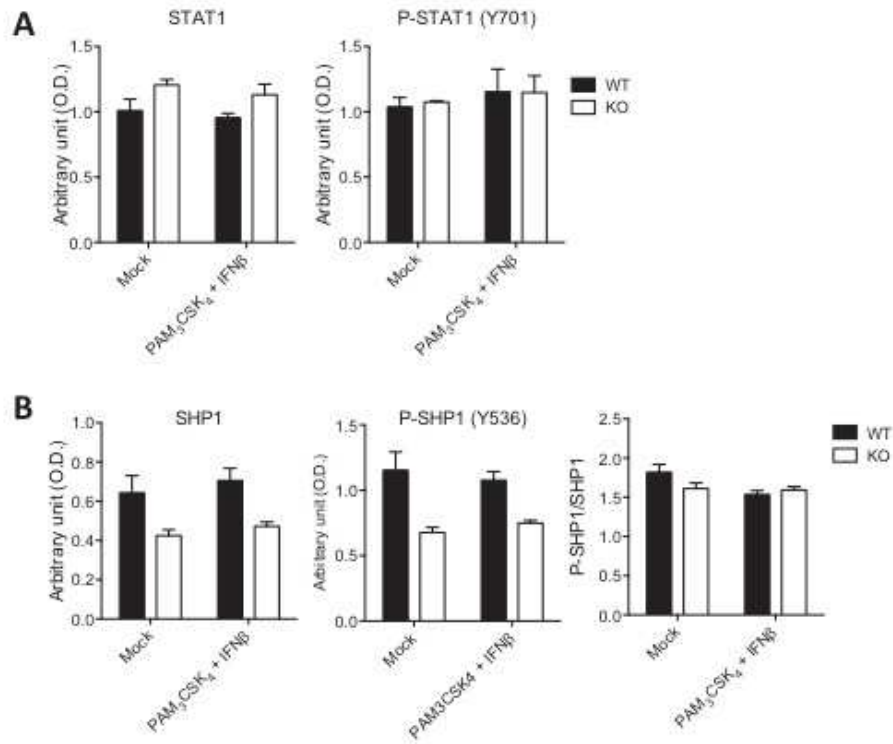


Fig. S6 Analysis of the phosphorylation status of STAT1 (Tyr701) and SHP1 (Tyr536) in WT vs. KO cells. WT or KO DCs were left unstimulated (Mock), or co-stimulated with the TLR2 agonist lipopeptide Pam₃CSK₄ and IFN β for 4 h, as indicated. STAT1 (A) and SHP1 (B), and their phosphorylated forms were quantified in cell lysates by ELISA. In all panels, data are presented as mean \pm s.e.m. of at least 3 biological replicates. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05, ***P*<0.01.

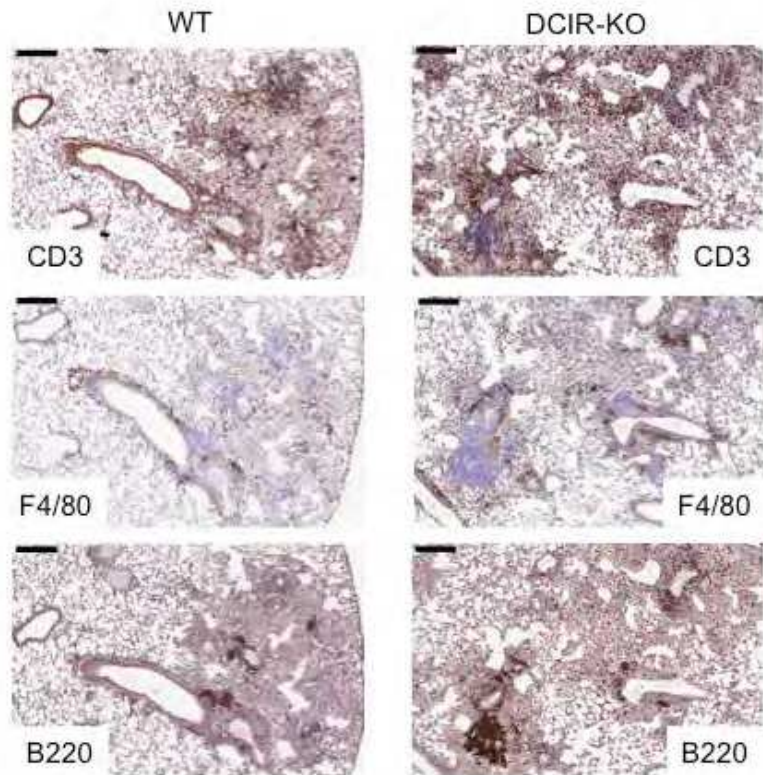


Fig. S7 Immuno-histological analysis of CD3-, B220- and F4/80-expressing T lymphocytes, B lymphocytes and macrophages, respectively, in the lungs of *M. tuberculosis*-infected WT or KO mice 42 days after infection. Bars correspond to 200 μ m.

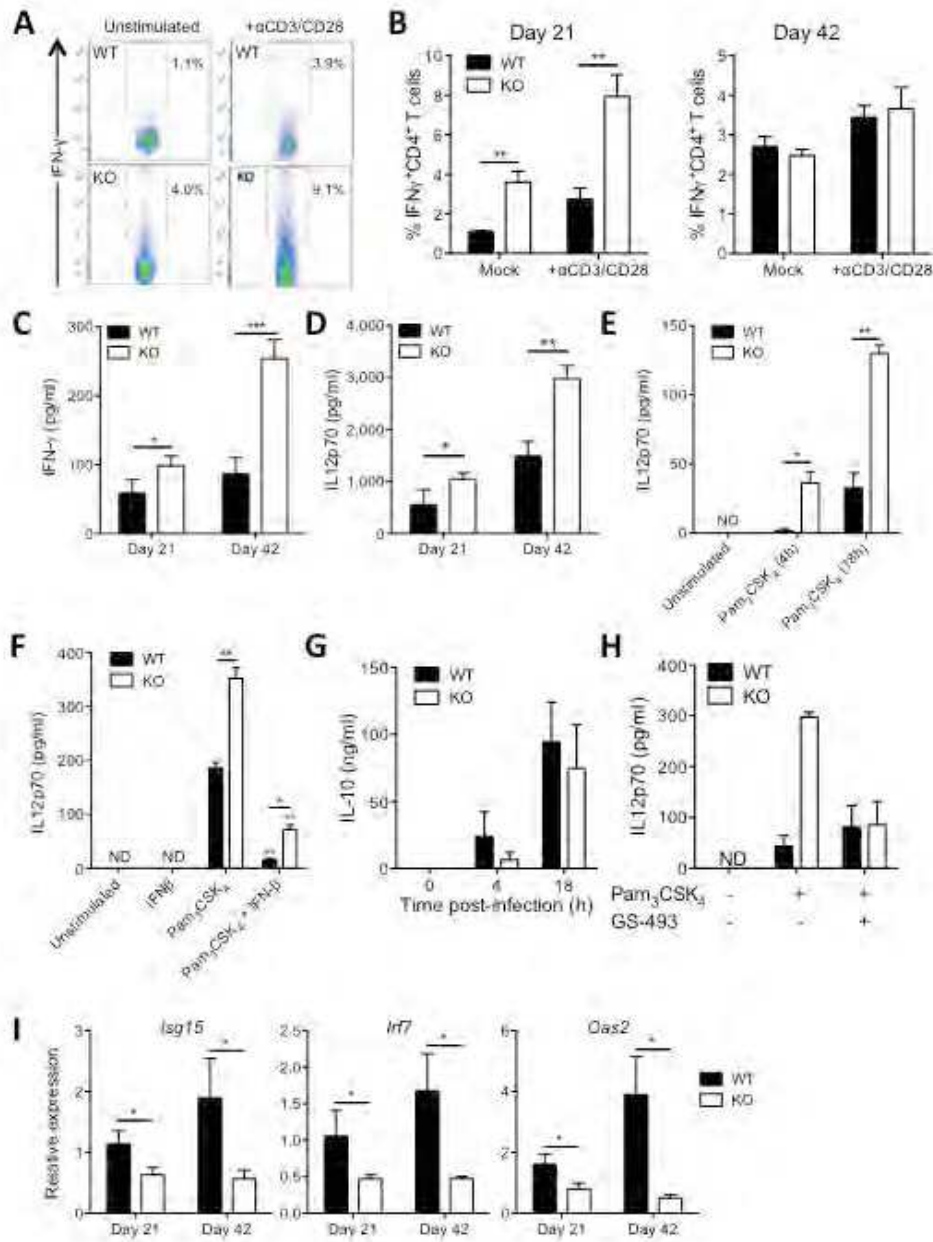


Fig. S8 DCIR impairs anti-*M. tuberculosis* Th1 immunity in the LNs. Mice were infected as in Figure 3. (A,B) IFN γ -producing CD4⁺ Th1 cells were quantified by intracellular cytokine FACS staining after either stimulation with anti-CD3 and -CD28 antibodies or in the absence of restimulation (Mock), as indicated. A representative experiment at day 21 is depicted in (A). (B) represents analysis of 6 biological replicates. (C,D) ELISA quantification of total IFN γ (C) or IL-12p70 (D) in LN lysates of infected mice. (E,F) ELISA quantification of IL-

12p70 in bone marrow-derived DCs from WT or KO mice stimulated with the TLR-2 agonist Pam₃CSK₄ in the absence (E) or presence (F) of IFN β . In (F) cells were stimulated for 18 h. (G) ELISA quantification of IL-10 in *M. tuberculosis*-infected DCs after various periods of time. (H) ELISA quantification of IL-12p70 in bone marrow-derived DCs from WT or KO mice stimulated for 4 h with the TLR-2 agonist Pam₃CSK₄ in the absence or presence of the SHP2 inhibitor GS-493. (I) RT-qPCR quantification of gene expression of the ISGs *Isg15*, *Irf7* and *Oas2* in LN lysates of *M. tuberculosis*-infected WT or KO mice.

In (C-I), data are presented as mean \pm s.e.m. of at least 3 biological replicates, and are representative of at least 2 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test; **P*<0.05, ***P*<0.01.

Supplementary Tables

Table S1. List of IFN-stimulated genes (ISG) and –inhibited genes (IIG) genesets used for generating the Bubblemaps in Fig. 1B

ISG_geneset	IIG_geneset
Ly6a	Scd2
Irf7	Emb
Usp18	Serpnb1a
Ifit2	Elov16
Ctse	Gde1
Ifi204	Gbp2b
Csprs	Enc1
Ifi44	Tle1
Ifi2712a	Brix1
Eif2ak2	1600029D21Rik
Cxcr4	Sgms1
Cmpk2	Snx24
Slfn8	Gesh
Slfn5	Fcgr2b
Ai607873	Ado
Xaf1	Hepacam2
Rtp4	Lyz1
Oas1c	Setp03
Isg20	Xpot
Rsad2	Polr3g
Oas1a	Bst1
Oas2	Ppargc1b

Loc667373	Ctsl
Ddx58	Acsl3
Pydc4	Pgm2L1
Pydc3	Ppp1R3d
I830012O16Rik	Sod2
Ifit1	Cpd
Spon1	Znrf2
Mx1	Ccbl2
Asprv1	Ptpla
Oasl2	Btg2
Apod	5430435G22Rik
Parp9	Ppfia4
Fap	1300007C21Rik
Il18	Zfp236
Il15	Fcgr3
Nat5	Loc622147
Slfn1	
Sct	
Ms4a6b	
Ms4a4d	
Daxx	
Asb13	
Stk39	
Pttg1	
Sgcb	
Mx2	
St8Sia1	
Abcb1a	
Etnk1	

Tktl1	
Ms4a4c	
Lgals9	
Car13	
Trim34b	
Ly6c2	
Slfn3	
Stat2	
Tor3a	
Oprd1	
Sp100-rs	
H2-T24	
Loc270335	
Gjb2	
Ildr1	
Rpl39l	
Ms4a4b	
Oasl1	
I600014C10Rik	
Tmem219	
Loc432823	
Pgap2	
Wdfy1	
Trim34a	
Oas1b	
Oas3	
Trim25	
Mitd1	
Ifih1	

Tdrd7	
Parp12	
Znfx1	
Slfn4	
Dopey2	
Zc3hav1	
Pvr14	
Dck	
Pik3ap1	
9030607L20Rik	
Hmgn3	
Herc6	
Parp14	
Mthfr	
Frmd4a	
Sp100	
Mxd1	
Pyhin1	
Helz2	
C130026I21Rik	
Trim30d	
Bc147527	
Aw011738	
9530028C05	
Cdc42bpg	
5230400M03Rik	
B430306N03Rik	
Fam46a	
Phf11d	

Adar	
Chic1	
Synj1	
Loc240327	
G530011O06Rik	
Lrp8	
Ppm1k	
Hsh2d	
Serinc4	
2010109K09Rik	
D130084N16Rik	
Samhd1	
Pnpt1	
Loc665317	
Usp25	
Atp10a	
Rilp1	
Pml	
Ifi203	
Kdr	
Ehd4	
H2-T10	
Ms4a6c	
Xdh	
Nt5C3	
Rab711	
Ddx60	
Tcstv3	
Trim30a	

Ankle2	
Rnf213	
Whsc111	
Fndc3a	
Pou3f1	
Samd9l	

Table S2. Primers used for RT-qPCR experiments

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Hprt</i>	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGAT	CCCCGTTGACTGATCATTACAG
<i>Irf7</i>	ACTTCAGCACTTTCTTCCGAGAAC	AGGTAGATGGTGTAGTGTGGTGAC
<i>Isg15</i>	AGCAATGGCCTGGGACCTAAAG	AGTCACGGACACCAGGAAATCG
<i>Ifit1</i>	AGCAGAGAGTCAAGGCAGGTTTC	TGGTCACCATCAGCATTCTCTCC
<i>Oas2</i>	AAAGTCCTGAAGACCGTCAAGGG	ACAACAATGTCAGCATCTGATCCC
<i>Cxcl9</i>	AGCAGTGTGGAGTTCGAGGAAC	AGGGATTTGTAGTGGATCGTGC
<i>Tnfrsf10</i>	GCTGTGTCTGTGGCTGTGACTTAC	TCATCCGTCTTTGAGAAGCAAGC
<i>Ccl2</i>	CCACTCACCTGCTGCTACTCATT	TCCTTCTTGGGGTCAGCACAGA
<i>Ifnβ</i>	GCACTGGGTGGAATGAGACT	AGTGGAGAGCAGTTGAGGACA
<i>Ifnα</i>	TCTGATGCAGCAGGTGGG	AGGGCTCTCCAGACTTCTGCTCTG
<i>Tnfa</i>	CAAAATTCGAGTGACAAGCCTGT	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
<i>Nos2</i>	TCCTCACGCTTGGGTCTTGTTTC	TCCAACGTTCTCCGTCTCTTGC
<i>Mrc1</i>	AATGCCAAAAATTATTGATCGTG	ACGGTGACCACTCCTGCTG
<i>Ym1</i>	TACCCTATGCCTATCAGGGTAAT	CCTTGAGCCACTGAGCCTTC
<i>Arg1</i>	AATGAAGAGCTGGCCTGGTGTGGT	ATGCTTCCAAGTCCAGACTGTG

Table S3. Histopathological scoring of TB lesions in NHPs

	Type of lesions	Granuloma Size	Type of granuloma	Distribution pattern	Cellular composition	Notes
Asymptomatic infection #46	Granulomatous	Small	Non-necrotizing	Focal	- Lymphocytic cuff (1) - Epithelioid Mφ - Fibrosis (+++)	1: with few plasma cells
Active TB #55	Granulomatous	Medium	Caseous (admixed with some PMN) Non-necrotizing (Mixed)	Multifocal coalescing	- Lymphocytic cuff (1) - Epithelioid & foamy Mφ (2) - MGC	1: with plasma cells 2: presence of foamy Mφ in the alveoli in the vicinity of granulomas

Abbreviations: Mφ: Macrophages; MGC: Multinucleated giant cells, PMN: Polymorphonuclear neutrophils.

Table S4. Antibodies used for histological analysis

Antigen	Clone / Number	Supplier	Dilution	Incubation time	Antigen retrieval
DCIR	Rabbit polyclonal, HPA007842	Sigma-Aldrich	1/200	1 h	HIER/Citrate pH6/MO*
CD45R/B220	RA3-6B2 Rat mAb	Bio-Rad	1/400	1 h	HIER/ Citrate ph6/MO*
CD3	SP7 Rabbit mAb	Spring Bioscience	1/100	1 h	HIER/ Tris-EDTA ph9/WB
F4/80	Cl:A3-1 Rat mAb	Bio-Rad	1/100	1 h	Proteinase K proteolytic digestion
T-bet	4B10, Mouse mAb	BioLegend	1/100	1 h	HIER/Tris-EDTA ph8/MO**

Abbreviations: mAb : monoclonal antibody; Ab: antibody; HIER: Heat-induced epitope retrieval.;

MO : Boiling in microwave oven twice 10 minutes each/MO* or 7 minutes/MO**; WB: Heating in water-bath at 95°C for 40 minutes.

(C) Discussion

Pour notre étude, nous avons exploré le rôle joué par DCIR dans le contexte d'inflammation chronique causé par l'infection par *Mtb*. Dans un premier temps, nous avons démontré que DCIR s'exprime à la périphérie des granulomes dans les poumons de macaques infectés (Figure S1 de la publication). De plus, nous avons confirmé que DCIR est exprimé principalement par les DCs au niveau des poumons (Figure S2 de la publication) (Bates *et al.*, 1999).

Comme DCIR contient un motif inhibiteur ITIM dans sa partie cytoplasmique, il était anticipé que ce récepteur pouvait agir en tant que régulateur négatif de la signalisation des cellules immunitaires (Sancho and Reis e Sousa, 2012). Cependant, nos résultats basés sur une approche transcriptomique indiquent clairement que la déficience en DCIR (DCIR1/CLEC4A2) dans les BMDCs de souris conduit à une diminution forte de la réponse aux IFN de type I (Figure 1 de la publication), ce qui laisse penser que ce récepteur est activateur, et non inhibiteur dans ce contexte. Notamment, cette activation concerne la signalisation médiée par la voie JAK-STAT activée en aval de l'induction du signal par le récepteur IFNAR. De manière intéressante, nous avons observé que l'inhibition de la voie IFN de type I se manifeste déjà à l'état basal, en absence d'infection par *Mtb*. De plus, nous n'avons pu détecter d'interaction entre DCIR et la mycobactérie, que ce soit en utilisant le pathogène entier ou bien des composants isolés de sa membrane (Figure S4 de la publication), suggérant fortement, comme précédemment proposé (Maglinao *et al.*, 2013), que DCIR pourrait interagir avec un ou plusieurs ligand(s) endogène(s). L'absence de DCIR est sans effet sur l'expression du récepteur IFNAR à la surface de la cellule, ainsi que sur la production d'IFN α/β (Figure 2 de la publication). Par contre nous avons démontré que l'absence de DCIR induit une phosphorylation augmentée de la phosphatase SHP-2, avec comme conséquence une déphosphorylation de la serine 727 de STAT1 et l'inactivation partielle de cette dernière (Figure 2 de la publication). De plus, lorsque les BMDCs sont traitées avec un inhibiteur spécifique de SHP-2, on observe une restauration de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules déficientes en DCIR, démontrant clairement que la phosphorylation excessive de STAT1 dans les cellules dépourvues du récepteur est bien causée par une sur-activation de SHP-2 (Figure 2 de la publication). Il a déjà été démontré que l'ITIM de DCIR interagit et lie la forme non phosphorylée de SHP-2, et non pas la forme

phosphorylée (Richard *et al.*, 2006). DCIR pourrait ainsi fonctionner comme protéine d'ancrage et séquestrerait la forme inactive, non phosphorylée, de SHP-2, ce qui limiterait la présence de la forme active dans le cytoplasme responsable de la déphosphorylation de STAT1 et de son inactivation. Notre modèle propose donc que la déficience en DCIR conduit à une augmentation de la forme phosphorylée cytoplasmique de SHP-2, qui peut à son tour déphosphoryler et donc inactiver STAT1 afin d'inhiber la signalisation par l'IFN de type I.

Comme précédemment décrit, le niveau de production d'IFN de type I est un paramètre important dans le contrôle de *Mtb*. Nos résultats sont en accord avec la notion que l'IFN de type I exerce un rôle délétère dans la TB (O'Garra *et al.*, 2013), notamment par la démonstration que les souris déficientes en DCIR contrôlent mieux l'infection que les souris sauvages tout en présentant un excès d'infiltrats cellulaires et d'inflammation dans les poumons (Figure 3 de la publication). De plus, ces souris présentent une réponse Th1 exacerbée (Figure 4 de la publication). En effet les DC de souris DCIR produisent fortement l'IL-12p70 et déclenchent une plus forte réponse T CD4+ de type Th1 au niveau du ganglion médiastinal, ce qui se traduit par une infiltration plus forte de ces cellules au niveau des poumons et une production accrue d'IFN γ (Figure 4 de la publication). Comme déjà décrit dans d'autres études (McRae *et al.*, 1998), nous avons pu montrer que l'IFN de type I inhibe la production d'IL-12p70 par les cellules myéloïdes, dont les DCs (Figure S8 de la publication). Ainsi, DCIR agit en tant que modulateur de l'inflammation en induisant une augmentation de la réponse IFN de type I qui, en retour, inhibe la génération de la réponse Th1. L'axe IL-12/IFN γ étant crucial dans la réponse à *Mtb*, l'absence de DCIR entraîne une activation exacerbée de celui-ci, ce qui peut expliquer la meilleure clairance du pathogène. Une conséquence de cette exacerbation de la réponse inflammatoire, déjà décrite dans des études précédentes, est la survenue d'immunopathologies (Guo *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). Notre étude suggère fortement que l'IFN de type I joue un rôle important dans ce processus, notamment en contrôlant l'expression de cytokines comme l'IL-12 et l'IFN γ (Figure S8 de la publication).

