



HAL
open science

Étude du rôle de la réponse inflammatoire et des microARN du macrophage au cours de l'infection avec *Mycobacterium tuberculosis*

Pauline Badé

► **To cite this version:**

Pauline Badé. Étude du rôle de la réponse inflammatoire et des microARN du macrophage au cours de l'infection avec *Mycobacterium tuberculosis*. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT088 . tel-04299856

HAL Id: tel-04299856

<https://theses.hal.science/tel-04299856v1>

Submitted on 22 Nov 2023

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1183

Étude du rôle de la réponse inflammatoire et des microARN du macrophage au cours de l'infection avec *Mycobacterium tuberculosis*

Présentée par Pauline BADE
Le 14 décembre 2021

Sous la direction d'Isabelle Duroux-Richard et de Florence Apparilly
Responsable scientifique Evotec : Christine Roubert

Devant le jury présidé par Laleh MAJLESSI et composé de

Laleh MAJLESSI, DR, Institut Pasteur

Etienne MEUNIER, DR, CNRS

Isabelle DUROUX-RICHARD, HDR, Inserm

Florence APPARAILLY, DR, Inserm

Say VIENGCHAREUN, HDR, Inserm

Christine ROUBERT, PhD, Evotec

Rapporteure, Présidente

Rapporteur

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse

Examineur

Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Resumé

La tuberculose, une infection qui touche 23% la population mondiale, a été déclarée comme une urgence sanitaire mondiale depuis 1993 par l’OMS. Pourtant, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), l’agent causal de la maladie est resté le pathogène le plus mortel au monde jusqu’à l’émergence du SARS-Cov-2 et a causé près de 1,4 millions de décès en 2019. La lutte contre la maladie est freinée par la capacité de Mtb à déjouer la réponse immunitaire de son hôte et en premier lieu, la réponse du macrophage, qui constitue son réservoir principal. Le macrophage est une cellule immunitaire innée qui déclenche une réponse inflammatoire (RI) protectrice contre les infections. Malheureusement, Mtb détourne cette RI et utilise le macrophage comme une niche lui permettant d’établir une infection chronique. L’objectif de ma thèse a été d’apporter une meilleure compréhension de la RI déclenchée par le macrophage au cours de l’infection et d’apporter des éléments de réponse permettant de comprendre comment Mtb la détourne.

Afin d’éclaircir les mécanismes sous-jacents de ce détournement, j’ai comparé, par une approche transcriptomique, la RI des modèles de tuberculose couramment utilisés avec celle des macrophages alvéolaires des patients tuberculeux. J’ai d’autre part, dans un modèle de macrophage humain, identifié les gènes de la RI dont l’expression est liée à la virulence de Mtb par rapport à d’autres mycobactéries non virulentes chez l’Homme. En quantifiant, les microARN dérégulés au cours de l’infection et en identifiant, *in silico*, ceux pouvant réguler les gènes liés à la virulence de Mtb, miR-132-3p a s’est présenté comme un candidat pertinent pour réguler la défense des macrophages. Grâce à des expériences de perte de fonction par ARN interférence, j’ai montré que l’inhibition de miR-132-3p permet de réduire la charge de Mtb *in vivo* dans les poumons de souris infectées et *in vitro* dans un modèle de macrophage humain. Grâce des mesures de métabolisme et à la quantification de gènes marqueurs de la polarisation, j’ai montré que l’implication de miR-132-3p dans la réponse des macrophages est médiée par le contrôle de leur polarisation *via* la régulation du gène *FOXP1*.

Mon projet a permis d’enrichir les connaissances actuelles sur la façon dont Mtb détourne la réponse inflammatoire du macrophage. Les voies cellulaires mises en évidence, notamment celles contrôlées par l’axe miR-132-3p / *FOXP1* ouvrent des pistes sur les cibles potentielles pouvant être utilisées dans le cadre des thérapies dirigées par l’hôte, pour améliorer la RI du macrophage au cours de l’infection avec Mtb.

Remerciements

Mais qui ne pas remercier ? Je sais : je ne remercie aucun des variants de SARS-CoV-2 qui nous ont bien saccagé ces deux dernières années.

Qui remercier ? La liste est longue.

Je commence par remercier tous les membres du jury, les docteurs Laleh Majlessi, Etienne Meunier et Say Viengchareun, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail et dont l'expertise me permettra de l'améliorer. Je remercie également mes directrices de thèse Florence Apparailly, Isabelle Duroux-Richard et ma tutrice Christine Roubert d'avoir pris part à ce jury, mais vous n'aviez pas vraiment le choix !

Florence, Isabelle, merci pour votre excellent encadrement et votre bienveillance à toutes les deux durant ces quatre années. Isabelle, spécialiste miR, spécialiste gene ontolgy et sauveuse d'article quand l'inspiration me manquait ou qu'il fallait trouver une direction magique, merci (et pardon pour les sueurs froides à chaque réinscription !) !

Christine, je vais faire court parce que peu importe les quelques lignes de remerciement que je pourrai écrire, elles ne suffiront pas. Alors merci d'être toi. Tu es une personne tellement fantastique. Merci d'être une spécialiste en décryptage « de moi » et de m'avoir tant appris scientifiquement et humainement. Je n'ai pas peur de dire que je n'aurais pas survécu sans toi. Et puis quelques mots en vrac : fraise, underrated, Thomaslade (puis je cherche le mot qui veut dire que tu m'encourages à devenir une harceleuse par mail, mais je ne trouve pas) !

Ma famille, mon pilier, ma base. Je ne sais pas si c'est parce qu'il est (très, très) tard (et que bien évidemment j'écris les remerciements à la dernière minute), ou si c'est mon vocabulaire qui est limité, mais je ne trouve pas les mots pour vous dire à quel point vous êtes extraordinaires et que votre soutien est extraordinaire et que quand vous me remontez le moral vous êtes extraordinaires. Sauf toi Manu, t'as voulu me perdre dans les nuages au-dessus de Lyon et tu me dois un BMX depuis plus de 20 ans (je t'aime quand même mon frère) ! Ma Faf, mon Manu, mon Titive, mon Cocob, Jimoustache, mon papa, MA MAMAN. Ô maman ! Merci, tu es la meilleure. Merci aussi ma Tilou, super tatie qui a proposé de relire mes fautes !! Et Jacques le mamouyeux de maman, merci pour la patience !

L'équipe TB. Je ne pense pas que j'aurais pu tomber dans une meilleure équipe avec des gens aussi compétents et gentils. Merci pour votre accueil, pour votre bienveillance, merci d'avoir toujours été enthousiastes pour mon projet et de m'avoir aidée plus qu'il ne le fallait. Je vous cite par ordre aléatoire : Christine (Bon, je t'ai déjà dit merci deux fois, mais en voilà une troisième couche !), Steph, Khad, Nico, Aurélie, Sylvain, Caro, Isabelle (Blanc), Florian, Anna, Jean-Michel, Sophie (attendez, j'essaie de voir si je n'oublie pas un.e. chef.fe. dans un coin de ma tête). Un énorme merci tout particulièrement à Khad, Steph et Nico pour la formation P3. Merci Nico, Khad (alias rayon de soleil), Caro (alias rayon de soleil, tout pareil) et Sylvain pour les manip parfaites sur lesquelles j'ai pu m'appuyer toute ma thèse. Steph, merci... pour tout en fait ! Mais surtout pour ta patience sans faille à chaque fois que tu devais m'aider pour l'ArrayScan. Puis un grand merci à tous pour les babysittings au P3 quand je prévoyais une heure de sortie (très optimiste) mais que je finissais deux heures après. Je vous dois des gâteaux à la banane, je n'oublie pas ! Jean-Michel, merci mille fois pour ton implication dans ma thèse et tous tes conseils (et puis les blagues, ça ne s'oublie pas les blagues). Florian, thank you very much for being so supportive and for the very interesting talks whenever we had the chance to meet. Anna, thank you so much for your much valued advice and overall kindness every time I had the chance to talk to you! I was always amazed to realize how much you knew about my project and how enthusiastic you were about it! Sophie, comme tu m'as manqué ! Tu es encore cheffe TB dans mon organigramme personnel. Merci pour tout, de t'être battue pour la thèse et de m'avoir accompagnée tout au long !

Côté Evotec, je remercie aussi les filles de la viro d'être toutes (bon, outre les compétences indiscutables) : gentilles, drôles, agréables... et en plus vous décorez l'open space !

Je vous remercie aussi, Lilia et Cédric, pour l'aide que vous m'avez apportée pour la comparaison des transcriptomes. En plus d'être méga forte en bio-stat/bio-info, Lilia est super forte en « comprendre les questions existentielles de Pauline sur R ». Je ne pense pas que ce soit très utile sur le CV, mais ça a été vraiment très, très utile pour ma thèse ! Merci Lilia (et puis merci d'être super cool et super gentille) !

Les copains du côté de l'IRMB, bon sang j'ai une mémoire déplorable mais je ne vous ai pas oubliés ! J'ai survécu à ma première année de thèse grâce à vous. Merci pour les fous rires entre deux syncopes au labo (mais arrêtez un peu de vous moquer de ma faible composition !!). Mention spéciale au noyau de copains qui a été aux premières loges pour toutes mes péripéties : Maxou (alias poupoule, alias papapoupoule désormais), Claire,

Valentin, Yassine, Joffrey et puis... mes douces, mes doucettes, mes sœurs (PAS dans l'ordre d'importance, vous battez pas) : Yas, Débo et Nagège (ben tiens, Nadège, je me suis toujours demandé pourquoi t'as pas de surnom, toi, hein ma douce ?). Mes douces, pour vous, c'est comme pour Christine, je ne sais pas quoi dire tellement il y a à dire. Juste MERCI ! Mais rendez vous compte à quel point vous êtes des jeunes femmes brillantes, gentilles, vives, (incroyablement jolies, mais ce n'est qu'un détail), votre regard sur le monde ne cesse de m'enrichir. Je n'avais pas d'autre choix : vous m'avez touchée au plus profond de mon cœur et vous n'en partirez pas et puis tenez, voilà, je vous aime moi ! Puis poupoule, Ah mon pouppouuuuule !!! (Tout le blabla sur tes qualités personnelles et ta gentillesse et ton twerk im-pé-ca-ble, que j'espère, tu enseigneras à ta descendance). Sans toi, qui aurait réussi sa thèse dans ce labo, même ? Tu es phénoménal ! Tu es indispensable ! Je ne sais pas comment j'ai pas encore cramé mon appart, en fait, sans toi. Et je suis sûre que Yasamine fait n'importe quoi sur son ordi et qu'elle n'ose pas te dire !

Pavla, Jen... ça aurait été tellement chouette de vous avoir tout près, mais votre soutien à distance a été plus que génial. Ne sortez jamais de ma vie s'il vous plait !!!!

Yoann ? Mais t'es encore là ??! Si la thèse ne te faisait pas partir j'ai pensé qu'une de mes crises pulmonaires me faisant chanter la douce chanson de la toux sans fin au creux de ton oreille trois semaines par an aurait eu raison de ton amour mais tu es là (oui, cette phrase est sans fin et sans répit comme une nuit bercée par la toux). Merci pour tout !

Ma Manoune. Je te dédie ce manuscrit, toi qui me demandais tout le temps si un jour j'allais enfin finir cette thèse sans fin et qui n'en finissait, finalement, tellement pas que je n'ai pas eu la chance de t'avoir à mes côtés jusqu'au bout. Je t'aime si fort ! Manoune, tu me manques chaque jour. Un jour je boirai un ti-punch à ta santé sans être triste, je te promets.

Il y a beaucoup trop de personnes que je n'ai pas citées. Mais j'en suis déjà à trois pages de remerciements, alors je vais m'arrêter là, parce-que l'une ou l'autre de mes trois directrices finira bien par se demander, puisque je suis si bavarde, pourquoi je ne rajoute pas une page ou deux à ma conclusion !

A nouveau, et pour finir, Isabelle. Aujourd'hui, le 08/02/2022, bien après cette belle soutenance que nous arroserons en pensant à toi ; je rajoute, émue, ces quelques lignes qui n'auraient jamais dû être écrites et que tu ne pourras malheureusement pas lire. Je te dédie également ma thèse, elle est aussi la tienne.

A ma grand-mère, ma maman et à Isabelle,

Table des matières

A. Liste des abréviations	10
B. Introduction	13
1. La tuberculose, challenge et enjeux actuels	13
2. Mycobacterium tuberculosis, histoire et description	16
3. L'enveloppe de Mtb, un facteur clef dans la relation hôte –pathogène	18
4. Le cycle de l'infection et la formation du granulome tuberculeux dans le poumon	19
5. L'interaction Mtb/macrophages	21
5.1 La persistance et la virulence	22
5.2 L'interférence avec la phagocytose et l'autophagie	26
5.3 Le contrôle de la mort cellulaire	31
5.4 Le contrôle de la polarisation des macrophages par Mtb 32	
5.4.1 Généralités sur les signaux de polarisation de type M1	33
5.4.2 Généralités sur les signaux de polarisation de type M2	35
5.4.3 Le rôle des macrophages de type M1	36
5.4.3.1 <i>Production de composés microbicides</i>	36
5.4.3.2 <i>Recrutement et activation des cellules immunitaires</i>	37
5.4.4 Le rôle des macrophages de type M2	37
5.4.5 Le métabolisme énergétique des macrophages	38
5.4.6 Les macrophages pulmonaires.....	42
5.4.6.1 <i>Origine</i>	42

5.4.6.2	<i>Fonctions des macrophages pulmonaires</i>	43
5.4.7	La polarisation des macrophages à l'intérieur des granulomes.	47
5.4.8	La polarisation de type M1 médiée par Mtb.....	49
5.4.9	Le shift de la polarisation vers le type M2 médiée par Mtb	50
5.4.10	Les macrophages spumeux	52
6.	Les microARN	55
6.1	Transcription des microARN	55
6.2	La maturation des miARN.....	57
6.3	La régulation exercée par les miARN.....	58
6.4	Le réseau de complémentarité seed / MRE.....	59
6.5	Utilisation des miARN à des fins thérapeutiques	60
6.6	Implication des miARN en tuberculose.....	61
6.6.1	Les miARN impliqués dans l'apoptose et l'autophagie	62
6.6.2	Les miARN impliqués dans la réponse anti-inflammatoire au cours de l'infection.....	64
7.	Objectif des travaux de recherche	68
C.	Résultats	70
1.	Article 1	70
1.1	Introduction	70
2.	Article 2	88
2.1	Introduction	88
3.	Article 3	119
3.1	Introduction	119

D. Conclusion et perspectives	146
1. Comparaison et évaluation de la réponse inflammatoire de modèles de tuberculose utilisés dans ces travaux.....	146
2. Identification des gènes de la réponse de l'hôte et des miARN liés à la virulence de Mtb.....	148
3. Etude du rôle de miR-132 dans la réponse inflammatoire des macrophages infectés par Mtb.....	149
E. Références bibliographiques	155

A. Liste des abréviations

Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ACOD1	Aconitate décarboxylase 1
AGO	Protéines de la famille Argonaute
Arg1	Arginase 1
ARN RBP	RNA Binding Protein
ARNm	ARN messenger
ATG4A	Autophagy Related 4A Cysteine Peptidase
Bach1	BTB and CNC homology 1
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BPal	Bédaquiline, prétomanid et linézolide
CLIP	Cross-link covalent suivit d'immunoprécipitation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPT	Carnitine transférase
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dommages
DC-SIGN	Récepteur de lectine de type C
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DIM	Dimycocérosates de phthiocérols
EEA1	Early endosome antigen 1
EGR	Early growth factor
ETH	Ethambutol
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Transfert d'énergie de résonance entre molécules fluorescentes
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
hMDM	Macrophage dérivé de monocyte primaire humain
CD11b⁺	Macrophage murin CD11 ⁺
hypoxia-MφTHP-1	THP-1 différenciées en macrophage en condition hypoxiques
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IFN	Interféron
INH	Isoniazide
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible

IL	Interleukine
IRAK	Kinase associée au récepteur de l'interleukine-1
IRF	Facteur de régulation interféron
KatG	Catalase-péroxydase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
KLF4	Kruppel-like factor 4
LM	Lipomannane
M1	Macrophage de type M1
M2	Macrophage de type M2
MAIT	Mucosal-associated invariant T
Man-LAM	Lipoarabinomannane mannosylé
MAP3K8	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8
MDR	Multi drug resistant
miARN	MicroARN
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complexe
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
MφTHP-1	Cellule de la lignée monocyttaire THP-1 différenciée en macrophage
NF-κB	Facteur de transcription nucléaire κB
Nlrp3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO	Monoxyde d'azote
NOX	NADPH oxydase
NOX2	NADH oxydase 2
OXPHOS	Phosphorylations oxydatives
PAMP	Motifs moléculaire associé aux pathogène
PGL	Phéno glycolipides
PIM	Phosphatidyl- <i>myo</i> -inositols mannosides
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMK2	Pyruvate kinase M2
Pol II	ARN Polymérase II
poly(A)	Queue de poly-Adénine
PPAR-γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
pre-miARN	Précurseur de miARN

PRR	Pattern recognition receptors
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
PZA	Pyrazinamide
RD1	Région différence 1
RIF	Rifampicine
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
scRNA-seq	Séquençage à l'échelle de la cellule unique
SHIP1	Src homology 2 containing inositol 5' phosphatase 1
SOCS	Protéine suppresseuse de la signalisation des cytokines
SODA	Superoxide dismutase
SR-A	Récepteur scavenger A
T7SS	Systèmes de sécrétion de type 7
TB	Tuberculose
TDM	Ddimycolates
TICAM-1	Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1
TLR	Récepteur Toll Like
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TNT	Tuberculosis Necrotizing Toxin
UVRAG	Protéine associée à la résistance aux rayons UV
XDR	Extensively drug résisant

B. Introduction

1. La tuberculose, challenge et enjeux actuels

En 2019, avant la pandémie de COVID-19, la tuberculose était la maladie infectieuse la plus mortelle. Elle est causée par un agent pathogène unique, le bacille de Koch ou *Mycobacterium Tuberculosis* (Mtb). Ce bacille est à l'origine de plus de 1,4 millions de décès chaque année (Diseases 2021). Il existe plusieurs formes de tuberculose : ganglionnaire, méningée, osseuse, miliaire mais la forme pulmonaire est la plus contagieuse et la plus répandue. Les symptômes les plus fréquents en sont la toux, la fièvre, la fatigue, l'amaigrissement et le manque d'appétit. Chez 30% des primo infectés, le système immunitaire, bien qu'incapable d'éradiquer Mtb, parvient à contenir l'infection. Ces individus ne présentent pas de symptômes et développent une tuberculose dite latente pouvant demeurer asymptomatique pendant leur vie entière (D. Young, Hussell, et Dougan 2002). Malheureusement, 15 à 33% de ces tuberculoses latentes évoluent en une forme active. Un des facteurs contribuant à cette transition est l'affaiblissement du système immunitaire (Bibbins-Domingo *et al.* 2016) comme, par exemple, dans le cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou suite à un traitement par chimiothérapie. D'autres éléments favorisant la survenue de la maladie sont la pauvreté, la sous-nutrition, le tabagisme, l'alcoolisme et la pollution de l'air. Selon les estimations actuelles, près de 23% de la population mondiale est infectée par Mtb, ce qui correspond à 1,7 milliards de personnes. Chaque année, 10 millions de personnes développent une tuberculose active parmi lesquels 88% d'adultes et 12% d'enfants. Les régions les plus touchées sont le Pacifique-ouest, l'Afrique et l'Asie du sud-est avec, respectivement, 18%, 25% et 44% de la population vivant avec la maladie (Diseases 2021) (Figure 1).

Le nombre de nouvelles infections est élevé car il n'existe pas de vaccin suffisamment efficace à ce jour. En effet, le vaccin bacille de Calmette et Guérin (BCG), composé d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, qui a été découvert il y a 100 ans par Albert Calmette (1863-1933) et Camille Guérin (1872-1961), n'offre qu'une immunité partielle contre la tuberculose. Il permet cependant d'éviter les formes sévères de la maladie chez l'enfant. Par exemple, il protège ces derniers à 80% contre le développement de la tuberculose miliaire et méningite (Puvacic *et al.* 2004) et à 50% contre la tuberculose pulmonaire (Mangtani *et al.* 2014). Au bout d'environ vingt ans, la protection induite par le vaccin diminue fortement et

on considère que les adultes ne sont plus protégés (Fatima *et al.* 2020). Pour améliorer la prévention de la maladie, d'autres vaccins sont en cours de développement. Notamment, les essais cliniques ont débutés pour le M72/AS01E, un vaccin constitué de l'antigène M72 contenu dans le liposome AS01E, est en cours d'essai clinique (Weerasuriya *et al.* 2020). M72 est une protéine issue de la fusion de Mtb32A (PepA) et Mtb39A (PPE10) deux antigènes hautement immunogènes de Mtb (Ji *et al.* 2019). Le M72/AS01E se montre très prometteur pour protéger les adultes contre 50% des tuberculoses pulmonaires et contre la réactivation des tuberculoses latentes (Ji *et al.* 2019).

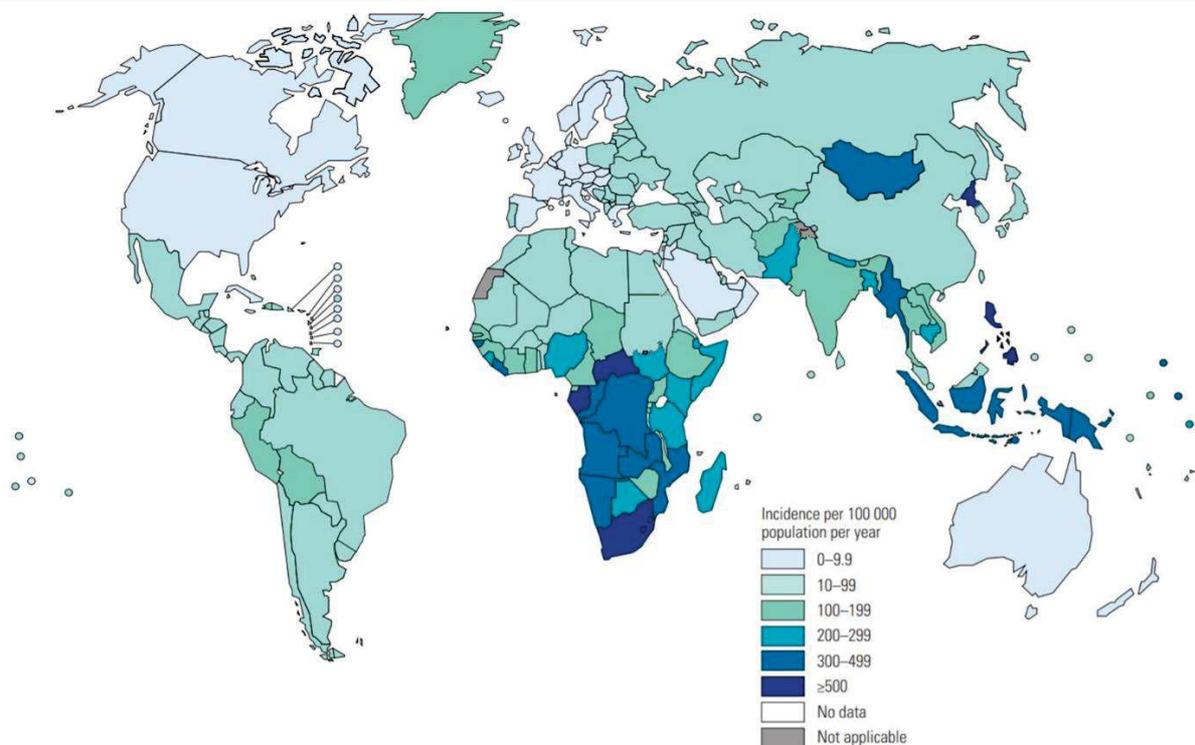


Figure 1. Incidence de la tuberculose dans le monde en 2019 (WHO 2020)

Par ailleurs, la lutte contre la tuberculose est particulièrement difficile car, au-delà de la prévention de la maladie, le diagnostic et la prise en charge des malades sont difficiles, en particulier dans les pays les plus pauvres. Chaque année, 2,9 millions, soit 29% de primo-infectés seraient incorrectement diagnostiqués, et donc contagieux car non traités. A ces erreurs de diagnostics s'ajoutent les écarts de diagnostic dus à des tuberculoses résistantes aux antibiotiques. En effet, la détection des résistances n'est pas systématique et n'est réalisée qu'au court de 34% des diagnostics. Aussi, parmi les 500 000 cas estimés de résistances, moins de 210 000 ont été reportés entre 2018 et 2019 (Diseases 2021). Le nombre

de tuberculoses résistantes aux antibiotiques est en augmentation permanente (+10% de 2018 à 2020) et l'apparition de mutations résistantes constitue un réel frein à l'éradication de la maladie (Diseases 2021).

Le traitement standard de la tuberculose combine quatre antibiotiques (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol) administrés pendant deux mois, puis deux antibiotiques (rifampicine, isoniazide) pendant les quatre mois suivants (Ying Zhang 2005). L'échec thérapeutique est souvent associé à des raisons géopolitiques, financières, à un manque de pédagogie et d'éducation ou simplement, à l'extrême rareté et l'éloignement des dispensaires (Diseases 2021; Oga-Omenka *et al.* 2020). Certains patients cessent leur traitement dès la disparition des symptômes, ce qui ne coïncide pas toujours avec l'éradication des bactéries (Diseases 2021). A ce jour, du fait de la complexité et de la durée du traitement, beaucoup de patients ne sont pas en mesure de suivre leur traitement correctement et l'émergence de souches résistantes est directement liée au non-respect des prescriptions médicales (Diseases 2021). Les souches de Mtb résistantes sont classées en deux catégories. Les MDR (multi drug resistant), résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine et les souches XDR (extensively drug resistant), résistantes à l'isoniazide, à la rifampicine, aux fluoroquinolones et à un des composés injectables (*i.e.* amikacine, capromycine ou kanamycine). Le régime BPaL, une combinaison de bédaquiline, prêtomanid et linézolide, s'est récemment avéré efficace pour soigner en six mois les tuberculose MDR et XDR (Conradie *et al.* 2020). Toutefois les nombreux effets secondaires (*e.g.* les neuropathies périphériques et la dépression médullaire, principalement) constituent toujours un frein à l'assiduité des patients, d'autant plus que le traitement est long (Conradie *et al.* 2020; Yang *et al.* 2017). Un modèle mathématique, établi à partir de données de patients d'Asie du Sud-Est, estime que de limiter le traitement à deux mois permettrait de réduire les contaminations de 20% et la mortalité de 25% (Salomon *et al.* 2006).

Malheureusement il est aussi difficile de réduire la durée du traitement car Mtb possède un arsenal de facteurs de virulence et de stratégies de détournement de la réponse immunitaire qui ont pérennisé sa relation avec l'Homme malgré l'émergence des traitements antibiotiques. Cette relation entre l'Homme et Mtb est très ancienne : de l'ADN de Mtb a été retrouvé dans des momies péruviennes et hongroises datant d'au moins 6000 ans (Gordon et Parish, 2018). La complexité de la réponse immunitaire induite par Mtb, ses différentes

localisation possible dans l'organisme, le fait qu'elle puisse agir comme pathogène intra- ou extracellulaire, pouvant, de surcroît, être séquestré à l'intérieur d'un granulome tuberculeux, et les différents états métaboliques qu'elle peut adopter, dont celui de tolérance phénotypique (T. E. Hartman *et al.* 2017), sont autant de facteurs qui font de la tuberculose une maladie particulièrement difficile à éradiquer.

La stratégie "End TB" de l'OMS a pour objectif de mettre fin à la pandémie en 2035. Malheureusement, les progrès se font trop lentement et la réduction de 20% de l'incidence qui était visée entre 2015 et 2020 n'a atteint que 9% (Diseases 2021). Pour atteindre l'objectif de 2035, il est primordial d'améliorer le diagnostic et le traitement antituberculeux. L'émergence de résistances parmi les souches de Mtb en circulation et les effets secondaires entraînés par les traitements actuels, ont fait naître un intérêt particulier pour de nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire de l'hôte. Il apparaît donc de première importance de mieux caractériser cette réponse immunitaire complexe, ainsi que les facteurs qui permettent à Mtb de la déjouer aussi efficacement.

2. *Mycobacterium tuberculosis*, histoire et description

Le 24 mars 1882, Robert de Koch identifie le bacille de Koch, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), comme étant l'agent causal de la tuberculose. L'anniversaire de cette date est actuellement célébré par le « Tuberculosis World Day ». Mtb est une bactérie à croissance lente. En milieu complet et dans des conditions optimales de croissance (à 37°C en condition aérobie), son temps de génération est de 24h (contre 30 min en moyenne pour *Escherichia coli*) et il faut environs trois semaines de culture sur géloses pour observer des colonies. Elle appartient à la classe des *Actinobacteria*, l'ordre des *Actinomycetales*, la famille des *Mycobacteriaceae* et au genre *Mycobacterium*. Parmi la famille des *Mycobacterium*, on identifie, le *Mycobacterium tuberculosis* complexe (MTBC), un petit groupe de pathogènes capables d'infecter des espèces de mammifères différentes et classés en huit lignées selon leur distance phylogénétiques (Figure 2). Mtb (lignées 1 à 4 et 7) et *Mycobacterium Africanum* (lignée 5 et 6) et la lignée ancestrale L8, découverte récemment dans la région des grands lacs africains, causent la tuberculose chez l'Homme. Les autres espèces du MTBC appartiennent à la lignée 8 et causent des tuberculoses animales : *Mycobacterium microti* (infectant le campagnol), *Mycobacterium pinnipedii* (infectant le phoque), *Mycobacterium orygis*

(infectant la gazelle), *Mycobacterium mungii* (infectant la mangouste), *Mycobacterium caprae* (infectant les caprins) et *Mycobacterium bovis* (infectant les bovins) (Comas *et al.* 2013). Très proche de ce complexe, *Mycobacterium marinum* est une espèce capable de provoquer la tuberculose chez les ectodermes (Shiloh et DiGiuseppe Champion 2010) (Figure 2). La comparaison des génomes des espèces appartenant au MTBC a montré qu'elles partagent plus de 99,9% d'identité et dérivent très certainement toutes de Mtb (Comas *et al.* 2013). Le génome de Mtb contient 4.4 Mb avec une forte proportion de guanines et de cytosines (65.9%). Il code pour 4018 gènes dont 9% sont dédiés au métabolisme des lipides, soulignant leur importance pour Mtb (Sasseti, Boyd, et Rubin 2003).

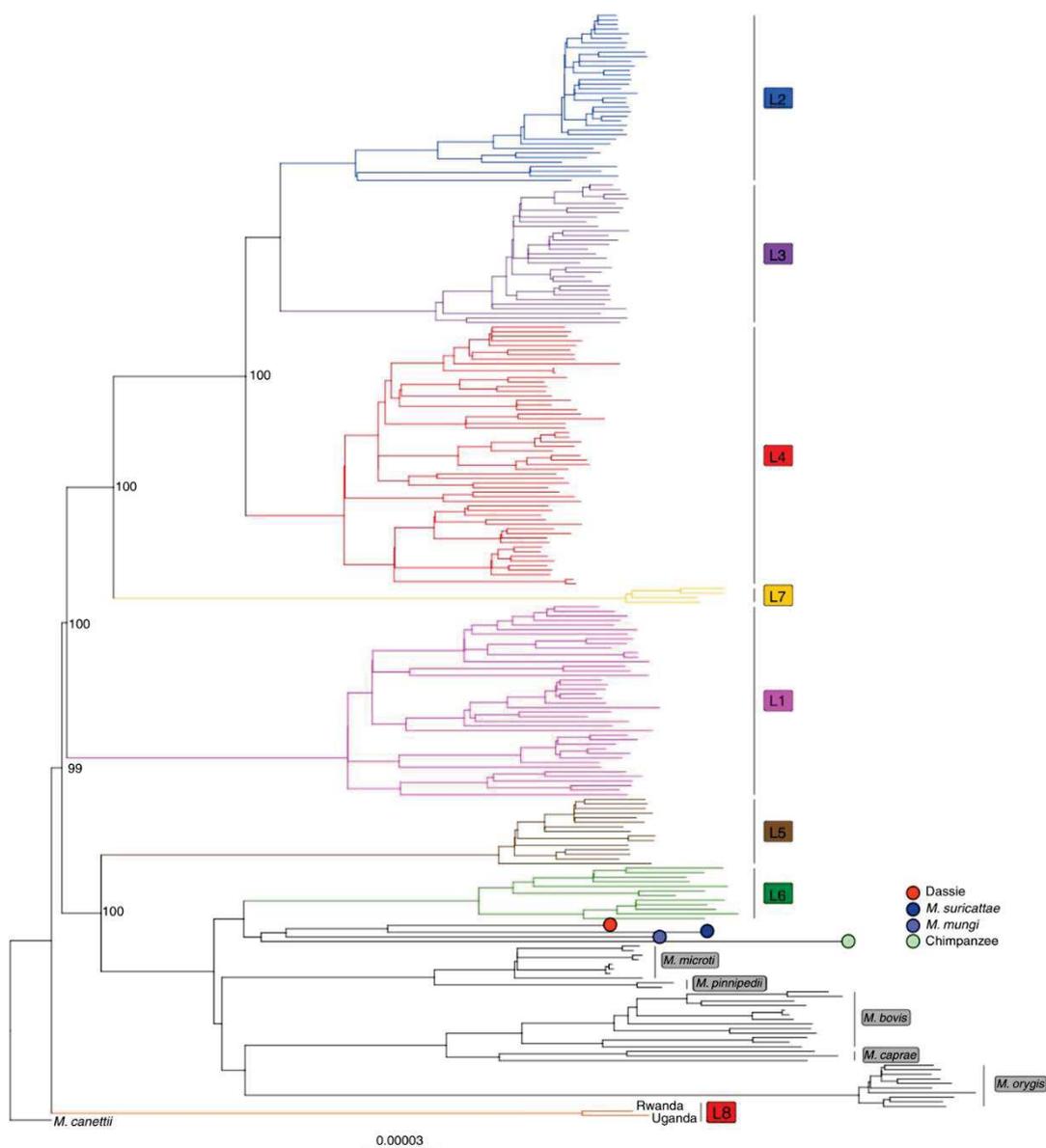


Figure 2 Analyse phylogénétique de 241 génomes de souches appartenant au MTBC inférées pour 43 442 positions. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site polymorphique. Les branches correspondant aux souches

adaptées à l'homme sont colorées et les branches correspondant aux souches causant des tuberculoses animales sont représentées en noir. L'arbre phylogénétique est enraciné avec la souche *Mycobacterium canettii* et les valeurs de bootstrap sont indiquées pour les embranchements les plus importants. D'après et traduit de Ngabonziza et al. (2020).

3. L'enveloppe de Mtb, un facteur clef dans la relation hôte – pathogène

Les lipides jouent un rôle central pour la synthèse de l'enveloppe de Mtb dont ils constituent 40% à 60% du poids alors que dans le reste du règne bactérien, cette proportion atteint en moyenne 5% à 10% (Daffé 2015). Bien que Mtb soit classée parmi les bactéries Gram-positives, son enveloppe a une structure qui se conforme avec celle des Gram-négatives de par la présence d'une membrane externe séparée de la membrane plasmique interne par un espace périplasmique. La particularité des enveloppes des mycobactéries est que la membrane externe est formée par un complexe de trois molécules liées de façon covalente : le peptidoglycane, l'arabinoglycane et des acides gras spécifiques à longue chaîne, appelés acides mycoliques (Figure 3). Ce complexe, nommé le mycolyl-Arabinogalactane-Peptidoglycane, permet la fixation d'autres lipides dits extractibles car ils ne sont pas fixés par des liaisons covalentes. Parmi les lipides extractibles, les phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIM), les lipomannanes (LM), les lipoarabinomannanes mannosylés (Man-LAM), les dimycocérosates de phthiocérols (DIM), les phénolglycolipides (PGL) et les dimycolates de tréhalose (TDM) sont des facteurs de virulence qui seront présentés dans un autre chapitre. Enfin, la membrane externe est recouverte d'une capsule composée de polysaccharides (glucane, D-arabino-D-mannane), de lipides (PGL, DIM) et de protéines dont les mycoloytransférases Ag85ABC (Daffé 2015).

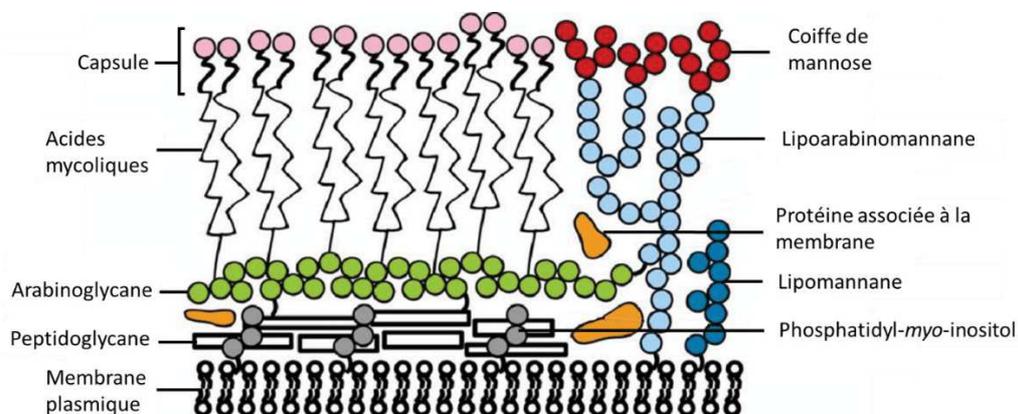


Figure 3. Structure de l'enveloppe de Mtb. L'enveloppe de Mtb est composée d'une membrane externe et d'une capsule. La membrane externe est composée d'un complexe trois molécules liées de façon covalente: le peptidoglycane,

l'arabinoglycane et des acides gras spécifiques à longue chaîne, appelés acides mycoliques. Ce complexe permet la fixation, d'acides gras dits extractibles, car ils ne sont pas liés de façon covalente, comme les lipomannanes, les lipoarabinomannanes mannosylés (comportant une coiffe de mannose) et les phosphatidyl-*myo*-inositol. Adapté de (Welin 2021).

L'épaisse enveloppe de *Mtb* lui confère une imperméabilité qui la dote d'une certaine protection physique contre les antibiotiques et les défenses de l'hôte (Marrakchi, Lanéelle, et Daffé 2014).

4. Le cycle de l'infection et la formation du granulome tuberculeux dans les poumons

Mtb est une mycobactérie très contagieuse car elle est aéroportée et qu'un nombre très faible de bactéries (même une seule) suffit à causer une infection (Kaufmann 2001). Les premières étapes de l'infection suivent un schéma relativement similaire chez chaque individu : une fois inhalées, les bactéries sont phagocytées par des macrophages alvéolaires qui constituent la première barrière de défense de l'immunité innée contre l'infection. Au cours des premières étapes de l'infection, ces macrophages migrent vers l'épithélium pulmonaire et déclenchent une réaction inflammatoire qui conduit à la sécrétion de cytokines et de chimiokines responsables du recrutement d'autres cellules immunitaires. Dans un premier temps, ce recrutement attire des monocytes circulants qui se différencient en macrophages, des polynucléaires neutrophiles, des cellules dendritiques et des Natural Killer. Cette accumulation de cellules de l'immunité innée constitue les premières fondations du granulome. Plus tard, les cellules dendritiques migrent à travers le système lymphatique pour présenter les antigènes de *Mtb* aux lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires (Davis *et al.* 2002; O'Garra *et al.* 2013; Orme et Basaraba 2014). Chez l'homme, la présence de lymphocytes n'est détectable qu'après quatre à six semaines d'infection, ce qui est relativement long par rapport à la réponse engendrée par d'autres pathogènes (Wolf *et al.* 2008). Ce recrutement tardif place les lymphocytes à la périphérie du granulome (Davis *et al.* 2002) qui s'organise en couches concentriques avec au centre une majorité de macrophages (Ehlers et Schaible, 2013). Avec le temps, une fibrose se forme au pourtour du granulome, l'isolant complètement des tissus sains (Ulrichs *et al.* 2004). Puis, dans certains granulomes, les macrophages se nécrosent et forment, au centre du granulome, un magma acellulaire riche

en lipides : le caséum (figure 4). Les granulomes caséux n'existent dans aucune autre pathologie et sont donc spécifiques de la tuberculose. Il arrive, même après plusieurs années, que ces granulomes nécrotiques se rompent et se liquéfient dans les voies aériennes, libérant le bacille qui, via la toux, pourra se disséminer pour contaminer d'autres hôtes. Plus tard, les granulomes caséux se calcifient et forment finalement les tubercules, des lésions permanentes caractéristiques de la tuberculose, détectables par radiographie aux rayons X. Au cours de la maladie, l'hôte peut développer plusieurs granulomes qui peuvent être à des stades différents. Certains granulomes non caséux peuvent se résorber complètement. D'autres peuvent s'enkyster et contenir des mycobactéries pendant plusieurs années avant de reprendre leur évolution (Russell, Barry, et Flynn 2010).

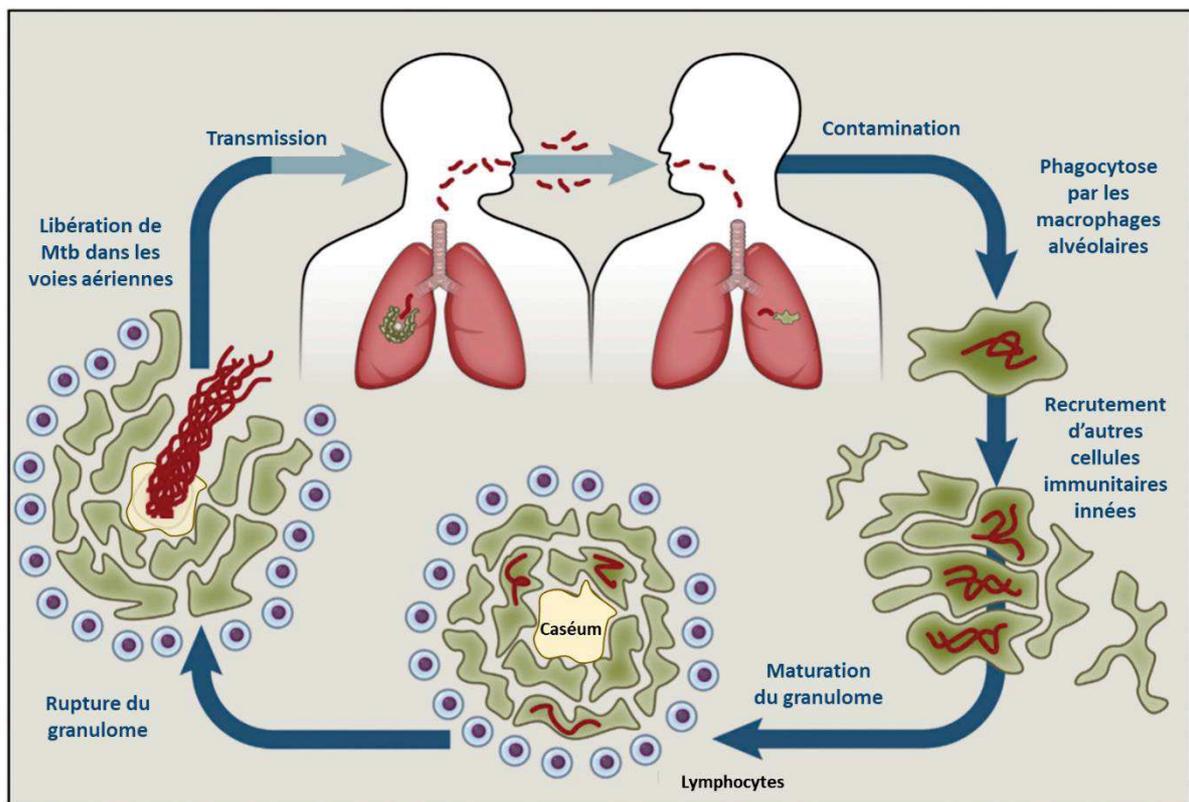


Figure 4 Cycle de l'infection et de maturation du granulome. La transmission de la tuberculose se fait par inhalation d'aérosols contaminés, générés par la toux d'un individu infecté. Une fois dans les poumons, Mtb est phagocytée par les macrophages alvéolaires. Suite à la phagocytose, les macrophages alvéolaires déclenchent une réponse inflammatoire responsable du recrutement et de l'activation d'autres cellules immunitaires. En premier lieu, des cellules immunitaires innées se rendent sur le site de l'infection. Elles sont rejointes, plus tard, par des lymphocytes, lorsque l'immunité adaptative est mise en place. Cette agglomération de cellules immunitaire en couches concentriques forme le granulome. Au cours du temps, l'accumulation de débris cellulaires provenant de la nécrose des macrophages forme un caséum au centre du granulome. Lorsque la réponse immunitaire est surpassée, le granulome se rompt et libère son contenu dans les voies aériennes, ce qui provoque la toux de l'individu infecté. Cette toux génère des aérosols, dans lesquels des bacilles sont alors capables d'infecter un nouvel individu. Adapté de Cambier, Falkow, et Ramakrishnan (2014).

Beaucoup de questions restent en suspens sur les étapes précises de la formation du granulome et leur temporalité (Orme et Basaraba 2014). Notamment, les raisons menant à la

nécrose des macrophages et permettant de former le caséum ne sont pas bien comprises, bien que la découverte d'une toxine, la Tuberculosis Necrotizing Toxin (TNT) produite par Mtb pourrait en être la cause (Danilchanka *et al.* 2014) et que plus récemment, la caractérisation de la ferrocytose dans les macrophages infectés apporte des éléments de réponses supplémentaires (Amaral *et al.* 2019; Meunier et Neyrolles 2019). Le rôle du granulome est également très discuté. Tour à tour défini comme un élément essentiel du contrôle de l'infection (Cosma, Sherman, et Ramakrishnan 2003; JoAnne L Flynn et Chan 2003) ou comme le résultat de l'échec d'une réponse immunitaire qui confère une protection à Mtb. Étonnamment, chez le poisson zèbre la formation du granulome a un effet bénéfique sur la multiplication de Mtb (Volkman *et al.*, 2004). Cet effet serait dû au recrutement de macrophages, potentiels nouveaux réservoirs pour la bactérie, sur le site de l'infection via la protéine effectrice ESAT-6 de Mtb (Volkman *et al.* 2004; 2010). Ces résultats suggèrent que Mtb initie la formation du granulome à son avantage (Ramakrishnan 2012). Chez le macaque, l'absence de granulome est synonyme d'une réponse immunitaire efficace et d'un contrôle pérenne de la maladie sous forme latente. En revanche, la formation précoce de granulomes est observée chez les macaques dont le système immunitaire ne parvient pas à contenir Mtb et qui développent une maladie active (Capuano *et al.* 2003; Coleman *et al.* 2014; Martin *et al.* 2017). Ces observations soulignent le rôle de la réponse immunitaire précoce, avant même la formation du granulome, et notamment le rôle clé des macrophages. En effet, les macrophages sont non seulement les principales cellules hôtes de Mtb (J. L. Flynn, Chan, et Lin 2011), mais ce sont également celles qui initient la réponse immunitaire et la formation du granulome en cas d'échec de l'élimination immédiate de l'infection.

5. L'interaction Mtb/macrophages

Les macrophages représentent une population hétérogène de phagocytes professionnels qui participent à la fois à l'élimination des pathogènes, à celui des débris cellulaires mais aussi aux processus de réparation tissulaire et de cicatrisation. Pour effectuer ces fonctions, ils sont de nature extrêmement plastique et répondent très rapidement à des signaux d'activation pouvant conduire à un large spectre de fonctions différentes. Par convention, les deux extrêmes de ce spectre d'activation ont d'abord été définis comme étant les macrophages de type M1, pro-inflammatoires, bactéricides et activés par la voie classique, ou les macrophages de type M2, anti-inflammatoires, permissifs à l'infection et activés par la voie alterne. Cette

nomenclature a été établie en regard du phénotype obtenu en exposant les macrophages *in vitro* aux cytokines produites par deux sous-populations de lymphocytes helper, qualifiés de Th1 ou Th2, suivant qu'ils sécrètent respectivement de l'interféron gamma (IFN- γ) ou de l'Interleukine-4 (IL4), (Orecchioni *et al.* 2019). Grâce à l'avancée des techniques de séquençage, il est établi que la dualité M1 / M2 ne s'applique pas aux phénotypes des macrophages *in vivo* et notamment à celui des macrophages pulmonaires, lesquels, soumis à des signaux beaucoup plus complexes, sont constitués d'au moins huit clusters différents au cours de l'infection par Mtb (Pisu *et al.* 2021). Cependant, comme la plupart des études ciblées sur la polarisation des macrophages ont été réalisées *in vitro* et que des études majeures décryptant le rôle des macrophages au cours de l'infection avec Mtb ont été réalisées au moment où le dogme M1 / M2 était encore très utilisé, la nomenclature M1 / M2 a été conservée dans ce manuscrit.

La première étape de l'infection débute par l'internalisation de Mtb dans les macrophages alvéolaires suite à la phagocytose. Une réponse rapide des macrophages est essentielle pour contenir et limiter la dissémination de Mtb. Sans cette réponse, les bactéries se répliqueraient librement avec une issue fatale pour l'hôte bien avant que l'immunité adaptative ne soit mise en place (Mills 2012). Les macrophages participent également à l'immunité adaptative en induisant le recrutement des lymphocytes et en leur présentant les antigènes de Mtb (C. Zhang, Yang, et Ericsson 2021). Le succès de Mtb en tant que pathogène dépend donc de sa capacité à établir une infection chronique et donc à survivre à l'intérieur des macrophages en luttant contre les stress intracellulaires. Au cours de sa coévolution avec l'Homme depuis des milliers d'années (Perrin 2015), un dialogue complexe s'est instauré entre Mtb et son hôte. Mtb a acquis la capacité de détourner à son avantage la défense des macrophages alvéolaires, puis celle des macrophages recrutés sur le site de l'infection. Les mécanismes qu'elle a mis en place pour contourner la réponse immunitaire lui permettent de mieux tolérer les traitements antibiotiques, de contrer les défenses des macrophages et d'induire chez eux une réponse qui facilite sa survie (Behar, Divangahi, et Remold 2010; Lerner, Borel, et Gutierrez 2015).

5.1 La persistance et la virulence

Le traitement des individus atteints de tuberculose s'étale sur six mois et comprend une combinaison de quatre antibiotiques (Ying Zhang 2005). L'assiduité des patients au traitement

est ainsi compromise par la durée du traitement, ce qui entraîne l'émergence de souches multirésistantes et ultrarésistantes (Ying Zhang, Yew, et Barer 2012). Pourtant, la grande majorité des bactéries est éliminée au cours des 14 jours suivant le début de la prise d'antibiotiques. C'est donc l'éradication d'une petite sous-population bactérienne qui requiert le prolongement du traitement (Fauvart, De Groote, et Michiels 2011) (figure 5). En 1958, McDermott fit l'hypothèse que cette sous population était composée de bactéries persistantes qui, selon ses termes, « feraient les mortes » et seraient dans un état métabolique réversible, permettant une tolérance temporaire et non héréditaire aux antibiotiques. Cette hypothèse a été depuis vérifiée chez la souris (McCune *et al.* 1966) et l'Homme (Mitchison, 1979 ; Wallis *et al.*, 1999). Ce concept est également appuyé par des données transcriptomiques qui révèlent une répression des gènes du métabolisme basal chez les bactéries persistantes (Lewis 2010). La persistance est permise grâce au ralentissement du métabolisme des bactéries allant jusqu'à l'arrêt total de la réplication, ce qui pose problème puisque certains des antituberculeux couramment utilisés (*e.g.* ethambutol, isoniazide) ne ciblent que les bactéries répliquatives (Hervé *et al.* 2015).