Afin de comprendre si nos observations étaient généralisables au-delà de la TB, nous avons effectué des expériences de présentation antigénique *in vivo* à partir d'un modèle de transfert adoptif. Des cellules T possédant un TCR transgénique spécifique d'un peptide antigénique de l'ovalbumine (peptide OVA) transférées dans des souris receveuses sauvages

ont été activées par des BMDCs chargées en peptide OVA et provenant de souris compétentes ou déficientes en DCIR. Dans ce modèle, la réponse Th1 spécifique du peptide OVA s'est avérée plus forte lorsque les BMDCs proviennent de souris DCIR KO et, comme dans le cas de l'infection par *Mtb*, la production d'IFN γ et d'IL-12p70 est également plus forte et corrélée à une diminution de l'expression de gènes de la réponse IFN de type I (Figure S9 de la publication).

Notre étude s'étant surtout intéressée à des modèles murins, il serait intéressant d'analyser si les résultats obtenus sont extrapolables chez l'homme. Il existe 4 homologues murins du DCIR humain, et le plus proche de ces homologues, qui a fait l'objet de notre étude, ne possède un pourcentage d'identité que de 50% avec la protéine humaine (Bates *et al.*, 1999). Pour comprendre le rôle du DCIR humain, il est possible d'éteindre son expression dans des DCs primaires issus de sang humain en utilisant une méthode de *silencing* développée dans notre laboratoire (Annexe I). En utilisant cette approche, nous avons pu observer que l'inhibition de l'expression de DCIR conduit à une diminution de la réponse IFN de type I, comme indiqué par une faible expression des transcrits codant pour des ISGs comme IRF7 (**Figure 22**). Bien que ces résultats soient prometteurs et en accord avec nos observations chez la souris, l'utilisation des siRNA présente un problème dans notre contexte puisqu'elle induit en elle-même une forte activation des ISGs (Whitehead *et al.*, 2011). L'emploi d'un système alternatif d'extinction comme l'utilisation d'anticorps bloquants ou la méthode CRISPR/Cas9 pourront être envisagées (Newman and Ausubel, 2016).

Pour notre étude, nous nous sommes focalisés sur la cellule exprimant le plus fortement DCIR : les DCs. Cependant d'autres types cellulaires, comme les macrophages, expriment également DCIR (Bates *et al.*, 1999). En termes de croissance bactérienne (**Figure 23**) et de production cytokinique (TNF- α et IL-10) (**Figure 24**), nous n'avons pas observé de réponses différentes entre les macrophages DCIR-KO et sauvages. Cependant, *in vivo*, l'expression de gènes reflétant une polarisation de type M1 des macrophages est augmentée dans les poumons des souris déficientes en DCIR alors que l'expression de gènes marqueurs de macrophages anti-inflammatoires de polarisation M2 est diminuée (Figure 4 de la publication). Les macrophages étant des effecteurs important dans la réponse à *Mtb*, le rôle de l'expression de DCIR dans ces cellules devrait être analysé plus avant, notamment *in vivo*.

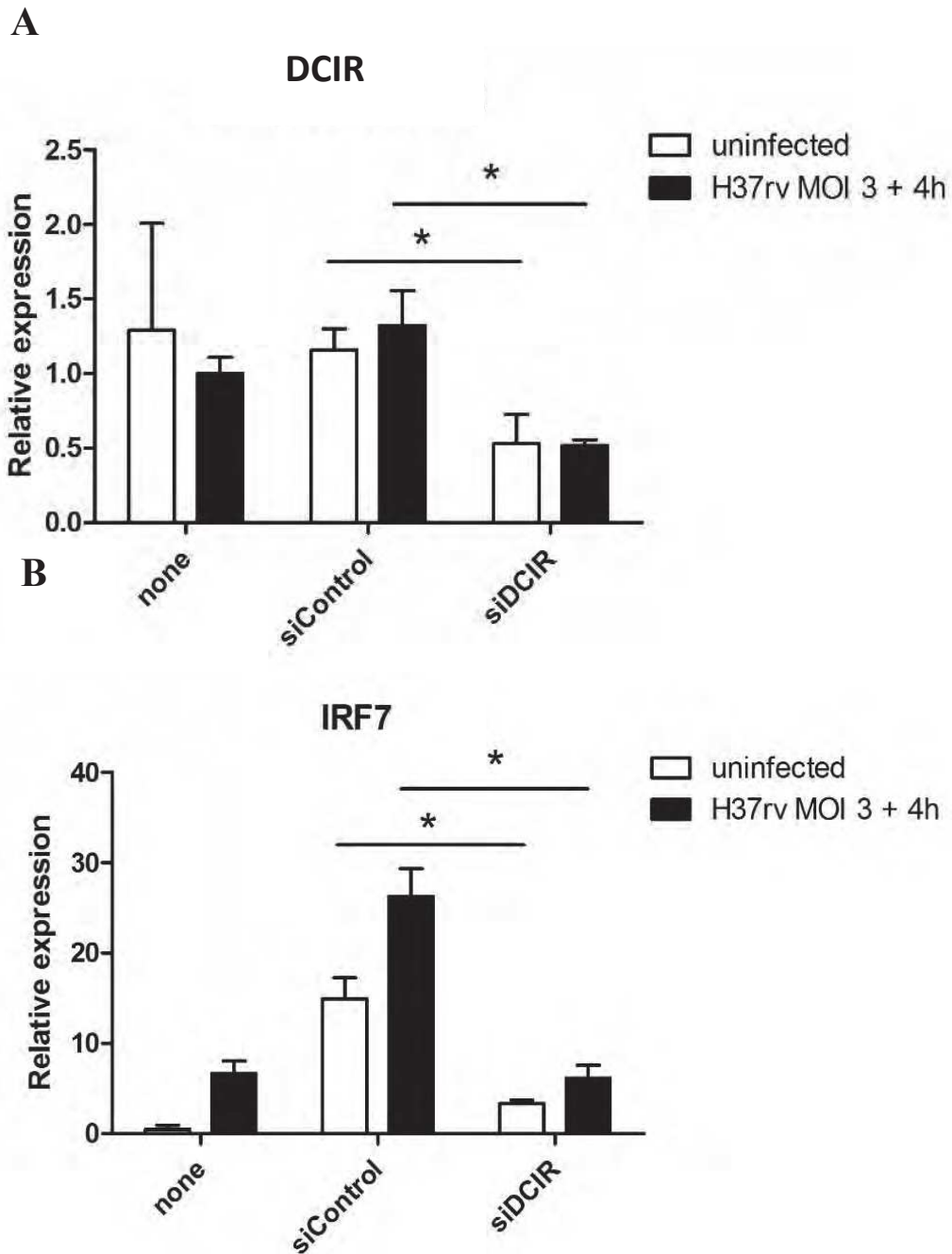


Figure 22/ Extinction de DCIR par l'utilisation de siRNA et conséquence sur l'expression d'IRF7

A) Des DCs générées à partir de monocytes dérivés du sang humain en présence de GM-CSF et IL-4 ont été « silencées » par l'intermédiaire de siRNA spécifique de DCIR ou un siRNA contrôle puis infectées ou non par *Mtb*. Le résultat montre l'expression de DCIR par RT-qPCR dans les différentes conditions. N= 3, (p-value * = p < 0,05). **B)** Comme en **A)** sauf que l'expression d'IRF7 est analysée. N= 3, (p-value * = p < 0,05).

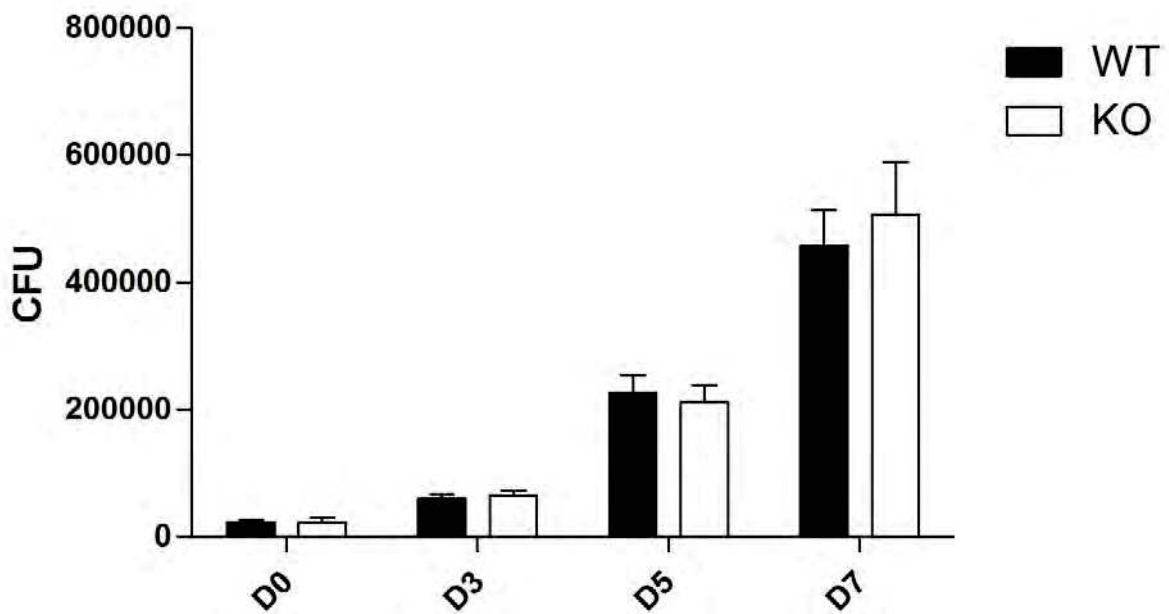


Figure 23/ Analyse de la croissance bactérienne dans des BMDMs DCIR-KO ou WT.

Mesure des charges bactériennes dans des BMDMs issus de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) au cours du temps après infection par *Mtb* à une MOI de 0,1. L'histogramme est représentatif de 3 expériences indépendantes.

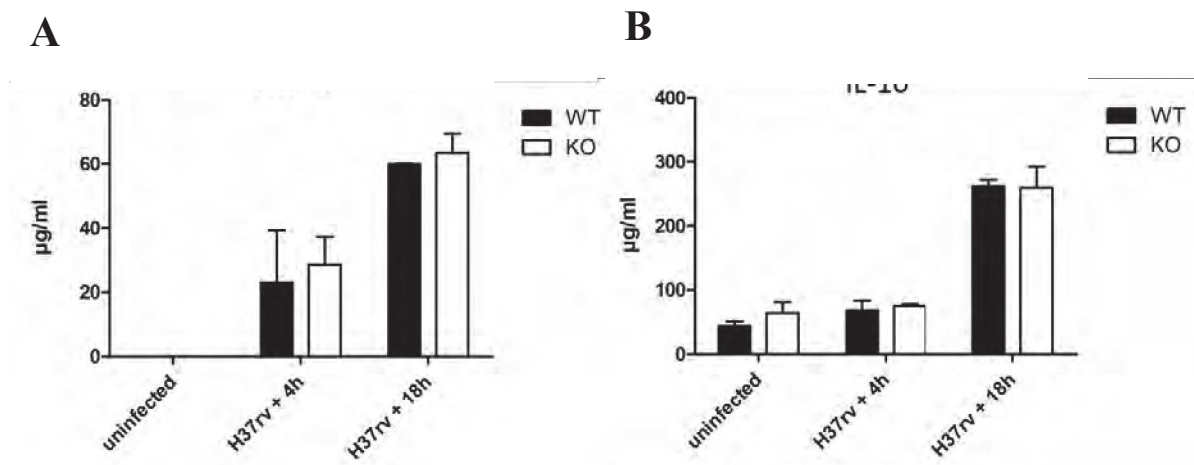


Figure 24/ Production cytokinique après infection de BMDMs DCIR-KO ou WT

Des BMDMs issus de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) sont infectés par *Mtb* à une MOI de 3 durant différents temps (0, 4 et 18h). Les surnageants sont ensuite prélevés et analysés pour la production de TNF- α (A) et d'IL-10 (B). Les histogrammes sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Outre les macrophages, il a été montré que les cellules T et les neutrophiles expriment également DCIR. Compte tenu du rôle connu de ces cellules dans l'immunité anti-tuberculeuse, il serait intéressant de définir plus en détails l'impact de la déficience en DCIR sur ces types cellulaires, afin de savoir si cette lectine influence leurs mécanismes effecteurs directs, comme la production de radicaux libres oxygénés ou de NETs (*Neutrophil extracellular traps*) chez les neutrophiles (Braian *et al.*, 2013), ou encore l'activation des cellules T et leur fonctions effectrices. Enfin, bien que nous nous soyons focalisés sur les DCs dans notre étude, nous n'avons porté notre attention que sur les DCs dites inflammatoires issus de la différenciation des monocytes présents dans la moelle osseuse des souris. Cependant il existe d'autres sous types de DCs qui pourraient avoir un rôle particulier dans un contexte d'infection bactérienne (Papadopoulos and Gorvel, 2015). Notamment, comme DCIR module la voie IFN de type I, il serait intéressant d'étudier son impact sur les DCs plasmacytoïdes qui représentent la principale cellule productrice d'IFN type I (Swiecki and Colonna, 2015). Une déficience en DCIR sur ces cellules pourrait se traduire par des conséquences fonctionnelles importantes pour ces cellules notamment dans la réponse anti-tuberculeuse. En effet il a été montré que les DCs plasmacytoïdes jouent un rôle favorable à l'hôte en permettant un meilleur contrôle de la croissance bactériennes en partenariat avec les DCs myéloïdes (Lozza *et al.*, 2014). Finalement, DCIR favorise la génération des Treg (Massoud *et al.*, 2014) dont l'importance dans le contrôle de la réponse immune anti-*Mtb* a été bien décrite (Kursar *et al.*, 2007). On peut donc imaginer qu'en absence de DCIR, la génération de Treg pourrait être affectée et contribuer non seulement à une meilleure clairance mais aussi aux dommages tissulaires. L'impact de l'expression ou non de DCIR sur les Treg sur l'immunité anti-TB mériterait donc d'être analysé.

Comme décrit précédemment, une étude réalisée chez la souris a relié déficience en DCIR et auto-immunité en montrant que la prolifération excessive des DCs observée était due à une plus forte activation du facteur de transcription STAT5 en présence de GM-CSF (Fujikado *et al.*, 2008). Dans notre étude, nous avons également observé cet excès de prolifération des DCs *in vitro* (**Figure 25**), phénomène associé à une diminution de la mortalité cellulaire (**Figure 26**). Compte tenu de l'étude précédente, il est donc concevable que les observations réalisées *in vitro* dans notre travail soient particulièrement mises en évidence par l'utilisation de BMDCs générées en présence de GM-CSF. Par ailleurs, la voie IFN de type I peut être

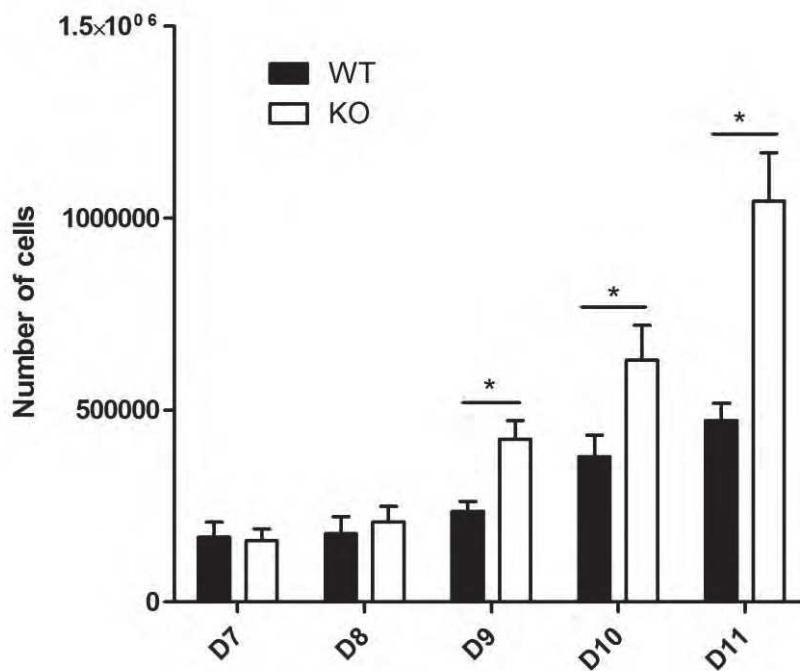


Figure 25/ Prolifération cellulaire de DCs DCIR-KO ou WT cultivées en présence de GM-CSF

La numération de BMDCs issus de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) est déterminée à différents temps (7, 8, 9, 10, et 11 jours) au cours de leur différenciation *in vitro* en présence de GM-CSF. L'histogramme est représentatif de 3 expériences indépendantes (p-value * = $p < 0,05$).

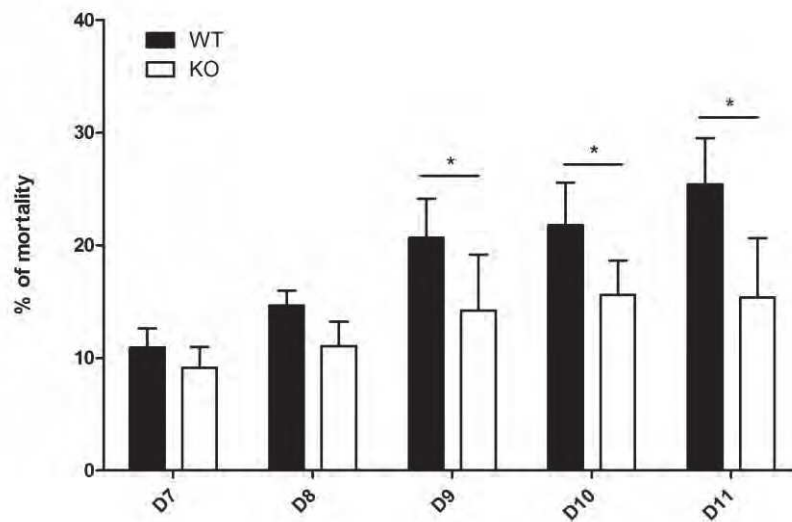


Figure 26/ Survie cellulaire des DCs DCIR-KO ou WT cultivées en présence de GM-CSF

La mortalité des BMDCs issus de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) est déterminée à différents temps (7, 8, 9, 10, et 11 jours) au cours de leur différenciation en présence de GM-CSF, par marquage à l'Annexin-V et analysée en cytométrie en flux. L'histogramme est représentatif de 3 expériences indépendantes (p-value * = $p < 0,05$).

activée de manière « non canonique » par l'intermédiaire de STAT5 (McNab *et al.*, 2015). Dans notre étude, les expériences sont effectuées en lavant les cellules et en enlevant le GM-CSF 24h avant stimulation. Lorsque les cellules ne sont pas lavées et le GMCSF maintenu, nous n'avons pas observé de différences en termes d'expression d'IL-12p70 ou de gènes ISG par rapport à nos résultats observés sans GM-CSF (**Figure 27**). De plus les BMDCs DCIR-KO expriment toujours davantage d'IL-12p70 que les BMDCs sauvages (**Figure 28**). Cependant on pourrait analyser l'état d'activation de STAT5 par Western Blot dans ces conditions ainsi que son état d'oligomérisation avec d'autres STATs par des expériences de co-immunoprécipitation. Une différence d'activation de STAT5 pourrait avoir des conséquences sur la réponse anti-tuberculeuse, que ce soit par le biais de la prolifération des DCs ou du contrôle de la voie IFN de type I.

Un enjeu majeur pour le futur sera d'identifier le(s) ligand(s) de DCIR. N'ayant pas observé de liaison au pathogène entier ou à des sucres de sa paroi (Figure S4 de la publication), et ayant observé des différences entre DC KO et sauvages sans stimulation, il apparaît très probable que DCIR reconnaisse un ou plusieurs ligand(s) endogène(s) comme suggéré par une autre étude (Maglinao *et al.*, 2013). L'analyse par spectrométrie de masse des partenaires de DCIR a été entreprise et a révélé que les trois protéines qui interagissent le plus avec le domaine de reconnaissance de DCIR sont les trois sous-unités composant la molécule de complément C1q (**Figure 29**). C1qa déjà été décrit pour lier des CLR membraneires comme DC-SIGN (Hosszu *et al.*, 2012). Comme C1q influence la différenciation des DCs (Hosszu *et al.*, 2010) et que la culture de DC en présence de C1q conduit à un défaut d'activation des T vers un phénotype pro-inflammatoire Th1 (Teh *et al.*, 2011), il est tentant de relier ces observations avec le fait qu'une absence de DCIR, la génération de cellules Th1 soit favorisée (Figure 4 de la publication). De manière intéressante, il a été montré que C1q, outre ces capacités à induire l'activation du complément, peut également se lier aux corps apoptotiques afin de faciliter leurs reconnaissances et leur clairance par les cellules phagocytaires comme les macrophages (Benoit *et al.*, 2012). Or nous avons pu montrer que DCIR est capable de se lier aux corps apoptotiques (**Figure 30**). Bien que n'ayant pu montrer que la liaison de DCIR aux corps apoptotiques soit C1q-dépendante, il s'agit d'une hypothèse intéressante à approfondir. Démontrer une liaison directe de C1q à DCIR représente de ce point de vue une étape clé à

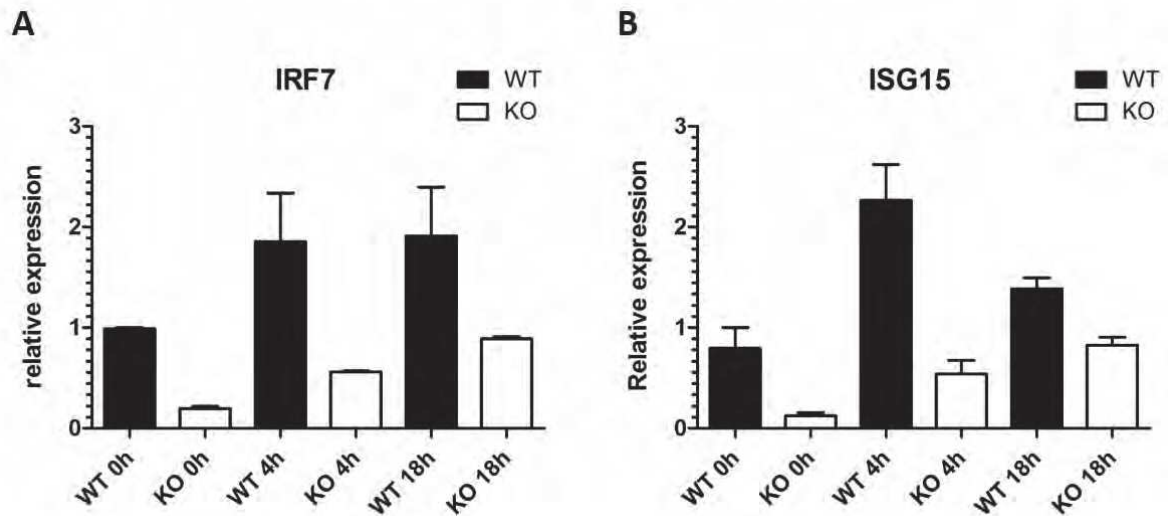


Figure 27/ Expression d'IRF7 et d'ISG15 dans des BMDCs WT ou DCIR-KO en présence de GM-CSF

Analyse par RT-qPCR de l'expression d'IRF7 (A) et d'ISG15 (B) dans des BMDCs issues de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) infectés avec *Mtb* à une MOI de 3 pendant différents temps (0, 4 et 18h). Les histogrammes sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

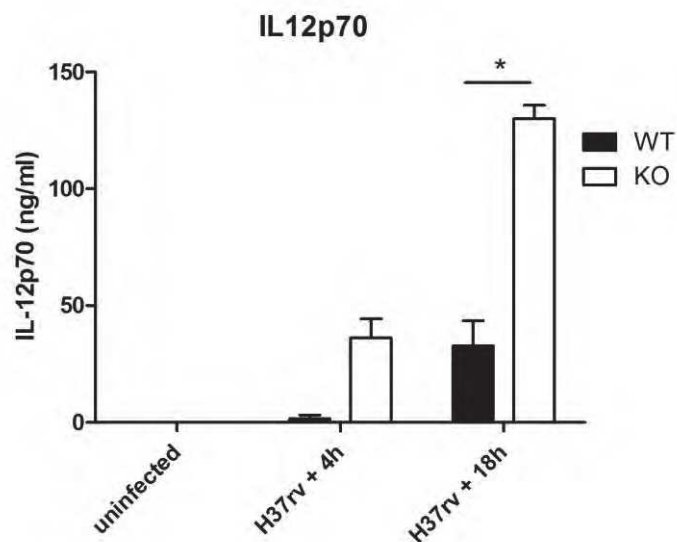


Figure 28/ Production d'IL-12p70 des BMDCs WT ou DCIR-KO en présence de GM-CSF

Mesure par ELISA de la production d'IL-12p70 dans les surnageants de BMDCs issues de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) infectés par *Mtb* à une MOI de 3 à différents temps (0, 4 et 18h). L'histogramme est représentatif de 2 expériences indépendantes.

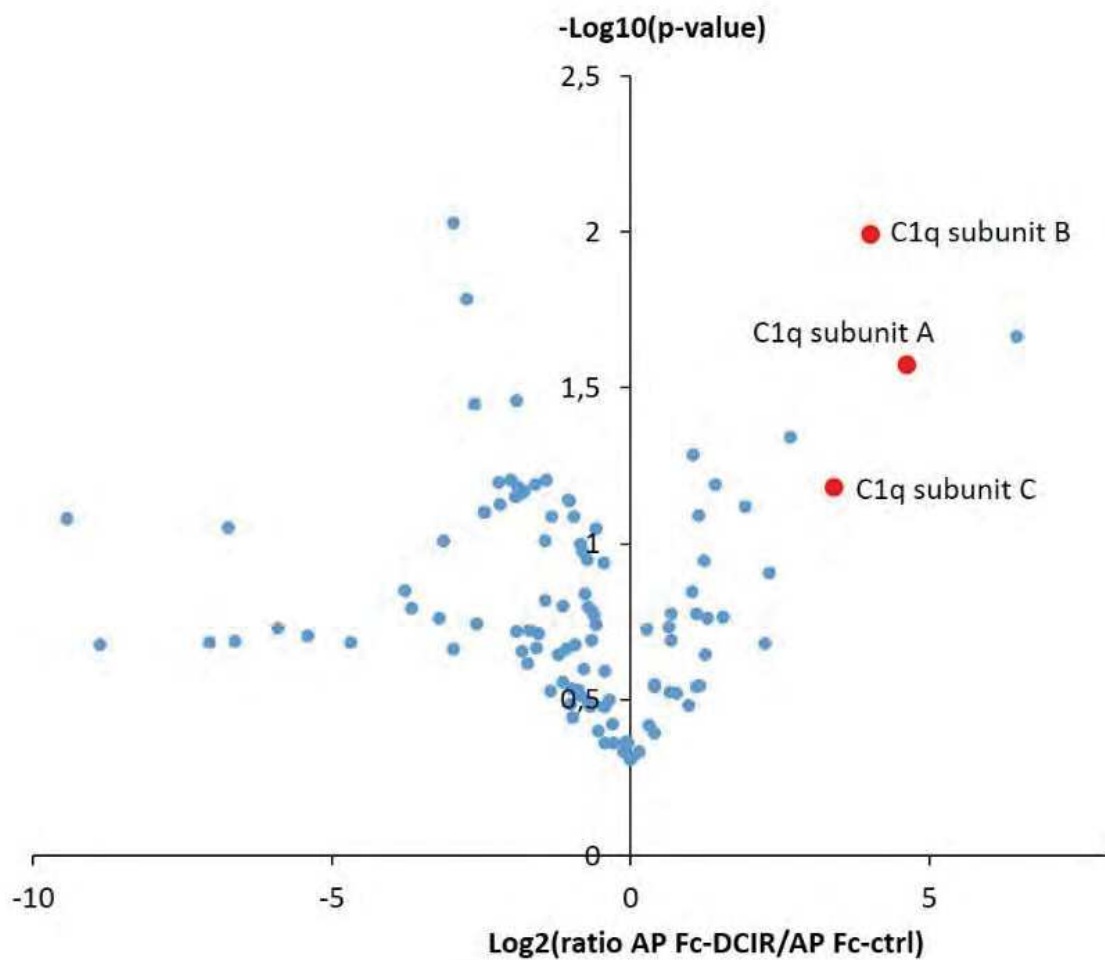


Figure 29/ Volcano plot représentant les molécules ayant une affinité pour DCIR

Analyse de l'interactome de DCIR par chromatographie d'affinité puis spectrométrie de masse. Une protéine chimérique composée d'un fragment Fc d'immunoglobuline à laquelle est associée le domaine de reconnaissance de DCIR (Fc-DCIR) a été immobilisée sur des colonnes d'affinités (le control utilisé est la partie d'immunoglobuline Fc ne comportant pas la partie de reconnaissance de DCIR, Fc-control). Du surnageant de BMDCs est déposé sur ces colonnes et les protéines retenues sont analysées par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont représentés en *Volcano plot*, avec en abscisse une représentation en logarithme du ratio entre ce qui est fixé sur la colonne avec le Fc-DCIR par rapport au Fc-control, et en ordonnée le degré de significativité reflétant la *p-value* associée.

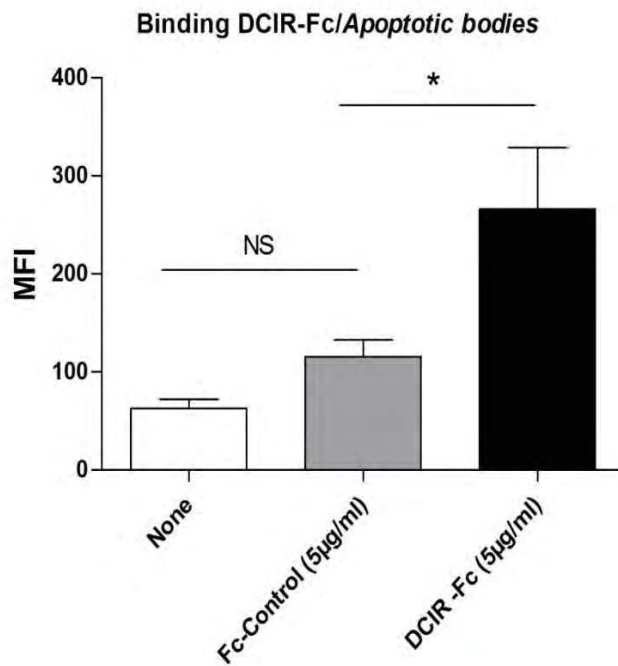
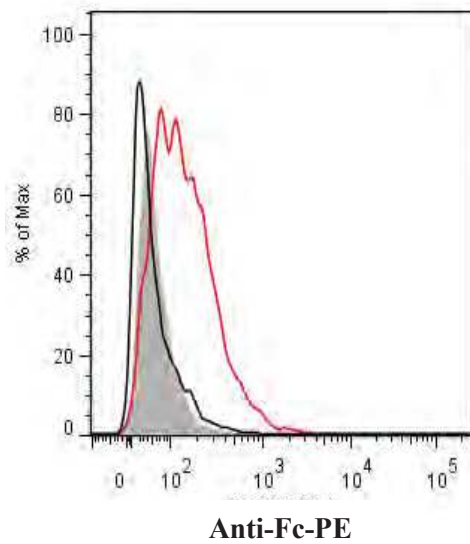
A**B**

Figure 30/ Liaison de DCIR à des corps apoptotiques

Analyse par cytométrie de la liaison de Fc-DCIR à des corps apoptotiques de BMDCs. **A)** Intensité moyenne de liaison de Fc-DCIR aux corps apoptotiques utilisant un anticorps anti-Fc fluorescent. (Le contrôle consiste en l'utilisation de partie d'immunoglobuline Fc ne comportant pas la partie de reconnaissance de DCIR, Fc-control). L'histogramme est représentatif de 3 expériences indépendantes (p-value * = $p < 0,05$). **B)** Histogramme de cytométrie reflétant les valeurs en MFI d'une expérience représentative du marquage des corps apoptotiques par anti-Fc fluorescent.

documenter, ainsi que la mise en évidence des conditions de cette interaction. L'importance de l'état de glycosylation de DCIR durant ce processus semble être un paramètre non négligeable comme précédemment décrit (Bloem *et al.*, 2013), et qui pourrait influencer fortement l'interaction avec son(ses) ligand(s).

La signalisation intrinsèque à DCIR doit également être analysée de façon plus approfondie. Des expériences de co-immunoprécipitation devraient permettre d'identifier ses différents partenaires moléculaires. Bien que l'on ait montré que SHP-2 induise une inhibition de la phosphorylation de STAT1 (Figure 2 de la publication), on ne sait pas si cela résulte d'une interaction directe avec DCIR ou par le biais d'un ou de plusieurs autre(s) partenaire(s) moléculaire(s). De plus, on ne sait pas non plus si DCIR peut se lier directement à des récepteurs membranaires comme IFNAR afin d'exercer son inhibition sur la voie IFN. Il serait également intéressant d'analyser un récepteur DCIR portant des mutations sur son motif ITIM afin de déterminer l'importance de la phosphorylation de ce motif dans la signalisation induite.

DCIR étant encore relativement peu décrit dans la littérature, il est possible qu'il exerce une action sur d'autres composantes du système immunitaire. Des résultats obtenus au cours de notre travail suggèrent que DCIR aurait un effet sur l'activation de l'inflammasome. Ce complexe, suite à son activation médiée par la reconnaissance de signaux de danger par des NLRPs, conduit au clivage de la pro-caspase 1 en caspase 1 effectrice responsable de la production des formes matures des cytokines IL-1 β , IL-1 α et IL-18. Nos résultats indiquent que suite à une infection par *Mtb*, l'expression de ces trois cytokines est réduite dans les BMDCs issus de souris déficientes en DCIR par rapport aux DC sauvages (**Figure 31**). Cela suggère que DCIR, *via* sa signalisation, pourrait induire une augmentation de l'activité de caspases ou de molécules de reconnaissance des signaux de danger comme les NLRPs. Cela pourrait aussi être une conséquence indirecte de la réponse IFN de type I par DCIR connue pour favoriser l'activation de l'inflammasome (Yang *et al.*, 2015). Il serait donc utile d'analyser l'inflammasome et le comportement des acteurs intracellulaires qui le composent en fonction de la présence ou non de DCIR.

En conclusion, notre étude identifie DCIR comme un récepteur clé, non seulement dans la réponse à *Mtb*, mais plus généralement dans la régulation de la réponse immunitaire au sens large, en agissant comme un modulateur de la réaction inflammatoire. Compte tenu de

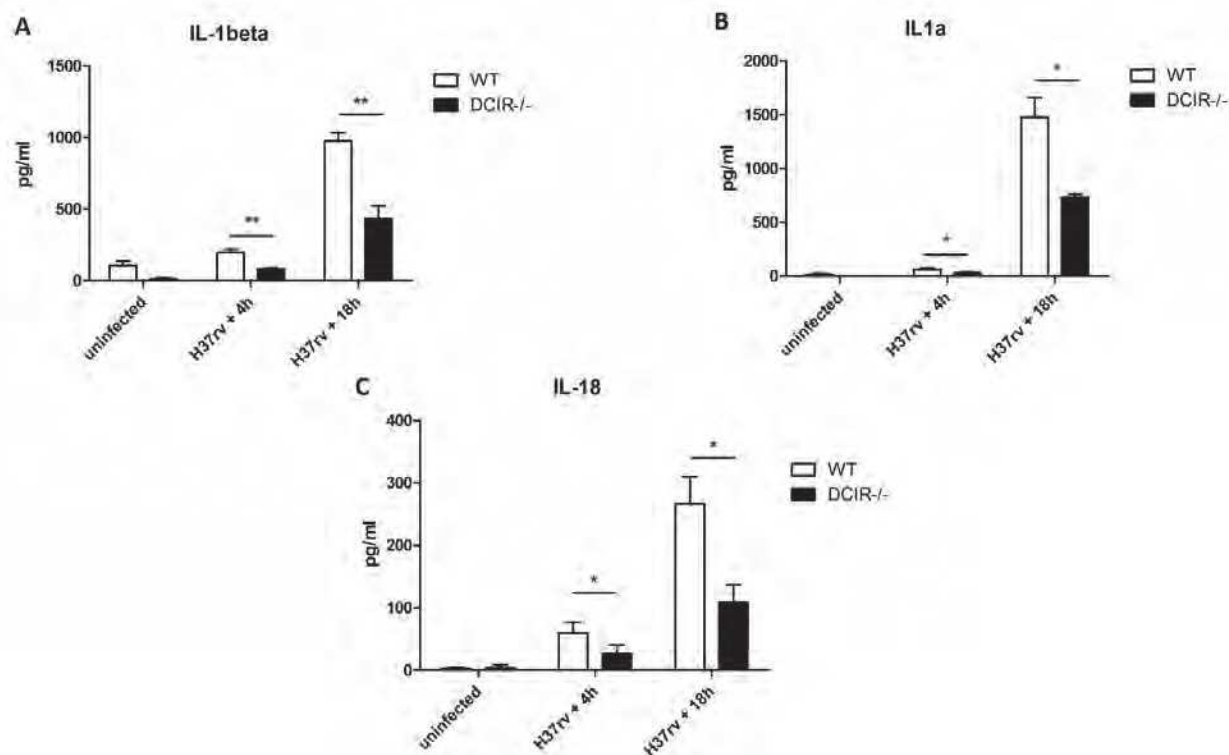


Figure 31/Production d'IL-1 β , IL-1 α et IL-18 par des BMDCs WT ou DCIR-KO suite à une infection par *Mtb*

Analyse par ELISA de la production d'IL-1 β (A), IL-1 α (B) et IL-18 (C) dans le surnageant de BMDCs issues de souris déficientes en DCIR (noir) ou sauvages (blanc) infectés par *Mtb* à une MOI de 3 après différents temps (0, 4 et 18h). Les histogrammes sont représentatifs de 3 expériences indépendantes (p-value * = p < 0,05).

l'importance de cette réaction dans de nombreux contextes pathologiques, infectieux ou non, le rôle de DCIR mérite d'être analysé en détails. L'identification du/des ligand(s) de DCIR pourrait permettre de rechercher des composés pharmacologiques capables de moduler la réponse IFN de type I, impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires, au-delà de la TB.

CONCLUSION GENERALE

La TB est toujours une cause majeure de mortalité due à l'infection par un agent pathogène unique. Avec la problématique que représente l'émergence de nouvelles souches résistantes aux traitements actuels et la co-morbidité liée à la co-infection avec le VIH ou à l'incidence du diabète, cette pathologie reste un problème de santé publique majeur. L'efficacité variable du vaccin BCG et les difficultés dans le diagnostic de la pathologie sont des obstacles à l'éradication de la maladie. Il apparaît donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, de nouveaux marqueurs, ainsi que de nouveaux vaccins ou adjuvants dans le but de pouvoir proposer des approches complémentaires aux stratégies de thérapie et de prévention actuelles. Pour parvenir à cet objectif, il est donc essentiel de mieux caractériser les interactions hôte-pathogène et d'accéder à une meilleure compréhension des différentes étapes qui conduisent à l'établissement de l'infection et au développement de la pathologie.

Durant l'infection, la bactérie est reconnue par de nombreux PRRs membranaires ou solubles ou induit indirectement leur activation. Parmi ces PRRs, les CLR sont spécialisés dans la reconnaissance de motifs glycosylés, présents de manière importante à la surface des bactéries, dont *Mtb*. Plusieurs lectines ont déjà été impliquées dans la reconnaissance directe ou indirecte de *Mtb* et influencent la réponse immune de l'hôte. Caractériser plus en détails l'implication de cette famille de récepteurs dans la TB représente donc un axe de recherche important pour la compréhension des interactions hôte-*Mtb* et constitue, de ce fait, un angle d'attaque potentiel pour espérer améliorer les stratégies thérapeutiques et vaccinales actuelles.

Notre étude apporte une pierre à cet édifice en caractérisant deux nouvelles lectines, CL-LK et DCIR, non encore étudiées dans le contexte de l'infection par *Mtb*.

Nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre le taux de CL-LK dans le sang de patient tuberculeux et la sévérité de la pathologie. La mesure du taux sanguin de CL-LK représente donc un nouveau marqueur potentiel de la pathologie. Combiné aux marqueurs actuels, le taux de CL-LK dans le sang de patients permettraient d'avoir un paramètre biologique supplémentaire afin d'identifier de manière plus fiable la sévérité de la pathologie chez les patients atteints de la TB, et pourrait permettre de suivre l'efficacité d'un traitement antituberculeux administré à un patient au cours du temps.

En ce qui concerne DCIR, notre étude est la première réalisée concernant un CLR possédant un motif ITIM dans la TB. Bien que ce CLR n'interagisse pas directement avec le bacille, nous avons caractérisé DCIR comme étant un récepteur clé, non seulement dans la réponse anti-tuberculeuse, mais également plus globalement dans la modulation de la réponse immune de l'hôte par son action sur le contrôle de la réaction inflammatoire. Cibler ce récepteur pourrait donc être une approche nouvelle pour des immunopathologies d'origine infectieuse ou non. De ce point de vue, l'identification et la caractérisation de ligands endogènes, activateurs ou inhibiteurs de DCIR pourrait être d'un intérêt majeur afin d'élaborer de nouveaux composés thérapeutiques utilisables dans des approches de modulation de la réaction inflammatoire dans les pathologies inflammatoires chroniques, incluant mais non limitées à TB.

En conclusion, notre travail a permis d'accroître les connaissances dans le domaine des interactions hôte-pathogène dans la TB, en caractérisant deux nouvelles lectines, CL-LK et DCIR, apportant ainsi des connaissances fondamentales importantes dans la compréhension de la réponse immunitaire anti-tuberculeuse. Notre étude permet de faire ressortir deux nouvelles cibles pharmacologiques potentielles, dont l'avenir dira si elles peuvent être manipulées efficacement pour l'élaboration de nouvelles stratégies de suivi, de traitement et de prévention de la TB.