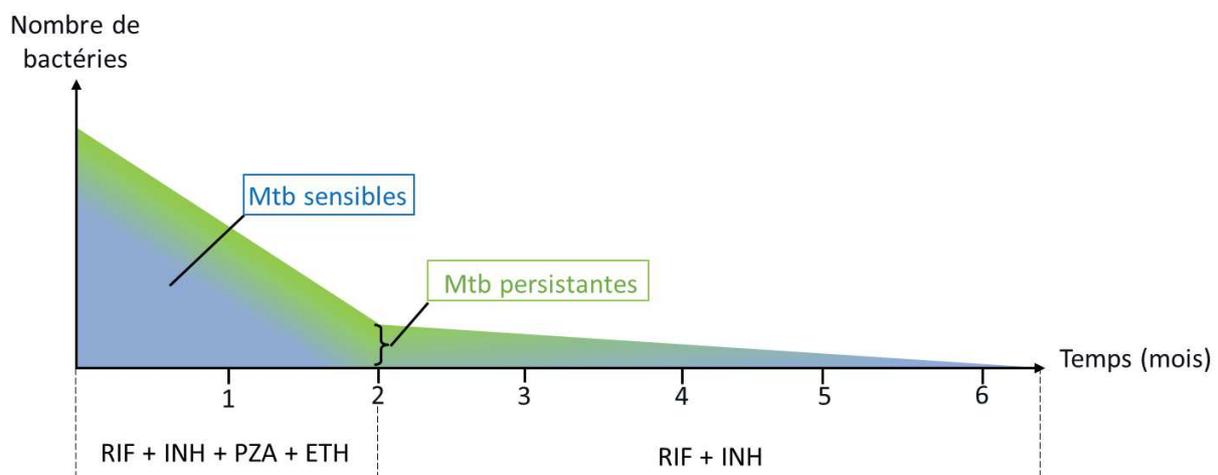


Figure 5. Evolution de la charge bactérienne chez les malades au cours du traitement. Durant les deux premiers mois de traitement, la combinaison de rifampicine (RIF), pyrazinamide (PZA), isoniazide (INH) et éthambutol (ETH), est généralement prescrite aux patients. Cette phase de traitement intensive permet d'éradiquer la majorité des bactéries sensibles à ces composés (Zha et Nahid, 2019). Ensuite, pour venir à bout d'une sous population de bactéries persistantes, le traitement se prolonge durant quatre mois avec une combinaison de RIF et INH. Cette phase du traitement dite de continuation est nécessaire à l'élimination des bactéries persistantes qui reprennent peu à peu un état métabolique plus actif (Zha et Nahid, 2019).

Durant l'infection, il est admis qu'à la fois des bactéries répliquatives et non répliquatives coexistent (Dannenberg 2003; Dheda *et al.* 2005; Karakousis *et al.* 2004). Les facteurs

permettant d'induire la persistance demeurent largement méconnus, ce qui freine la découverte de traitements permettant de cibler les bactéries persistantes ou d'empêcher l'induction de cet état. L'arrêt de la croissance bactérienne est l'un des mécanismes d'induction de la persistance les mieux caractérisés. Certains auteurs parlent de dormance, sous-entendant que Mtb cesse toute activité métabolique, mais ce concept est encore débattu et on sait aujourd'hui que toutes les bactéries persistantes ne sont pas dormantes. Ceci est par exemple illustré par la tolérance à l'isoniazide, dont l'activité toxique est activée par la catalase KatG, une catalase-péroxydase de Mtb. L'expression de KatG est hétérogène dans la population de Mtb. Des bactéries conservant leur état répliatif mais exprimant faiblement KatG sont alors en mesure de tolérer l'isoniazide (Balaban *et al.*, 2013 ; Wakamoto *et al.*, 2013). De plus, des bactéries persistantes peuvent être générées par exposition à la streptomycine ou à la rifampicine (Saito *et al.* 2017; Zhu *et al.* 2018) dont les mécanismes d'action ciblent pourtant les bactéries non répliatives (Lewis, 2010).

L'état de persistance semble encouragé par les conditions environnementales complexes auxquelles sont soumises les bactéries *in vivo*. Il est intéressant de noter que la persistance de Mtb est en grande partie induite par le système immunitaire de l'hôte, notamment à l'intérieur des macrophages (Adams *et al.* 2011). En effet dans ces macrophages infectés, ou bien dans les granulomes, Mtb est confrontée à : i) un environnement hypoxique, ii) un pH acide, iii) une faible accessibilité aux nutriments, iv) des lipides comme source de carbone, v) la présence de monoxyde d'azote (NO) (Höner zu Bentrup et Russell, 2001 ; Wayne et Hayes, 1996 ; Wayne et Sohaskey, 2001). L'utilisation de ces différents facteurs de stress *in vitro*, génère des bactéries s'apparentant à un état de persistance dont la population cesse de croître (Betts *et al.*, 2002a ; Rustad *et al.*, 2008 ; Voskuil *et al.*, 2003, 2004). De ce fait, de nombreux auteurs utilisent également le concept de la persistance pour décrire l'aptitude de Mtb à survivre à la réponse immunitaire. La persistance est intimement liée à la virulence de Mtb, un concept plus large qui englobe également celui de sa pathogénicité (Coscolla et Gagneux, 2014).

La virulence peut être définie comme l'aptitude de Mtb à survivre au stress généré par la réponse immunitaire de son hôte, sa capacité à induire des symptômes sévères et sa contagiosité (Coscolla et Gagneux, 2014). Dans le règne des bactéries, les principaux facteurs de virulence sont les toxines qui ont un effet pathogène direct sur l'hôte (Henkel, Baldwin, et

Barbieri 2010). A ce jour, une seule toxine produite par Mtb, la TNT, a été identifiée. La TNT serait en partie responsable de l'entrée en nécrose des macrophages (Danilchanka *et al.*, 2014). Ainsi, la virulence de Mtb ne repose pas principalement sur la production de toxines et semble être majoritairement liée à sa capacité à survivre et à moduler la réponse immunitaire de l'hôte et plus particulièrement, celle de sa cellule hôte principale, le macrophage. Cependant, l'efficacité de la réponse immunitaire varie en fonction des individus. Des facteurs génétiques contribuant à la susceptibilité ou la résistance à la tuberculose ont pu être identifiés. Parmi ces facteurs figurent des variants pour les gènes codants pour les récepteurs Toll like (TLR), intervenant dans la reconnaissance de Mtb et pour le facteur de transcription FOXP1 (forkhead box protein P1) nécessaire à la différenciation des monocytes en macrophages (van Tong *et al.* 2017). De plus, des gènes bactériens capables de contrecarrer certains mécanismes de défense des cellules immunitaires sont directement responsables de la virulence de Mtb et seront décrits dans les chapitres ci-dessous (Coscolla et Gagneux, 2014). Les gènes de virulence de Mtb sont des gènes qui ne sont pas présents chez les mycobactéries non virulentes et leur délétion entraîne une perte de virulence chez Mtb. Hormis le gène codant pour la TNT (Danilchanka *et al.* 2014; Tak *et al.* 2019), les gènes de virulence identifiés chez Mtb sont impliqués dans l'interaction avec l'hôte et codent principalement pour les lipides de l'enveloppe et des systèmes de sécrétion ainsi que les protéines effectrices.

Les lipides de l'enveloppe sont localisés à un endroit clé pour interagir avec l'hôte et nombre d'entre eux sont des acteurs primordiaux de la virulence de Mtb. Leurs effets sont parfois redondants, notamment ceux des TDM, des Man-LAM et des DIM pour le blocage de la maturation du phagosome.

Pour introduire ses protéines effectrices dans les macrophages, Mtb utilise une stratégie partagée avec d'autres bactéries intracellulaires, les systèmes de sécrétion qui forment des canaux permettant le transfert des molécules dans les membranes ou le cytosol des cellules infectées (T. R. D. Costa *et al.* 2015). Le génome de Mtb contient les gènes nécessaires à l'expression des systèmes de sécrétion généraux : le système TAT, utilisé par de nombreuses bactéries, et le système Sec, ubiquitaire. Mtb possède également cinq systèmes de sécrétion de type 7 (T7SS) nommés ESX-1 à 5 qui sont spécifiques aux mycobactéries. Le système le mieux décrit est le système ESX-1 qui permet la sécrétion de la protéine effectrice ESAT-6 (EsxA) (Figure 6) dont le rôle dans la virulence de Mtb est très documenté. Le système ESX-3

et 5 permettent la sécrétion d'analogues de ESAT-6 et des travaux ont aussi montré leur implication dans la virulence. Les systèmes ESX-2 et 4 sont beaucoup moins bien caractérisés (pour revue (Majlessi *et al.* 2015; Refai, Barbouche, et Essafi 2018; V. Singh *et al.* 2015; Gröschel *et al.* 2016)).

Dans la section ci-dessous seront détaillés les mécanismes par lesquels les facteurs de virulence interfèrent avec la défense des macrophages et permettent la persistance de la bactérie.

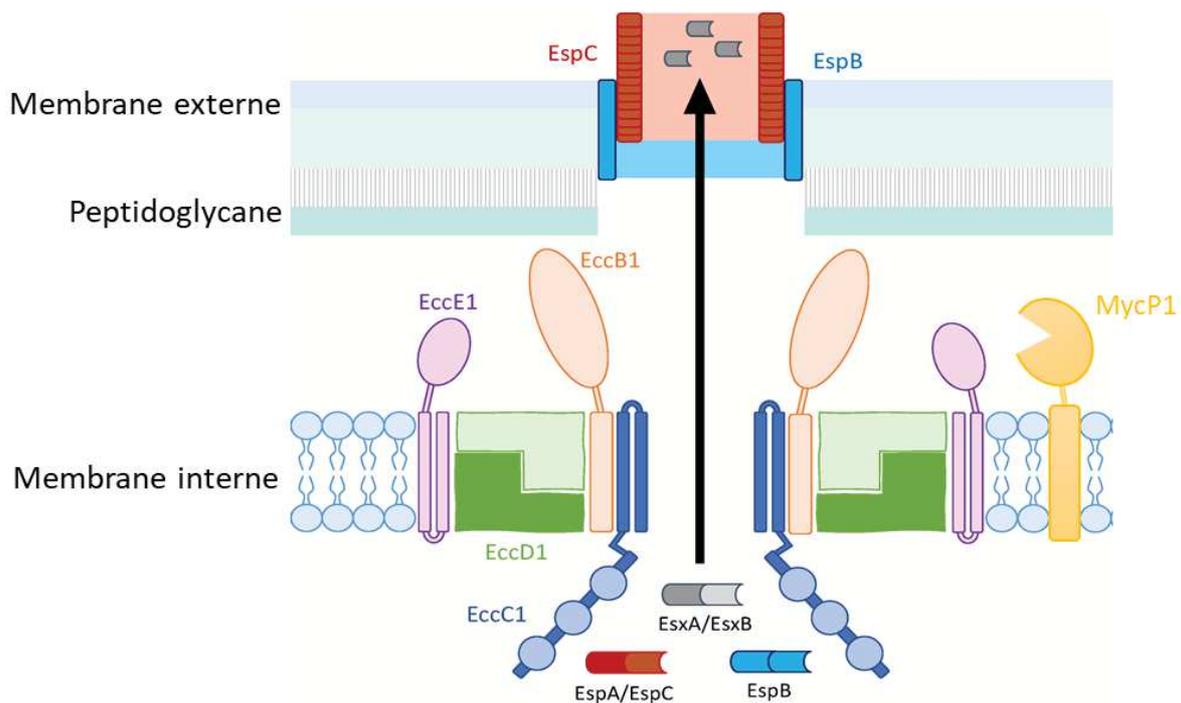


Figure 6 Structure du système de sécrétion de type 7 (SST7) ESX-1 de Mtb. Le système ESX-1 composé d'un complexe transmembranaire composé des protéines EccB, EccC, EccD et MycP1 insérées dans la membrane plasmique et permettant la sécrétion des protéines effectrices, notamment ESAT-6 (EsxA), CFP-10 (EsxB), Esp (ESX-1 secretion-associated protein) A, EspB et EspC. Il est très probable que la polymérisation des protéines EspB et EspC forment un canal permettant la sécrétion des substrats de ESX-1 à travers la membrane externe et vers le cytosol des macrophages. Adapté de [Ly et Liu \(2020\)](#).

5.2 L'interférence avec la phagocytose et l'autophagie

La phagocytose permet l'internalisation de pathogènes par les macrophages grâce à la formation de pseudopodes ou par une invagination de la membrane plasmique suite à une réorganisation du cytosquelette d'actine (Hirayama, Iida, et Nakase 2017). La phagocytose est induite soit directement par la reconnaissance directe des pathogènes par les « pattern recognition receptors » (PRR) (e.g. la lectine de type C transmembranaire Dectine-1 (alias

CLEC7A), le récepteur scavenger A (SR-A), le récepteur scavenger MARCO et le récepteur du mannose CD206 (alias MRC1) (Hirayama, Iida, et Nakase 2017), soit indirectement via un mécanisme dépendant de l'opsonisation (Van Lookeren Campagne, Wiesmann, et Brown 2007). La phagocytose indirecte est médiée par les opsonines, de petites molécules solubles capables de faciliter l'interaction entre les pathogènes et les corps étrangers. Elles possèdent une partie variable capable de se fixer aux pathogènes et une région constante reconnue par des récepteurs sur les phagocytes. Les plus connues sont les immunoglobulines dont la région constante Fc γ est reconnue par les récepteurs Fc γ R à la surface de macrophages, et les fragments du complément qui sont notamment reconnus par le récepteur au complément de type 3 (CR3) (Van Lookeren Campagne, Wiesmann, et Brown 2007).

Dans le cas d'une infection, une fois les récepteurs engagés par la reconnaissance des PAMP, la phagocytose est initiée par la formation du phagosome, une vésicule issue de protrusions de la membrane plasmique permettant d'absorber les pathogènes. Afin que la phagocytose puisse efficacement mener à la digestion des pathogènes, le phagosome subit une maturation qui nécessite la fusion avec des endosomes (Figure 7). Tout d'abord le phagosome précoce fusionne avec des endosomes précoces par le biais de la protéine EEA1 (early endosome antigen 1) qui est recrutée par la GTPase Rab5. La maturation du phagosome se poursuit par le remplacement de Rab 5 par Rab 7, ce qui permet la fusion avec les endosomes tardifs. A ce stade, des pompes à protons de type V, les V-ATPases, sont recrutées dans les membranes des phagosomes tardifs et permettent d'acidifier le milieu intra vésiculaire. La maturation s'achève par une fusion avec des lysosomes. Les lysosomes sont des granules contenant de nombreuses enzymes hydrolytiques dont l'activité conduit à une forte augmentation de la concentration de composés microbicides à l'intérieur du phagosome mature, à ce stade qualifié de phagolysosome. Un complexe transmembranaire, la NADH oxydase 2 (NOX2) est recruté dans les phagolysosomes et permet la synthèse de composés microbicides. Les étapes de la résolution des phagolysosomes, une fois les pathogènes digérés sont à ce jour encore peu caractérisées (Uribe-Querol et Rosales 2020)

Mtb est capable de survivre à l'intérieur du phagosome en déjouant tout le processus de digestion, c'est à dire en empêchant l'acidification et la fusion avec le lysosome. L'arsenal de stratégies dont le bacille dispose pour contrer l'acidification et la maturation des phagosomes est la principale cause de son succès en tant que pathogène (Armstrong et Hart 1971).

Les protéines de l'enveloppe de Mtb sont des facteurs essentiels dans ce processus. En effet, des études réalisées grâce à l'utilisation de microbilles recouvertes avec des TDM, ou par l'utilisation de TDM purifiés, ont démontré une action délétère sur la maturation des phagosomes, dont ils inhibent l'acidification (Axelrod *et al.* 2008). Les Man-LAM sont également responsables du blocage de la maturation du phagosome en limitant la concentration intracellulaire de Ca⁺ requise pour le bon déroulement de ce processus (Vergne, Chua, et Deretic 2003). En ce qui concerne les DIM, des dérivés des mycocétosates, une étude montre que les mutants déficients en DIM ne parviennent pas à arrêter l'acidification du phagosome (Astarie-Dequeker *et al.* 2009). Une étude plus récente a de surcroît montré que les DIM sont capables d'endommager la membrane des phagosomes et d'y créer des pores pour permettre à Mtb d'introduire des protéines effectrices dans le cytosol (Augenreich *et al.* 2017). Des expériences menées chez la souris ont montré que la NADH déshydrogénase mycobactérienne NuoG est responsable de l'inhibition de l'acidification dépendante de Nox2 (Miller *et al.* 2010) et de l'enzyme catabolisant la conversion de l'uridine triphosphate en cytidine triphosphate, la CtpsA, en empêchant leurs recrutements dans les phagosomes (Köster *et al.* 2017). Pour survivre à l'acidification, Mtb exprime également des enzymes pour détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme la superoxyde dismutase (SodA) et la KatG (Ng *et al.* 2004). Rv3034c est une catalase produite par Mtb qui limite le stress oxydatif en favorisant l'expressions de gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogénèse du peroxyosome : Pex3, Pex5, Pex19, Pex11b, la protéine de fission 1 mitochondriale, Fis-1 et la dynamin-like GTPase, DLP-1 (Ganguli *et al.* 2020). Mtb se protège aussi des espèces réactives de l'azote grâce à ses LM, qui inhibent leur production (Doz *et al.* 2007), et grâce à ses DIM qui ont un effet imperméabilisant sur l'enveloppe (Siméone *et al.* 2007). Les souches mutantes synthétisant des LM modifiés ont d'ailleurs une virulence atténuée chez la souris et une plus forte sensibilité aux antibiotiques par rapport aux souches sauvages (Fukuda *et al.* 2013).

Afin d'assurer sa survie et de prévenir la formation d'un phagolysosome, Mtb dispose d'un arsenal d'effecteurs bactériens capables de détourner les voies de signalisation et empêcher sa fusion avec le lysosome. C'est le rôle d'EsxH (ESAT-6-like protein), la protéine effectrice sécrétée par ESX-3 (Mehra *et al.* 2013). Les TDM, dont la présence est abondante dans l'enveloppe de Mtb, ralentissent la maturation du phagosome (Indrigo, Hunter, et Actor

2003). Plus récemment, en utilisant des microbilles recouvertes d'immunoglobulines G couplées à des TDM, il a été montré que l'effet inhibiteur des TDM est médié par le recrutement de Mincle (alias CLEC4E, le récepteur de lectine dépendant du Ca^{2+} inductible par les macrophages) suite à l'activation de Fc γ RIIB lors de la phagocytose opsonique (Patin *et al.* 2017). D'autre part, les Man-LAM participent aussi à l'inhibition de la fusion avec les lysosomes en s'intercalant dans les endomembranes des phagosomes (Fratti *et al.* 2003).

Suite au blocage de la maturation du phagosome, une portion de Mtb est capable de s'échapper, perméabilisant sa membrane pour atteindre le cytosol qui constitue certainement un environnement nutritionnel plus favorable. Cette aptitude demeure sujet de controverse. En 2007, Wei et collègues montrent, par cryomicroscopie électronique la présence de certains bacilles dans le cytosol des macrophages. Par une méthodologie très élégante reposant sur la détection, en microscopie de fluorescence, du transfert d'énergie de résonance entre molécules fluorescentes (FRET) généré par le clivage de la sonde fluorescente CCF-4 par les bêta-lactamases des bacilles, Siméone *et al.* (2012) confirment la présence des bacilles dans le cytosol de THP-1 différenciées en macrophage. Les auteurs impliquent deux substrats du système ESX-1 dans la rupture du phagosome : l'ESAT-6 et sa partenaire, la protéine CFP-10 (culture filtrate partner 10). En 2015, la même équipe confirme *in vivo* la rupture du phagosome dans plusieurs types de phagocytes murins, en utilisant la détection, en cytométrie en flux, du FRET produit par le clivage de CCF-4 (Siméone *et al.* 2015). Augenstreich *et al.* (2017) ont montré que la perméabilisation du phagosome nécessite, en plus de ESAT-6 et CFP-10, l'action conjointe des DIM. En effet, les souches BCG synthétisent les DIM, mais sont déficientes pour ESX-1 et ses substrats ESAT-6 et CFP-10, en raison de la délétion de la région différence 1 (RD1) contenant les gènes codants pour ces protéines. Les auteurs ont montré que les souches BCG dans lesquelles la région RD1 a été rajoutée (RD1⁺), sont capables de perméabiliser le phagosome. Toutefois, cette faculté est moindre pour les souches BCG RD1⁺ dont un gène nécessaire pour la synthèse des DIM est délété (Augenstreich *et al.* 2017).

Une fois libre dans le cytoplasme, Mtb doit faire face à une autre menace, l'autophagie, un processus par lequel, en condition non pathologique, les cellules recyclent ou se débarrassent des composants cellulaires endommagés (Bernard *et al.* 2020). Pour cela, un autophagosome se forme dans le cytosol et compartimente les corps à dégrader. Puis tout comme lors de la phagocytose, l'autophagosome est adressé aux lysosomes (Ma *et al.* 2013). L'autophagie

possède aussi une action microbicide contre les pathogènes qui se retrouvent séquestrés dans l'autophagosome. L'élimination de Mtb via cette voie a été démontrée par Deretic *et al.*, (2013) comme un mécanisme efficace. Cependant, Mtb est capable de contrer la fusion du lysosome et de perméabiliser l'autophagosome en utilisant des mécanismes dont certains sont similaires à ceux utilisés pour survivre à la phagocytose, et notamment grâce à ESAT-6 (Pour revue Paik *et al.*, 2018).

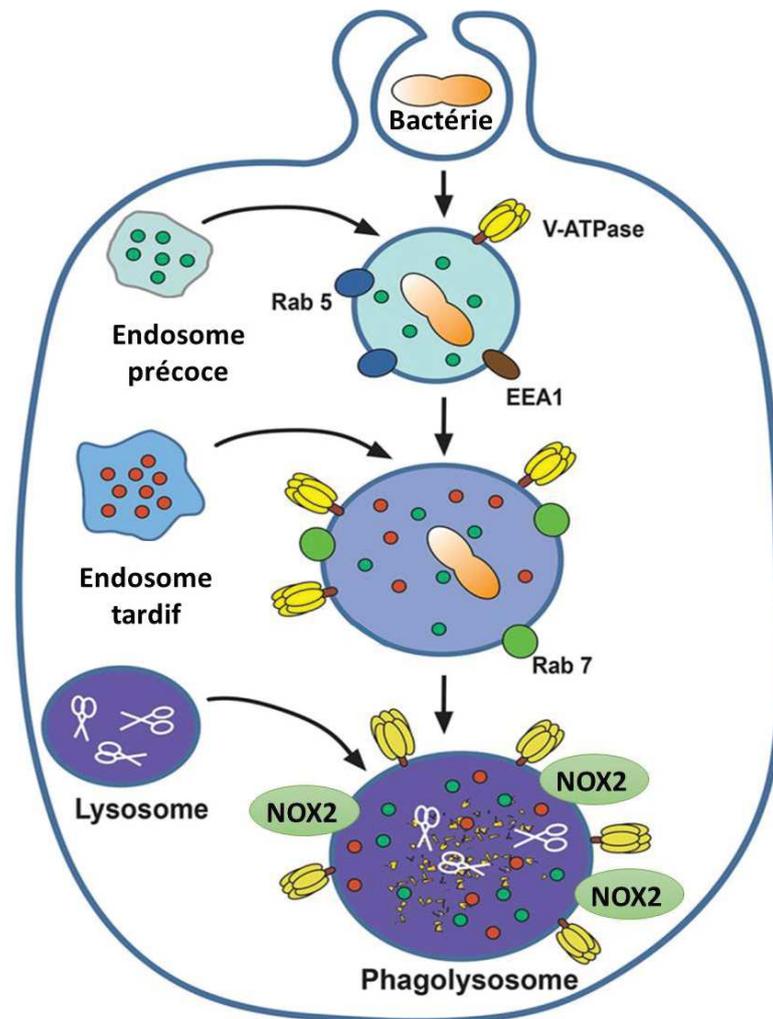


Figure 7. La phagocytose et la maturation du phagosome. La phagocytose débute par la formation du phagosome grâce à des protrusions de la membrane plasmique. Ensuite, les protéines Rab5 enchâssées dans la membrane du phagosome recrutent la protéine EEA1 qui permettent la fusion avec des endosomes précoces. Cette fusion permet l'acidification progressive du phagosome et le recrutement de Rab7 qui adresse le phagosome aux endosomes tardifs. La maturation du phagosome s'achève par sa fusion avec les lysosomes. Les lysosomes contiennent des enzymes hydrolytiques qui digèrent les pathogènes. A ce stade le complexe NOX2 est recruté dans les membranes du phagosome et assure une forte production de composés microbicides. Adapté de Uribe-Querol et Rosales (2020)

L'effet des facteurs de virulence ne se limite pas à interférer avec la phagocytose et l'autophagie. Une fois échappée dans le cytosol, Mtb est alors capable d'y moduler plus

largement la réponse de son hôte et notamment la mort cellulaire ainsi que le statut inflammatoire des macrophages.