ANNEXE I

ORIGINAL ARTICLE

An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages

Anthony Troegeler^{1,2,4}, Claire Lastrucci^{1,2,4}, Carine Duval^{1,2}, Antoine Tanne³, Céline Cougoule^{1,2}, Isabelle Maridonneau-Parini^{1,2,5}, Olivier Neyrolles^{1,2,5} and Geanncarlo Lugo-Villarino^{1,2,5}

Mononuclear phagocytes (MP) comprise monocytes, macrophages (MΦ) and dendritic cells (DC), including their lineage-committed progenitors, which together have an eminent role in health and disease. Lipid-based siRNA-mediated gene inactivation is an established approach to investigate gene function in MP cells. However, although there are few protocols dedicated for siRNA-mediated gene inactivation in primary human DC and MΦ, there are none available for primary human monocytes. Moreover, there is no available method to perform comparative studies of a siRNA-mediated gene silencing in primary monocytes and other MP cells. Here, we describe a protocol optimized for the lipid-based delivery of siRNA to perform gene silencing in primary human blood monocytes, which is applicable to DCs, and differs from the classical route of siRNA delivery into MΦs. Along with this protocol, we provide a comparative analysis of how monocytes, DC and MΦ are efficiently transfected with the target siRNA without affecting cell viability, resulting in strong gene knockdown efficiency, including the simultaneous inactivation of two genes. Moreover, siRNA delivery does not affect classical functions in MP such as differentiation, phagocytosis and migration, demonstrating that this protocol does not induce non-specific major alterations in these cells. As a proof-of-principle, a functional analysis of hematopoietic cell kinase (Hck) shows for the first time that this kinase regulates the protease-dependent migration mode in human monocytes. Collectively, this protocol enables efficient gene inactivation in primary MP, suggesting a wide spectrum of applications such as siRNA-based high-throughput screening, which could ultimately improve our knowledge about MP biology.

Immunology and Cell Biology (2014) 92, 699–708; doi:10.1038/icb.2014.39; published online 3 June 2014

INTRODUCTION

Mononuclear phagocytes (MPs) are mainly composed of monocytes, macrophages (MΦ) and dendritic cells (DCs), including their lineage-committed progenitors.^{1–3} Although they have a prominent role in maintaining body homeostasis, the MP cells are also important for the constant monitoring and interaction with the different local microenvironments, establishing trophic and remodeling functions on tissues, symbiotic liaisons with microbiota, recognition and capture of pathogens, proper activation of early defensive mechanisms of inflammation and innate effector cells, rapid relay of innate information signals to the adaptive immune system resulting in immunological memory and the establishment of peripheral immunological tolerance. Moreover, the MP cells are implicated in pathological processes such as chronic inflammation, autoimmunity, infection and cancer, among others.^{3–5} For these reasons, these cells are a subject of intense investigation as they hold a tremendous potential for immunoregulation and exploitation for biomedical purposes.

Although much progress has been made over the last two decades in the characterization of the human MP cells, there are still many

important issues left to be understood concerning the development, homeostasis and function during health and disease, including the gene networks operating in these cells. In an attempt to break through these research areas, one current challenge in the field is to adapt emerging molecular tools in primary human MP cells.³ Among the available molecular tools, RNA interference (RNAi) is the fastest approach to identify gene function. Since its discovery about 15 years ago,⁶ RNAi has become one of the most common methods for gene inactivation based on the targeting mediated by small interfering RNAs (siRNAs), which are double-stranded RNA molecules (19–25 nucleotide length) that trigger sequence-specific mRNA degradation via a catalytic mechanism. Moreover, the high demand and commercialization of the RNAi method have resulted in major advances in siRNA modifications and delivery reagents, overcoming intrinsic problems with their stability and cellular uptake, making it easier to adapt this method in primary human cells, including amniotic fluid stem cells, neurons, hepatocytes and T lymphocytes.^{7–10} This is especially true for primary human MP cells, as their active nuclease machinery and hard-to-transfect nature

¹CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France; ²Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France and ³Division of Hematology & Oncology, Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at Mt Sinai, New York, NY, USA

⁴These authors have contributed equally to this work.

⁵These authors share the senior authorship.

Correspondence: Dr G Lugo-Villarino or Dr C Cougoule, CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, Toulouse, F-31077, France.
E-mail: geanncarlo.lugo@ipbs.fr or celine.cougoule@ipbs.fr

Received 3 December 2013; revised 1 May 2014; accepted 3 May 2014; published online 3 June 2014

made traditional siRNA-mediated gene inactivation very difficult in the past.¹¹

Among the different methods to deliver siRNA into these cells, liposomal-based systems are a prevalent approach due to their practical mode of use in most cell types combined with the wide

range of commercially available products. This lipid-based approach relies on packaging particles called 'liposomes' that not only facilitate the cellular uptake of siRNA but also protect it from enzymatic degradation during cellular endocytosis.¹² Strikingly, however, only few protocols exist that fully delineate siRNA-mediated gene

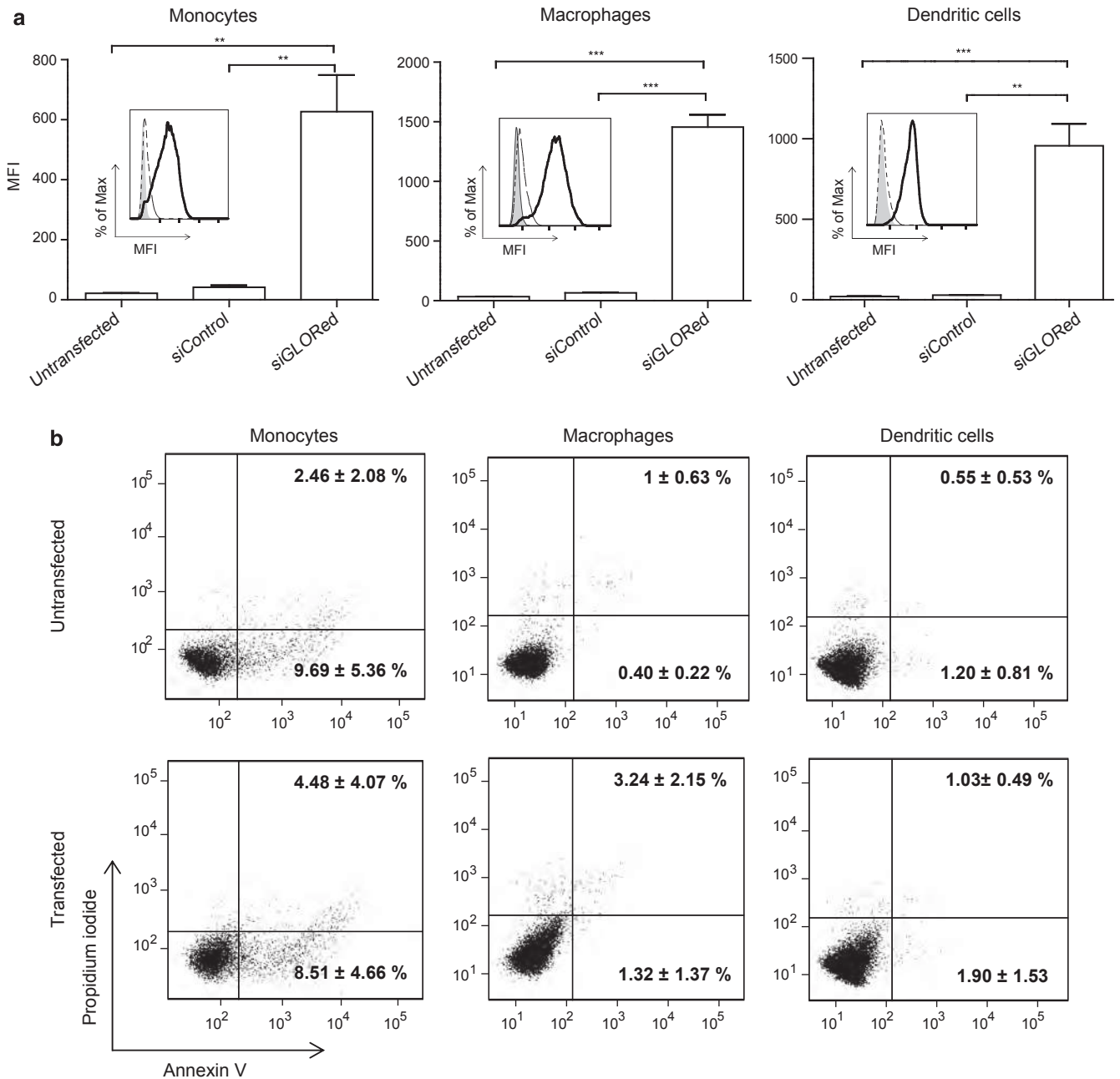


Figure 1 Comparative analysis of transfection efficiency between primary human monocytes, MΦs and DCs. **(a)** Semi-quantitative analysis of transfection efficiency in primary human monocytes (left), MΦs (center) and DCs (right). Cells were transfected with siGLO red transfection indicator (siGLOred), the non-fluorescent siControl or just treated with the transfection reagent (Untransfected). After 24 h, cells were analyzed by flow cytometry to measure the median fluorescent intensity (MFI). Results are listed by their MFI values and as mean of at least five independent experiments performed with different donors. Student's *t*-test values (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) are listed for siGLOred compared with siControl. Insets within each bar graph illustrate a representative histogram expressing the MFI for the siGLO red transfection indicator obtained from a single independent experiment; untransfected (grey), siControl (dashed line) and siGLOred (solid line). **(b)** Assessment of cell death in primary human phagocyte lineages transfected with control siRNA pool. Primary human monocytes (left), MΦs (center) and DCs (right) were transfected (bottom row) or not (top row) with the siControl. After 24 h, the incident of cell death is assessed with the use of the Annexin-V-FITC kit designed for flow cytometry analysis. The percentage of apoptosis was defined as the number of cells positive for Annexin-V-FITC but negative for propidium iodide; the percentage of necrosis as the number of cells positive for both Annexin-V-FITC and propidium iodide. Data are presented as mean of five independent experiments performed with different donors \pm s.e.m. No statistical significance was found using the Student's *t*-test.

inactivation in primary human DCs or MΦs. Even then, most published work in the literature based on these protocols hardly describes or takes into account factors that influence siRNA-mediated gene silencing such as: (1) isolation, differentiation, preparation and cell density before transfection; (2) siRNA transfection efficiency; (3) impact on cell viability; (4) extend of gene silencing in terms of protein stability/turnover; and (5) assessment of non-specific major functional alterations that might occur in these cells. To our knowledge, there are no protocols available in the literature dedicated for the siRNA-mediated gene inactivation in primary human blood monocytes. Moreover, there are no comparative studies of a given siRNA-mediated gene silencing method among MP cells, which would be both useful and practical for investigators in the MP field.

In this report, we optimized the lipid-based delivery of siRNA into primary human MP cells that ensures gene knockdown efficiency, including the simultaneous inactivation of two genes, without affecting cell viability or introducing non-specific major alterations in cell function. Not only this reverse transfection protocol is applicable to primary human blood monocytes and DCs, but also yields comparable results to those obtained in primary human MΦ using the classical transfection approach, suggesting a wide spectrum of applications such as siRNA-base high-throughput screening to further extend research progress in the human MP cells.

RESULTS

Comparative analysis of transfection efficiency between primary human monocytes, MΦs and DCs

Recently, we adapted a lipid-based protocol for the efficient delivery of siRNA into primary human MΦs¹³ that we termed in this report as the 'forward transfection' protocol. It consists of the drop-wise addition of the lipid-siRNA complexes into medium containing a layer of adherent MΦs (see Methods). However, this protocol was highly toxic in primary human monocytes and DCs, which are usually in suspension and may be directly exposed to high doses of the transfection reagent (data not shown). Therefore, we further optimized this protocol in terms of the route of siRNA delivery (reverse transfection: cell suspension added at once onto the siRNA-lipid complexes), final volume of the lipid-based transfectant (1 instead of 3% (vol/vol)) and total transfection time (4 instead of 6 h), resulting in a high transfection efficiency of both primary human monocytes and DCs. On the basis of the use of the siGLO red transfection indicator, this protocol yielded a strong delivery of siRNA as analyzed by a flow cytometry approach. Indeed, the percentage of siGLO red-positive cells obtained from the reverse transfection of monocytes ($94.18\% \pm 3.4$) is comparable to that obtained in DCs ($96.6\% \pm 6.9$) and to that in MΦs ($95.34\% \pm 3.16$) using the classical forward transfection approach. In terms of delivery of siRNA per cell, as measured by the high median fluorescence intensity (MFI), we noticed that monocytes had a slightly lower content of siRNA ($\approx 627 \pm 122$) compared with that of DCs (MFI $\approx 957 \pm 137$) and MΦs (MFI $\approx 1455 \pm 104$), probably reflecting differences in the physical capacity (for example, cell size, cytoplasm to nucleus ratio) to accept a high content of siRNA between these cells (Figure 1a). From a qualitative point of view, the siGLO red indicator is readily detected in the majority of transfected monocytes without causing major alteration of the cell shape, as visualized by fluorescent imaging (Supplementary Figure 1a). Although this alternate detection approach confirms the high transfection efficiency of monocytes using our protocol, it also reveals that the intensity of the indicator per monocyte is not as abundant or uniform as that obtained per

MΦ, further arguing that physical limitations according to cell type may determine the final siRNA load per cell (Supplementary Figure 1b). Equally important, similar to DCs and MΦs, the high transfection efficiency in monocytes is accompanied by a low incidence of cell death, as assessed by the use of a Propidium iodide/Annexin V-FITC Kit, which simultaneously detects apoptotic and necrotic cells by flow cytometry (Figure 1b). Altogether, the optimized parameters ensure a strong and safe delivery of siRNA into primary human blood monocytes and DCs to a level that is comparable to that obtained in MΦs with an established protocol.¹³

Comparative analysis of gene knockdown efficiency between primary human monocytes, MΦs and DCs

Having once optimized an efficient siRNA delivery into human MP, we next determined the gene knockdown efficiency in these cells. In order to provide a comparative analysis between primary human monocytes, MΦs and DCs, we chose to inactivate the hematopoietic cell kinase (Hck) gene that is primarily expressed in hematopoietic cells, particularly in cells of the myeloid lineage. Hck is a member of the Src family tyrosine kinase, expressed as two isoforms p59Hck and p61Hck mostly localized in the cell plasma membrane and lysosomes, respectively.^{14,15} It is implicated in phagocytosis,¹⁶ receptor-mediated signaling¹⁷ and protease-dependent migration,¹⁸ among other roles.¹⁹ Transfection with the siRNA targeting human Hck resulted in a statistically significant and reproducible protein knockdown of $71\% \pm 6$ in monocytes, $78\% \pm 13$ in MΦs and $93\% \pm 2$ in DCs, as measured by SDS-PAGE and western blotting analysis (Figures 2a and b). Inactivation of Hck protein was specific, as the expression of other Src family tyrosine kinases (for example, Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog, Fgr) remained intact in MP cells (Supplementary Figures 2a,b). While the siRNA-mediated gene knockdown of human Hck was previously shown in primary MΦs,²⁰ to our knowledge, this is the first time that it has been shown in either primary human blood monocytes or DCs.

Simultaneous inactivation of two genes (double knockdown) in primary human monocytes and MΦs

One of the most difficult challenges in the MP field is to characterize the role of redundancy and compensation among the gene networks at play in these cells, in particular within the host defense signaling pathways.²¹ The C-type lectin receptors (CLRs), for instance, is one of the best-known families of microbial sensors that are expressed abundantly in MP cells, and, yet, the redundancy among its members makes it difficult to define the contribution of individual receptors during host-pathogen interactions.²² As siRNA-mediated gene silencing holds great potential in this area, we further optimized our protocol to carry out the simultaneous inactivation of two CLR genes in primary human monocytes and MΦs. We chose human mannose receptor (MR/CD206) and DC-SIGN (CD209) as ideal candidates based on their shared interleukine-4 (IL-4)-dependent expression (Supplementary Figure 3) and the perceived redundant role that they play to antagonize the pro-inflammatory response against *M. tuberculosis*.²³ Flow cytometry analysis indicated that the simultaneous inactivation of these CLRs was achieved similarly in primary human monocytes and MΦs in a statistical significant manner (Figures 2c and d) without affecting cell viability (Supplementary Tables 1 and 2), highlighting how this protocol may further advance the analysis of gene functional redundancy in MP cells.

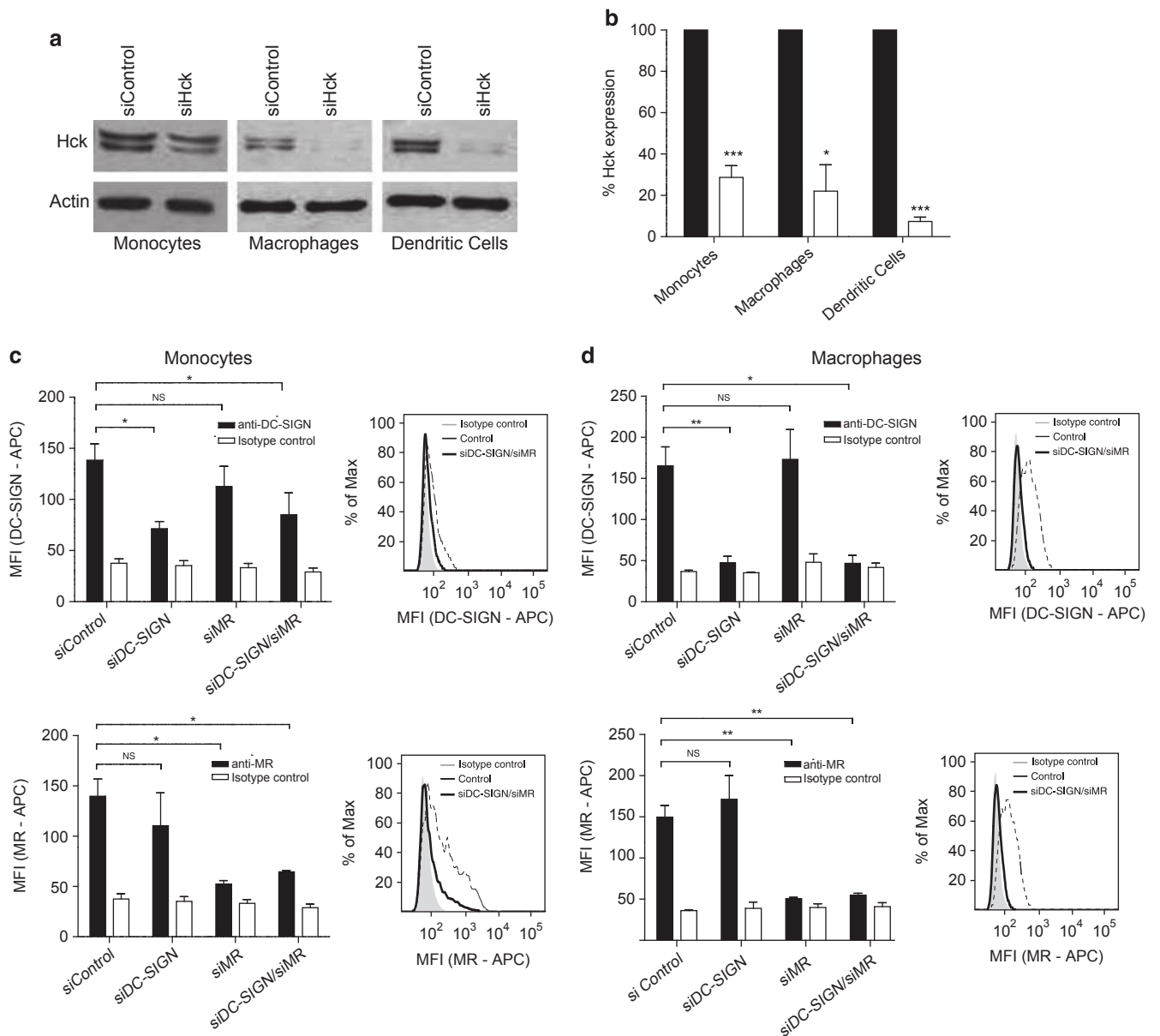


Figure 2 Comparative analysis of siRNA-mediated gene knockdown efficiency in primary human monocytes, macrophages and dendritic cells. **(a, b)** Analysis of the inactivation of Hck in human monocytes, MΦs and DCs. Cells were either transfected with the siRNA targeting Hck (white) or non-targeting control (black). After 72 h, Hck protein levels were measured by western blot analysis. **(a)** Immunoblot images are representative of the least three independent experiments performed with different donors. **(b)** Hck immunoblots were densitometrically scanned, and protein abundance is listed as a percentage relative to that of siRNA Control-treated cells (set arbitrarily at 100%). At least three independent experiments were performed with different donors for all cell types. Results are expressed as mean \pm s.e.m. **(c, d)** Simultaneous inactivation of DC-SIGN (top row) and MR (lower row). **(c)** Primary human monocytes or **(d)** MΦs were transfected with the siRNA pools targeting the indicated CLRs or non-targeting control and treated with IL-4 for 72 h to induce CLR expression. All cells were collected and stained with the indicated antibodies (black bars) or the corresponding isotype antibody controls (white bars) for flow cytometry analysis, as described in Methods. For each cell type, the left column illustrates the analysis performed from three independent experiments performed with different donors. Results are expressed as mean \pm s.e.m. *P*-values obtained using the Student's *t*-test (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001) are listed for targeting siRNAs compared with non-targeting siRNA control. Right column shows a representative histogram plot measuring the expression for each CLR based on the double knockdown condition (siDC-SIGN/siMR) in comparison with the siRNA control (siControl) over the background staining (isotype control).