5.3 Le contrôle de la mort cellulaire

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée non inflammatoire qui contribue à la défense des organismes contre les pathogènes. Ce phénomène a été très étudié et est extrêmement bien décrit (Nagata 2018; Place, Lee, et Kanneganti 2021). La dernière étape de ce processus d'apoptose est la fragmentation : le macrophage en apoptose se fragmente, Mtb comme le reste du contenu cellulaire, est relarguée dans le milieu extracellulaire, contenus à l'intérieur de multiples corps apoptotiques délimités par des fragments de membrane plasmique (Divangahi, Behar, et Remold 2013). Grâce à l'apoptose, les macrophages limitent la survie de Mtb en la privant de sa niche. Ainsi, Mtb contenue dans les corps apoptotiques, stimule les cellules dendritiques et le recrutement de l'immunité innée, tout en épargnant l'hôte de la virulence médiée par les composants de son enveloppe (Weiss et Schaible, 2015). De plus, l'apoptose puis l'efférocytose (terme définissant la phagocytose des cellules apoptotiques) ont montré une grande efficacité pour éliminer les mycobactéries (Hartman et Kornfeld, 2011; Lam *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2006). De ce fait, pas moins de 19 facteurs synthétisés par Mtb ont pour fonction de contrer directement l'apoptose afin de favoriser la survie du macrophage. Les mécanismes les mieux décrits sont ceux par lesquels Mtb empêche l'activation de la voie des caspases grâce à ses Man-LAM, NuoG, EspR (le facteur transcriptionnel qui active ESX-1), la nucléoside diphosphate kinase Ndk, Rv3033, la protéine tyrosine phosphatase MptpB et la protéine tyrosine phosphatase Ptpa (pour revue (Abdalla *et al.* 2020)).

Mtb favorise la nécrose, plutôt que l'apoptose, pour assurer sa dissémination. La nécrose est une mort cellulaire non programmée qui permet, durant la phase active de la tuberculose, de créer le caséum et de libérer des bacilles infectieux dans le milieu extracellulaire. Durant longtemps, les raisons menant à l'induction de la nécrose et à l'origine de la formation du caséum sont demeurées inconnues (Sarathy et Dartois 2020). En 2006, Lee *et al.* montrent que certains macrophages explosent lorsque la charge bactérienne atteint au moins 25 bacilles. Les auteurs montrent également que la mort des macrophages par la nécrose n'a aucun impact négatif sur la survie de Mtb, soulignant le bénéfice de cette voie pour les

bactéries. Pendant longtemps, la nécrose induite par Mtb a été liée uniquement au phénomène de surexposition des macrophages au stress causé, par exemple, par la réplication de Mtb ou l'accumulation de lipides (Sarathy et Dartois 2020). Puis, en 2014, Danilchanka *et al.* Identifient la toute première et seule toxine identifiée chez Mtb, la TNT, issue du clivage de la porine CpnT et capable d'induire la nécrose des macrophages. La ferroptose, un mécanisme de mort cellulaire qui s'apparente à une nécrose programmée, a été impliquée dans l'induction de la nécrose des macrophages infectés par Mtb (Amaral *et al.*, 2019). La ferroptose a été décrite pour la première fois en 2012. Elle est induite par l'accumulation de fer, de lipides peroxydés et de lipides oxydés dans le cytosol des macrophages (Dixon *et al.* 2012). Bien que l'importance du rôle occupé par le fer au cours de l'infection des macrophages par Mtb suggérait déjà un rôle pour ce type de mort cellulaire programmée (pour revue (Meunier *et Neyrolles*, 2019)), ce n'est que très récemment que l'implication de la ferroptose au cours de l'infection des macrophages avec Mtb a été étudiée (Amaral *et al.*, 2019). Amaral *et al.* (2019) ont montré que la nécrose des macrophages infectés par Mtb s'accompagne d'une augmentation de la concentration en fer et que l'inhibition de la ferroptose grâce à la ferrostatine, un inhibiteur connu de cette voie, empêche complètement l'entrée en nécrose des macrophages infectés.

5.4 Le contrôle de la polarisation des macrophages par Mtb

De par leur nature de phagocytes, les macrophages sont capables d'exercer leur fonction phagocytaire quelque soit leur état de polarisation. Toutefois, suivant leur phénotype (M1 ou M2), la phagocytose est initiée par des récepteurs différents et entraîne une signalisation différente. En effet, la polarisation de type M1 va entraîner l'expression de récepteurs qui, une fois activés, entretiennent la réponse pro-inflammatoire (*e.g.* CD14, CD16, MARCO) (Ambarus *et al.* 2012; Mantovani *et al.* 2004; Uribe-Querol et Rosales 2020). La polarisation de type M2, quant à elle, induit l'expression de récepteurs dont l'activation provoque un signal anti-inflammatoire suite à la phagocytose (*e.g.* MRC1, CD163) (PrabhuDas *et al.* 2017). Les fonctions bactéricides des macrophages de type M1 les rendent plus efficaces pour éliminer Mtb, alors que le profil anti-inflammatoire des macrophages de type M2 les rend plus susceptibles à permettre sa survie sur le long terme (Ahluwalia *et al.* 2017; Peyron *et al.* 2008). Aussi, au-delà du contrôle exercé par les facteurs de virulence directement sur les mécanismes de défense, au cours de l'infection, Mtb module également la réponse inflammatoire et la

polarisation des macrophages afin que ces derniers répriment la mise en place de conditions qui lui sont hostiles.

5.4.1 Généralités sur les signaux de polarisation de type M1

Les macrophages adoptent une polarisation de type M1 principalement en réponse aux voies de signalisations activées par les récepteurs Toll Like (TLR), IFN- γ et GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) (pour revues (Marino *et al.*, 2015, 2015)) (Figure 8).

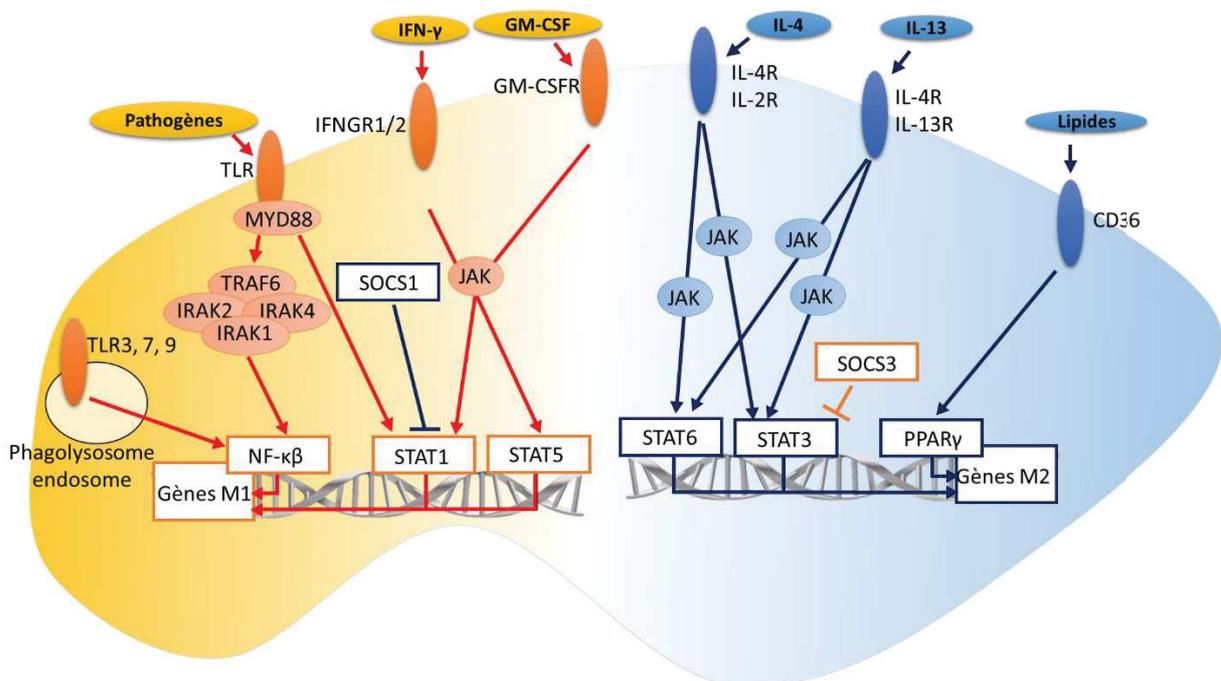


Figure 8. Les signaux de polarisation des macrophages. En orange, les signaux impliqués dans la polarisation de type M1 et en bleu, les signaux impliqués dans la polarisation de type M2. Les gènes impliqués dans la polarisation de types M1 sont principalement sous le contrôle de trois facteurs de transcription : NF- κ B, STAT1 et STAT5. La reconnaissance des pathogènes par les TLR permet l'activation du facteur NF- κ B, via l'activation de MYD88, TRAF6, IRAK1, IRAK2 et IRAK4, dans le cas des TLR situés à la membrane plasmique. Les facteurs STAT1 et STAT5 sont respectivement activés par l'activation des récepteurs IFNGR1/2 et GM-CSFR, de façon dépendante de la cascade d'activation des kinases JAK. Les gènes permettant la polarisation de type M2 sont majoritairement sous le contrôle des facteurs STAT3, STAT6 et PPAR γ . Les récepteurs de l'IL-4, IL-4R et IL-2R, permettent l'activation de STAT6. La reconnaissance de l'IL-13 par les récepteurs IL-4R et IL-13R conduit à l'activation de STAT3. L'internalisation de lipides induite par les macrophages de type M2 grâce à l'expression du récepteur scavenger CD36 mène à l'activation du facteur PPAR γ .

Pour reconnaître les pathogènes, les macrophages expriment à leur surface les PRR, des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern). Parmi eux, les TLR sont des récepteurs transmembranaires et représentent la composante principale de l'activation de type M1 de

l'immunité innée. Les TLR reconnaissent un large éventail de PAMP et de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP, Damage Associated Molecular Pattern). Chez l'Homme, 10 types de TLR ont été décrits et ne reconnaissent pas tous les mêmes types de ligands. Dans le cas des interactions hôte/pathogènes, les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont mis en jeu pour la reconnaissance des pathogènes extracellulaires, et les TLR3, 7, 8 et 9 pour celle des pathogènes intracellulaires, du fait de leur expression dans la membrane des lysosomes et des endosomes. A l'exception de TLR3, l'activation des TLR induit la voie de signalisation dépendante de MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) (pour revue (El-Zayat, Sibaii, et Mannaa 2019; C. Zheng *et al.* 2020)). L'activation de MyD88 entraîne une cascade de signalisation impliquant les kinases de types 1, 2 et 4 associées au récepteur de l'interleukine-1 (IRAK1, 2 et 4) ainsi que le facteur associé au récepteur du TNF, TRAF6. Cette cascade de signalisation mène à la translocation du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) dans le noyau (Figure 8), permettant la transcription des gènes placés sous son contrôle, qui codent notamment pour des médiateurs pro-inflammatoires, des protéines impliquées dans l'apoptose et dans le recrutement d'autres cellules immunitaires (De Nardo *et al.* 2018). La signalisation via TLR3 active également NF- κ B de façon dépendante de la protéine adaptatrice TICAM-1 (Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1, alias TRIF) et TRAF3 ou RIP1 (sérine / thréonine-protéine kinase 1 interagissant avec les récepteurs) (Nguyen, Gazy, et Venketaraman 2020). L'activation des voies pro-inflammatoires induites par la réponse des TLR fait aussi intervenir des facteurs de régulation des interférons (IRF), le facteur de transcription STAT1 et le facteur de croissance EGR (early growth factor) (pour revue (El-Zayat, Sibaii, et Mannaa 2019)).

La signalisation dépendante de l'IFN- γ ou du GM-CSF se produit secondairement et agit pour maintenir la polarisation de type M1. En effet, l'IFN- γ et le GM-CSF sont produits par des macrophages et des lymphocytes déjà activés par la voie classique. Dans les macrophages, l'IFN- γ et le GM-CSF déclenchent respectivement l'activation de STAT1 et STAT5, principalement via JAK2 (Figure 8). Ceci induit l'expression de gènes pro-inflammatoires et notamment la production d'IRF1 et IRF8, et d'IL-1 et IL-12, deux interleukines qui possèdent un rôle clé dans la défense contre Mtb (Yunna *et al.* 2020).

5.4.2 Généralités sur les signaux de polarisation de type M2

Contrairement à la polarisation de type M1 qui confère aux macrophages des propriétés pro-inflammatoires et largement microbicides ; la voie d'activation alterne de type M2 confère aux macrophages des propriétés soit pro-réparatrices (principalement IL-4 et IL-13) soit anti-inflammatoires selon les signaux par lesquels elle est induite, visant à restaurer l'homéostasie tissulaire (principalement IL-10 et le facteur de croissance transformant TGF- β). L'IL-4 et l'IL-13 initient une cascade de signalisation dépendante des kinases Jak1 / Jak2 / Jak3 et Tyk2 qui va mener à l'activation des facteurs de transcription STAT3 et STAT6 et à la transcription subséquente des gènes anti-inflammatoires qu'ils contrôlent (Figure 8), notamment le récepteur MRC1, les facteurs de transcription IRF4 et KLF4 (Kruppel-like factor 4), ainsi que la protéine inhibitrice de la signalisation des cytokines, SOCS1 (Malyshev et Malyshev 2015; C. Zhang, Yang, et Ericsson 2021). L'IL-4 induit aussi l'importation d'acide gras en provoquant l'expression du récepteur scavenger CD36. Les acides gras activent en retour le récepteur PPAR γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma) (Sheedy et Divangahi 2021), un récepteur nucléaire fortement impliqué dans l'induction de nombreux gènes nécessaires à la polarisation de type M2 (Figure 8) et dans l'inhibition de l'activation classique (Varga, Czimmerer, et Nagy 2011). La polarisation alterne inhibe également la voie d'activation classique par le biais, par exemple, de STAT3 qui réprime toute la voie de signalisation pro-inflammatoire dépendante de NF- κ B et aussi par le biais de SOCS1, qui réprime STAT1 (Figure 8). Les macrophages de type M2 assurent une forte production d'IL-10 qui permet également de conduire à l'activation de STAT3 avec le même effet répresseur sur la voie classique. L'IL-10 est par ailleurs capable de réprimer jusqu'à 20% des gènes pro-inflammatoires induit par la voie classique. Son rôle est probablement de contrebalancer les effets négatifs d'une polarisation classique exacerbée, car son expression est induite dans les macrophages de type M1 (Lang *et al.* 2002). La polarisation alternative est également entretenue par la stimulation autocrine du TGF- β . L'effet anti-inflammatoire TGF- β est engendré par l'inhibition des gènes pro-inflammatoires et par l'apoptose (Batlle et Massagué, 2019).

5.4.3 Le rôle des macrophages de type M1

Les macrophages de type M1 assurent un rôle de défense contre les pathogènes. Pour cela ils produisent des composés bactéricides (*e.g.* des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène) qui permettent de digérer les pathogènes. Les macrophages M1 produisent également des médiateurs de l'inflammation afin de stimuler l'immunité innée et de faire le lien avec l'immunité adaptative.

5.4.3.1 *Production de composés microbicides*

Les composés bactéricides permettent une élimination non spécifique des pathogènes. Ces composés sont des dérivés toxiques du dioxyde d'oxygène et de l'azote.

La production de ROS par les macrophages est majoritairement réalisée par le complexe NOX (NADPH oxydase). Ce complexe est composé de plusieurs protéines cytosoliques, dont NOX2, et s'assemble dans la membrane plasmique en réponse à des stimuli de type M1 tels que le TNF- α (Tumor necrosis factor α) et l'IL-1 (Fisher 2009). La localisation du site actif de NOX2 permet de synthétiser des ROS dans le milieu extracellulaire, ce qui permet au macrophage d'exercer une pression bactéricide sur les pathogènes qui n'ont pas été phagocytés. De plus, lors de la phagocytose, l'invagination de la membrane plasmique permet l'internalisation de NOX2 à l'intérieur des phagosomes et assure une forte concentration en ROS dans ce compartiment. Les macrophages sont aussi capables d'assurer une production de ROS cytosoliques par les complexes de la chaîne de transport des électrons mitochondriale (Herb et Schramm 2021). Ces mtROS permettent de cibler les pathogènes capables de s'échapper du phagosome tels que Mtb.

Dans les macrophages humains, la production de NO n'est pas constitutive. Elle se fait à partir de L-arginine et, en réponse à l'induction des voies activées par TLR2, 4, 5 et 9, elle est assurée par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). L'activité d'iNOS est réprimée par les médiateurs de la polarisation alterne comme l'IL-4 et le TGF- β car ils favorisent l'expression de l'arginase 1 (Arg1), une enzyme qui rentre en compétition avec iNOS pour la consommation de la L-arginine. Contrairement à iNOS, Arg1 transforme la L-arginine en composés non toxiques dont certains participent à la cicatrisation. Bien que la régulation et les rôles antagonistes d'iNOS et Arg1 au cours des infections soient très bien décrits dans les

macrophages murins, ils sont à ce jour encore controversés chez l'Homme (Nathan et Shiloh 2000). Il est toutefois important de noter que les études relatant l'implication de iNOS/Arg1 dans les pathologies humaines sont nombreuses ((Murray et Wynn 2011; Nathan 2006; Ochoa *et al.* 2001)

5.4.3.2 Recrutement et activation des autres cellules immunitaires

Une fois polarisés en type M1, l'activation des macrophages est exacerbée grâce à la production de médiateurs qui vont influencer une polarisation du même type de façon autocrine et paracrine sur les macrophages environnants. Ces médiateurs vont également attirer les autres cellules de l'immunité innée et adaptative vers le site de l'infection avant d'en influencer également l'activation. Ces médiateurs appartiennent à la famille des cytokines qui comprend les interférons, les interleukines, le TNF et les chimiokines. Les principales cytokines pro-inflammatoires amplifiant la polarisation de type M1 sont l'IL-1 β , l'IL-6, IL-12, l'IL-23 et le TNF- α . Le recrutement par chimiotactisme et la différenciation des monocytes en macrophages sont assurés par les chimiokines CXCL1, 2 et 3. Le recrutement des autres cellules immunitaires est assuré par les chimiokines CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8 qui mobilisent majoritairement des neutrophiles, et par les chimiokines CCL3, 4, 5, 23, CXCL9, 10, 11, 12, 13, 14 et 16 et qui recrutent principalement des lymphocytes et des cellules NK. Les macrophages sont également capables d'activer les lymphocytes en assurant un rôle de cellules présentatrices d'antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II (Atri, Guerfali, et Laouini 2018; Cowin 2018; Martinez *et al.* 2013; Ruytinx *et al.* 2018; Scheu *et al.* 2017; Xuan *et al.* 2015).

5.4.4 Le rôle des macrophages de type M2

L'activité pro-inflammatoire des macrophages de type M1 induit des dommages collatéraux en causant des lésions aux tissus environnants. La polarisation de type M2 ont alors pour fonction d'assurer la résolution de l'inflammation, à savoir : réparer, cicatriser, tempérer la réaction pro-inflammatoire et rétablir l'homéostasie tissulaire. Pour cela, les macrophages de type M2 recrutent et activent une immunité adaptative de type Th2 via des chimiokines particulières dont CCL1, 2, 13, 14, 17, 18, 20 – 24 et 26 (Atri, Guerfali, et Laouini 2018; Cowin 2018; Martinez *et al.* 2013; Ruytinx *et al.* 2018; Scheu *et al.* 2017; Xuan *et al.* 2015). L'effet des cytokines synthétisées par les Th2 (*e.g.*, IL-10, TGF- β) favorise le retour à

l'homéostasie en inhibant la production de médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , l'IL-12, et le TNF- α par les macrophages de type M1 (Ruytinx *et al.* 2018). Les macrophages de type M2 produisent également du collagène et de la fibronectine pour favoriser la réparation tissulaire et, via la sécrétion de TGF- β , induisent la synthèse de collagène par les myofibroblastes environnants (Batlle et Massagué 2019).

5.4.5 Le métabolisme énergétique des macrophages

La polarisation des macrophages entraîne également une reprogrammation de leur métabolisme énergétique. La voie classique augmente la dépendance des macrophages de type M1 envers la glycolyse, alors que cette dernière n'est pas impactée dans les macrophages de type M2 qui dépendent majoritairement des phosphorylations oxydatives (OXPHOS), couplées au cycle de Krebs, se déroulant dans les mitochondries, et de la β -oxydation des acides gras. Cette reprogrammation est à la fois nécessaire pour satisfaire les besoins énergétiques des macrophages et pour réguler l'expression de certains gènes impliqués dans l'immunité ; c'est pour cela que le concept d'immunométabolisme a été introduit pour les macrophages (Sheedy et Divangahi 2021) (figure 9).

La glycolyse est un processus utilisé par la quasi-totalité des êtres vivants pour générer de l'énergie sous forme d'ATP. Elle se déroule dans le cytoplasme et génère deux molécules d'ATP lors de la transformation d'une molécule de glucose en une molécule de pyruvate. Dans les mitochondries des cellules eucaryotes et en condition aérobie, le cycle de Krebs augmente le rendement énergétique en couplant la glycolyse à l'OXPHOS grâce à l'utilisation de l'acétyl-co-A, un dérivé du pyruvate (Yajuan Zhang *et al.* 2018).

L'acétyl-co-A intervient dans l'étape du cycle de Krebs qui transforme l'oxaloacétate en citrate grâce à l'activité de l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Les autres étapes du cycle permettent générer des coenzymes réduits, le NADH et le FADH₂, grâce à la décarboxylation du citrate en oxaloacétate. Le cycle de Krebs en lui-même ne produit pas d'énergie sous forme d'ATP. Il le permet indirectement grâce à la production de NADH et de FADH₂ qui sont réoxydés par l'OXPHOS assurée par la chaîne de transfert des électrons. L'OXPHOS se produit dans la membrane interne des mitochondries par l'activité de quatre complexes qui régénèrent du NAD⁺ et du FAD à partir du NADH et du FADH₂ en utilisant l'O₂ comme accepteur final d'électrons. C'est ce transport d'électrons qui finalement génère un gradient de protons utilisé

par l'ATP synthase pour synthétiser de l'ATP. En plus du pyruvate, le cycle de Krebs peut être alimenté avec d'autres métabolites issus du catabolisme des sucres, des acides aminés comme la glutamine et l'aspartate, et des lipides (Yajuan Zhang *et al.* 2018). Ceci permet au cycle de Krebs, conjointement avec l'OXPHOS, d'assurer la majorité de la production d'ATP de façon indépendante de la glycolyse.

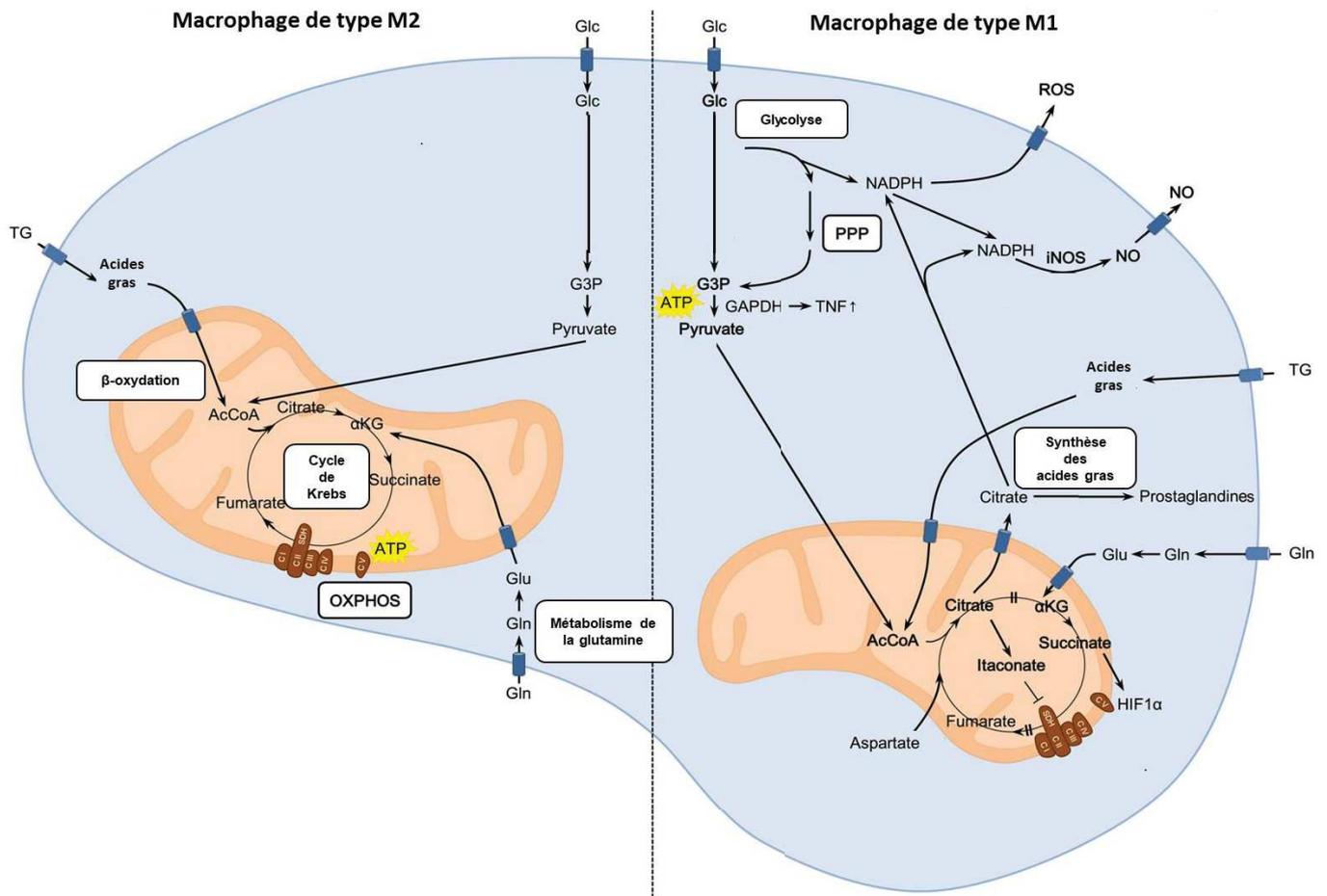


Figure 9. L'immunométabolisme des macrophages. Les macrophages de type M1 répriment le cycle de Krebs et l'OXPHOS au profit d'une induction de la glycolyse alors que le métabolisme des macrophages de type M2 dépend principalement du cycle de Krebs et de l'OXPHOS. Dans les macrophages de type M2, le pyruvate produit par la glycolyse, ainsi que des dérivés du métabolisme de la glutamine et de la β-oxydation des acides gras, sont importés dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs produit deux coenzymes réduits qui sont réoxydés par l'OXPHOS réalisée sur la chaîne des électrons localisée dans les membranes des mitochondries. Dans les macrophages de type M1, la production d'énergie, sous forme d'ATP, est majoritairement assurée par la conversion du glucose-3-phosphate en pyruvate. Le cycle de Krebs est interrompu à plusieurs étapes clés permettant l'accumulation de citrate, de succinate et d'itaconate, trois métabolites dont le rôle, pro-inflammatoire, permet de maintenir la polarisation de type M1 et de réprimer celle de type M2 : *i*) le citrate est exporté dans le cytoplasme et est utilisé pour synthétiser des prostaglandines, *ii*) le succinate permet la stabilisation du facteur pro-inflammatoire HIF1α et *iii*) l'itaconate inhibe la chaîne de transport des électrons qui assure l'OXPHOS. La voie des pentoses phosphates (PPP) permet de générer du NADPH servant la production de ROS et de NO. Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, TG : triglycérides, αKG : α-cétoglutarate, AcCoA : acétyl-co-A. Adapté de Rabold *et al.* (2017).

Le métabolisme des macrophages de type M2 dépend principalement de l'OXPHOS, alors que les macrophages de type M1 induisent une forte activité glycolytique et répriment leur

métabolisme mitochondrial en bloquant le cycle de Krebs. Ils dépendent donc principalement de la glycolyse pour subvenir à leur besoin en ATP. L'induction de la glycolyse et la répression du métabolisme mitochondrial pourrait sembler contreproductif pour le macrophage de type M1 car la glycolyse possède un rendement moindre face à celui de l'OXPPOS. Cependant, l'ATP produite par la glycolyse est plus rapidement disponible et comblerait, même dans un environnement hypoxique, un besoin urgent en énergie des macrophages de type M1 (Koo et Garg 2019). Dans les macrophages, la glycolyse est induite par le GM-CSF, l'activation des PRR (e.g. l'activation de TLR4 par le LPS) et les cytokines pro-inflammatoires. La signalisation résultante de ces voies conduit à l'activation de NF- κ B qui, à son tour, amplifie la réponse pro-inflammatoire, particulièrement via l'activation du facteur 1-alpha inductible par l'hypoxie, HIF1- α (van Uden, Kenneth, et Rocha 2008). Par ailleurs, HIF1- α induit l'import massif de glucose grâce à l'augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT-1 (Freemerman *et al.* 2014). La pyruvate kinase M2 (PKM2) intervient dans la dernière phase de la glycolyse consistant à transformer le phosphoenolpyruvate en pyruvate. Cette fonction est assurée par la forme active tétramérique de l'enzyme. Cependant, sous sa forme inactive dimérique, PKM2 est capable de se transloquer dans le noyau pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires comme HIF1- α , STAT1 et IL-1 β , et ainsi, promouvoir la polarisation de type M1 (Palsson-McDermott *et al.* 2015). La voie des pentoses phosphate est également induite dans les macrophages de type M1. Cette voie présente un intérêt certain pour la défense des macrophages car elle produit du NADPH, un métabolite qui peut être utilisé par Nox2 pour produire des ROS et par iNOS pour produire du NO (Rabold *et al.* 2017).

Un autre avantage de la répression de l'OXPPOS est que l'interruption du cycle de Krebs, à certaines étapes particulières, permet de générer des métabolites tels que le citrate, le succinate et l'itaconate, dont le rôle pro-inflammatoire est crucial pour l'activation classique des macrophages.

L'accumulation de citrate est rendue possible dans les macrophages de type M1 grâce à la répression de l>IDH et à la surexpression d'un transporteur du citrate, le CIC. Dans le cytoplasme, le citrate est converti en acétyl-co-A, puis ce dernier est converti en acides gras qui serviront à générer des composés microbicides comme les ROS, le NO et des prostaglandines gras (Infantino *et al.* 2013; 2014). L'accumulation de citrate est la conséquence de la stimulation des macrophages par des signaux pro-inflammatoires comme

le LPS, l'IFN- β et le TNF- α . Le citrate est également impliqué dans la production de NADPH dépendante du métabolisme des acides gras (Infantino *et al.* 2013; 2014).

L'itaconate est produit grâce à l'aconitate décarboxylase 1 (ACOD1) à partir du cis-aconitate produit par le cycle de Krebs. ACOD1 est surexprimé au cours de la polarisation de type M1. L'itaconate possède un rôle microbicide direct en inhibant l'isocitrate lyase des bactéries. Dans les macrophages, il agit plutôt comme un immunorégulateur puisque son effet est d'inhiber la transcription de gènes pro-inflammatoires (*e.g.* IL-1 β , IL-6) en empêchant la dégradation du facteur de transcription NRF2 (Williams et O'Neill, 2018).

L'accumulation de succinate permet de favoriser la polarisation de type M1 par le biais de la stabilisation du facteur HIF1- α (Rabold *et al.* 2017).

Dans le cas de la polarisation alterne de type M2, comme la glycolyse n'est pas induite, le pyruvate vient à manquer pour alimenter le cycle de Krebs, et de ce fait, la cellule augmente l'importation d'acides aminés et de lipides comme source d'énergie alternative. L'IL-4 entraîne l'expression du récepteur CD36, lequel assure l'internalisation d'acides gras (S. C.-C. Huang *et al.* 2014). Une boucle d'activation positive s'établit alors : PPAR γ (Chawla *et al.* 2001) est activé par les acides gras et favorise l'expression de CD36, qui, à son tour, va entraîner l'accumulation de lipides dans le cytosol (Chawla *et al.* 2001). Ces acides gras sont utilisés pour générer d'avantage d'ATP au cours de la β -oxydation réalisée dans la matrice des mitochondries, à proximité de la chaîne de transport des électrons qui assure l'OXPPOS (Sheedy et Divangahi 2021). Le transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie nécessite leur activation préalable par une conversion en acyl-Co-A, puis un transport à travers les membranes mitochondriales par la navette de la carnitine. Cette navette fait intervenir deux carnitine transférases (CPT1 et CPT2). L'activité de CPT1 est l'élément limitant de la β -oxydation. L'inhibition de CPT1 avec de l'etomoxir a montré que la β -oxydation est nécessaire à la polarisation de type M2, mais la raison de cette dépendance reste inconnue (Murthy et Pande 1987).

Dans le cas des macrophages de type M1, la situation est différente. La β -oxydation est limitée car ils utilisent les lipides pour synthétiser des acides gras bactéricides tels que les prostaglandines. L'import de corps gras n'est pas particulièrement induit au cours de l'activation classique et les macrophages de type M1 se servent de l'acétyl-co-A, produit par

la glycolyse et par la conversion du citrate issu du blocage de l'OXPHOS, pour la synthèse d'acide gras bactéricides (Sheedy et Divangahi 2021).

La dichotomie glycolyse / OXPHOS dans les macrophages de type M1 et M2 observée *in vitro* n'est cependant pas aussi tranchée *in vivo*. Les macrophages pulmonaires ont notamment un métabolisme particulier qui résulte de la complexité des signaux auxquels ils sont soumis.

5.4.6 Les macrophages pulmonaires

5.4.6.1 Origine

Deux populations de macrophages sont majoritaires dans les poumons : les macrophages alvéolaires et les macrophages interstitiels. L'origine et le rôle des macrophages pulmonaires a été très majoritairement étudiée chez la souris, car chez l'Homme, l'isolement des macrophages pulmonaires est effectué principalement par lavage broncho-alvéolaire et ne permet pas de collecter les macrophages interstitiels localisés à l'intérieur des tissus pulmonaires. Chez la souris, trois sources différentes ont été identifiées pour la génération de progéniteurs des monocytes qui se différencient ensuite en macrophages : le sac vitellin, le foie fœtal et la moelle osseuse adulte. Il est établi que les macrophages alvéolaires sont issus de la différenciation des monocytes embryonnaires et fœtaux en réponse au TGF- β et au GM-CSF via le récepteur du GM-CSF (CSF2R). Ils ont donc une origine prénatale et se maintiennent ou prolifèrent par auto-renouvellement local dans les poumons (Woo, Jeong, et Chung 2021). A l'inverse, les macrophages interstitiels proviennent des précurseurs situés dans la moelle osseuse. Ils sont renouvelés par recrutement des monocytes sanguins et, à ce jour, peu d'études ont démontré leur capacité à proliférer. Cette incapacité pourrait provenir du blocage de la prolifération médiée par l'expression du facteur de transcription MAF, mais aussi par la dépendance au M-CSF des macrophages interstitiels via une forte expression de son récepteur, CSF1R (Evren, Ringqvist, et Willinger 2020).

Chez la souris, à l'état naïf, la population des macrophages pulmonaires est constituée à 96% par les macrophages alvéolaires et d'une minorité macrophages issus de l'infiltration des monocytes circulants provenant de la moelle osseuse. Mais en cas d'infection ou de lésions, une infiltration massive de monocytes se produit dans les poumons (Aegerter *et al.* 2020; Machiels *et al.* 2017; Pisu *et al.* 2021) et cette population de macrophages nouvellement

recrutés constitue finalement 72% des macrophages pulmonaires totaux (Pisu *et al.* 2021). Ces deux populations de macrophages exercent des fonctions complémentaires pour assurer à la fois la défense contre les agressions et l'homéostasie dans les poumons. La présence de la population de macrophages recrutés a longtemps été considérée comme transitoire (Janssen *et al.* 2016). Cependant, une proportion de ces macrophages réside de façon permanente dans les poumons, même après la résolution de l'inflammation à l'origine de leur recrutement (Misharin *et al.* 2017; Pisu *et al.* 2021). Par ailleurs, des études plus récentes ont montré que les macrophages interstitiels recrutés sont très difficilement différenciables des macrophages alvéolaires, soit en cytométrie en flux, par leur expression de marqueurs de différenciation, soit en microscopie, par leur morphologie (pour revue (Kulikauskaitė et Wack 2020)), et que sous l'influence de l'environnement pulmonaire, au cours du temps, les macrophages interstitiels finissent par arborer un phénotype semblable à celui des macrophages alvéolaires (Evren *et al.* 2021). Il est alors possible que des erreurs d'interprétation sur les fonctions et la nature même de ces deux populations de macrophages pulmonaires aient été commises et soient à l'origine des divergences constatées parmi les travaux publiés. Néanmoins grâce à l'amélioration des techniques d'analyses, et notamment le séquençage à l'échelle de la cellule unique (scRNA-seq), ces populations de macrophages sont de mieux en mieux caractérisées. Grâce à cette technique, deux populations de macrophages interstitiels, Lyve1^{hi}CD38^{low} et Lyve1^{low}CD38^{hi}, ont été indentifiées chez la souris, selon leur expression du gène *Lyve1* (lymphatic endothelium hyaluronan receptor-1) et du gène codant pour la glycoprotéine membranaire Cd38 (Chakarov *et al.* 2019). Ces populations sont présentes à l'état naïf dans les poumons, le cœur, la peau et les tissus adipeux. Cette année, également grâce au scRNA-seq, Pisu *et al.* (2021) ont mis en évidence trois sous populations de macrophages alvéolaires et une population de macrophages interstitiels présents à l'état basal dans les poumons de souris saines et qui sont conservées chez l'Homme.

5.4.6.2 Fonctions des macrophages pulmonaires

Les macrophages alvéolaires ont pour fonction principale de maintenir l'homéostasie pulmonaire en condition dite normale (hors infection et lésion pulmonaire). Grâce à leur production constitutive de TGF- β et grâce à la production de GM-CSF par les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires sont soumis à la fois à des signaux pro- et anti-

inflammatoires. Ainsi, ils débarrassent les voies respiratoires des cellules mortes, des infections et de toutes les particules étrangères inhalées au cours de la respiration, tout en empêchant, grâce à leur fonction immunomodulatrice liée à la signalisation du TGF- β , que ces agressions extérieures ne génèrent une inflammation chronique et délétère pour les poumons (Woo, Jeong, et Chung 2021). Une étude datant de 2014 suggère que ces deux fonctions sont assurées par deux sous populations de macrophages alvéolaires différentes identifiées par la détection de macrophages alvéolaires fluorescents *in situ* dans des poumons de souris. Ainsi, les macrophages alvéolaires non sessiles, c'est à dire mobiles, patrouillent comme des sentinelles dans les espaces alvéolaires et déclenchent une réaction pro-inflammatoire et microbicide suite à la détection de pathogènes. Les macrophages alvéolaires sessiles, c'est-à-dire sédentaires, sont ancrés dans l'épithélium pulmonaire grâce à des jonctions Gap et régulent l'inflammation en sécrétant des médiateurs anti-inflammatoires (Westphalen *et al.* 2014). De façon intéressante, la dichotomie entre deux populations de macrophages alvéolaires, l'une pro-inflammatoire, l'autre immunorégulatrice a également été démontrée par Chakarov *et al.* (2019). En effet, les auteurs ont montré, en déplétant la population de macrophage Lyve1^{hi}CD38^{low} présente à l'état naïf dans les poumons, que cette dernière exerce une activité immunomodulatrice dans un modèle de fibrose pulmonaire, en limitant le recrutement des neutrophiles et l'expression de gènes pro-inflammatoires. Pisu *et al.* (2021) ont affiné cette caractérisation, dans le contexte de l'infection avec Mtb, grâce à une analyse multidimensionnelle alliant la cytométrie en flux et le scRNA-seq. Pour trier et purifier les sous populations de macrophages murins infectés *in vivo*, ils ont utilisé une souche de Mtb exprimant constitutivement la protéine fluorescente mCherry et la GFP (Green Fluorescence Protein) sous le contrôle du promoteur du gène *hsp α* (*Hsp α ::GFP*), lui-même activé par DosR, le principal activateur des gènes induisant la tolérance aux antibiotiques chez Mtb (Figure 10). Ils ont ainsi pu identifier *in vivo* les sous populations de macrophages en fonction de l'expression des marqueurs de différenciation en macrophages alvéolaires ou interstitiel, de différents gènes d'intérêt (notamment marqueurs de la polarisation M1 ou M2), de leur permissivité (le nombre de bactéries internalisées quantifiées grâce à l'intensité de mCherry et le stress subit par Mtb quantifié grâce à l'intensité de GFP). Quatre populations de macrophages alvéolaires ont ainsi été identifiées : *i*) les AM_1 qui sont composés de deux sous populations dont l'une déclenche une réponse pro-inflammatoire, exprime fortement la NO synthase, *Nos2*, et les gènes de la glycolyse suite à l'infection, alors que l'autre est associée à

des marqueurs de type M2 et une faible induction du régulon DosR chez Mtb, *ii*) les AM_2 qui représentent une population en transition entre un phénotype pro-inflammatoire et de résolution de l'inflammation, *iii*) les AM_3, une population anti-inflammatoire exprimant des gènes impliqués dans la polarisation M2 et dans le métabolisme des acides gras et *iv*) les AM_4 qui assurent le renouvellement des macrophages alvéolaires (Figure 10).

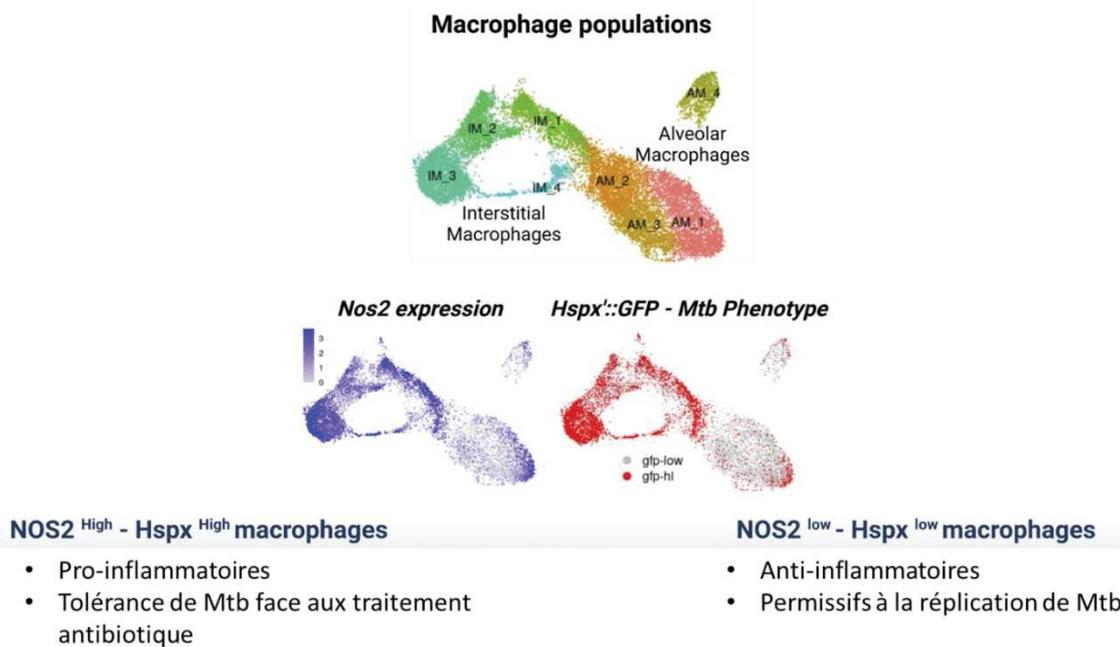


Figure 10. Les sous-populations de macrophages alvéolaires et de macrophages interstitiels identifiés *in vivo* chez la souris infectée avec Mtb. Grâce à une caractérisation en scRNA-seq de l'expression des gènes exprimés par les macrophages pulmonaires, Pisu et al. (2021) ont identifié 4 populations de macrophages alvéolaires et 4 populations de macrophages interstitiels dans les poumons. Ces populations sont discriminées par leur expression de *Nos2*, un gène codant pour une enzyme responsable de la synthèse de nitrite, par l'intensité de fluorescence générée par une souche de Mtb exprimant la GFP de manière constitutive et par la réponse au stress déclenchée par Mtb et suivie par l'expression d'un gène rapporteur, *Hspx*, situé dans le régulon *DosR*. Adapté de (Pisu et al. 2021)

A l'exception de la sous population pro-inflammatoire des AM_1, le métabolisme des macrophages alvéolaires dépend majoritairement de l'OXPHOS et de la β -oxydation des acides gras, et pour cette raison ils sont largement considérés comme ayant, à l'état basal, un profil anti-inflammatoire (Pisu et al. 2021). Très récemment, en mesurant l'activité glycolytique et la respiration mitochondriale des macrophages alvéolaires stimulés ou non avec du LPS, Woods et al. (2020) ont montré que la dichotomie OXPHOS/glycolyse ne s'appliquait pas aux macrophages alvéolaires pour qualifier leur statut inflammatoire. En effet, cette étude a montré que, contrairement aux macrophages dérivés des monocytes de la moelle osseuse, l'inhibition de la glycolyse avec de l'oxamate n'inhibe pas la réponse pro-inflammatoire des

macrophages alvéolaires en réponse au LPS. La faible disponibilité du glucose dans les poumons, comparativement au sérum, pourrait expliquer que les macrophages alvéolaires aient développé la capacité de déclencher une réponse pro-inflammatoire indépendamment de la glycolyse (Baker *et al.* 2007; Lawless *et al.* 2017). En effet, la glycolyse ne pourrait pas satisfaire l'activité phagocytaire de ces cellules qui est très élevée et très énergivore. Aussi, le métabolisme des acides gras pourrait être également mis en place pour pallier le manque de glucose en utilisant les acides gras qui sont en forte concentration dans le surfactant qui tapisse les voies aériennes (Hashimoto *et al.* 2013).

Du fait de la facilité de l'isolation des macrophages alvéolaires, leur rôle pro-inflammatoire est très documenté, et il semblerait que leur réponse pro-inflammatoire soit à la fois précoce et éphémère suite à une agression des poumons (pour revue (Kulikauskaite et Wack 2020)). Comme en témoigne l'étude de Pisu *et al.* (2021) chez la souris, une faible sous population pro-inflammatoire d'AM₁ semble transiter durant l'infection vers un profil intermédiaire de type M1 / M2 pour constituer la population AM₂ dont le phénotype est anti-inflammatoire. Ensuite, toujours chez la souris, la population de macrophages alvéolaires est dépassée par le recrutement massif de macrophages interstitiels. Suite à cette infiltration, l'inflammation est alors assurée principalement par les macrophages recrutés (Ghoneim, Thomas, et McCullers 2013; Hashimoto *et al.* 2013; Janssen *et al.* 2011; Pisu *et al.* 2021) alors que les macrophages alvéolaires se démarquent par une réponse plus faible, même sous la stimulation des nombreux signaux pro-inflammatoires environnants (pour revue (Kulikauskaite et Wack 2020)). Kulikauskaite et Wack (2020) suggèrent que le rôle principal des macrophages alvéolaires serait de déclencher le recrutement des cellules immunitaires dans les phases très précoces, et qu'ensuite les macrophages recrutés assureraient la réponse pro- ou anti-inflammatoire appropriée pour enrayer les pathologies. En 2019, Schyns *et al.* ont montré, grâce à la technique du ScRNA-seq, que les macrophages interstitiels sont constitués d'au moins deux sous populations qui reflètent celles identifiées par Westphalen *et al.* (2014) : une sous-population CD206⁺ situé dans les bronches et une sous-population CD206⁻ résidant dans les alvéoles, qui assurent respectivement un rôle pro-inflammatoire en sécrétant des chimiokines impliquées dans le recrutement de l'immunité adaptative Th1 (*e.g.*, CXCL11, CXCL10, CXCL9) et un rôle immunosuppresseur via la production d'IL-10 et du récepteur antagoniste de l'IL-1 β , IL-1R α . L'étude récente de Pisu *et al.* (2021) affine la caractérisation

des macrophages interstitiels en identifiant, au cours de l'infection avec Mtb quatre clusters différents (figure 10) : i) les IM_1 déjà présents dans les poumons sains à l'état basal et dont le phénotype est assez similaire à celui des AM_2, exprimant à la fois des gènes pro-inflammatoires et des gènes de la résolution de l'inflammation, ii) les IM_2 qui phagocytent peu de bactéries et dont le phénotype est majoritairement anti-inflammatoire, iii) les IM_3 qui sont pro-inflammatoires et iv) les IM_4 qui semblent être en transition entre les phénotypes IM_3 et IM_1. De façon intéressante, ils ont confirmé que les sous-populations de macrophages IM_1, AM_1, 2 et 4 sont retrouvées chez l'homme dans les poumons de sujets humains sains (Pisu *et al.* 2021). Bien que la majorité des études récentes présentées dans ce chapitre aient montré, grâce à la technique ScRNA-seq que les macrophages alvéolaires et interstitiels murins sont constitués de sous populations répondant différemment aux agressions, globalement, chez la souris, et à l'échelle de la population, les macrophages alvéolaires résidents sont prédestinés à suivre une polarisation de type M2 suite à l'infection avec Mtb alors que les macrophages interstitiels recrutés suivent une polarisation de type M1 ((Pisu *et al.* 2021; L. Huang *et al.* 2018)). Huang *et al.* (2018) ont observé que, contrairement aux macrophages interstitiels, à l'échelle de la population entière, les macrophages alvéolaires plus permissifs à l'infection que les macrophages interstitiels. En effet, la déplétion des macrophages alvéolaires permet un meilleur contrôle de l'infection (L. Huang *et al.* 2018). L'explication pourrait se trouver dans le fait que leur métabolisme, tourné vers l'OXPPOS et le métabolisme des acides gras, produit des métabolites détournés par Mtb pour assurer sa propre survie (Pisu *et al.* 2021; Segal et Bloch 1956).

5.4.7 La polarisation des macrophages à l'intérieur des granulomes

Chez l'Homme, au cours de l'infection, plusieurs types de granulomes coexistent dans les poumons. Ils sont à des stades d'activation immunitaire différents et possèdent des niveaux d'activité bactéricide différents (J. L. Flynn, Chan, et Lin 2011; M.-J. Kim *et al.* 2010; Stanton *et al.* 2003). La même observation a été faite chez les lapin et les primates non humains (Gideon *et al.* 2015; Lin *et al.* 2014; Mattila *et al.* 2013; Via *et al.* 2012). En 2015, une étude menée par Huang *et al.* a déterminé, par immunomarquage de CD68 (une protéine transmembranaire des lysosomes), CD206 et iNOS, sur des coupes de granulomes de patients tuberculeux et par

quantification de l'expression de *CXCL10*, *CXCL11*, *CCR7*, *CCL17* et *CCL18*, que la polarisation de type M2 prédomine au sein des lésions granulomateuses tandis que dans les tissus situés au pourtour, on retrouve des marqueurs de type M1 et M2 en proportions équivalentes. En 2016, Marakalala *et al.* ont analysé plus finement le profil inflammatoire des granulomes humains grâce à des micro dissections au laser, de la spectrométrie de masse, de la quantification protéique "label free" et de la microscopie confocale. Cette étude a montré que les différents types de granulomes ne diffèrent pas par leur composition protéique totale, mais que chaque granulome est subdivisé en zones dont les propriétés inflammatoires sont différentes (Marakalala *et al.*, 2016). En effet, à l'intérieur d'un même granulome, il existe des compartiments spécifiques exprimant des protéines spécifiques : i) les caséums, ii) les cellules bordant les caséums et iii) les cavités en marge expriment des protéines pro-inflammatoires alors que les cellules en périphérie des granulomes ont une signature anti-inflammatoire (Figure 11). L'étude de Mattila *et al.* (2013) menée chez les primates non-humains arrive à la même conclusion en montrant, grâce à la détection de marqueurs de polarisation en immunohistochimie, que les macrophages de type M1 sont localisés à la bordure centrale des granulomes caséux, alors que les macrophages de types M2 sont à la périphérie. Plusieurs études ont par ailleurs montré qu'un équilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires était indispensable pour la formation du granulome (Flynn et Klein, 2016; Gideon *et al.*, 2015; O'Garra *et al.*, 2013). Ainsi, une inflammation insuffisante ou une inflammation exacerbée conduit, dans les deux cas de figure, à une dissémination de Mtb (Vyas et Goswami, 2017).