Functional assessment of transfected primary human mononuclear phagocytes: differentiation, phagocytosis and 3D migration

Lipid-based transfection systems and siRNAs have been shown to interfere with the biology of MΦs.^{24–26} Even though our optimized protocol does not affect cell viability, we decided to perform a functional analysis of the transfected monocytes to assess for

non-specific major alterations. Differentiation, phagocytosis and cell migration are basic biological functions of MP cells, as they have a crucial role in the control of the immune response. The former is one of the most crucial functions of monocytes, as they are well known to replenish the MΦ and DC populations under steady state or inflammatory conditions. For this reason, we first decided to assess

the capacity of human monocytes to differentiate into either program soon after undergoing the transfection process with our method. Figure 3a clearly illustrates that there was no apparent effect in the differentiation of transfected monocytes with the non-targeting siRNA into either MΦs or DCs, as compared with untransfected cells. On the one hand, as monocytes differentiated into the MΦ program, we observed the classic loss of CD14 expression accompanied by the upregulation of CD11b, CD11c and mannose receptor, and the acquisition of a morphology characterized by high cytoplasmic-to-nuclear ratio and vacuolated cytoplasm devoid of granules. On the other hand, as monocytes differentiated into the DC program, the loss of CD14 expression is associated with the gaining of classic markers such as CD1a and DC-SIGN, along with cell morphology characterized by veil-, star-like-, sheet-like processes (Figure 3a). Another important basic function of MP cells is phagocytosis, a mechanism by which cells take up large particles (> 0.5 μm) into the phagosome. To determine whether our lipid-based siRNA-mediated transfection protocols affected this biological function, we tested the ability of primary human monocytes and MΦs transfected with the control siRNA (siControl + HiPerFect), or not (Untransfected), to bind and internalize FITC-labeled opsonized zymosan particles. Results clearly demonstrate that our transfection protocol did not affect phagocytosis in neither cell type (Supplementary Figure 4). Concerning cell migration in 3D environments, human MP cells use different types of migration modes depending on the nature of the experimental matrix. For instance, in porous matrices such as those based on fibrillar collagen I, human monocytes and MΦs display a similar capacity to engage the amoeboid migration mode for which they both acquire a rounded cell shape.²⁷ To assess whether this migration mode is altered by our protocol, human monocytes and MΦs were transfected (siControl + HiPerFect) or not (untransfected), and their capacity to migrate in a fibrillar collagen I matrix was compared with that obtained from cells treated either with the transfection reagent (HiPerFect) or the siRNA (siControl) alone. We observed that the amoeboid migration mode was not perturbed regardless of treatment or transfection status, as reflected by the migration index and the acquired rounded cell morphology (Figure 3b). In dense matrices, such as Matrigels,²⁷ resembling the complex extracellular environment found in many tissues, cells switch towards the mesenchymal mode of migration that is protease-dependent and for which they display a star-like, elongated cell morphology. In particular, human MΦs migrate more efficiently using this mode compared with freshly isolated monocytes and other leukocytes.^{27,28} Nevertheless, we noticed that mesenchymal migration is improved in both cell types in the presence of a culture supernatant obtained from the HT1080 human fibrosarcoma cell line (CoHT1080), which contains various tumor-derived factors with chemotactic activity²⁹ (Figure 3c, white bars). In this context, we show that the transfection with the siControl did not affect the migration capacity of both human monocytes and MΦs (Figure 3c, black bars), which exhibited, when infiltrating the matrix, the typical elongated cell shape (Figure 3c). Taken together, these results demonstrate that basic biological functions of MP cells are maintained upon siRNA transfection with our lipid-based protocol.

Hck regulates the mesenchymal migration of human monocytes and MΦs

Using MΦs from *hck*-deficient mice, we have previously shown that, although this kinase does not regulate the amoeboid migration,³⁰ it is still a key factor for the mesenchymal mode.^{18,31} To validate our method as an efficient approach to elucidate gene function in different

MP cells, siRNA-mediated gene knockdown of Hck was performed in human MΦs, and their capacity to perform mesenchymal migration was evaluated. In the presence of the siRNA targeting Hck, the chemotactic effect induced by the CoHT1080 culture supernatant was inhibited in terms of total percentage (Figure 3b, gray bars) and migration distance (Supplementary Figure 5) of the MΦs penetrating the matrix. Similarly, when this approach was applied to human monocytes, we demonstrate for the first time that Hck is implicated in their ability to perform mesenchymal migration. By contrast, both parameters were not affected in any of these cells transfected with the siRNA control (Figure 3b and Supplementary Figure 5). Altogether, these results argue that Hck regulates the mesenchymal mode of migration in MP cells in both mice and humans.

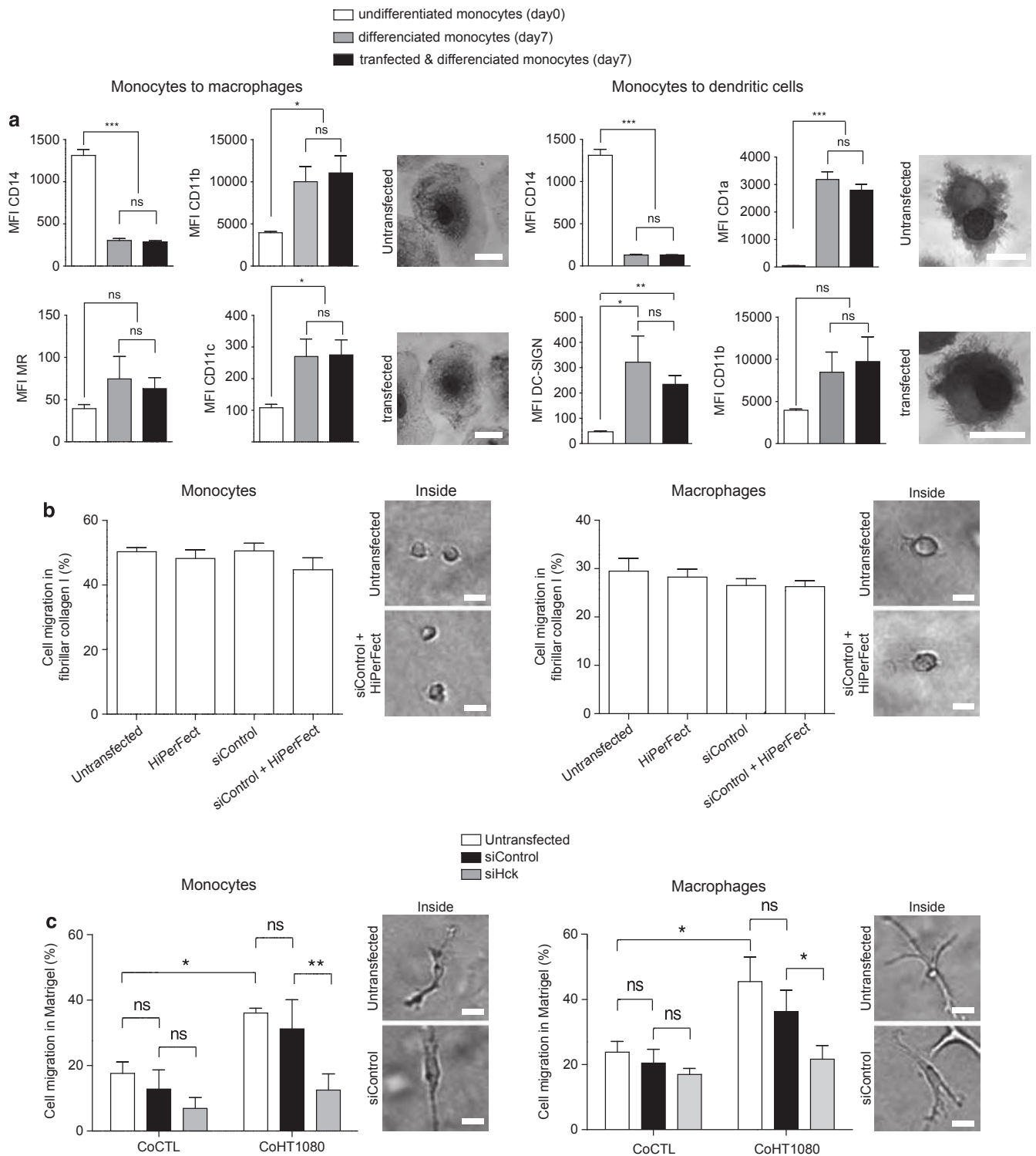
DISCUSSION

There are currently three different methods to deliver siRNA into MP cells: viral-, electroporation- and liposomal-based systems. Among these, viral-based systems are the most effective for the transfection and the establishment of stable expression of siRNA. However, this approach poses risks due to their non-specific inflammatory and immunogenic effects, as best described in transduced primary DCs.^{32,33} To overcome these limitations, non-viral methods offer an alternative approach for siRNA delivery *in vitro*. On the one hand, the electroporation approach physically translocates siRNA into cells during a brief but powerful electric pulse causing transient perturbations of the cell membrane, making it a more general method for siRNA delivery into all cell types. Although electroporation is reported to cause high cell death in general,³⁴ there are established protocols for specific primary MP cells that do not impair cell viability or induce non-specific immunogenic effects.³⁵ Nevertheless, this approach requires special instruments, demands expertise from the experimenter and needs extensive parameter optimization for different cell types, making difficult to reproduce the reported results.³⁶ On the other hand, lipid-based transfection systems are easy to use in most cell types, yield high efficiency and reproducibility, and there are many commercial offerings. Yet, despite our search in the literature for a dedicated lipid-based siRNA-gene silencing method in primary MP cells, we were surprised to find few protocols for either human DCs or MΦs, and none for primary human blood monocytes, highlighting the fact that these cells are delicate and difficult to transfect efficiently. In this report, taking into account the multiple parameters that influence siRNA-mediated gene silencing, we present a highly efficient and practical procedure to deliver siRNA in primary human MP cells with a low incidence on cell death and void of non-specific major alterations in cell functions such as differentiation, phagocytosis and cell migration, which could hinder the study of gene inactivation in these cells.

Although there is a wide range of commercially available products for lipid-based transfection systems, we found that the HiPerFect reagent was uniquely optimal for the delivery of siRNA into primary human monocytes, MΦ and DC. Widely used transfection reagents such as DharmaFECT4 (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Illkirch, France) were first tested for this purpose, but they yielded variable transfection efficiency and cell death, resulting in poor gene knockdown in primary human monocytes (data not shown). Similarly, the HiPerFect transfection reagent was highly toxic when used as described for siRNA delivery into primary human MΦs.¹³ Nevertheless, further parameter optimization in terms of final volume (1% vol/vol), incubation time allowed for siRNA/lipid complex formation (15–20min), reverse mode of transfection (suspension cells onto siRNA/lipid

complexes) and total time of transfection (4h) made the HiPerFect reagent as the lipid-based transfection system of choice. Not only these optimized parameters were applicable to the transfection of human DCs, but also they resulted in a comparable gene knockdown efficiency to that obtained in human MΦs with an established protocol.¹³ Of note, this protocol works as efficiently for MΦs as it does for monocytes/DCs, provided MΦs are detached from the well and maintained in suspension (data not shown).

Another critical reagent was the ON-TARGETplus SMARTpool siRNA. Compared with other siRNA products, we found the ON-TARGETplus SMARTpool siRNA are highly reliable and effective in knocking down the gene of interest. These siRNA pools (a mixture of four siRNAs targeting one gene), whose strands are chemically modified to enhance specificity and reduced off-targets, offer different advantages including (1) the use of lower concentration of siRNA, (2) the good quality of the siRNA pool void of impurities that may yield



poor results and (3) at least one of the four siRNA sequences is guaranteed to inactivate the gene of interest, according to the manufacturer. Most studies using lipid-based siRNA-mediated approaches for gene inactivation in primary MP cells utilize a siRNA final concentration ranging from as low as 1 nM to as high as 300 nM. Along with this report, 15 SMARTpool siRNA have been tested in primary human MP cells, yielding a 100% success rate of gene knockdown at a final concentration of 200 nM. Interestingly, siRNA concentrations ranging from 100 nM to 133 nM also yielded similar results depending on the gene target. Below a final concentration of 100 nM, however, the gene inactivation efficiency diminishes considerably for all tested siRNA pools. Above a final concentration of 200 nM, we observed variations in cell viability and non-specific major alterations in cellular functions (for example, upregulation of co-stimulatory molecules). For the double gene knockdown, it is imperative to find out the lowest final siRNA concentration to inactivate each gene of interest; the combined final concentration for the two siRNA pools should ideally not exceed 200 nM. Finally, the recommended final siRNA concentration of 200 nM usually resulted in a prolonged protein knockdown starting at 2 days and lasting up to 7 days after transfection, without affecting cell viability.

Most of the published work and available protocols using a lipid-based siRNA-mediated gene silencing approach perform the analysis of gene knockdown efficiency solely at the mRNA level by qPCR analysis. Although we routinely use this approach to test the efficiency of each siRNA pool, we also monitor gene knockdown at the protein level by flow cytometry (for example, cell surface receptors), western blot (for example, cytoplasmic proteins), ELISA (for example, secreted proteins) and immunofluorescence imaging (for example, cytoskeleton and actin-binding proteins). We reasoned that beyond the inhibition of *de novo* protein synthesis, siRNA-mediated gene silencing mainly occurs *via* mRNA degradation or prevention of mRNA from being translated, the cell still preserves residual protein whose abundance is, thereafter, subjected by its natural turnover rate. For instance, MR protein has a half-life of 33 h based on pulsed-chase studies,³⁷ and, in this report, its knockdown was optimally and reproducibly assessed 48 h after transfection. However, for certain gene targets, specifically those with a high transcription rate or high protein stability/low turnover, the optimized parameters may not be sufficient to induce a significant protein knockdown. The neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein (N-WASp) best illustrates this

case, as its protein turnover rate is dependent on the status of phosphorylation and ubiquitination,³⁸ and its interaction with HSP90, which protects it from proteasome-dependent degradation.³⁹ By reducing the cell density per well (in order to adjust a higher ratio of siRNA delivered per cell), we were able to improve the partial knockdown of the N-WASp protein only 96 h after transfection of primary human MΦs.⁴⁰ In addition, although we do not provide evidence in this report, consecutive transfections can be done in the same cells to deliver the siRNA at different time points and prolong the gene silencing effect for more than 10 days, without affecting cell viability. All things consider, however, whether or not the turnover rate of the protein of interest is known, a kinetic time course analysis for the protein knockdown should be performed when testing a new SMARTpool siRNA.

The efficient delivery of siRNA to primary MP cells, and specifically in monocytes, provides an avenue to further identify and characterize novel gene networks at work in these cells. To demonstrate in principle the consequences of gene knockdown in primary human monocytes, for example, we focused on the role of Hck as a regulator of the mesenchymal migration based on previous studies in murine MΦs.^{18,31} The Hck knockdown in human monocytes and MΦs indeed results in an inhibition of mesenchymal migration, suggesting that this function of Hck is highly conserved between mice and humans. Similarly, we envision this protocol will further enhance the study across species of many other gene targets thought to be involved in MP biology. In particular, the capacity to perform the simultaneous knockdown of two, and possibly more, genes in primary human MP cells will enhance the characterization of the role of redundancy and compensation within the gene networks at work in these cells. On the basis of this protocol, for instance, we are currently carrying out an unprecedented study to investigate the contribution of the CLR family of receptors to the human monocyte response to different microbial pathogens, in a similar manner recently done for primary human MΦs.¹³ Finally, this protocol can be adapted for transfection of MP cells in multiple cell culture plate formats including 384-well plates, suggesting it can be applicable to perform different global approaches including siRNA-based high-throughput screening.

In summary, we optimized a protocol for lipid-based siRNA-mediated gene silencing in primary human MP cells that is efficient for the single and double knockdown of target proteins. The protocol

Figure 3 Functional assessment of transfected primary human monocytes and MΦs. (a) Monocyte capacity to differentiate into MΦs and DCs. Human monocytes were prepared as described in Methods, and their cell-surface marker expression was assessed directly by flow cytometry, serving as a reference sample for freshly isolated blood monocytes (white). In parallel, monocytes were transfected with the non-targeting siRNA (black) at 200 nM, or not (gray). After 4 h, monocytes were either cultured to undergo a differentiation program into MΦs (left) and DCs (right), as indicated in Methods. After 7 days, all cells were collected, stained accordingly for the indicated cell-surface marker and analyzed by flow cytometry. Results were obtained from four independent experiments performed with different donors. Results are expressed as mean ± s.e.m. *P*-values obtained using the Student's *t*-test (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001). Cytospins were imaged using an inverted microscope (Leica DMIRB) from cells collected at day 7 after differentiation into MΦs (left) or DCs (right) (scale bar, 10 μm). (b) Protease-independent migration analysis in fibrillar collagen I matrices. Primary human monocytes (left) and MΦs (right) were treated either with the transfecting reagent (HiPerFect) or siRNA (siControl), transfected with the control siRNA (siControl+HiPerFect) or not (Untransfected), for 4 and 6 h, respectively. Monocytes and MΦs were then cultured in complete RPMI supplemented with M-CSF at 10 ng ml⁻¹ for 24 and 72 h, respectively. All cells were collected from the culture plates and counted, placed on top of the fibrillar collagen I matrix and allowed to migrate into the matrix for 24 h. The percentage of cell migration was obtained as the ratio of cells within the matrix to the total cell number. Three independent experiments were performed with different donors. Results are expressed as mean ± s.e.m. No statistical significance was found using the Student's *t*-test analysis. Pictures illustrate monocytes and MΦs infiltrated into fibrillar collagen I, which exhibit the round morphology characteristic of the amoeboid movement (scale bar, 20 μm). (c) Mesenchymal migration analysis in Matrigel. Primary human monocytes (left) or MΦs (right) were transfected with the siRNA targeting Hck, non-targeting control or untransfected. Monocytes and MΦs were cultured for 24 and 48 h, respectively, in complete RPMI supplemented with M-CSF at 10 ng ml⁻¹. All cells were then layered on the top of Matrigel and allowed to migrate into the matrix in response to conditioned medium obtained from HT1080 human fibrosarcoma cell cultures (CoHT1080) or control medium (CoCTL) for 72 h. Three independent experiments were performed with different donors. Results are expressed as mean ± s.e.m. *P*-values obtained after analysis using the Student's *t*-test (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). Pictures illustrate monocytes and MΦs infiltrated into Matrigel, exhibiting an elongated cell morphology characteristic of the mesenchymal movement (scale bar, 20 μm).

does not affect cell viability or induce non-specific major alterations in cell functions. Therefore, this easy-to-use technique might represent an advantage compared with the commercially available protocols that are usually optimized in monocytic cell lines, and it can be well employed in several MP cells to investigate and compare the function of various genes.

METHODS

Isolation of the human primary monocytes and differentiation of monocyte-derived MΦs and DCs

Human monocytes were obtained from blood donors (Etablissement Français de Sang, EFS, Toulouse, France). For this report, written informed consents were obtained from the donors under EFS contract n°21/PVNT/TOU/IPBS01/2009-0052. Following articles L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code, the contract was approved by the French Ministry of Science and Technology (agreement n AC 2009-921). The monocytes were prepared following a previously published procedure.⁴¹ In brief, mononuclear cells were isolated from using Leucosep tubes (Fisher), according to the manufacturer's instructions. Monocytes were further purified using CD14 microbead positive selection and MACS separation columns (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. Upon purification, CD14⁺ monocytes were counted using trypan blue (Sigma-Aldrich) and a hemocytometer, and used directly either for transfection purposes or differentiation of primary human monocyte-derived cells. For differentiation of MΦs, monocytes were allowed to adhere to the microscope cover glasses (VWR international) in six-well or 24-well plates (Thermo Scientific), at 1.5×10^6 cells per well and 3×10^5 cells per well, respectively, for 2 h at 37 °C in warm RPMI 1640 medium (GIBCO). The medium was then supplemented to a final concentration of 10% FCS (PAN-BIOTECH), 1% sodium pyruvate (GIBCO) and 0.1% β-mercaptoethanol (GIBCO), considered from hereon as 'complete' RPMI, and human M-CSF (Miltenyi Biotec) at 20 ng ml⁻¹. Cells were allowed to differentiate for 5–7 days. The cell medium is renewed every third or fourth day of culture. For differentiation of DCs, monocytes are seeded directly in 24-well plates (5×10^5 cells per well) with complete RPMI supplemented with human IL-4 (Miltenyi Biotec) and human GM-CSF (Miltenyi Biotec) at 20 and 10 ng ml⁻¹, respectively. Cells are allowed to differentiate for 5–7 days. The cell medium is renewed every third or fourth day of culture. All cell cultures are performed in antibiotic-free condition (that is, grown without penicillin/streptomycin), as their presence increases the incidence of cell death during the transfection procedure. To confirm the full differentiation of human monocytes into the MΦ and DC program, cytospin analysis was performed as previously described⁴² using a Shandon Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific). After 7 days of differentiation, cells were cytospined, fixed and stained with May-Grünwald Giemsa (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Pictures were acquired with an inverted Leica DMIRB microscope.