L'influence de Mtb sur la polarisation des macrophages dans les granulomes humains est difficile à étudier dans le temps car les données obtenues à partir de résections pulmonaires de patients gravement malades et sous traitement ne sont pas représentatives de l'évolution naturelle de la maladie. *In vivo*, l'activation des macrophages alvéolaires murins par Mtb induit un recrutement massif de macrophages interstitiels (Srivastava, Ernst, et Desvignes 2014). Grâce à un modèle de granulome humain *in vitro*, Huang *et al.* (2015) ont montré que les macrophages de type M1 induisent la formation du granulome, puis dérivent vers une polarisation de type M2 au cours du temps. Une transition confirmée par l'identification des 4 sous-populations de macrophages interstitiels par Pisu *et al.* (2021). Par ailleurs, plusieurs études avaient déjà montré une forte réponse pro-inflammatoire, suivie par un shift de la

polarisation vers un phénotype anti-inflammatoire sur des modèles plus simples d'infection de macrophages *in vitro* et dans des modèles murins (Benoit, Desnues, et Mege 2008; Hernández-Pando *et al.* 1996; Lugo-Villarino *et al.* 2013; Méndez-Samperio 2008).



Figure 11. Chez les primates non humains, les macrophages de types M2 se trouvent à la périphérie des granulomes alors que les macrophages de type M1 se situent au pourtour et dans les caséums. Coupes de granulomes tuberculeux de primates non humains marqués pour STAT1 (en vert) et STAT3 (en rose). STAT1 et STAT3 sont utilisés comme marqueurs de la polarisation de type M1 et M2, respectivement. D'après (Marino *et al.* 2015)

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce shift sont nombreux et très certainement redondants. Cependant, la complexité de la réponse inflammatoire dont le niveau doit être contrôlé afin d'éviter l'effet délétère d'une inflammation exacerbée, met en jeu l'expression simultanée d'effecteurs pro- et anti-inflammatoires. Ceci complique d'avantage l'interprétation des études et l'identification des mécanismes induits par les macrophages pour prévenir les effets délétères d'une réponse exacerbée ou par Mtb pour assurer une infection pérenne.

5.4.8 La polarisation de type M1 médiée par Mtb

La polarisation de type M1 est déclenchée au tout début de l'infection via la reconnaissance de Mtb par les macrophages. Les lipides de l'enveloppe de Mtb sont suffisants pour déclencher une réponse pro-inflammatoire. En effet, l'injection de TDM purifiés à des souris induit la formation de granulomes et produit une réponse inflammatoire similaire à celle induite par Mtb (Behling *et al.* 1993).

Plusieurs récepteurs exprimés à la surface du macrophage sont capables de déclencher la phagocytose de Mtb : CD206, CD14, les protéines du surfactant, le récepteur de lectine de type C (DC-SIGN alias CD209), Dectine-1. Suite à la phagocytose de Mtb, les macrophages sont soumis à deux types de signaux : *i)* des signaux pro-inflammatoires agissant en faveur de la protection contre Mtb et *ii)* des signaux anti-inflammatoires issus de la manipulation de la réponse des macrophages par Mtb. Cette réponse est complexe à étudier car les deux types de signaux s'opposent. Ainsi, la signalisation induite de façon très précoce par des récepteurs non impliqués dans la phagocytose, comme celle des TLR, est plus évidente à étudier (Queval, Brosch, et Simeone 2017).

Le rôle des TLR est de moduler la réponse inflammatoire en réponse à la détection des pathogènes. Par exemple, l'activation de TLR2 ou TLR4 par Mtb induit une forte réponse pro-inflammatoire traduite par l'induction de HIF-1 α et la subséquente expression des gènes impliqués dans la glycolyse (Sánchez *et al.* 2010). L'engagement de TLR2 et 9 au cours de l'infection reste controversée dans les modèles murins. En effet, bien que les études de Carvalho *et al.* (2011) et Drennan *et al.* (2004) aient montré que des souris déficientes de TLR2 et 9 succombent plus rapidement à l'infection, Hölscher *et al.* (2008) n'ont pas observé ce phénotype mais attribuent en revanche un rôle déterminant à MyD88, en aval de ces TLR. En effet, leur étude a montré que les souris déficientes pour *Myd88* ne parviennent pas à induire une réponse pro-inflammatoire et protectrice contre Mtb. Chez l'homme, les TLR semblent jouer un rôle prédominant dans la réponse à Mtb, si bien que des polymorphismes associés aux TLR2, 4, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la susceptibilité à la tuberculose dans des populations issues d'origines différentes (Arji *et al.* 2014; Bukhari *et al.* 2015; 2015; Dalgic *et al.* 2011; Graustein *et al.* 2015; Kobayashi *et al.* 2012; Lai *et al.* 2016; Torres-García *et al.* 2013; Velez *et al.* 2010; Wu *et al.* 2015; 2015; Zaki *et al.* 2012).

5.4.9 Le shift de la polarisation vers le type M2 médiée par Mtb

Dans les macrophages dérivés de monocytes humains primaires et dans un modèle *in vitro* de granulome humain, après l'activation classique déclenchée par l'infection, la polarisation des macrophages tend de plus en plus vers une activation alterne. C'est un changement progressif illustré par l'inhibition graduelle de l'expression des marqueurs de type M1 et l'induction croissante de l'expression des marqueurs M2 (Z. Huang *et al.* 2015). Des études

réalisées *in vitro* sur des macrophages non infectés, stimulés par des signaux de type Th1 montrent que ce changement de polarisation s'opère naturellement grâce à des boucles de régulation négatives déclenchées par la polarisation de type M1 pour prévenir les effets délétères d'une réaction pro-inflammatoire exacerbée même hors du contexte infectieux. En effet, suite à l'activation du TLR4 par le LPS, la polarisation de type M1 induit l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Ernst *et al.* 2019). Cette cytokine réprime fortement l'activation classique et favorise l'expression de médiateurs anti-inflammatoires (Fiorentino *et al.* 1991). Par ailleurs L'IL-10 réprime l'effet inhibiteur du NO sur la chaîne de transport des électrons des mitochondries et provoque ainsi la répression de l'OXPPOS dans les macrophages de type M1 (Baseler *et al.* 2016). L'IL-10 est donc un allié de taille pour Mtb car elle avantage très clairement sa survie ; en plus de favoriser la polarisation alterne du macrophage au cours de l'infection (Schreiber *et al.* 2009), l'IL-10 empêche également la maturation du phagosome (O'Leary, O'Sullivan, et Keane 2011). L'IL-10 bloque l'apoptose en induisant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 et en inhibant les facteurs pro-apoptotiques p53, NO et TNF- α (Balcewicz-Sablinska, Gan, et Remold 1999; Patel *et al.* 2009). *In vivo*, l'IL-10 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse innée et cause un retard dans le recrutement de l'immunité adaptative (Cyktor *et al.* 2013). L'induction de l'IL-10 n'est pas le seul mécanisme d'autorégulation assuré par les macrophages de type M1. Un exemple est l'effet de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Synthétisée par les macrophages de type M1, elle peut à la fois exercer des effets pro- et anti-inflammatoires pour moduler l'inflammation (Scheller *et al.* 2011). L'effet anti-inflammatoire est médié par la voie classique suivant la reconnaissance par son récepteur membranaire IL-6R. L'effet pro-inflammatoire est généré par la voie « trans », une voie qui fait intervenir le récepteur soluble à l'IL-6 (Reeh *et al.* 2019).

Ainsi, dès lors que les macrophages sont activés, ils sont continuellement soumis à des stimulations opposées de types M1 et M2, et leur phénotype dépend de la balance entre ces deux activations. Le déséquilibre en faveur d'un phénotype de type M2 atteint au cours de l'infection est peut-être la conséquence inévitable des boucles de régulations négatives des macrophages et des conditions environnementales dans les poumons connues pour favoriser l'activation alterne (Woo, Jeong, et Chung 2021). Cependant, des mécanismes encourageant la polarisation de type M2 sont également induits par Mtb dès le début de l'infection. Grâce à l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-6, dont l'expression est induite par l'infection avec Mtb,

Dutta *et al.* (2012) ont montré que cette cytokine interfère avec la réponse à l'IFN des macrophages et facilite l'infection en bloquant l'autophagie. Les lipides de l'enveloppe de Mtb agissent en faveur de sa virulence en atténuant la réponse protectrice des macrophages. En effet, la signalisation déclenchée par les macrophages suite à la reconnaissance des lipides purifiés de Mtb (*i.e.* des PIM, des TDM et des Man-LAM) par CD206 entraîne une expression de cytokines anti-inflammatoires (Nigou *et al.* 2001) et l'inhibition de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et d'IL-12 (Court *et al.* 2011). Plus précisément, la O-mannosylation des Man-LAM permet d'induire une réponse TLR2 atténuée par rapport aux lipoarabinomannanes (non mannosylés) (Alonso *et al.* 2017). Les Man-LAM sont également, à eux seuls, capables d'induire l'activation de PPAR γ , un facteur de transcription permettant l'expression de gènes impliqués dans la polarisation de type M2 et dans le métabolisme des acides gras (Rajaram *et al.* 2010). Rv3034c, une catalase produite par Mtb, et P19, une lipoprotéine de 19 kDa située dans l'enveloppe, sont également positivement impliquées dans l'expression de PPAR γ (Ganguli *et al.* 2020; L. Liu *et al.* 2015). L'activation de PPAR γ est une stratégie clé pour Mtb. Non seulement ce facteur joue un rôle crucial pour induire le phénotype M2 dans les macrophages, mais il est aussi impliqué dans l'accumulation de lipides à l'intérieur du cytosol (Varga, Czimmerer, et Nagy 2011; Chawla *et al.* 2001). De ce fait, PPAR γ élément déterminant dans un autre type de différenciation induit par Mtb dans les macrophages est la différenciation en macrophages spumeux.

5.4.10 Les macrophages spumeux

Les macrophages spumeux sont des macrophages présentant à la fois des marqueurs de polarisation de type M1 et de type M2. Il se distinguent particulièrement par l'accumulation de corps lipidiques sous forme de gouttelettes dans leur cytosol, ce qui leur donne un aspect caractéristique en microscopie électronique (Stöger *et al.* 2012). La différenciation des macrophages en macrophages spumeux a lieu au cours de la formation du granulome et la nature majoritairement lipidique du caséum est imputée à la nécrose de ces macrophages. *In vitro*, l'infection avec Mtb permet, sans aucun autre facteur, d'induire ce phénotype dans les macrophages humains. Le stockage de corps gras est donc directement induit par Mtb et semble lié à sa virulence puisque la souche *Mycobacterium smegmatis*, non virulente pour l'homme, n'induit pas ce phénotype (Peyron *et al.* 2008).

La différenciation en macrophage spumeux n'est pourtant pas spécifique à la tuberculose et elle a pu être observée dans d'autres pathologies. La première pathologie dans laquelle les macrophages spumeux ont été décrits, en 1913 par Anitschkow, est l'athérosclérose (Steinberg 2013). Plus tard ils ont également été identifiés dans d'autres pathologies chroniques ou auto-immunes, *e.g.* la maladie de Niemann-Pick, le lupus, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, dans certains cancers, et également dans le contexte d'autres maladies infectieuses causées par i) d'autres mycobactéries *i.e.* *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, ii) d'autres bactéries *i.e.* *Salmonella typhimurium*, *Nocardia brasiliensis*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia pneumoniae*, iii) un champignon *i.e.* *Histoplasma capsulatum*, et iv) des parasites *i.e.* *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi* (pour revue (Guerrini et Gennaro 2019)). Ainsi, et pendant longtemps, l'athérosclérose a été utilisée comme modèle principal pour étudier le rôle des macrophages spumeux, dont la formation des gouttelettes de cholestérol peut être aisément induite *in vitro* par des LDL oxydés (Moore, Sheedy, et Fisher 2013). Notamment, l'analogie avec la toxicité d'une accumulation massive de cholestérol entraînant la nécrose des macrophages dans les lésions athérosclérotiques avait été utilisée pour expliquer la formation du caséum dans les granulomes tuberculeux (McClellan et Tobin 2016; Tabas 2005). Récemment, Guerrini *et al.* ont montré, par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse que les gouttelettes lipidiques des macrophages spumeux différenciés par l'infection avec Mtb sont très différentes car elles contiennent une majorité de triglycérides. En effet, dans ces macrophages spumeux infectés, l'inhibition de la synthèse des gouttelettes lipidiques a été observée par le traitement d'un inhibiteur chimique de l'enzyme DGAT1 (A922500) qui contrôle la conversion des di en triglycérides (Guerrini *et al.* 2018).

Cependant, les conséquences communes de cette différenciation aberrante en macrophages spumeux, dans toutes les pathologies décrites, sont : un effet délétère dû à une inflammation chronique, des dommages tissulaires et, dans le cas des pathologies infectieuses, la survie des pathogènes. Dans le contexte de la tuberculose, l'inflammation chronique et les dommages tissulaires sont médiés par la nécrose des macrophages spumeux lorsque les eicosanoïdes produits à partir des acides gras stockés dans les gouttelettes lipidiques sont déchargés dans l'espace extracellulaire (Guerrini et Gennaro 2019). Dans

certain cas, on observe une exacerbation de l'inflammation dans le granulome qui va mener à sa rupture et permettre la dissémination de Mtb dans les voies aériennes par la toux, et ainsi la propagation de la maladie (Russell, Barry, et Flynn 2010).

Toutefois, au cours de l'infection avec Mtb, l'activité des macrophages spumeux est plutôt anti-inflammatoire. Une étude basée sur l'inhibition, par ARN interférence, de l'expression des gènes codants pour PPAR γ et TR4 (testicular nuclear receptor 4), deux facteurs nucléaires capables de détecter les lipides, a montré que la différenciation des macrophages spumeux dépend de ces facteurs. PPAR γ et TR4 inhibent notamment la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α alors qu'ils induisent l'expression des marqueurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le CD206 (Mahajan *et al.* 2012). Par ailleurs, les macrophages qui se sont différenciés en macrophage spumeux après avoir été infectés perdent leur capacité à phagocyter d'autres bactéries. La population de Mtb contenue dans ces macrophages reste stable dans le temps. Cela suggère que la résidence dans ces macrophages suffit à induire l'état de persistance nécessaire à l'arrêt de la réplication de Mtb ; un état qui lui permet à la fois d'installer une infection chronique et d'échapper à l'effet de nombreux antituberculeux (P. Agarwal *et al.* 2020; Cáceres *et al.* 2009; Peyron *et al.* 2008). Notamment, les tests réalisés dans un modèle utilisant du caséum de lapin montrent une augmentation de la tolérance de Mtb aux composés antituberculeux comparativement à la sensibilité observée dans les modèles qui ne contiennent pas de caséum (Sarathy *et al.* 2018). L'induction de l'état de persistance est directement liée à l'utilisation par Mtb des triglycérides contenus dans les gouttelettes des macrophages spumeux en tant que source principale de carbone. Lorsque Mtb utilise ces acides gras, elle arrête son cycle répliatif et modifie la composition de son enveloppe tout en devenant moins sensible aux antituberculeux (Daniel *et al.* 2011). De plus, des observations en microscopie électronique ont montré que le bacille se localise préférentiellement à proximité des gouttelettes lipidiques ou à l'intérieur de ces dernières. En effet, le métabolisme des acides gras est nécessaire à la survie et à la virulence de Mtb au sein de ces macrophages (Peyron *et al.* 2008).

L'induction de ce phénotype dans les macrophages est directement assuré par des acides mycoliques de l'enveloppe, en particulier les céto-mycolates, sans lesquels la différenciation en macrophages spumeux ne peut avoir lieu (Dkhar *et al.* 2014; Peyron *et al.* 2008).

En conclusion, la polarisation des macrophages est un processus complexe qui fait intervenir l'activation et l'inhibition simultanée d'une multitude de cascades de régulation. L'efficacité de la réponse inflammatoire médiée par les macrophages repose donc sur l'expression coordonnée et finement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel de différents facteurs. De nombreuses études ont démontré que les microARNs (miARN) jouent un rôle central dans la modulation de l'activation et de la polarisation des macrophages, de l'infiltration tissulaire et de la résolution de l'inflammation. En ce sens, la forte implication des miARN dans le contrôle de la polarisation des macrophages est traitée dans le chapitre suivant.

6. Les microARNs

La découverte du premier miARN et de sa fonction ont formellement été établies en 1993 en montrant le rôle de répresseur transcriptionnel d'un petit ARN non codant de *Caenorhabditis elegans*, lin-4 (R. C. Lee, Feinbaum, et Ambros 1993). Les miARN sont des petits ARN non codants endogènes d'une longueur de 18 à 25 nucléotides agissant principalement comme des répresseurs post transcriptionnels de l'expression des gènes (Michlewski et Cáceres 2019). La découverte de miARN dans la plupart des espèces de métazoaires prouve que les miARN sont très conservés entre les espèces. La dernière version de miRbase (v22), la banque de donnée de référence concernant l'annotation de miARN, recense 2654 miARN humains (Kozomara, Birgaoanu, et Griffiths-Jones 2019). On estime qu'ils réguleraient un tiers des 20 000 gènes humains (Saliminejad *et al.* 2019) dont, bien entendu, des gènes impliqués dans la réponse des macrophages à l'infection avec Mtb (A. K. Singh *et al.* 2021). Le nombre croissant de miARN découverts au fil des ans a nécessité l'élaboration de règles de nomenclature. Ainsi parmi les métazoaires, les miARN sont identifiés par le terme « miR » suivi d'un numéro attribué selon l'ordre de découverte (*e.g.* miR-1 est le premier miARN à avoir été décrit). Si la précision est nécessaire, le nom du miARN est précédé de trois lettres permettant d'identifier l'espèce *e.g.* hsa pour l'Homme, mmu pour la souris (Budak *et al.* 2016). Une autre subtilité de la nomenclature sera développée dans un des chapitres ci-dessous.

6.1 Transcription des microARN

La biogénèse des miARN est initiée dans le noyau cellulaire, sous la forme d'un miARN primaire (pri-miR) qui subit une série d'étapes de maturation pour produire les miARN

matures (figure 12) (Tanzer et Stadler, 2006). La transcription de la plupart des miARN est assurée, tout comme celle des ARNm, par l'ARN Polymérase II (Pol II) (Saliminejad *et al.* 2019) (figure 12a). L'ARN Polymérase III (Pol III) transcrit aussi certains miARN, majoritairement ceux situés dans des régions riches en séquences Alu répétées (Borchert, Lanier, et Davidson 2006). Les séquences des miARN peuvent être situées soit dans les introns de la même unité transcriptionnelle codant pour une protéine, et sont donc sous contrôle du promoteur de cette dernière (Ha et Kim 2014), soit, plus majoritairement, dans les exons de séquences non codantes (V. N. Kim, Han, et Siomi 2009).

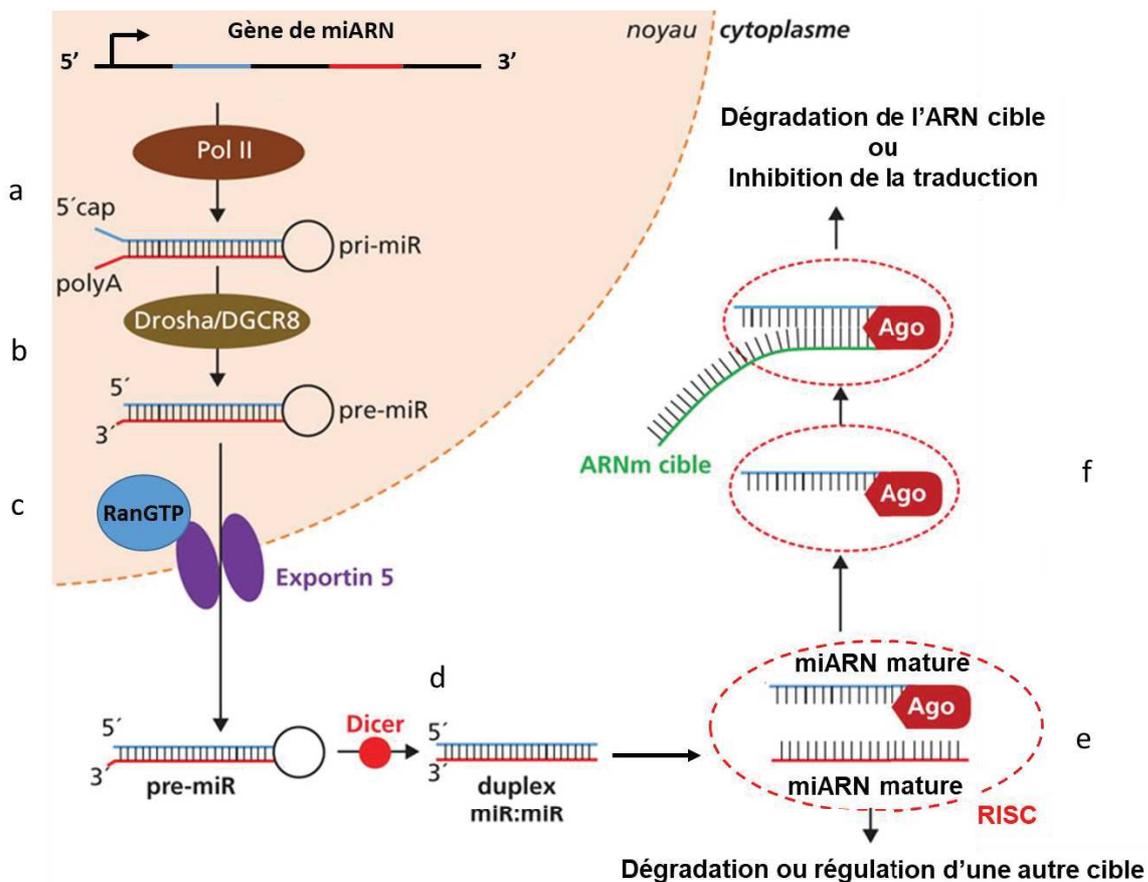


Figure 12. Biogénèse et maturation des miARN. La transcription des miARN est réalisée par Pol II et génère un transcrite d'une centaine à un millier de paires de bases, le pri-miR, replié en une structure tige-boucle. La maturation du pri-miR en un pré-miR de 60 à 70 paires de bases est assurée par le microprocesseur Droscha/DGCR8 qui clive les régions simples brins de part et d'autre de la structure en tige-boucle. Le pré-miR est ensuite exporté dans le cytoplasme par le complexe Exportine5 et RanGTP. Dans le cytoplasme, la maturation du pré-miR se poursuit grâce à Dicer, une endonucléase qui clive le pré-miR et génère une structure double brin formée des deux séquences complémentaires 5' et 3' des futures miARN matures. Cette structure est chargée dans le complexe RISC formé avec les protéines AGO1 à 4. La protéine AGO2 sépare les deux miARN matures et selon leurs propriétés thermodynamiques, le miARN le moins stable sera déchargé du RISC. Le miRNA mature qui est conservé dans le complexe est alors apte à reconnaître et réguler les ARNm qu'il cible. Adapté de Chautard *et al.* (2020).

Lorsque plusieurs séquences de miARN sont localisées dans une même unité transcriptionnelle, on parle alors de cluster de miARN (Tanzer et Stadler, 2006). Ces miARN

présentent souvent des séquences paralogues, provenant de la duplication d'une même séquence ancestrale (Tanzer et Stadler 2006). Les clusters de miARN sont souvent transcrits simultanément, mais des régulations post-transcriptionnelles peuvent être à l'origine de différences d'expression de manière individuelle (Ha et Kim, 2014). Le pri-miR transcrit se replie en une structure tige-boucle (Figure 12a) qui comporte une ou plusieurs régions en épingle à cheveux, une « coiffe » en 5' (7-méthylguanosine triphosphate (m7G)) et une queue de poly-Adénine ou poly(A) à son extrémité 3' (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Kim *et al.*, 2017). Sa taille oscille entre quelques centaines, voire quelques milliers de nucléotides (Y. Lee *et al.* 2003; Ruby, Jan, et Bartel 2007).

6.2 La maturation des miARN

Dans le noyau, le précurseur de miARN (pré-miARN) est généré par le complexe « microprocesseur » Drosha/DGCR8 après clivage des régions simples brin de part et d'autre de la tige-boucle (Figure 12b). Ce complexe est composé de la protéine de liaison à l'ARN RBP (RNA Binding Protein), de la protéine DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) et de la ribonucléase Drosha (Michlewski et Cáceres 2019). La protéine DGCR8 est essentielle dans le processus de clivage par Drosha. Pour la détermination du site de clivage, la protéine DGCR8 mesure la distance entre les fragments simples brins et ceux doubles brins, et facilite ainsi l'accès du site de clivage de Drosha. Les pri-miARN correspondant à une partie de l'intron, appelés aussi « mirtrons », l'étape catalysée par l'enzyme Drosha permettant de générer le pré-miARN, se déroule au même moment que l'épissage (Morlando *et al.*, 2008).

Le pre-miARN, d'environ 60 à 70 nucléotides (Y. Lee *et al.* 2003; Ruby, Jan, et Bartel 2007), est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme par un autre complexe formé de l'exportine 5 (EXP5, codé par le gène XPO5) et du cofacteur nucléaire Ran-GTP (RAS-related Nuclear protein – Guanosine TriPhosphate) (Y.-K. Kim, Kim, et Kim 2016) (figure 12c). Soixante-quinze pourcent des pré-miARN sont exportés par le complexe EXP5 / RanGTP, les autres empruntent des voies alternatives à ce jour moins bien caractérisées (Y.-K. Kim, Kim, et Kim 2016). Dans le cytoplasme, la RNase III et endonucléase Dicer clive la boucle du pré-miARN, conduisant à la formation d'une structure double brin formée des deux futurs miARN matures, l'un sur le bras 5p et l'autre sur le bras 3p de la structure (Figure 12d). Certains miARN ne dépendent pas de Drosha et / ou de Dicer pour effectuer leur maturation. Notamment, les miARN dont les

mirtrons ne codent pas pour des pri- et pré-miR comprenant des structures en épingle à cheveux, à la base desquelles, les régions simple brins sont indispensables à la reconnaissance par Drosha. Cette maturation alternative concerne moins de miARN et ne sera pas décrite dans ce manuscrit (O'Brien *et al.* 2018). La structure double brin clivée par Dicer (miR::miR), mesurant entre 19 et 22 nucléotides, est ensuite recrutée par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), formé conjointement des protéines de la famille Argonaute (AGO 1 à 4). Ce complexe RISC permet le passage d'un miARN double brin à un miARN simple brin (brin 5' ou 3') (O'Brien *et al.* 2018). Selon les propriétés thermodynamiques des deux brins, l'un des deux brins, le brin passager, se désolidarise du complexe (Medley, Panzade, et Zinovyeva 2021) (Figure 11e) et l'autre miARN mature, toujours intégré dans le complexe RISC, va effectuer son rôle de régulateur (O'Brien *et al.* 2018) (figure 12f). Auparavant, le brin passager était considéré comme systématiquement dégradé et identifié par un astérisque (*e.g.* miR-144*) pour le différencier du miARN mature fonctionnel. Cependant, il est à ce jour admis que les brins passagers ne sont pas forcément détruits et beaucoup assurent leur fonction en tant que miARN matures. La nomenclature a alors évolué et l'astérisque a été abandonné au profit d'une nomenclature plus inclusive nommant les miARN selon leur localisation sur bras 5p ou 3p des pri- et pre-miARN (Budak *et al.* 2016).

6.3 La régulation exercée par les miARN

Les miARN matures chargés dans le complexe RISC régulent l'expression des gènes cibles grâce à une complémentarité avec leur site de liaison et principalement la région 3'-UTR de l'ARNm (région 3' non traduite) (O'Brien *et al.*, 2018) (Figure 12e). Ils sont capables, mais plus rarement, de cibler les régions 5'-UTR et codante des ARNm (O'Brien *et al.*, 2018).

La reconnaissance d'un miARN sur son ARNm cible s'exerce grâce à la complémentarité de sa séquence « seed », une séquence de 7 nucléotides en moyenne, située en 5', avec celle de l'élément de réponse aux miARN (MRE) située sur l'ARNm (O'Brien *et al.*, 2018). Les MRE sont majoritairement situés en 3'-UTR (région 3' non traduite) des ARNm cibles ; plus rares sont ceux localisés en 5'-UTR ou dans la séquence codante. La liaison du miARN sur l'ARNm est accompagnée d'une hybridation complète ou partielle du miARN sur sa cible. Lorsque l'hybridation est complète, AGO2 clive l'ARNm, ce qui conduit à sa dégradation (Jo *et al.*, 2015) (Figure 12e). Toutefois, la reconnaissance de MRE et l'hybridation du miARN tolère des

mésappariements. Dans le cas d'une hybridation partielle, l'ARNm n'est pas dégradé, mais sa traduction est inhibée par le recrutement de protéines qui interfèrent dans l'interaction avec la protéine qui se fixe à la queue poly(A) des ARNm (O'Brien *et al.*, 2018) (Figure 12e). Dans le cas d'une hybridation partielle, la durée de vie de l'ARNm peut également être réduite par élimination de sa coiffe en 5' (O'Brien *et al.*, 2018).

Bien que ces fonctions soient plus rares, certains miARN sont impliqués dans la régulation de la transcription (Salmanidis *et al.* 2014), et d'autres seraient activateurs de la traduction de leur ARNm cible (Broughton *et al.* 2016; Ha et Kim 2014; Vasudevan 2012).

6.4 Le réseau de complémentarité seed / MRE

Les miARN inhibent 5 à 30% de l'expression protéique de leurs cibles (Baek *et al.* 2008; Loeb *et al.* 2012). Les MRE ciblés peuvent être présents sur plusieurs ARNm différents (le plus souvent ayant des fonctions similaires (Hammond 2015)), et les miARN joueraient un rôle de rhéostat moléculaire, permettant d'éviter de trop fortes variations du nombre de protéines traduites à partir de leurs ARNm cibles (Hammond 2015). Les miARN dont les seeds sont quasiment identiques forment ce que l'on appelle une famille et ciblent les mêmes MRE (Hammond 2015). De même, des miARN n'appartenant pas à la même famille peuvent également contrôler le même ARNm en s'y fixant par le biais de MRE différents. La complexité de ce réseau de régulation implique que la surexpression d'un miARN n'induit pas systématiquement la sous expression d'une cible donnée. En effet, en fonction de la co-expression de ses autres cibles, le miARN peut être titré par son hybridation sur plusieurs MRE à la fois (Franco-Zorrilla *et al.* 2007; Salmena *et al.* 2011).

Afin de prédire les ARNm ciblés par les miARN, de nombreux outils de prédiction ont été développés. Les outils les plus intuitifs, tels que le programme TargetScan, détectent, par homologie de séquences, les MRE conservés entre les espèces sur les ARNm, puis vérifient leur complémentarité avec les seeds des miARN (V. Agarwal *et al.* 2015). Il existe également des outils s'appuyant sur d'autres méthodes. Notamment, RNAhybrid calcule l'énergie de liaison nécessaire pour l'hybridation entre un miARN et un ARNm donné ; plus l'énergie est faible, plus leur interaction est probable (Krüger et Rehmsmeier 2006). Malheureusement, ces outils ne permettent pas de prendre en compte la structure secondaire des ARN ni l'intervention d'autres protéines telles que les RBP dans l'interaction miARN / ARNm. Il est

donc obligatoire de confirmer expérimentalement l'hybridation d'un miARN sur sa cible. La méthode la plus utilisée *in vitro* est celle de l'utilisation d'une séquence d'ARNm constitué de la séquence codant pour la luciférase et comprenant le MRE répondant à un miARN d'intérêt dans sa région 3'UTR. La luciférase est une protéine qui émet naturellement de la luminescence lorsqu'elle est exprimée. Ainsi, dans le cas où le seed du miARN à tester reconnaît le MRE, la traduction de la luciférase est inhibée et la diminution de la luminescence peut être mesurée (Jin *et al.* 2013; Moyle *et al.* 2017). D'autres méthodes existent pour valider l'interaction miARN / ARNm. Par exemple la méthode de « cross-link covalent » suivi d'immunoprécipitation (CLIP) permet de lier de façon covalente les protéines du complexe RISC, en général AGO2, à celles du miARN et de l'ARNm cible. Pour identifier les miARN et ARNm mis en jeu, le CLIP est suivi d'un séquençage d'ARN à haut débit (CLIP-Seq) (Bottini *et al.* 2018).

De par la diversité des gènes qu'ils régulent, les miARN sont impliqués dans énormément de processus biologiques, dont la polarisation des macrophages (Curtale, Rubino, et Locati 2019; G. Fu *et al.* 2013). Le dérèglement de leur expression est associé à des pathologies et les miARN peuvent de ce fait très utilisés en tant que biomarqueurs de ces pathologies (Tüfekci *et al.* 2014) car ils sont de surcroît très stables et relativement résistants aux dégradations par les RNases (Glinge *et al.* 2017). Leurs fonctions inhibitrices sont également étudiées dans le but d'utiliser les miARN à des fins thérapeutiques (Hanna, Hossain, et Kocerha 2019; S. Zhang *et al.* 2021).

6.5 Utilisation des miARN à des fins thérapeutiques

Deux méthodes d'utilisation thérapeutique des miARN sont envisageables. La première est de mimer artificiellement la surexpression d'un miARN qui est sous exprimé dans un contexte pathologique afin de rétablir son niveau d'expression normal. Cette méthode est réalisable grâce à l'utilisation d'oligonucléotides composés d'une séquence identique au miARN (miR-mimic) mature que l'on souhaite surexprimer. La seconde repose sur l'inhibition d'un miARN qui est surexprimé en condition pathologique. Cette méthode requiert, cette fois-ci, l'utilisation d'un oligonucléotide antisens, complémentaire au miARN d'intérêt, auquel il va donc s'hybrider pour inhiber la fixation du miARN à son ARNm cible (Yong Fu, Chen, et Huang

2019). De nombreuses modifications chimiques de ces oligonucléotides artificiels sont utilisées pour améliorer leur stabilité (pour revue (Yong Fu, Chen, et Huang 2019)).

C'est très récemment, en 2018 et en 2019, que patisiran et givoviran, ont été respectivement les tout premiers traitements contenant un petit ARN (200 nucléotides) antisens approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour leur utilisation thérapeutique. Bien qu'aucun miARN n'ait encore obtenu d'approbation de mise sur le marché, certaines compagnies, notamment Santaris Pharma, Miragen, Synlogic et Regulus Therapeutics, ont breveté des miARN et une dizaine d'entre-deux sont actuellement en phase de test clinique (Hanna, Hossain, et Kocerha 2019; S. Zhang *et al.* 2021). Miravirsén, le premier miARN à être entré en phase clinique en 2013 est actuellement en phase 2, et tous les autres sont en développement préclinique ou en phase 1.

A ce jour, aucun miARN « médicament » n'est en phase clinique pour une utilisation contre la tuberculose. Cependant, la recherche pour des thérapie basées sur les petits ARN et les miARN afin de traiter d'autres pathologies montre le potentiel de l'utilisation des miARN en tant que médicaments (Yong Fu, Chen, et Huang 2019), et certains miARN impliqués dans la tuberculose pourraient s'avérer intéressants dans la lutte contre la maladie (pour revue (Sabir *et al.*, 2018)).

6.6 Implication des miARN en tuberculose

Les miARN ont majoritairement été étudiés pour leur utilisation en tant que biomarqueurs de la maladie. Grâce à leur petite taille, les miARN sont stables et relativement résistants contre l'action des RNAses (Gupta, Bang, et Thum 2010). Il a de plus été montré que les miARN du plasma et sérum résistent à plusieurs cycles de congélation/décongélation, et sont stables pendant 24 h à température ambiante (Mitchell *et al.* 2008).

Des études réalisées sur du sérum de patients tuberculeux ont révélé que Mtb modifie le profil d'expression de nombreux miARN. Les études fonctionnelles permettant de déterminer le contrôle des miARN sur la réponse de la cellule hôte infectée sont plus rares et l'étendue de leur fonction dans le contexte de la maladie reste encore largement à explorer. Dans les chapitres suivants, ne seront présentés que les miARN pour lesquels un rôle fonctionnel a été identifié au cours de l'infection avec Mtb.

6.6.1 Les miARN impliqués dans l'apoptose et l'autophagie

La phagocytose et l'autophagie sont deux mécanismes efficaces dans l'élimination de Mtb. Ainsi les stratégies développées par Mtb pour contourner ces défenses impliquent également la modulation de la transcription des miARN de l'hôte (Flores-Valdez, Segura-Cerda, et Gaona-Bernal 2018; J. Lee, Hartman, et Kornfeld 2009).

En accord avec son rôle anti-inflammatoire permissif à l'infection, miR-223 inhibe l'apoptose en ciblant l'ARNm codant pour FOXO3 (Xi *et al.* 2015, 3). MiR-889 inhibe l'apoptose par son interaction avec TWEAK (TNF weakly inducer of apoptosis) (D.-Y. Chen *et al.* 2020).

En utilisant la lignée monocyttaire THP-1 infectée par Mtb, Tripathi *et al.* ont montré que l'inhibition de l'apoptose est médiée par l'axe miR-let-7b et son gène cible *FAS*, facilitant ainsi la survie de Mtb (Tripathi, Srivastava, et Singh 2018). De plus, l'expression de miR-let-7b est par ailleurs utilisée comme un biomarqueur fiable de l'infection (Henan *et al.* 2016).

L'expression de miR-30a est induite chez les patients TB et dans les THP-1 infectés avec Mtb. MiR-30a s'hybride à la région 3'-UTR de l'ARNm codant pour la Bécline-1, une protéine dont le rôle est clé dans la formation de l'autophagosome. La surexpression de miR-30a inhibe donc l'autophagie (Z. Chen *et al.* 2015).

La surexpression de miR-17-5p inhibe l'expression des gènes *Mcl-1* et *Stat3* dans les macrophages murins (R. Kumar *et al.* 2016). La protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde induite, *Mcl-1*, régule négativement Bécline-1. De ce fait, miR-17-5p réprime l'action inhibitrice de *Mcl-1* sur Bécline-1 et promeut à la fois l'autophagie et l'apoptose. Mtb entraîne l'inhibition de miR-17-5p dans les RAW264,7 et les macrophages murins primaires, ce qui faciliterait sa survie (R. Kumar *et al.* 2016).

MiR-144-3p et miR-144-5p répriment tous deux l'autophagie en régulant des cibles différentes (Guo *et al.* 2017; J. K. Kim *et al.* 2016, 2; Lv *et al.* 2016). En plus d'être surexprimé dans le sérum des patients, miR-144-5p l'est également dans leurs poumons et dans les nodules lymphatiques. Dans les monocytes primaires humains, il a été montré que ce miARN inhibe l'autophagie en interagissant directement avec l'ARNm de l'activateur autophagique DRAM2 (DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 2), (J. K. Kim *et al.* 2016). MiR-144-3p réprime aussi ce processus, cette fois en ciblant le gène de la protéase ATG4A (Autophagy Related 4A Cysteine Peptidase) qui est nécessaire à l'autophagie (Guo *et al.* 2017). Bien qu'il

soit surexprimé dans le sérum et les crachats de patients (Lv *et al.* 2016), miR-144-3p est sous exprimé dans les macrophages primaires humains (Guo *et al.* 2017). Dans ces cellules, il cible directement l'expression de la kinase MAP3K8 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 8) qui participe à la réponse pro-inflammatoire en induisant la voie de signalisation ERK, via la phosphorylation de ERK1/2. Ainsi la levée des inhibitions d'ATG4A et de MAP3K8 subséquente à la sous expression de miR-144-3p entraîne l'induction de l'autophagie et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Guo *et al.* 2017).

MiR-33-3p et miR-33-5p sont deux miARN surexprimés au cours de l'infection dans les macrophages péritonéaux murins et dans les cellules de la lignée humaine monocyttaire THP-1 différenciée en macrophages (Ouimet *et al.* 2016). Ces deux miARN ciblent directement la région 3'-UTR de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie *i.e.* : ATG12, ATG5, LC3B, et permet l'activation de FOXO3 et TFEB, deux facteurs de transcription positivement impliqués dans la régulation de l'autophagie (Ouimet *et al.* 2016).

MiR-1958 inhibe également l'autophagie en ciblant le gène *Atg5* dans les RAW264.7 (Ding *et al.* 2019). Dans les RAW264.7 également, miR-129-3p a été identifié comme inhibiteur de l'autophagie, cette fois par une régulation directe d'ATG4b (Qu *et al.* 2019).

MiR-125a-3p cible l'ARNm codant pour la protéine associée à la résistance aux rayons UV (UVRAG) (J. K. Kim *et al.* 2015). UVRAG s'associe à la Bécline-1 et à la kinase associée à la Bécline-1, PIK3C3/Vps34, pour former un complexe impliqué dans la formation de l'autophagosome (Song, Quach, et Liang 2020). Ainsi, dans les macrophages infectés avec *Mtb*, la surexpression de miR-125a-3p inhibe l'autophagie et la maturation du phagosome (J. K. Kim *et al.* 2015).

MiR-27a a été décrit à la fois comme surexprimé ou réprimé dans les macrophages humains primaires (Brace *et al.* 2017; Furci *et al.* 2013; Ni *et al.* 2014) et surexprimé dans le sérum des patients tuberculeux (Feng Liu *et al.* 2018). Durant l'infection avec *Mtb*, miR-27a réprime l'autophagie par inhibition directe de l'expression de CACNA2D3, un transporteur de Ca²⁺ situé dans le réticulum endoplasmique. De plus, l'inhibition de miR-27a dans les souris infectées favorise la survie de *Mtb* (Feng Liu *et al.* 2018).

De façon intéressante, les miARN impliqués dans l'induction de l'activation alternative des macrophages sont souvent également impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et

l'autophagie.

6.6.2 Les miARN impliqués dans la réponse anti-inflammatoire au cours de l'infection

L'implication des miARN dans la régulation de la polarisation des macrophages et de la réponse inflammatoire induite par les pathogènes, notamment *Mtb*, est très documentée (pour revues ([Alipoor et al., 2020](#); [Behrouzi et al., 2019](#); [Kim et al., 2017](#); [Rajaram Ruiz-Tagle et al.](#); [Sabir et al., 2018](#); [Singh et al., 2021](#); [Wei and Schober, 2016](#))). Parmi les miARN qui favorisent l'activation alterne des macrophages, miR-132-3p, miR-20b, miR-26a, miR-let7, miR-223, miR-30a et miR-144-3p sont régulés au cours de l'infection avec *Mtb* ([M. Kumar et al. 2015](#); [Fen Liu et al. 2015b](#); [Lou et al. 2017](#); [Tripathi, Srivastava, et Singh 2018](#); [Zhuang Guoqing et al. 2012](#)) et sont surexprimés dans le sérum des patients tuberculeux par rapport aux individus sains ([Z. Chen et al. 2015](#); [Henan et al. 2016](#); [J. K. Kim et al. 2016](#); [H.-Y. Liu 2016](#); [Xi et al. 2015](#); [X. Zhang et al. 2013](#); [M.-L. Zheng, Zhou, et Luo 2016](#)).

[Ni et al., \(2014\)](#) ont démontré que l'induction de l'expression conjointe de miR-132-3p et de miR-26a par l'infection de macrophages primaires humains avec *Mtb* régule négativement l'inflammation en réprimant l'expression du co-activateur de transcription EP300, intervenant dans la cascade de signalisation de l'IFN- γ . Chez les patients tuberculeux, [Qi et al., \(2012\)](#) ont observé que miR-26a est surexprimé dans le sérum. Néanmoins, [Kleinsteuber et al. \(2013\)](#) ont observé que miR-26a est sous exprimé dans cellules myéloïdes circulantes des patients tuberculeux. Les mêmes auteurs ont montré que l'inhibition de miR-26a entraîne la surexpression d'un autre de ses gènes cibles, *KLF4* (Kruppel-like factor 4), un facteur de transcription nécessaire à l'activation alterne.

L'effet anti-inflammatoire de miR-20b est médié par l'inhibition de la voie Nlrp3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) /caspase-1/Il-1 β par interaction directe avec *Nlrp3* chez les souris infectées ([Lou et al. 2017](#)). Nlrp3 est une protéine activatrice de l'inflammasome ([Swanson, Deng, et Ting 2019](#)). Au cours de l'infection, la répression de l'inflammasome, permise par la surexpression de miR-20b, est accompagnée d'une régulation à la hausse des marqueurs de polarisation de type M2 ([Lou et al. 2017](#)).

MiR-223 est surexprimé dans le sang des patients tuberculeux et cette surexpression est également observée dans les macrophages primaires humains infectés ([Dorhoi et al., 2013](#);

Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011). Dans les modèles murins de tuberculose, miR-223 cible les gènes *Cxcl2*, *Ccl3* et *Il6* et inhibe donc le recrutement des autres cellules immunitaires, et plus généralement la réponse pro-inflammatoire. De plus, les souris déficientes pour miR-223 meurent rapidement des dommages causés par une inflammation exacerbée dans les poumons suite à l'inoculation de Mtb, ce qui démontre l'importance de maintenir des signaux de type M2 dès le début de l'infection (Y. Liu *et al.* 2015).

MiR-let-7f est également impliqué dans la régulation de cytokines pro-inflammatoires, mais cette fois avec une action positive médiée par l'inhibition directe de l'ARNm du gène *A20*, un inhibiteur de la voie NF- κ B dans les macrophages RAW264.7 infectés par Mtb (M. Kumar *et al.* 2015). La survie de Mtb est atténuée dans les macrophages déficients pour *A20*, et la production de médiateurs de l'immunité contre Mtb (TNF, IL-1 β , et NO) est inhibée (M. Kumar *et al.* 2015).

MiR-32-5p et miR-1178 sont induits par l'infection avec Mtb dans les lignées monocytaires humaines THP-1 et U937. Ils ciblent respectivement l'ARNm du gène *TLR4* (Shi *et al.*, 2018) et du gène *FSTL-1* (Follistatin-like protein 1) (Zhang *et al.*, 2017) codant pour une cytokine impliquée dans la polarisation de type M1 (G. Li *et al.* 2020). Indirectement, par le biais de *TLR4* et *FSTL-1*, la surexpression de miR-32-5p régule négativement l'expression de cytokines pro-inflammatoires *i.e.* IL-1 β , IL-6 et TNF- α ou IFN- γ , et celle de miR-1178 favorise la survie de Mtb (G. Shi *et al.* 2018; Z.-M. Zhang *et al.* 2017, 1).

MiR-33-3p et miR-33-5p joueraient un rôle dans la différenciation des macrophages spumeux. En effet, une étude de Quimet *et al.* a montré en 2016 que les macrophages issus de la moelle osseuse de souris déficientes pour le locus de miR-33 stockent beaucoup moins de gouttelettes lipidiques que les macrophages des souris sauvages.

Afin de maintenir un niveau d'inflammation suffisant pour conserver un effet bactéricide, tout en limitant ses effets délétères sur les tissus, la réponse inflammatoire doit être très finement régulée. Comme il a été décrit plus tôt dans ce manuscrit, des boucles de régulation négative sont mises en place dans les macrophages de type M1 pour éviter une exacerbation de l'inflammation. La régulation exercée par les miARN n'est donc pas épargnée par la nécessité de protéger l'hôte d'une inflammation disproportionnée. En ce sens, miR-155, miR-125a et miR-146a, identifiés comme ayant une influence au cours de l'infection, possèdent la double fonction d'activer à la fois la réponse de type M1 et celle de type M2.

Les deux miARN les plus étudiés pour leurs effets opposés sur la polarisation des macrophages au cours de l'infection par Mtb sont miR-125b et miR-155. MiR-125b inhibe l'expression d'IRF4 dans les macrophages, et sa surexpression potentialise l'activation des macrophages en réponse à l'IFN- γ , favorisant la polarisation de type M1 (Chaudhuri *et al.* 2011). L'expression de miR-125b est augmentée dans le sérum de patients tuberculeux (Yurong Fu *et al.* 2011) et dans les macrophages humains primaires infectés (Brace *et al.* 2017). Un rôle concomitant de miR-125b et miR-155 a été observé par Rajaram *et al.* (2011) dans les macrophages humains primaires infectés avec Mtb. En effet, l'exposition des macrophages à des Lipomannanes de Mtb entraîne la surexpression de miR-125b alors que miR-155 est au contraire sous exprimé. Cette double régulation a pour conséquence de diminuer la production de TNF- α . Il semblerait donc que l'effet pro-inflammatoire de miR-125b, décrit hors contexte infectieux, soit détourné par Mtb et potentiellement par des voies régulées par la sous expression de miR-155 dans ces conditions. Il est possible que cet effet soit également médié par la seule sous expression de miR-155. Toutefois, l'action de miR-155 est très discutée au cours de l'infection, et ses propriétés pro-inflammatoires sont très documentées (pour revue : [Mahesh and Biswas, 2019](#)). En effet, non seulement l'expression de miR-155 est plus élevée dans les macrophages de type M1 par rapport aux macrophages de types M2 (Yingying Zhang *et al.* 2013), mais elle est également positivement liée à celle des marqueurs de type M1 *e.g.* le TNF- α et la chimiokine CXCL9 (Graff *et al.* 2012). De plus chez la souris, miR-155 réprime l'expression du gène *Mafb*, un facteur de transcription favorisant la polarisation de type M2 (Hartman *et al.*, 2017), et cible directement le récepteur du M-CSF, ce qui renforce son effet inhibiteur de la polarisation de type M2 (Riepsaame *et al.* 2013). En cohérence avec ses propriétés pro-inflammatoires, Iwai *et al.* ont montré un effet protecteur *in vivo* de miR-155 contre l'infection Mtb, dans un modèle de souris déficientes pour ce miARN. Les souris déficientes pour miR-155 meurent plus vite que les souris sauvages (Iwai *et al.* 2015). Néanmoins, Rothchild *et al.* ont montré que les souris déficientes pour miR-155 arrivent mieux à contenir l'infection dans les étapes précoces, durant lesquelles miR-155 aurait un effet anti-inflammatoire. Ainsi miR-155 possède un rôle ambivalent chez la souris, désavantageux dans les phases précoces de la maladie, puis protecteur dans les phases tardives. L'effet protecteur *in vivo* dans les phases tardives de l'infection ne serait pas lié à la réponse des macrophages mais plutôt à une induction de la survie des lymphocytes T (Rothchild *et al.* 2016). L'effet délétère dans les phases précoces de miR-155 pourrait être lié à ses propriétés anti-

inflammatoires dans les macrophages. MiR-155 cible directement le gène d'ATG3 codant pour une protéine essentielle à la formation de l'autophagosome et sa la fusion avec le lysosome (Etna *et al.* 2018). Il inhibe également la production de NO en s'hybridant au MRE de l'ARNm codant pour C/EBP β (CAAT/enhancer binding protein β), un activateur de NOS2 (Qin *et al.* 2016). MiR-155 cible Bach1 (BTB and CNC homology 1), un facteur qui inhibe l'hème oxygénase-1 et augmente par conséquent la production de monoxyde de carbone, un activateur des gènes impliqués dans le ralentissement du métabolisme de Mtb (Shiloh, Manzanillo, et Cox 2008). MiR-155 réprime également l'expression de SHIP1 (Src homology 2-containing inositol-5'-phosphatase 1) qui induit l'activation subséquente de la sérine thréonine kinase AKT nécessaire à l'activation alternative (Kumar *et al.*, 2012). L'effet de miR-155 reste donc encore à élucider et semble dépendre des modèles utilisés et de la cinétique de l'infection. Enfin dans la plupart des études *in vitro* et *in vivo*, miR-155 est surexprimé dans les macrophages humains et murins suite à l'infection avec Mtb (que ce soit avec la souche virulente H37Rv ou la souche hyper-virulente HN878) ou avec la souche de *Mycobacterium bovis* atténuée utilisée dans le vaccin BCG (Furci *et al.* 2013; 2013; Qin *et al.* 2016; Rajaram *et al.* 2011; L. Zheng *et al.* 2015). Néanmoins, les études mesurant les niveaux d'expression de miR-155 dans le sérum des patients tuberculeux sont encore aujourd'hui opposées et donc controversées (J. Huang *et al.* 2015) (Wagh, Urhekar, et Modi 2017).

MiR-146a est un autre miARN dont le rôle au cours de l'infection n'est pas clair. Les miR-146-a et -b sont connus pour leur action inhibitrice de la polarisation de type M1. MiR-146a réprime la signalisation du TLR4 (Curtale *et al.* 2013; Vergadi *et al.* 2014) en inhibant directement la traduction des acteurs pro-inflammatoires IRAK1, IRAK2 et TRAF6, (Hou *et al.* 2009, 2; Taganov *et al.* 2006). La surexpression de miR-146a dans les macrophages alvéolaires murins inhibe l'expression des gènes *Traf6* et *Irf5* ainsi que celle de *Nos2* et favorise la polarisation de type M2 (Vergadi *et al.* 2014). De plus, bien qu'il ne soit pas parfaitement caractérisé, l'effet anti-inflammatoire de miR-146a via la régulation de PPAR γ est démontré (C. Huang *et al.* 2016). MiR-146a est surexprimé dans le sang périphérique de patients tuberculeux (Furci *et al.* 2013). Il favorise à la fois la polarisation de type M1 et celle de type M2 dans les THP-1 infectées avec *Mycobacterium bovis* (souche BCG). Sa surexpression réprime l'expression du gène de la prostaglandine synthase, PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), dont le rôle est pro-inflammatoire et, paradoxalement, facilite

l'élimination des bactéries. Parallèlement, miR-146a inhibe l'expression du TNF α selon une boucle de régulation négative (Z. Liu *et al.* 2014). Encore une fois, les effets paradoxaux de miR-146a soulignent l'importance d'équilibrer les signaux d'activation classique et alterne pour obtenir une réponse protectrice contre l'infection.

Les divergences pointées par l'analyse du rôle des miARN en fonction des modèles cellulaires étudiés, sur la régulation et le type de réponse inflammatoire des macrophages, montre l'importance et l'impact que le choix du modèle est crucial. Il est donc nécessaire de caractériser au mieux la réponse inflammatoire déclenchée par l'infection dans ces modèles, afin de mimer au plus juste celle qui a lieu chez le patient TB.

7. Objectif des travaux de recherche

La tuberculose peut être considérée comme une maladie liée à une défaillance du système immunitaire lors de la primo-infection. En effet, seuls 70% des individus infectés parviennent à éradiquer *Mtb* dès les premières phases de l'infection. L'infection pérenne s'installe malheureusement chez 30% des individus infectés, lorsque leur système immunitaire n'est pas assez efficace pour éliminer immédiatement *Mtb* et tente plutôt de contenir l'infection à l'intérieur des granulomes, qui prend alors une forme latente. Chez les sujets les plus affaiblis (5 à 10%), la maladie se développe en tuberculose active. *Mtb* parvient alors à surmonter la réponse immunitaire de l'hôte, les granulomes se rompent, le bacille se dissémine dans les voies aériennes (D. Young, Hussell, et Dougan 2002).

De manière générale, la réponse immunitaire contre les infections fait tout d'abord intervenir l'immunité innée, puis, 4 à 7 jours après, l'immunité adaptative (Charles A Janeway *et al.* 2001). L'immunité contre *Mtb* ne déroge pas à cette règle, cependant, *Mtb* parvient à retarder la mise en place de l'immunité, si bien que, durant les quatre à six premières semaines de l'infection, la défense repose principalement sur le premier maillon de la chaîne : le macrophage (Wolf *et al.* 2008). Le macrophage joue un rôle clé dans le succès ou l'échec de la réponse immunitaire. En tant que première cellule infectée et réservoir principal de *Mtb*, la réponse inflammatoire qu'il déclenche est maître d'orchestre dans l'activation et la coordination des autres acteurs de l'immunité innée et adaptative (Upadhyay, Mittal, et Philips 2018). En manipulant la réponse du macrophage, et notamment l'expression de ses miARN, *Mtb* parvient alors à échapper à une éradication précoce et à entrer dans un état

métabolique qui lui assure protection contre les défenses immunitaires et les traitements antibiotiques (Rao Muvva *et al.* 2020; A. K. Singh *et al.* 2021). L'efficacité de l'antibiothérapie utilisée à ce jour n'est pas optimale : le traitement est long, l'assiduité des patients est compromise et des souches de Mtb résistantes aux antibiotiques se développent (Diseases 2021).

Pour répondre au challenge causé par la persistance de Mtb, un fort intérêt est porté sur : *i)* la découverte de thérapies dirigées par l'hôte afin d'améliorer la réponse immunitaire et d'optimiser l'efficacité des vaccins et *ii)* la découverte de composés antituberculeux actifs contre les bactéries persistantes. Le macrophage étant à la fois hôte principal de Mtb et générateur de bactérie persistantes, la compréhension et la caractérisation de sa réponse inflammatoire sont alors déterminantes dans l'avancée de la recherche. C'est donc dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de recherche.

Mon travail s'est articulé autour de trois principaux axes :

- 1- Quelles modifications transcriptionnelles de la réponse inflammatoire sont spécifiquement induites par la virulence de Mtb et quelles sont les voies de signalisation associées ?
- 2- Quel est le rôle de miR-132-3p (identifié dans l'axe 1) dans la réponse des macrophages durant l'infection ?
- 3- La réponse inflammatoire des macrophages dans les modèles classiques utilisés *in vivo* et *in vitro* est-elle fidèle à la réponse observée chez les patients ?

C. Résultats et discussion

1. Article 1

1.1 Introduction

Les souches cliniques de Mtb les plus virulentes provoquent, dans le macrophage, une réaction inflammatoire moins protectrice que celle provoquée par les souches moins virulentes (Coscolla et Gagneux, 2014). De ce fait, le succès de l'infection est lié à la capacité de Mtb à diminuer l'efficacité de la réponse inflammatoire des macrophages.

La première partie de mes travaux de recherche a été dédiée à identifier ce qui différencie, du point de vue de la réponse de l'hôte, une souche Mtb virulente par rapport à des mycobactéries non virulentes chez l'Homme.

J'ai étudié comment la souche virulente de laboratoire H37Rv modifie l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et plus généralement dans la réponse de l'hôte ; j'ai caractérisé les régulations qui font de cette réponse une réponse unique par rapport à deux souches non virulentes : M. marinum et H37Ra. J'ai ainsi identifié trente gènes potentiellement impliqués dans la virulence de Mtb. Afin de quantifier précisément et simultanément 184 gènes de la réponse inflammatoire, de façon sensible et reproductible pour tous les échantillons, j'ai utilisé la RT-qPCR (Real time quantitative polymerase chain reaction) en temps réel.

Pour enrichir la compréhension du réseau de régulation, j'ai également quantifié l'expression des miARN dans les macrophages infectés avec H37Rv et identifié *in silico*, lesquels constituaient des régulateurs, potentiels ou validés expérimentalement, des 30 gènes liés à la virulence. La quantification des miARN a été effectuée par RT-qPCR sur des plaques commerciales dédiées, permettant de quantifier simultanément 754 miARN humains. J'ai ainsi identifié 37 miARN significativement modulés dans les macrophages infectés par H37Rv. L'analyse *in silico* intégrative que j'ai ensuite réalisée a permis de révéler des réseaux d'interaction entre les miARN et les gènes liés à la virulence, et d'apporter ainsi une meilleure compréhension de la réponse du macrophage à H37Rv.

En effet, les gènes et miARN mis en évidence par mon étude pourraient être médiateurs de la virulence de Mtb et constituer, directement ou indirectement via les voies dans lesquelles ils interviennent, des cibles pertinentes pour une thérapie dirigée par l'hôte.

Les principaux résultats de cette première partie sont présentés sous la forme d'un article intitulé « *Integrative analysis of human macrophage inflammatory response related to Mycobacterium tuberculosis virulence* » qui a été publié dans le journal « *Frontiers Immunology* » en juin 2021 et que je signe en première auteure.

Integrative analysis of human macrophage inflammatory response related to *Mycobacterium tuberculosis* virulence

Pauline Bade^{1,2}, Fabrizio Simonetti², Stephanie Sans², Patricia Laboudie², Khadija Kissane², Nicolas Chappat², Sophie Lagrange², Florence Apparailly¹, Christine Roubert², # and Isabelle Duroux-Richard^{1, #, *}

¹IRMB, INSERM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France

²Evotec ID (Lyon), SAS, 1541, Avenue Marcel Merieux, Marcy l'Etoile 69280, France

*Correspondence: Isabelle Duroux-Richard isabelle.richard@inserm.fr

These authors contributed equally to this work

Keywords: miRNA, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, macrophage, host response, inflammatory response, virulence.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, kills 1.5 to 1.7 million people every year. Macrophages are Mtb's main host cells and their inflammatory response is an essential component of the host defense against Mtb. However, Mtb is able to circumvent macrophage defenses and thus trigger an inappropriate inflammatory response. Mtb's ability to hinder phagolysosome maturation and acidification, and escape the phagosome into the cytosol is closely linked to its virulence. The modulation of the host inflammatory response is specific of Mtb virulence factors, but remains poorly studied. So, understanding macrophage interactions with Mtb is crucial in order to develop strategies to control tuberculosis. In this study, we compared the inflammatory response and miRNome of human macrophages infected with either the virulent H37Rv, a heat killed Mtb strain (HKMT) or the *M. marinum* species, to identify genetic networks specifically modulated by Mtb virulence. Using the THP-1 cell line differentiated into macrophages and infected with two different live strains of mycobacteria (Mtb H37Rv and *M. marinum*), we quantified and analyzed 93 inflammatory mRNAs and 765 micro(mi)RNAs using Taqman miRNA and mRNA arrays. We identified genes that were differently modulated by H37Rv in comparison with the two other conditions and also matched the deregulated miRNAs with their targets among the H37Rv-specific signature using the IPA software. We identified 34 host inflammatory response

genes and 32 deregulated miRNAs specific for H37Rv infection. Overall, our data and analysis suggest that H37Rv might ensure a long intracellular survival by regulating genes and miRNA that inhibit a pro-inflammatory polarization and favor TH2 dependent macrophage alternative activation, while extending their lifetime by repressing apoptosis.



Integrative Analysis of Human Macrophage Inflammatory Response Related to *Mycobacterium tuberculosis* Virulence

OPEN ACCESS

Edited by:

Sangeeta Tiwari,
The University of Texas at El Paso,
United States

Reviewed by:

Anthony George Tsolaki,
Brunel University London,
United Kingdom
Vinod Kumar,
Radboud University Nijmegen Medical
Centre, Netherlands

*Correspondence:

Isabelle Duroux-Richard
isabelle.richard@inserm.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 15 February 2021

Accepted: 07 June 2021

Published: 28 June 2021

Citation:

Bade P, Simonetti F, Sans S,
Laboudie P, Kissane K, Chappat N,
Lagrange S, Apparailly F, Roubert C
and Duroux-Richard I (2021)
Integrative Analysis of Human
Macrophage Inflammatory Response
Related to *Mycobacterium*
tuberculosis Virulence.
Front. Immunol. 12:668060.
doi: 10.3389/fimmu.2021.668060

Pauline Bade^{1,2}, Fabrizio Simonetti², Stephanie Sans², Patricia Laboudie²,
Khadija Kissane², Nicolas Chappat², Sophie Lagrange², Florence Apparailly¹,
Christine Roubert^{2†} and Isabelle Duroux-Richard^{1*†}

¹ Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy (IRMB), INSERM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France,
² Evotec ID (Lyon), Lyon, France

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the etiological agent of tuberculosis, kills 1.5 to 1.7 million people every year. Macrophages are Mtb's main host cells and their inflammatory response is an essential component of the host defense against Mtb. However, Mtb is able to circumvent the macrophages' defenses by triggering an inappropriate inflammatory response. The ability of Mtb to hinder phagolysosome maturation and acidification, and to escape the phagosome into the cytosol, is closely linked to its virulence. The modulation of the host inflammatory response relies on Mtb virulence factors, but remains poorly studied. Understanding macrophage interactions with Mtb is crucial to develop strategies to control tuberculosis. The present study aims to determine the inflammatory response transcriptome and miRNome of human macrophages infected with the virulent H37Rv Mtb strain, to identify macrophage genetic networks specifically modulated by Mtb virulence. Using human macrophages infected with two different live strains of mycobacteria (live or heat-inactivated Mtb H37Rv and *M. marinum*), we quantified and analyzed 184 inflammatory mRNAs and 765 micro(mi)RNAs. Transcripts and miRNAs differently modulated by H37Rv in comparison with the two other conditions were analyzed using in silico approaches. We identified 30 host inflammatory response genes and 37 miRNAs specific for H37Rv virulence, and highlight evidence suggesting that Mtb intracellular-linked virulence depends on the inhibition of IL-1 β -dependent pro-inflammatory response, the repression of apoptosis and the delay of the recruitment and activation of adaptive immune cells. Our findings provide new potential targets for the development of macrophage-based therapeutic strategies against TB.

Keywords: miRNA, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum*, macrophage, host response, inflammatory response, virulence

INTRODUCTION

Tuberculosis is one of the top 10 causes of death (1) and, right after COVID-19 (2), is the world's deadliest infection caused by a single infectious agent: *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (3). Mtb is responsible for 1.5 to 1.7 million deaths each year, but unlike COVID-19, is more prevalent in low and middle income countries (4). Active tuberculosis infection (ATBI) is characterized by replicating and metabolically active bacteria and causes severe lung lesions while latent tuberculosis infection (LTBI) remains asymptomatic. Seventy percent of newly infected individuals efficiently clear the bacteria. However, for the remaining 30%, the immune system is only able to contain, but not to eradicate the bacteria (5). These people develop LTBI that can persist for their entire lifetime (6). However, approximately 5 to 10% of LTBI evolve into ATBI when the immune system is no longer able to constrain Mtb (5). The ability of Mtb to persist for so long in the host is due to its ability to hijack host defense mechanisms by converting macrophages into a permissive cellular niche (7, 8).

Macrophages are first-line antimicrobial cells in our body. They play a key role during Mtb infection by triggering an arsenal of immune responses (7). Macrophages are the most abundant cell type within the site of infection and represent the primary host cells for Mtb (9). Depending on the polarization of their immune response, macrophages ability to fight Mtb differs. Classically activated (M1-like) macrophages trigger a Th1 pro-inflammatory response and help to eliminate the bacteria. Alternatively, activated (M2-like) macrophages trigger a Th2 anti-inflammatory response and become long term hosts (10–13). Many studies describe a strong pro-inflammatory response promoting M1-like polarization, immediately after Mtb infection, followed later by a shift to an anti-inflammatory response and M2-like polarization (14–17). However, pro-inflammatory mechanisms do not always kill the bacteria and anti-inflammatory mechanisms are not always protective for the host. Inability to orchestrate a protective inflammatory response leads to poor clinical outcome (9). This might be the reason why innate immunity is often related to genetic susceptibility to tuberculosis (18–20) and why cytokine signaling and inflammation pathways are found to be the most induced processes during the infection (21, 22). MicroRNAs (miRNAs) are critical regulators of the fine-tuning of cytokine signaling, macrophage polarization, and inflammation. They are small endogenous non-coding RNA molecules, acting mainly as post-transcriptional repressors by targeting mRNAs on their 3'UTR (23–27). Several studies have explored the roles of host miRNAs in tuberculosis and showed that Mtb infection modifies the miRNome of macrophages (28–31). Mtb might thus influence the macrophage inflammatory response by modulating their miRNAs expression.

Mtb encompasses a group of genetically related species (named the Mtb complex) that are highly contagious airborne mycobacterial strains and can cause tuberculosis in humans (32). *Mycobacterium (M.) marinum* is one of the most closely related mycobacterium species to the Mtb complex and a commonly used pertinent intracellular infection model. Indeed,

both thrive in the same macrophage compartments (33) and their survival in the immature phagosome is made possible through pathogen-dependent inhibition of phagosome-lysosome fusion. Then, both Mtb and *M. marinum* use the ESX-1 secretion system to escape the phagosome into the cytosol and thus to circumvent macrophage defenses (34–39). Cutaneous lesions caused either by Mtb or *M. marinum* form similar granulomas in humans (40), suggesting that they trigger comparable immune responses. The *M. marinum* ESX-1 system however confers reduced virulence, compared to that of Mtb (41), and human granulomatous lesions are less severe than those caused by Mtb infection (42). This suggests that phagosome escape is not the only cause of mycobacterial virulence. After phagosomal escape, Mtb must be able to reprogram macrophages' defenses in a way that favors its virulence in humans in a more effective way than *M. marinum*.

Recent studies have indicated that genetic diversity within the Mtb complex can influence host inflammatory response to infection and during tuberculosis disease (43). Because Mtb strains that diminish protective cytokine secretion show enhanced virulence (44, 45), the present study aims at identifying how the virulent Mtb strain H37Rv specifically reprograms the inflammatory transcriptome and related miRNAs of macrophages in comparison with less virulent Mtb strains, compared with *M. marinum*. We thus compared macrophages' inflammatory transcriptomes following infection with either the virulent Mtb strain H37Rv, *M. marinum* or the heat killed avirulent H37Ra strain (HKMT). *M. marinum* infection was used to filter the response specific for H37Rv with a less, yet virulent mycobacterial strain, which is also able to escape the phagosome and to trigger a cytosolic immune response. We used HKMT infection as a way to focus on both post-phagocytosis changes and to identify changes related to human-specific pathogen recognition. Indeed, in contrast to H37Rv, macrophages successfully eliminate HKMT in their phagolysosomes (46). As a macrophage model, we used PMA-differentiated THP-1 cells since they display similar properties compared to human monocyte-derived macrophages during Mtb infection (47). We identified an H37Rv-specific signature of inflammatory genes. We also identified a miRNA-based signature following H37Rv infection and provide potential mRNA/miRNA circuits related to H37Rv virulence in the context of the macrophage inflammatory response.

MATERIALS AND METHODS

Mycobacterial Strains and Cultures

We used fluorescent H37Rv and *M. marinum* strains that were both obtained as a kind gift from IPBS, Toulouse. H37Rv and *M. marinum* cultures were grown at 37°C or 33°C, respectively, and 5% CO₂ in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% Middlebrook Oleic Albumin Dextrose Catalase (Difco, Livonia, MI). Cultures were grown to a mid-log phase (optical density 600 [OD₆₀₀] of 0.6), then frozen with 10% glycerol at –80°C in 1.5 ml aliquots prior to infection. Heat inactivated H37Ra (HKMT) was purchased from Invivogen.

Cell Cultures

The human monocytic cell line THP-1 cells (TIB-202) were purchased from ATCC. Cells were cultured in 24 well plates (Corning) and differentiated into THP-1 derived macrophages 24 hours prior to infection with 40 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in RPMI 1640 Medium GlutaMAXTM Supplement (Gibco) at 37°C and 5% CO₂. Experiments were realized within 15 passages and cell viability was measured before experiments by trypan blue exclusion and was greater than 97%. CD14⁺ primary human monocytes were extracted from peripheral blood of 5 healthy donors anonymously provided by the French Blood Establishment (EFS, Lyon). CD14⁺ monocytes were purified from whole blood using an autoMACS[®] Pro Separator, Whole Blood Column Kit and StraightFrom[®] Whole Blood CD14 MicroBeads (Mitenyi) according to the manufacturer's instructions. Cell viability was measured before proceeding to macrophage differentiation, by trypan blue exclusion and was always greater than 80%. CD14⁺ monocytes were then plated in 24 well plates (Corning) at a density of 400 000 cells per well and differentiated into macrophages for 5 days prior to infection with 50 µg/ml Rh-GM-CSF (Miltenyi) in RPMI 1640 Medium GlutaMAXTM Supplement (Gibco) with 10% FBS (Sigma-Aldrich) at 37°C, 5% CO₂.

Infections

Macrophages were infected with H37Rv or *M. marinum* at a multiplicity of infection (MOI) of 1:1 for 1 hour and at an MOI of 4: 1 for 3 hours, respectively, in RPMI 1640 medium GlutaMAXTM Supplement with 10% HiFBS. Macrophages stimulation with HKMT was performed with 50 µg/ml of HKMT for 3 hours in RPMI 1640 medium GlutaMAXTM Supplement with 10% HiFBS. Cells were then rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to remove extracellular mycobacteria and further cultured in RPMI 1640 medium GlutaMAXTM Supplement with 10% HiFBS for 48 hours before RNA extraction. Uninfected cells were handled in the same conditions as infected cells and served as controls.

Gene and miRNA Profiling

Total RNA including miRNAs was extracted 2 days post-infection. Briefly, to protect RNA from degradation, macrophages were rinsed with PBS, then scraped with Maxwell[®] RSC miRNA Tissue Kit homogenization solution/thioglycerol (50/1) (Promega). Followed 10 min of incubation with Maxwell[®] RSC miRNA Tissue Kit lysis buffer (Promega), cells and bacteria were lysed by bead beating into Matrix B tubes containing silica beads (MP Biomedical) with the Super-Fast Prep-1 instrument (MP Biomedical). Finally, samples were processed into a Maxwell[®] RSC instrument for RNA extraction. RNA concentration was measured with QIAxpert System (Qiagen) and RNA integrity was evaluated by automated electrophoresis with TapeStation Systems (Agilent). Reverse transcription of total mRNA or miRNAs were performed with 500 ng total RNA using SuperScriptTM IV VILOTM Master Mix or a TaqmanTM microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), respectively. qPCR amplifications were run with a QuantStudioTM 12K Flex system (Applied Biosystems) and using

a customized TaqMan[®] Array (Table S1 in Supplementary Material) for mRNAs and the TaqMan[®] Array Human MicroRNA Card Set v3.0 dispatched in two pools: highly characterized miRNAs (pool A) and more recently discovered miRNAs (pool B) (Applied Biosystems) for miRNAs, according to the manufacturer's instructions.

Data and Statistical Analysis

The data was analyzed using the ThermoFisher ConnectTM online application (ThermoFisher). The mRNA content relative to the secreted proteins was normalized to GAPDH and GUSB expression, that of the receptors was normalized to GAPDH and TBP expressions and miRNA content was normalized using the global normalization method. Then, relative expression and expression fold changes were calculated following the ΔCt and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methods, respectively. Briefly: $\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{endogenous\ control}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ treated\ sample - \Delta Ct\ untreated\ control$. Heatmaps and principal components analysis (PCA) were generated with Clustvis online software (48). All miRNA and gene Taqman Low Density Array data are available from the ncbi database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE165327>. Genes and miRNAs interactions were further explored with the Ingenuity SystemsTM Pathways Analysis (IPA) tool (<http://www.ingenuity.com>). We used GraphPad Prism 8 for statistical analysis. Student's t-test was used on ΔCt to compare treated samples to their controls and on $\Delta\Delta Ct$ to compare H37Rv-infected PMA differentiated THP-1 to H37Rv-infected CD14⁺ (monocyte-derived macrophages) MDM responses. ANOVA with multiple comparisons were used on $\Delta\Delta Ct$ to compare H37Rv-infected macrophages to *M. marinum*-infected macrophages and to HKMT-stimulated macrophages. PCA and hierarchical or unsupervised clustering were performed using Clustvis online software with the correlation distance method and average linkage. Relative gene expression or gene expression fold changes as indicated were centered and unit variance scaled. Imputation was used for missing value estimation.

RESULTS

Infection With Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Leads to a Specific Deregulation of Macrophage Host Response-Related Genes

To compare the host inflammatory response induced by macrophages upon infection with a virulent or non-virulent mycobacterial strain, we used PMA-differentiated THP-1 cells as a human macrophage model and infected them with either the virulent H37Rv strain, or the occasional human pathogen *M. marinum* and the avirulent heat killed Mtb (HKMT). In this first attempt to dissect the host response associated with specific Mtb virulence, we decided to use the classical laboratory strain H37Rv as a surrogate for Mtb strains. Using RT-qPCR arrays, the host inflammatory response was evaluated by quantifying the expression level of 184 genes designed to encompass the full

landscape of host immune responses (Table S1 in Supplementary Material). Among the 184 mRNAs tested, 98 genes were detectable (Ct values < 32) in THP-1, including 14 interleukins, 11 interleukin receptors, 23 chemokines, 12 chemokine receptors, 6 interferons, 2 interferon receptors, 11 tumor necrosis factor (TNF) superfamily members, 12 TNF receptors and 7 toll-like receptors (Table S2 in Supplementary Material). We used principal component analysis (PCA) and unsupervised hierarchical clustering to visualize the relationships between the three sample groups, based on the expression of these genes. PCA analysis displayed 60.5% of the dataset on the two principal components (Figure 1A), which was representative of the sample distribution. Interestingly, PCA showed that expression profiles obtained with *M. marinum* infection and HKMT stimulation were similar, as their distribution overlapped, and that both were very different from H37Rv infection. This was confirmed by the unsupervised hierarchical

clustering analysis (Figure 1B). H37Rv-infected samples were found further from controls compared to the other two conditions on the PCA and heatmap (Figures 1A, B), showing that infection with H37Rv induced more drastic changes than the other two experimental conditions.

First, we assessed which genes are differentially expressed between uninfected and infected conditions. The UpSet diagram (49) represents the intersection between the three sets of differentially expressed genes (DEGs) from the three infections (Figure 1C). The data indicate that H37Rv infection significantly deregulated 71 DEGs, whereas both other conditions only modulated 48 DEGs. While 36 DEGs were shared between the three conditions, 25 DEGs were specific for H37Rv infection and only 5 and 6 DEGs for *M. marinum* and HKMT, respectively. Overall, our data showed that H37Rv infection induced greater changes to the host response, with more DEGs and higher fold changes.