Preparation of cells before transfection

The transfection of CD14⁺ monocytes was done the same day they are freshly isolated from blood, and, consequently, they were kept on ice (no more than 6 h) in complete RPMI until the transfection is performed. For DCs, the majority of cells were semi-attached and/or floating in clusters starting at day four, with a robust number of cell clusters concentrating at the rim of the well and cell morphology characterized by veil-, star-like-, sheet-like processes. DCs were collected at day five in warm complete RPMI and counted using trypan blue and hemocytometer. Both CD14⁺ monocytes and DCs were resuspended in warm complete RPMI at a cell density of 1.5×10^6 cells per 1 ml per well for transfections in a six-well plate format (or at 3×10^5 cells per 250 μl per well for 24-well plates). Monocyte and DC cell suspensions were kept afterwards in a humidified tissue culture incubator at 37 °C and 5% CO₂. For MΦs, the majority of cells were attached (70–90%) to the microscope cover glasses with a roundish MΦ/myeloid morphology by day five. No transfections were done under a cell confluence of 50%. The culture media was aspirated gently from each well and washed twice with warm complete RPMI to ensure the removal of floating cells, which can contribute to atypical high levels of cell death

during the transfection procedure. Fresh complete RPMI was added to the attached cells to a final volume that is critical for the transfection procedure (250 μl per well in 24-well plates; 1 ml per well in six-well plates) and kept thereafter at 37 °C and 5% CO₂.

Preparation of ready-to-use siRNA reagent and lipid-siRNA complex formation

The ON-TARGETplus SMARTpool siRNA targeting Hck, MR, DC-SIGN and Dectin-1, the non-targeting siRNA and the siGLO Red transfection indicator were purchased from Thermo Scientific, Dharmacon (Illkirch, France). Upon arrival, siRNAs came in dried pellets and were stored as such at –20 °C. The resuspension of siRNA pellets was done in 1 × siRNA Buffer (Thermo Scientific, Dharmacon). The working aliquots (20 μM) and master stocks (200 μM) were then stored at –20 °C and –80 °C, respectively.

In this report, we used a final siRNA concentration of 200 nM: 15 μl (= 300 pmol or ≈ 4.0 μg) for the six-well plates and 3.75 μl (= 75 pmol or ≈ 1.0 μg) for 24-well plates, from the 20 μM siRNA working stocks (Supplementary Table 3). This calculation was based on a standard average molecular weight of a 19–22 bp siRNA (13 300 g mol⁻¹).⁷ For simultaneous inactivation of two genes (double knockdown), the working siRNA concentration combined for the two genes to be silenced did not exceed the final concentration of 200 nM. To compare siRNA-mediated effects between single and double knockdowns, we prepared siRNA dilutions for single transfectants along with the non-targeting siRNA in order to control the siRNA amounts used in the double knockdown condition.

For the formation of the lipid-siRNA complexes, warm RPMI medium (non-supplemented) was used given that serum inhibits the formation of these complexes consequently yielding a poor gene knockdown efficiency. For MΦs, the transfection mix per well was 440 μl of warm RPMI medium (non-supplemented) and 45 μl of HiPerFect transfectant (Qiagen, Courtaboeuf, France) for six-well plate format, and 110.25 μl of warm RPMI medium and 11 μl of HiPerFect transfectant for 24-well plates (Supplementary Table 3). For monocytes and DCs, the transfection mix per well was 470 μl of warm RPMI medium and 15 μl of HiPerFect transfectant for six-well plate format, and 117.5 μl of warm RPMI medium and 3.75 μl of HiPerFect transfectant for 24-well plates (Supplementary Table 3). The siRNA amounts described above were added, and the lipid-siRNA mix incubated for 15–20 min at room temperature during which the mixture was inverted gently a few times to enhance the formation of complexes. Of note, although it is thought that lipid-siRNA complexes are stable ≈ 1 h at room temperature, we obtained lower transfection efficiencies when siRNA complex formation with HiPerFect transfectant exceeds 20 min.

Forward transfection of primary human MΦs (siRNA complexes onto attached cells)

At the end of the incubation period, the lipid-siRNA complexes were centrifuged briefly to concentrate and avoid loss of volume. The lipid-siRNA complexes were added drop-wise onto the media of adherent MΦs (0.5 ml for six-well and 125 μl for 24-well plate formats), accompanied by a gentle rocking of the plate to mix the complexes throughout the well. The addition of the lipid-siRNA complexes into the culture media results in a siRNA final concentration of 200 nM (at 26.7 ng μl⁻¹) and 3.0% (vol/vol) of HiPerFect transfectant. As soon as the complexes were added to all wells, the plates were then placed at 37 °C and 5% CO₂. After 6 h, complete RPMI supplemented with M-CSF (final concentration of 10 ng ml⁻¹) was added as 0.5 ml (24-well plate) or 2.0 ml (six-well plate) per well, and cells were allowed to recuperate overnight. For the double gene knockdown of MR and DC-SIGN, IL-4 (20 ng ml⁻¹) was added 24 h after to induce the expression of these genes, which peaks between 48 and 72 h after treatment.

Reverse transfection of primary human monocytes and DCs (suspension cells onto complexes)

Having tilted down the cell culture plate to be used for transfection, the lipid-siRNA complexes (500 μl for six-well and 125 μl for 24-well plate formats) were added and maintained into one side of the well. The cells in suspension (monocytes or DCs; 1.0 ml for six-well and 250 μl for 24-well plate formats) were added directly into the lipid-siRNA complexes at once, without pipetting

up and down the mixture as it leads to a high incidence of cell death. The addition of the cell suspension into the lipid-siRNA complexes results in a siRNA final concentration of 200 nM (at 26.7 ng μl^{-1}) and 1.0% (vol/vol) of HiPerFect transfectant. As soon as the cells were added to all wells, the plate was gently swirled to ensure uniform distribution of lipid-siRNA complexes, and placed at 37 °C and 5% CO₂ for a total of 4 h. Then, for monocytes only, complete RPMI supplemented with M-CSF to a final concentration of 10 ng ml^{-1} was added as 0.5 ml (24-well plate) or 2.0 ml (six-well plate) per well. This concentration is close to that of circulating M-CSF levels in normal human blood ranging ~2–9 ng ml^{-1} ,⁴³ and kept the monocytes steady without fully differentiating them towards a M Φ program. For the double gene knockdown of MR and DC-SIGN in human monocytes, IL-4 (20 ng ml^{-1}) was added 24 h after to induce the expression of these genes, which reaches its peak 48–72 h after. For DCs, the transfection is stopped by 0.5 ml (24-well plates) and 2 ml (six-well plates) of complete RPMI supplemented with GM-CSF and IL-4 (final concentrations of 10 and 20 ng ml^{-1} , respectively). Of note, this protocol works as efficiently for M Φ s as it does for monocytes/DCs, provided they are detached from the well and maintained in suspension.

Analysis of transfection efficiency by fluorescence microscopy

Primary human monocytes and M Φ s were transfected with siGLO Red Transfection Indicator for 4 and 6 h, respectively. After 24 h in complete RPMI supplemented with M-CSF (10 ng ml^{-1}), cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) subsequently quenched with 50 mM NH₄Cl for 2 min. Cell nuclei and F-actin were counterstained during 15 min with a mix of DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and Alexa-Fluor 488-conjugated Phalloidin (Molecular Probes, Illkirch, France) at 1 U ml^{-1} in 1 × PBS 0.1% Triton X-100/5% BSA. Cells were imaged using an Olympus FV1000 confocal microscope for human monocytes or a Leica DM-RB fluorescence microscope for human M Φ s.

Assessment of transfection, gene knockdown, cell death and monocyte differentiation by flow cytometry

All cells were transfected with siRNA complexes accordingly. After 48 h, while the transfected monocytes and DCs were easily collected from culturing plates, M Φ s were detached from plates using non-enzymatic cell dissociation solution (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. The cells were washed in cold FACS buffer (PBS pH 7.2, 5% BSA) and centrifuged for 5 min at 340 g at 4 °C, and then blocked for 15 min at room temperature using the FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. The cells were stained for 25 min (on ice) with the corresponding antibody for the protein of interest, and in parallel, with the corresponding isotype control antibody, using a general dilution of 1/400. The anti-human DC-SIGN (CD209, clone DCN46), MR (CD206, clone 19.2), CD11c (clone B-ly6), CD11b (clone ICRF44), CD14 (clone M5E2), and their corresponding isotype control antibodies, were purchased from BD Biosciences/Pharmingen (Le pont de Claix, France). The anti-human Dectin-1 (CLEC7A, clone 259931) was acquired from R&D Biosystems (Lille, France), and the anti-human CD1a (clone HI149) was obtained from eBioscience (Paris, France). Alternatively, the Annexin V-FITC Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) was used to assess the incidence of apoptosis and necrosis of all transfected cells, according to the manufacturer's instructions. After staining, the cells were washed with FACS buffer, centrifuged for 5 min at 340 g at 4 °C (two times) and analyzed by flow cytometry using LSR-II flow cytometer (BD Biosciences). Data were then acquired and analyzed using the FlowJo 7.6.5 software.

Analysis of gene knockdown efficiency by SDS-PAGE and western blotting analysis

All cells were transfected with siRNA complexes accordingly. After 72 h, cell cultures in either 24-well plates (3×10^5 cells per well) or six-well plates (1.5×10^6 cells per well) were lysed with boiling cell lysis buffer (62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS (Eurobio, CourtaBoeuf, France), 10% glycerol (Promega, Charbonnières, France), 5% β -mercapto-ethanol, 0.002% Bromophenol blue (Sigma-Aldrich)), which typically yield 30 μg and 150 μg protein per well, respectively. For suspension cells, cell pellets were lysed directly upon centrifugation using similar parameters as those for attached cells. For

immunodetection, protein lysates (25 μg) were loaded equally onto SDS-PAGE gels (percentage according to the size of protein of interest) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% BSA (EUROMEDEX, Souffelweyersheim, France) in TBS Tween-20 0.1% (EUROMEDEX) and incubated with corresponding primary antibodies at 4 °C overnight. The primary antibodies used were anti-Hck (N-30) (Santa Cruz, Nanterre, France, 1/1000, sc72), anti-Fgr (M-60) (Santa Cruz, 1/1000, sc-50338) and anti-actin^{20–33} (Sigma-Aldrich, 1/20000). The membranes were washed extensively (three times) with TBS Tween-20 0.1% and then exposed to the corresponding secondary antibody at room temperature for 1 h. Secondary antibody used: goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate (Biorad, Marnes-la-Coquette, France, 1/20000). Signals were detected by autoradiography using a chemiluminescence detection system (Millipore, Molsheim, France).

Opsonization and FITC-labelling of zymosan

Zymosan A particles from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) were incubated in human serum (Sigma-Aldrich) for 20 min at 37 °C, washed twice in PBS, pH 7.4, and resuspended in PBS containing 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂. The number of particles or bacteria after opsonization was estimated by quantification in a Thoma chamber. For FITC staining, 10⁹ particles were added to 1 ml of 0.01% FITC (Invitrogen) in 0.2 M Na₂CO₃-NaHCO₃ buffer, pH 10.2, for 10 min and washed with PBS, pH 7.4.⁴⁴

Phagocytosis Assay by immunofluorescence microscopy

FITC-labeled opsonized zymosan A particles were added to monocytes and M Φ s at a multiplicity of 10 particles per cell in complete RPMI for 30 min at 37 °C. Cells were washed twice with warm RPMI medium and fixed in 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) supplemented with 15 mM sucrose at room temperature for 20 min. Extracellular non-internalized FITC-labeled zymosan A particles were stained as previously described⁴⁵ and then revealed with a secondary AlexaFluor 555-coupled goat-anti rabbit antibody (Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France). Thus, total particles are green (FITC-labeled) and extracellular particles are yellow (FITC-labeled + AlexaFluor 555-coupled anti rabbit antibody-revealed). Index of binding and phagocytosis were microscopically quantified using a Leica DM-RB fluorescence microscope as the number of bound or phagocytosed particles per 100 cells, using a Leica DM-RB fluorescence microscope.

Functional 3D-migration assays

All cells were transfected with lipid-siRNA complexes accordingly. The 3D-migration assays were performed as described previously.²⁷ In brief, to assess protease-independent migration (amoeboid mode), we used transwells (BD Biosciences) filled with fibrillar collagen I (Nutragen). The top of each matrix inset was seeded with 4×10^4 transfected cells, while the lower chamber was filled with 500 μl of culture medium (CoCTL). Migration was analyzed during the first 24 h. To assess protease-dependent migration (mesenchymal mode), transwells were filled with Matrigel (BD Biosciences). The top of each matrix insert was seeded with 4×10^4 cells, while the lower chamber was filled with 50% of complete medium or a 50% dilution of HT1080 conditioned medium (CoHT10-80) to establish a chemoattractant gradient. The CoHT1080 was obtained from maintained HT1080 human fibrosarcoma cell cultures,²⁷ which were systematic sterilized by filtration and stored as aliquots at -80 °C. Cell migration was analyzed after 72 h. All image acquisition was performed using the motorized stage of an inverted video microscope (Leica DMIRB) and the Metamorph software thereafter. Pictures were taken automatically with a 10 × objective and at constant 15- μm intervals, and cells on top and within the matrix were counted using the Cell Counter plugin of the ImageJ software. The percentage of cell migration was obtained as the ratio of cells within the matrix to the total number of counted cells.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm s.e.m. of at least three independent experiments; *P*-values (Student's *t*-test) are relative to the indicated control. Statistical significance was assumed when *P* < 0.05.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D Hudrisier and A Bénard for expert manuscript review and comments, technical support and conceptual advise, A. Bouissou and M. Deschamps for helpful comments and shared experience, and to all members of our laboratories for critical support and excellent discussion. This work was supported by the CNRS and the European Union (ERA-NET/ERASysBio, TB-HOST-NET grant), the French National Research Agency (ANR 2010-01301 and MigreFlame), European Community's seventh framework programme (FP7-2007-2013) under grant agreement HEALTH-F4-2011-282095-TARKINAID, and by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ 20110421312). CL (FDT 20130928326), CD and GL-V acknowledge support from FRM.

DISCLAIMER

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

- 1 van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968; **128**: 415–435.
- 2 Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 49–53.
- 3 Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 788–798.
- 4 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 953–964.
- 5 Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; **327**: 656–661.
- 6 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806–811.
- 7 Rosner M, Siegel N, Fuchs C, Slabina N, Dolznic H, Hengstschlager M. Efficient siRNA-mediated prolonged gene silencing in human amniotic fluid stem cells. *Nat Protoc* 2010; **5**: 1081–1095.
- 8 Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* 2004; **558**: 89–95.
- 9 Vandembroucke RE, De Geest BG, Bonne S, Vinken M, Van Haecke T, Heimberg H *et al*. Prolonged gene silencing in hepatoma cells and primary hepatocytes after small interfering RNA delivery with biodegradable poly(beta-amino esters). *J Gene Med* 2008; **10**: 783–794.
- 10 Mantei A, Rutz S, Janke M, Kirchhoff D, Jung U, Patzel V *et al*. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 2616–2625.
- 11 Martinez FO. Analysis of gene expression and gene silencing in human macrophages. *Curr Protoc Immunol* 2012; Chapter 14:Unit 14, **28**: 1–3.
- 12 Gooding M, Browne LP, Quinteiro FM, Selwood DL. siRNA delivery: from lipids to cell-penetrating peptides and their mimics. *Chem Biol Drug Des* 2012; **80**: 787–809.
- 13 Lefevre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H *et al*. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 2013; **38**: 1038–1049.
- 14 Welch H, Maridonneau-Parini I. Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 102–109.
- 15 Carreno S, Gouze ME, Schaak S, Emorine LJ, Maridonneau-Parini I. Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36223–36229.
- 16 Carreno S, Caron E, Cougoule C, Emorine LJ, Maridonneau-Parini I. p59Hck isoform induces F-actin reorganization to form protrusions of the plasma membrane in a Cdc42- and Rac-dependent manner. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21007–21016.
- 17 Barlic J, Andrews JD, Kelvin AA, Bosinger SE, DeVries ME, Xu L *et al*. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through beta-arrestin by CXCR1. *Nat Immunol* 2000; **1**: 227–233.
- 18 Cougoule C, Le Cabec V, Poincloux R, Al Saati T, Mege JL, Tabouret G *et al*. Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* 2010; **115**: 1444–1452.
- 19 Guiet R, Poincloux R, Castandet J, Marois L, Labrousse A, Le Cabec V *et al*. Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties-from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur J Cell Biol* 2008; **87**: 527–542.
- 20 Verollet C, Zhang YM, Le Cabec V, Mazzolini J, Charriere G, Labrousse A *et al*. HIV-1 Nef triggers macrophage fusion in a p61Hck- and protease-dependent manner. *J Immunol* 2010; **184**: 7030–7039.
- 21 Nish S, Medzhitov R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* 2011; **34**: 629–636.
- 22 Lugo-Villarino G, Hudrisier D, Tanne A, Neyrolles O. C-type lectins with a sweet spot for *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Microbiol Immunol* 2011; **1**: 25–40.
- 23 Zenaro E, Donini M, Dusi S. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol* 2009; **86**: 1393–1401.
- 24 Armstrong ME, Gantier M, Li L, Chung WY, McCann A, Baugh JA *et al*. Small interfering RNAs induce macrophage migration inhibitory factor production and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2008; **180**: 7125–7133.
- 25 Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S *et al*. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; **11**: 263–270.
- 26 Leon-Ponte M, Kirchhof MG, Sun T, Stephens T, Singh B, Sandhu S *et al*. Polycationic lipids inhibit the pro-inflammatory response to LPS. *Immunol Lett* 2005; **96**: 73–83.
- 27 Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* 2010; **184**: 1049–1061.
- 28 Cougoule C, Van Goethem E, Le Cabec V, Lafouresse F, Dupre L, Mehraj V *et al*. Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *Eur J Cell Biol* 2012; **91**: 938–949.
- 29 Ito Y, Iwamoto Y, Tanaka K, Okuyama K, Sugioka Y. A quantitative assay using basement membrane extracts to study tumor angiogenesis *in vivo*. *Int J Cancer* 1996; **67**: 148–152.
- 30 Guiet R, Verollet C, Lamsoul I, Cougoule C, Poincloux R, Labrousse A *et al*. Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *J Biol Chem* 2012; **287**: 13051–13062.
- 31 Guiet R, Van Goethem E, Cougoule C, Balor S, Valette A, Al Saati T *et al*. The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J Immunol* 2011; **187**: 3806–3814.
- 32 Roth MD, Cheng Q, Harui A, Basak SK, Mitani K, Low TA *et al*. Helper-dependent adenoviral vectors efficiently express transgenes in human dendritic cells but still stimulate antiviral immune responses. *J Immunol* 2002; **169**: 4651–4656.
- 33 Gao K, Huang L. Nonviral methods for siRNA delivery. *Mol Pharm* 2009; **6**: 651–658.
- 34 Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 1991; **60**: 297–306.
- 35 Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Kummer M, Steinkasserer A. Small interfering RNA (siRNA) delivery into monocyte-derived dendritic cells by electroporation. *J Immunol Methods* 2006; **311**: 139–152.
- 36 Pedersen CD, Fang JJ, Pedersen AE. A comparative study of transfection methods for RNA interference in bone marrow-derived murine dendritic cells. *Scand J Immunol* 2009; **70**: 447–456.
- 37 Lennartz MR, Cole FS, Stahl PD. Biosynthesis and processing of the mannose receptor in human macrophages. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2385–2390.
- 38 Suetsugu S, Hattori M, Miki H, Tezuka T, Yamamoto T, Mikoshiba K *et al*. Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 2002; **3**: 645–658.
- 39 Park SJ, Suetsugu S, Takenawa T. Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *EMBO J* 2005; **24**: 1557–1570.
- 40 Bettencourt P, Marion S, Pires D, Santos LF, Lastrucci C, Carmo N *et al*. Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells: the case of N-Wasp and miR-142-3p. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; **3**: 19.
- 41 Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A *et al*. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; **197**: 121–127.
- 42 Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Banuelos K, Werneck MB, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 15850–15855.
- 43 Hodge JM, Kirkland MA, Nicholson GC. Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 759–768.
- 44 Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 2000; **68**: 4736–4745.
- 45 Le Cabec V, Emorine LJ, Toesca I, Cougoule C, Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol* 2005; **77**: 934–943.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, B., Thieblemont, N., Quesniaux, V.J., 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. *J Immunol* 169, 3155-3162.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 4, 499-511.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2, 675-680.
- Andersen, P., and Doherty, T.M. (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews Microbiology* 3, 656-662.
- Armstrong, J.A., and Hart, P.D. (1971). Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *The Journal of experimental medicine* 134, 713-740.
- 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*. *The Journal of experimental medicine* 202, 1715-1724.
- Bajic, G., Degn, S.E., Thiel, S., and Andersen, G.R. (2015). Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO journal* 34, 2735-2757.
- Barnes, P.F., Leedom, J.M., Chan, L.S., Wong, S.F., Shah, J., Vachon, L.A., Overturf, G.D., and Modlin, R.L. (1988). Predictors of short-term prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 158, 366-371.
- Barreiro, L.B., Neyrolles, O., Babb, C.L., Tailleux, L., Quach, H., McElreavey, K., Helden, P.D., Hoal, E.G., Gicquel, B., and Quintana-Murci, L. (2006). Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS medicine* 3, e20.
- Barry, C.E., 3rd, Boshoff, H.I., Dartois, V., Dick, T., Ehrh, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R.J., and Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews Microbiology* 7, 845-855.
- Bartlomieczyk, M.A., Swierczko, A.S., Brzostek, A., Dziadek, J., and Cedzynski, M. (2014). Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with mycobacteria. *Clinical and experimental immunology* 178, 310-319.
- Basu, J., Shin, D.M., and Jo, E.K. (2012). Mycobacterial signaling through toll-like receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 145.
- Bates, E.E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J.J., Zurawski, S.M., Patel, S., Abrams, J.S., Lebecque, S., *et al.* (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 163, 1973-1983.
- 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.
- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.X., Divangahi, M., and Remold, H.G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal immunology* 4, 279-287.
- Beharka, A.A., Gaynor, C.D., Kang, B.K., Voelker, D.R., McCormack, F.X., and Schlesinger, L.S. (2002). Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 169, 3565-3573.
- 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.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276, 1420-1422.

Benoit, M.E., Clarke, E.V., Morgado, P., Fraser, D.A., and Tenner, A.J. (2012). Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J Immunol* *188*, 5682-5693.

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.

Bloem, K., Vuist, I.M., van den Berk, M., Klaver, E.J., van Die, I., Knippels, L.M., Garssen, J., Garcia-Vallejo, J.J., van Vliet, S.J., and van Kooyk, Y. (2014). DCIR interacts with ligands from both endogenous and pathogenic origin. *Immunology letters* *158*, 33-41.

Bloem, K., Vuist, I.M., van der Plas, A.J., Knippels, L.M., Garssen, J., Garcia-Vallejo, J.J., van Vliet, S.J., and van Kooyk, Y. (2013). Ligand binding and signaling of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) is modulated by the glycosylation of the carbohydrate recognition domain. *PloS one* *8*, e66266.

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.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* *174*, 1549-1555.

Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., El-Baghdadi, J., Camcioglu, Y., Parvaneh, N., El Azbaoui, S., Agader, A., Hassani, A., El Hafidi, N., Mrani, N.A., *et al.* (2015). Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunological reviews* *264*, 103-120.

Bowdish, D.M., Sakamoto, K., Kim, M.J., Kroos, M., Mukhopadhyay, S., Leifer, C.A., Tryggvason, K., Gordon, S., and Russell, D.G. (2009). MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens* *5*, e1000474.

Braian, C., Hogeia, V., and Stendahl, O. (2013). Mycobacterium tuberculosis- induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *Journal of innate immunity* *5*, 591-602.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., *et al.* (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* *285*, 732-736.

Briken, V., Ahlbrand, S.E., and Shah, S. (2013). Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Frontiers in cellular and infection microbiology* *3*, 62.

Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature reviews Microbiology* *13*, 620-630.

Bulut, Y., Michelsen, K.S., Hayrapetian, L., Naiki, Y., Spallek, R., Singh, M., and Ardit, M. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *The Journal of biological chemistry* *280*, 20961-20967.

Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffe, M., and Guilhot, C. (2001). Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *The Journal of biological chemistry* *276*, 19845-19854.

Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* *505*, 218-222.

Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature reviews Immunology* *13*, 621-634.

Cehovin, A., Coates, A.R., Hu, Y., Riffo-Vasquez, Y., Tormay, P., Botanch, C., Altare, F., and Henderson, B. (2010). Comparison of the moonlighting actions of the two highly homologous chaperonin 60 proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity* *78*, 3196-3206.

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.

Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D.S., Hong, S., Lee, D.M., Serhan, C.N., Behar, S.M., and Remold, H.G. (2008). Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2791-2801.

Chen, M., Liang, Y., Li, W., Wang, M., Hu, L., Abuaku, B.K., Huang, X., Tan, H., and Wen, S.W. (2015). Impact of MBL and MASP-2 gene polymorphism and its interaction on susceptibility to tuberculosis. *BMC infectious diseases* **15**, 151.

Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* **171**, 4552-4560.

Cohen, J. (2013). Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint. *Science* **339**, 130.

Collins, A.C., Cai, H., Li, T., Franco, L.H., Li, X.D., Nair, V.R., Scharn, C.R., Stamm, C.E., Levine, B., Chen, Z.J., *et al.* (2015). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell host & microbe* **17**, 820-828.

Colombo, M.I., Gutierrez, M.G., and Romano, P.S. (2006). The two faces of autophagy: *Coxiella* and *Mycobacterium*. *Autophagy* **2**, 162-164.

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*. *The Journal of experimental medicine* **186**, 39-45.

Cooper, A.M., Mayer-Barber, K.D., and Sher, A. (2011). Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal immunology* **4**, 252-260.

Court, N., Vasseur, V., Vacher, R., Fremont, C., Shebzukhov, Y., Yeremeev, 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.

Daffe, M., and Etienne, G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **79**, 153-169.

Daffe, M., Lacave, C., Laneelle, M.A., and Laneelle, G. (1987). Structure of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti). *European journal of biochemistry / FEBS* **167**, 155-160.

de Jonge, M.I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M.M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., Honore, N., Marchal, G., Jiskoot, W., England, P., *et al.* (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology* **189**, 6028-6034.

Degn, S.E., Hansen, A.G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (2009). MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol* **183**, 7371-7378.

Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current opinion in structural biology* **9**, 585-590.

Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., and Brown, G.D. (2011). The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *European journal of immunology* **41**, 276-281.

Dubey, V.S., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2002). Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Molecular microbiology* **45**, 1451-1459.

Eruslanov, E.B., Lyadova, I.V., Kondratieva, T.K., Majorov, K.B., Scheglov, I.V., Orlova, M.O., and Apt, A.S. (2005). Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infection and immunity* 73, 1744-1753.

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.

Fabri, M., Stenger, S., Shin, D.M., Yuk, J.M., Liu, P.T., Realegeno, S., Lee, H.M., Krutzik, S.R., Schenk, M., Sieling, P.A., *et al.* (2011). Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Science translational medicine* 3, 104ra102.

Farrar, C.A., Tran, D., Li, K., Wu, W., Peng, Q., Schwaeble, W., Zhou, W., and Sacks, S.H. (2016). Collectin-11 detects stress-induced L-fucose pattern to trigger renal epithelial injury. *The Journal of clinical investigation* 126, 1911-1925.

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. *J Immunol* 174, 4185-4192.

Ferguson, J.S., Martin, J.L., Azad, A.K., McCarthy, T.R., Kang, P.B., Voelker, D.R., Crouch, E.C., and Schlesinger, L.S. (2006). Surfactant protein D increases fusion of *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes with lysosomes in human macrophages. *Infection and immunity* 74, 7005-7009.

Ferguson, J.S., Voelker, D.R., McCormack, F.X., and Schlesinger, L.S. (1999). Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol* 163, 312-321.

Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451.

Florentin, J., Aouar, B., Dental, C., Thumann, C., Firaguay, G., Gondois-Rey, F., Soumelis, V., Baumert, T.F., Nunes, J.A., Olive, D., *et al.* (2012). HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 120, 4544-4551.

Flynn, J.L., Chan, J., and Lin, P.L. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal immunology* 4, 271-278.

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. *The Journal of experimental medicine* 178, 2249-2254.

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.

Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K., Ishii, A., Sugai, S., Kotaki, H., Sudo, K., Nose, M., and Iwakura, Y. (2008). Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine* 14, 176-180.

Gandotra, S., Jang, S., Murray, P.J., Salgame, P., and Ehrt, S. (2007). Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 75, 5127-5134.

Gao, L.Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., and Brown, E.J. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular microbiology* 53, 1677-1693.

Gaynor, C.D., McCormack, F.X., Voelker, D.R., McGowan, S.E., and Schlesinger, L.S. (1995). Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* 155, 5343-5351.

Gehring, A.J., Dobos, K.M., Belisle, J.T., Harding, C.V., and Boom, W.H. (2004). Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* *173*, 2660-2668.

Geijtenbeek, T.B., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews Immunology* *9*, 465-479.

Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine* *197*, 7-17.

Gilleron, M., Himoudi, N., Adam, O., Constant, P., Venisse, A., Riviere, M., and Puzo, G. (1997). Mycobacterium smegmatis phosphoinositols-glyceroarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry* *272*, 117-124.

Gler, M.T., Skripconoka, V., Sanchez-Garavito, E., Xiao, H., Cabrera-Rivero, J.L., Vargas-Vasquez, D.E., Gao, M., Awad, M., Park, S.K., Shim, T.S., *et al.* (2012). Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *The New England journal of medicine* *366*, 2151-2160.

Godfrey, D.I., Uldrich, A.P., McCluskey, J., Rossjohn, J., and Moody, D.B. (2015). The burgeoning family of unconventional T cells. *Nature immunology* *16*, 1114-1123.

Gomez, J.E., and McKinney, J.D. (2004). M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* *84*, 29-44.

Goubau, D., Deddouche, S., and Reis e Sousa, C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* *38*, 855-869.

Guo, J., Wu, X., Too, C.L., Yin, F., Lu, X., He, J., Li, R., Liu, X., Murad, S., Padyukov, L., *et al.* (2012). A replication study confirms the association of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) polymorphisms with ACPA - negative RA in a large Asian cohort. *PloS one* *7*, e41228.

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.

Hansen, S., Selman, L., Palaniyar, N., Ziegler, K., Brandt, J., Kliem, A., Jonasson, M., Skjoedt, M.O., Nielsen, O., Hartshorn, K., *et al.* (2010). Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol* *185*, 6096-6104.

Heitmann, L., Schoenen, H., Ehlers, S., Lang, R., and Holscher, C. (2013). Mincle is not essential for controlling Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunobiology* *218*, 506-516.

Henriksen, M.L., Brandt, J., Andrieu, J.P., Nielsen, C., Jensen, P.H., Holmskov, U., Jorgensen, T.J., Palarasah, Y., Thielens, N.M., and Hansen, S. (2013). Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin liver 1 are found in the circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol* *191*, 6117-6127.

Hinchey, J., Lee, S., Jeon, B.Y., Basaraba, R.J., Venkataswamy, M.M., Chen, B., Chan, J., Braunstein, M., Orme, I.M., Derrick, S.C., *et al.* (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of clinical investigation* *117*, 2279-2288.

Hoagland, D.T., Liu, J., Lee, R.B., and Lee, R.E. (2016). New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Advanced drug delivery reviews* *102*, 55-72.

Holmskov, U., Thiel, S., and Jensenius, J.C. (2003). Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annual review of immunology* *21*, 547-578.

Holscher, C., Atkinson, R.A., Arendse, B., Brown, N., Myburgh, E., Alber, G., and Brombacher, F. (2001). A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J Immunol* *167*, 6957-6966.

Holscher, C., Reiling, N., Schaible, U.E., Holscher, A., Bathmann, C., Korbel, 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. *European journal of immunology* *38*, 680-694.

Horsburgh, C.R., Jr., and Rubin, E.J. (2011). Clinical practice. Latent tuberculosis infection in the United States. *The New England journal of medicine* *364*, 1441-1448.

Hosszu, K.K., Santiago-Schwarz, F., Peerschke, E.I., and Ghebrehiwet, B. (2010). Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate immunity* 16, 115-127.

Hosszu, K.K., Valentino, A., Vinayagasundaram, U., Vinayagasundaram, R., Joyce, M.G., Ji, Y., Peerschke, E.I., and Ghebrehiwet, B. (2012). DC-SIGN, C1q, and gC1qR form a trimolecular receptor complex on the surface of monocyte-derived immature dendritic cells. *Blood* 120, 1228-1236.

Hoving, J.C., Wilson, G.J., and Brown, G.D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology* 16, 185-194.

Isakov, N. (1997). ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunologic research* 16, 85-100.

Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. (2009). Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *The Journal of experimental medicine* 206, 2879-2888.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology* 14, 36-49.

Jang, S., Ohtani, K., Fukuoh, A., Yoshizaki, T., Fukuda, M., Motomura, W., Mori, K., Fukuzawa, J., Kitamoto, N., Yoshida, I., *et al.* (2009). Scavenger receptor collectin placenta 1 (CL-P1) predominantly mediates zymosan phagocytosis by human vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 3956-3965.

Jin, W., Li, C., Du, T., Hu, K., Huang, X., and Hu, Q. (2014). DC-SIGN plays a stronger role than DCIR in mediating HIV-1 capture and transfer. *Virology* 458-459, 83-92.

Jozefowski, S., Sobota, A., Pawlowski, A., and Kwiatkowska, K. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan enhances LPS-induced TNF-alpha production and inhibits NO secretion by engaging scavenger receptors. *Microbial pathogenesis* 50, 350-359.

Juarez, E., Carranza, C., Hernandez-Sanchez, F., Leon-Contreras, J.C., Hernandez-Pando, R., Escobedo, D., Torres, M., and Sada, E. (2012). NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *European journal of immunology* 42, 880-889.

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. *The Journal of experimental medicine* 202, 987-999.

Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M., and Nunez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 549-559.

Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Ohtani, K., Sakai, Y., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Nozaki, M., *et al.* (2002). Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66, 2134-2145.

Keane, J., Remold, H.G., and Kornfeld, H. (2000). Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164, 2016-2020.

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 26, 677-704.

Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends in immunology* 32, 151-156.

Keshi, H., Sakamoto, T., Kawai, T., Ohtani, K., Katoh, T., Jang, S.J., Motomura, W., Yoshizaki, T., Fukuda, M., Koyama, S., *et al.* (2006). Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiology and immunology* 50, 1001-1013.

Khader, S.A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jolley-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. *The Journal of experimental medicine* 203, 1805-1815.

Khader, S.A., Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jolley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSauvage, 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-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* **175**, 788-795.

Kharchenko, O.V., Kharitonenko, A.I., Vovk, A.I., Kukhar, V.P., Babii, L.V., Khil'chevskii, A.N., and Mel'nik, A.K. (2005). [Inhibiting properties of stable nitroxyl radicals in reactions of linoleic acid and linoleyl alcohol oxidation catalyzed by 5-lipoxygenase]. *Ukr Biokhim Zh* (1999) **77**, 52-57.

Kiemer, A.K., Senaratne, R.H., Hoppstadter, J., Diesel, B., Riley, L.W., Tabeta, K., Bauer, S., Beutler, B., and Zuraw, B.L. (2009). Attenuated activation of macrophage TLR9 by DNA from virulent mycobacteria. *Journal of innate immunity* **1**, 29-45.

Killick, K.E., Ni Cheallaigh, C., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E., and Harris, J. (2013). Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cellular microbiology* **15**, 1484-1495.

Knutson, K.L., Hmama, Z., Herrera-Velitz, P., Rochford, R., and Reiner, N.E. (1998). Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *The Journal of biological chemistry* **273**, 645-652.

Koral, K.F., Swailem, F.M., Buchbinder, S., Clinthorne, N.H., Rogers, W.L., and Tsui, B.M. (1990). SPECT dual-energy-window Compton correction: scatter multiplier required for quantification. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **31**, 90-98.

Kraal, G., van der Laan, L.J., Elomaa, O., and Tryggvason, K. (2000). The macrophage receptor MARCO. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2**, 313-316.

Kursar, M., Koch, M., Mittrucker, H.W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T., and Kaufmann, S.H. (2007). Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **178**, 2661-2665.

Lage, H., and Dietel, M. (1996). Cloning of a human cDNA encoding a protein with high homology to yeast methionyl-tRNA synthetase. *Gene* **178**, 187-189.

Lambert, A.A., Azzi, A., Lin, S.X., Allaire, G., St-Gelais, K.P., Tremblay, M.J., and Gilbert, C. (2013). Dendritic cell immunoreceptor is a new target for anti-AIDS drug development: identification of DCIR/HIV-1 inhibitors. *PloS one* **8**, e67873.

Lambert, A.A., Barabe, F., Gilbert, C., and Tremblay, M.J. (2011). DCIR-mediated enhancement of HIV-1 infection requires the ITIM-associated signal transduction pathway. *Blood* **117**, 6589-6599.

Lambert, A.A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A.D., and Tremblay, M.J. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* **112**, 1299-1307.

Lambert, A.A., Imbeault, M., Gilbert, C., and Tremblay, M.J. (2010). HIV-1 induces DCIR expression in CD4+ T cells. *PLoS pathogens* **6**, e1001188.

Laursen, T.L., Sandahl, T.D., Stoy, S., Schiodt, F.V., Lee, W.M., Vilstrup, H., Thiel, S., and Gronbaek, H. (2015). Circulating mannan-binding lectin, M-, L-, H-ficolin and collectin-liver-1 levels in patients with acute liver failure. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **35**, 756-763.

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. *Journal of clinical immunology* **29**, 795-805.

Lee, J.W., Choi, C.H., Park, J.H., Kim, J.W., Kang, S.B., Koo, J.S., Kim, Y.H., Kim, Y.S., Joo, Y.E., and Chang, S.K. (2016). Clinical features of active tuberculosis that developed during anti-tumor necrosis factor therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Intestinal research* **14**, 146-151.

Lemassu, A., and Daffe, M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Biochemical journal* **297 (Pt 2)**, 351-357.

Lemos, M.P., McKinney, J., and Rhee, K.Y. (2011). Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of *Mycobacterium tuberculosis* infection following aerosol challenge of mice. *Infection and immunity* **79**, 1077-1085.

Liu, M., Wu, X., Liu, X., He, J., Su, Y., Guo, J., and Li, Z. (2015). Contribution of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) polymorphisms in susceptibility of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *Human immunology* **76**, 808-811.

Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., *et al.* (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* *311*, 1770-1773.

Long, K.M., Whitmore, A.C., Ferris, M.T., Sempowski, G.D., McGee, C., Trollinger, B., Gunn, B., and Heise, M.T. (2013). Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. *Journal of virology* *87*, 5697-5706.

Lowe, D.M., Bandara, A.K., Packe, G.E., Barker, R.D., Wilkinson, R.J., Griffiths, C.J., and Martineau, A.R. (2013). Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis. *The European respiratory journal* *42*, 1752-1757.

Lozza, L., Farinacci, M., Fae, K., Bechtle, M., Staber, M., Dorhoi, A., Bauer, M., Ganoza, C., Weber, S., and Kaufmann, S.H. (2014). Crosstalk between human DC subsets promotes antibacterial activity and CD8+ T-cell stimulation in response to bacille Calmette-Guerin. *European journal of immunology* *44*, 80-92.

Luca, S., and Mihaescu, T. (2013). History of BCG Vaccine. *Maedica* *8*, 53-58.

MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 5243-5248.

Maglinao, M., Klopfeisch, R., Seeberger, P.H., and Lepenies, B. (2013). The C-type lectin receptor DCIR is crucial for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* *191*, 2551-2559.

Maglione, P.J., and Chan, J. (2009). How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of immunology* *39*, 676-686.

Maglione, P.J., Xu, J., Casadevall, A., and Chan, J. (2008). Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* *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*. *J Immunol* *178*, 7222-7234.

Majlessi, L., and Brosch, R. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* Meets the Cytosol: The Role of cGAS in Anti-mycobacterial Immunity. *Cell host & microbe* *17*, 733-735.

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. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* *25*, 694-701.

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.

Martin, C.J., Booty, M.G., Rosebrock, T.R., Nunes-Alves, C., Desjardins, D.M., Keren, I., Fortune, S.M., Remold, H.G., and Behar, S.M. (2012). Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell host & microbe* *12*, 289-300.

Martineau, A.R., Honecker, F.U., Wilkinson, R.J., and Griffiths, C.J. (2007). Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *103*, 793-798.

Martineau, A.R., Nhamoyebonde, S., Oni, T., Rangaka, M.X., Marais, S., Bangani, N., Tsekela, R., Bashe, L., de Azevedo, V., Caldwell, J., *et al.* (2011). Reciprocal seasonal variation in vitamin D status and tuberculosis notifications in Cape Town, South Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 19013-19017.

Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology* *92*, 1177-1186.

Martinez, V.G., Escoda-Ferran, C., Tadeu Simoes, I., Arai, S., Orta Mascaro, M., Carreras, E., Martinez-Florensa, M., Yelamos, J., Miyazaki, T., and Lozano, F. (2014). The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression. *Cellular & molecular immunology* *11*, 343-354.

Maruhashi, T., Kaifu, T., Yabe, R., Seno, A., Chung, S.H., Fujikado, N., and Iwakura, Y. (2015). DCIR maintains bone homeostasis by regulating IFN-gamma production in T cells. *J Immunol* *194*, 5681-5691.

Massoud, A.H., Yona, M., Xue, D., Chouiali, F., Alturahi, H., Ablona, A., Mourad, W., Piccirillo, C.A., and Mazer, B.D. (2014). Dendritic cell immunoreceptor: a novel receptor for intravenous immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* *133*, 853-863 e855.

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-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity* *35*, 1023-1034.

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews Immunology* *15*, 87-103.

McNab, F.W., Berry, M.P., Graham, C.M., Bloch, S.A., Oni, T., Wilkinson, K.A., Wilkinson, R.J., Kon, O.M., Banchereau, J., Chaussabel, D., *et al.* (2011). Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. *European journal of immunology* *41*, 1941-1947.

McNab, F.W., Ewbank, J., Howes, A., Moreira-Teixeira, L., Martirosyan, A., Ghilardi, N., Saraiva, M., and O'Garra, A. (2014). Type I IFN induces IL-10 production in an IL-27-independent manner and blocks responsiveness to IFN-gamma for production of IL-12 and bacterial killing in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *J Immunol* *193*, 3600-3612.

McNab, F.W., Ewbank, J., Rajsbaum, R., Stavropoulos, E., Martirosyan, A., Redford, P.S., Wu, X., Graham, C.M., Saraiva, M., Tschlis, P., *et al.* (2013). TPL-2-ERK1/2 signaling promotes host resistance against intracellular bacterial infection by negative regulation of type I IFN production. *J Immunol* *191*, 1732-1743.

McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P., and van Seventer, G.A. (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* *160*, 4298-4304.

Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* *111*, 4245-4253.

Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M.W., de Vries, I.J., Figdor, C.G., and Adema, G.J. (2009). DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *Journal of leukocyte biology* *85*, 518-525.

Moreira, L.O., and Zamboni, D.S. (2012). NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology* *3*, 328.

Moynagh, P.N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends in immunology* *26*, 469-476.

Newman, M., and Ausubel, F.M. (2016). Introduction to Gene Editing and Manipulation Using CRISPR/Cas9 Technology. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] *115*, 31 34 31-36.

Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., and Puzo, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* *166*, 7477-7485.

North, R.J., and Jung, Y.J. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annual review of immunology* *22*, 599-623.

Nunes-Alves, C., Booty, M.G., Carpenter, S.M., Jayaraman, P., Rothchild, A.C., and Behar, S.M. (2014). In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature reviews Microbiology* *12*, 289-299.

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.

Ohman, T., Teirila, L., Lahesmaa-Korpinen, A.M., Cypryk, W., Veckman, V., Saijo, S., Wolff, H., Hautaniemi, S., Nyman, T.A., and Matikainen, S. (2014). Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J Immunol* 192, 5952-5962.

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., *et al.* (2001). The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 44222-44228.

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Yamazaki, H., Shimada, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., *et al.* (1999). Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *The Journal of biological chemistry* 274, 13681-13689.

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Harton, M., Palanisamy, G., Troudt, J., Shanley, C., Basaraba, R.J., and Orme, I.M. (2007). The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol* 179, 522-531.

Orme, I.M., Andersen, P., and Boom, W.H. (1993). T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of infectious diseases* 167, 1481-1497.

Ottenhoff, T.H., Dass, R.H., Yang, N., Zhang, M.M., Wong, H.E., Sahiratmadja, E., Khor, C.C., Alisjahbana, B., van Crevel, R., Marzuki, S., *et al.* (2012). Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis. *PloS one* 7, e45839.

Paijo, J., Doring, M., Spanier, J., Grabski, E., Nooruzzaman, M., Schmidt, T., Witte, G., Messerle, M., Hornung, V., Kaefer, V., *et al.* (2016). cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. *PLoS pathogens* 12, e1005546.

Papadopoulos, A., and Gorvel, J.P. (2015). Subversion of mouse dendritic cell subset function by bacterial pathogens. *Microbial pathogenesis* 89, 140-149.

Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Douni, E., and Kollias, G. (1996). Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new! *Cytokine & growth factor reviews* 7, 223-229.

Pasula, R., Downing, J.F., Wright, J.R., Kachel, D.L., Davis, T.E., Jr., and Martin, W.J., 2nd (1997). Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to murine alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17, 209-217.

Pecora, N.D., Gehring, A.J., Canaday, D.H., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 177, 422-429.

Pennini, M.E., Pai, R.K., Schultz, D.C., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J Immunol* 176, 4323-4330.

Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, M., and Guilhot, C. (2004). A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 314-319.

Poyntz, H.C., Stylianou, E., Griffiths, K.L., Marsay, L., Checkley, A.M., and McShane, H. (2014). Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 94, 226-237.

Quesniaux, V.J., Nicolle, D.M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., and Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 172, 4425-4434.

Raghavan, S., Alagarasu, K., and Selvaraj, P. (2012). Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 92, 18-30.

Rainwater, D.L., and Kolattukudy, P.E. (1985). Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Bacillus Calmette-Guerin. Purification and characterization of a novel fatty acid synthase, mycocerosic acid synthase, which elongates n-fatty acyl-CoA with methylmalonyl-CoA. *The Journal of biological chemistry* 260, 616-623.

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.

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature reviews Immunology* 12, 352-366.

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. *European journal of immunology* 40, 2200-2210.

Redford, P.S., Murray, P.J., and O'Garra, A. (2011). The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. *Mucosal immunology* 4, 261-270.

Reiley, W.W., Calayag, M.D., Wittmer, S.T., Huntington, J.L., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Martino, C.A., Roberts, A.D., Cooper, A.M., Winslow, G.M., *et al.* (2008). ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10961-10966.

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. *J Immunol* 169, 3480-3484.

Richard, M., Thibault, N., Veilleux, P., Gareau-Page, G., and Beaulieu, A.D. (2006). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of CLECSF6 in neutrophils: a new mechanism of action for SHP-2. *Molecular immunology* 43, 1716-1721.

Ricklin, D., Reis, E.S., and Lambris, J.D. (2016). Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nature reviews Nephrology* 12, 383-401.

Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., *et al.* (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22, 507-517.

Rooryck, C., Diaz-Font, A., Osborn, D.P., Chabchoub, E., Hernandez-Hernandez, V., Shamseldin, H., Kenny, J., Waters, A., Jenkins, D., Kaissi, A.A., *et al.* (2011). Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nature genetics* 43, 197-203.

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.

Rousseau, C., Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Bordat, Y., Kolattukudy, P.E., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003). Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* 149, 1837-1847.

Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P., Huerre, M., Gicquel, B., and Jackson, M. (2004). Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cellular microbiology* 6, 277-287.

Roy, N., Ohtani, K., Matsuda, Y., Mori, K., Hwang, I., Suzuki, Y., Inoue, N., and Wakamiya, N. (2016). Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. *Biochimica et biophysica acta* 1860, 1118-1128.

Russell, D.G., Barry, C.E., 3rd, and Flynn, J.L. (2010a). Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science* 328, 852-856.

Russell, D.G., VanderVen, B.C., Lee, W., Abramovitch, R.B., Kim, M.J., Homolka, S., Niemann, S., and Rohde, K.H. (2010b). Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell host & microbe* 8, 68-76.

Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M., Yamamoto, M., and Takeda, K. (2012). Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *International immunology* 24, 637-644.

Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annual review of immunology* 30, 491-529.

Sanjurjo, L., Amezaga, N., Vilaplana, C., Caceres, N., Marzo, E., Valeri, M., Cardona, P.J., and Sarrias, M.R. (2013). The scavenger protein apoptosis inhibitor of macrophages (AIM) potentiates the antimicrobial response against *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing autophagy. *PLoS one* *8*, e79670.

Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews Immunology* *10*, 170-181.

Scharenberg, A.M., and Kinet, J.P. (1996). The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell* *87*, 961-964.

Schimmel, P., and Wang, C.C. (1999). Getting tRNA synthetases into the nucleus. *Trends in biochemical sciences* *24*, 127-128.

Schlesinger, L.S. (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* *150*, 2920-2930.

Schlesinger, L.S. (1996). Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Current topics in microbiology and immunology* *215*, 71-96.

Schoenen, H., Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus, K., Nimmerjahn, F., Agger, E.M., Stenger, S., Andersen, P., Ruland, J., *et al.* (2010). Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* *184*, 2756-2760.

Selman, L., and Hansen, S. (2012). Structure and function of collectin liver 1 (CL-L1) and collectin 11 (CL-11, CL-K1). *Immunobiology* *217*, 851-863.

Selman, L., Henriksen, M.L., Brandt, J., Palarasah, Y., Waters, A., Beales, P.L., Holmskov, U., Jorgensen, T.J., Nielsen, C., Skjodt, K., *et al.* (2012). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of human collectin 11 (CL-11, CL-K1). *Journal of immunological methods* *375*, 182-188.

Selman, L., Skjodt, K., Nielsen, O., Floridon, C., Holmskov, U., and Hansen, S. (2008). Expression and tissue localization of collectin placenta 1 (CL-P1, SRCL) in human tissues. *Molecular immunology* *45*, 3278-3288.

Seno, A., Maruhashi, T., Kaifu, T., Yabe, R., Fujikado, N., Ma, G., Ikarashi, T., Kakuta, S., and Iwakura, Y. (2015). Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice deficient for DCIR, an inhibitory C-type lectin receptor. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* *64*, 109-119.

Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Kariyone, A., Takatsu, K., and Urdahl, K.B. (2010). Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* *207*, 1409-1420.

Shim, T.S., Turner, O.C., and Orme, I.M. (2003). Toll-like receptor 4 plays no role in susceptibility of mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)* *83*, 367-371.

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 pathogens* *8*, e1002507.

Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Groschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015). Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS pathogens* *11*, e1004650.

Skjoedt, M.O., Palarasah, Y., Munthe-Fog, L., Jie Ma, Y., Weiss, G., Skjodt, K., Koch, C., and Garred, P. (2010). MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. *Immunobiology* *215*, 921-931.

Soilleux, E.J., Morris, L.S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L.J., Doms, R.W., Weissman, D., *et al.* (2002). Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of leukocyte biology* *71*, 445-457.

Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *7*.

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. *J Immunol* *178*, 3143-3152.

Sterne, J.A., Rodrigues, L.C., and Guedes, I.N. (1998). Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* *2*, 200-207.

Strasser, D., Neumann, K., Bergmann, H., Marakalala, M.J., Guler, R., Rojowska, A., Hopfner, K.P., Brombacher, F., Urlaub, H., Baier, G., *et al.* (2012). Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-sigma to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. *Immunity* *36*, 32-42.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., and Russell, D.G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* *263*, 678-681.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews Immunology* *15*, 471-485.

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., *et al.* (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *197*, 121-127.

Takahashi, M., Iwaki, D., Kanno, K., Ishida, Y., Xiong, J., Matsushita, M., Endo, Y., Miura, S., Ishii, N., Sugamura, K., *et al.* (2008). Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol* *180*, 6132-6138.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual review of immunology* *26*, 535-584.

Tanaka, Y., Morita, C.T., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* *375*, 155-158.

Tang, J., Yam, W.C., and Chen, Z. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* *98*, 30-41.

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*. *The Journal of experimental medicine* *206*, 2205-2220.

Teh, B.K., Yeo, J.G., Chern, L.M., and Lu, J. (2011). C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation. *Molecular immunology* *48*, 1128-1138.

Teles, R.M., Graeber, T.G., Krutzik, S.R., Montoya, D., Schenk, M., Lee, D.J., Komisopoulou, E., Kelly-Scumpia, K., Chun, R., Iyer, S.S., *et al.* (2013). Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* *339*, 1448-1453.

Thada, S., Ponnana, M., Sivangala, R., Joshi, L., Alasandagutti, M., Ansari, M.S., Schumann, R.R., Valluri, V., and Gaddam, S. (2016). Polymorphisms of IFN-gamma (+874A/T) and IL-12 (+1188A/C) in tuberculosis patients and their household contacts in Hyderabad, India. *Human immunology*.

Troldborg, A., Thiel, S., Jensen, L., Hansen, S., Laska, M.J., Deleuran, B., Jensenius, J.C., and Stengaard-Pedersen, K. (2015). Collectin liver 1 and collectin kidney 1 and other complement-associated pattern recognition molecules in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* *182*, 132-138.

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. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* *6*, 720-727.

Ulrichs, T., Kosmiadi, G.A., Trusov, V., Jorg, S., Prادل, 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.

Unkeless, J.C., and Jin, J. (1997). Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Current opinion in immunology* *9*, 338-343.

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 der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., and Peters, P.J. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287-1298.

Vannberg, F.O., Chapman, S.J., Khor, C.C., Tosh, K., Floyd, S., Jackson-Sillah, D., Crampin, A., Sichali, L., Bah, B., Gustafson, P., *et al.* (2008). CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PloS one* 3, e1388.

Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J.L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., Glickman, M., Jacobs, W.R., Jr., Porcelli, S.A., and Briken, V. (2007). Mycobacterium tuberculosis *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS pathogens* 3, e110.

Vely, F., and Vivier, E. (1997). Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J Immunol* 159, 2075-2077.

Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E., and Flugel, R.S. (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Current opinion in chemical biology* 1, 309-315.

Watson, R.O., Bell, S.L., MacDuff, D.A., Kimmey, J.M., Diner, E.J., Olivas, J., Vance, R.E., Stallings, C.L., Virgin, H.W., and Cox, J.S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell host & microbe* 17, 811-819.

Weikert, L.F., Lopez, J.P., Abdolrasulnia, R., Chronos, Z.C., and Shepherd, V.L. (2000). Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 279, L216-223.

Welsh, K.J., Hunter, R.L., and Actor, J.K. (2013). Trehalose 6,6'-dimycolate--a coat to regulate tuberculosis immunopathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* 93 Suppl, S3-9.

Whitehead, K.A., Dahlman, J.E., Langer, R.S., and Anderson, D.G. (2011). Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 2, 77-96.

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. *The Journal of experimental medicine* 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. *J Immunol* 179, 2509-2519.

Wu, L., Deng, H., Zheng, Y., Mansjo, M., Zheng, X., Hu, Y., and Xu, B. (2015). An association study of NRAM1, VDR, MBL and their interaction with the susceptibility to tuberculosis in a Chinese population. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 38, 129-135.

Wu, T., Guo, S., Wang, J., Li, L., Xu, L., Liu, P., Ma, S., Zhang, J., and Luo, Y. (2011). Interaction between mannosylated lipoarabinomannan and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin influences dendritic cells maturation and T cell immunity. *Cellular immunology* 272, 94-101.

Xu, D.D., Wang, C., Jiang, F., Wei, L.L., Shi, L.Y., Yu, X.M., Liu, C.M., Liu, X.H., Feng, X.M., Ping, Z.P., *et al.* (2015). Association of the FCN2 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis. *PloS one* 10, e0138356.

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.

Yang, H.Y., Li, H., Wang, Y.G., Xu, C.Y., Zhao, Y.L., Ma, X.G., Li, X.W., and Chen, H. (2014). Correlation analysis between single nucleotide polymorphisms of pulmonary surfactant protein A gene and pulmonary tuberculosis in the Han population in China. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 26, 31-36.

- Yang, Q., Stevenson, H.L., Scott, M.J., and Ismail, N. (2015). Type I interferon contributes to noncanonical inflammasome activation, mediates immunopathology, and impairs protective immunity during fatal infection with lipopolysaccharide-negative ehrlichiae. *The American journal of pathology* *185*, 446-461.
- Yi, Y.X., Han, J.B., Zhao, L., Fang, Y., Zhang, Y.F., and Zhou, G.Y. (2015). Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism contributes to pulmonary tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine* *8*, 20690-20700.
- Yoshida, T., Tsuruta, Y., Iwasaki, M., Yamane, S., Ochi, T., and Suzuki, R. (2003). SRCL/CL-P1 recognizes GalNAc and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen. *Journal of biochemistry* *133*, 271-277.
- Yuk, J.M., Shin, D.M., Lee, H.M., Yang, C.S., Jin, H.S., Kim, K.K., Lee, Z.W., Lee, S.H., Kim, J.M., and Jo, E.K. (2009). Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell host & microbe* *6*, 231-243.
- Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal* *272*, 6179-6217.
- Zhang, X., Jiang, F., Wei, L., Li, F., Liu, J., Wang, C., Zhao, M., Jiang, T., Xu, D., Fan, D., *et al.* (2012). Polymorphic allele of human MRC1 confer protection against tuberculosis in a Chinese population. *International journal of biological sciences* *8*, 375-382.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121-127.

Auteur : Anthony TROEGELER

Titre : Analyse de la fonction de deux nouvelles lectines de type C, DCIR et CL-LK, dans l'immunité anti-tuberculeuse

Directeur de thèse: Pr Denis HUDRISIER / **Codirecteur de thèse:** Dr Olivier NEYROLLES

Résumé : La tuberculose (TB) est une maladie très répandue qui provoque la mort de plus d'un million de personnes dans le monde chaque année. Cela représente un véritable problème de santé publique qui nécessite le développement de nouveaux médicaments et traitements afin de mieux lutter contre cette maladie destructrice. Dans ce contexte, il est important de comprendre la relation entre l'agent étiologique, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) et le système immunitaire. Les mycobactéries sont recouvertes de structure glycolipidiques qui pourraient être reconnus par des récepteur spécifiques appelés lectine de type C. Ici, nous avons étudié le rôle de deux lectines récemment identifiées qui n'ont pas été étudié dans un contexte de TB, CL-LK et DCIR. Au cours des dernières années, de nouvelles lectines solubles ont été identifiées et parmi elles ; CL-K1 a été définie par un criblage de divers ligands glycosylés, comme étant un potentiel récepteur de motifs présents sur la paroi de *Mtb*. Dans le sang, CL-K1 est associé avec une autre lectine soluble du nom de CL-L1, formant un complexe du nom de CL-LK. Par des expériences *in vitro*, notamment via des approches biochimique et d'analyses cytométriques, nous avons pu confirmer que CL-LK peut se lier à *Mtb* et encore plus particulièrement à la coiffe mannose présent sur le lipoarabinomannane, un constituant majeur de la mycomembrane. Les souris déficientes en CL-K1, une sous unités de CL-LK, ne présentent pas d'altération particulière de susceptibilité à *Mtb*. Cependant, nous avons pu mettre en évidence que la quantité de CL-LK dans le sérum de patient atteint d'une TB active est réduite comparé aux patients contrôles, et que cela corrèle de manière inverse à la réponse immune induite par le pathogène. Ces résultats indiquent que CL-LK pourrait présenter un intérêt comme élément de futur diagnostics ou suivi de traitement. Dans une seconde partie de la thèse, nous nous sommes concentré sur la lectine DCIR dans la réponse immune envers l'agent étiologique de la TB. DCIR est exprimé dans les lésions pulmonaires de macaques infectés par *Mtb* à la fois durant les infections asymptomatiques et dans les infections conduisant à une TB active. *In vitro*, une analyse globale de l'expression génique couplée à des validations par RT-qPCR ont pu révéler que suite à une infection par *Mtb*, l'expression d'un grand nombre de gènes répondant à l'interféron (IFN) de type I est inhibée dans les cellules dendritiques issues de moelle osseuses de souris déficientes en DCIR comparées à celles issues de souris sauvages. Cette inhibition corrèle avec une phosphorylation excessive de SHP2 dans les cellules dépourvues de DCIR, suivies d'une déphosphorylation de STAT1, laquelle est impliquée dans la régulation de la réponse à l'IFN de type I. L' IFN de type I est connu comme pouvant inhiber la production d' IL-12 dans les cellules dendritiques, et en effet, nous avons pu démontrer que l'inhibition de la signalisation relative à l'IFN de type I dans les cellules dendritiques déficientes en DCIR est associée avec une augmentation de la production d'IL12p70 ainsi qu'à une plus grande capacité de ces cellules à stimuler la prolifération de lymphocytes Th1 producteur d'IFN γ . Les souris déficientes en DCIR contrôlent mieux l'infection que les souris sauvages, ce qui corrèle également avec une plus grande production d'IL12p70, une plus forte réponse des lymphocytes Th1, ainsi qu'à une augmentation de l'inflammation et de l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris déficientes. Cette inflammation excessive est caractérisée par une augmentation de production du TNF- α et de iNOS dans les poumons. En conclusion, nos résultats révèlent une nouvelle voie moléculaire par laquelle les lectines peuvent moduler l'équilibre entre l'inflammation induite par l'infection et le contrôle du pathogène par l'intermédiaire de la modulation de la signalisation relative à l'IFN de type I dans les cellules dendritiques.

Abstract: Tuberculosis (TB) is a wide-spread disease which causes the death of more than one million of people around the world each year. This represents a really harmful healthcare and new drugs and treatments are always in development to better fight this destructive illness. In this context, it is crucial to understand the relation between the etiological agent, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and the immune system. Mycobacteria are recovered by some glycolipid structure which could be recognized by specific receptor called C-Type Lectin. Here we investigated the role of two recently highlights C-type lectins which haven't been studied in a tuberculosis context, CL-LK (Collectin Liver Kidney) and DCIR (Dendritic Cell (DC) ImmunoReceptor). In the recent years, novel soluble lectins were identified and belong these; CL-K1 (Collectin Kidney 1) was identified by a glycan array as a potential receptor in the sugar complex recognition of *M.tb*. In blood, CL-K1 is linked with another soluble lectin called CL-L1 (Collectin Liver 1) and form a complex CL-LK molecule. With some *in vitro* experiment, notably with biochemistry approach and cytometer analysis, we were able to confirm that CL-LK can bind *Mtb* and more particularly the mannose residue presents on the Lipoarabinomannan, a major constituent of the mycomembrane. Mice deficient in CL-K1, one of the CL-LK subunits, do not display altered susceptibility to *Mtb*. However, we found that the amount of CL-LK in the serum of patients with active TB is reduced, compared to that in controls, and correlates inversely to the magnitude of the immune response to the pathogen. These findings indicate that CL-LK might be of interest for future diagnostic and treatment monitoring purposes. In a second part of this thesis, we have focused our interest on the C-Type lectin DCIR in immunity to the tuberculosis agent, *Mtb*. DCIR is expressed in pulmonary lesions in *Mtb*-infected non-human primates during both symptomless infection and active TB disease. *In vitro*, global gene expression profiling coupled to RT-qPCR validation revealed that upon *Mtb* infection, the expression of a number of interferon (IFN)-responsive genes was impaired in DCIR-deficient murine bone marrow-derived DCs, compared to in wild-type cells. This inhibition correlated with an excessive phosphorylation of Src homology 2 domain tyrosine phosphatase (SHP)2 in DCIR-KO cells, followed by a subsequent dephosphorylation of Signal transducer and activator of transcription1(STAT1) which is crucially involved in the regulation of the type I IFN. Type I IFNs are known to inhibit interleukin (IL)-12 production in DCs, and indeed, we found that impaired IFN signaling in DCIR-deficient DCs was associated with an increased production of IL-12p70 and an increased ability of *Mtb*-infected cells to stimulate IFN γ -producing Th1 lymphocyte proliferation. DCIR-deficient mice controlled *Mtb* infection better than wild-type animals, which correlated with an increased production of IL-12p70, an increased proliferation of Th1 lymphocytes, and an increased inflammation and cell infiltration in the lungs of DCIR-KO animals. This excessive inflammation is characterized by an increased production of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the lungs. Taken together, our results reveal a novel pathway by which a C-Type lectin modulates the equilibrium between infection-driven inflammation and pathogen's control through sustaining type I IFN signaling in DCs.

Mots-clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Lectine de type C, DCIR, CL-LK, Interféron

Discipline : Immunologie

Intitulé et adresse du laboratoire : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS.

UMR5089, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex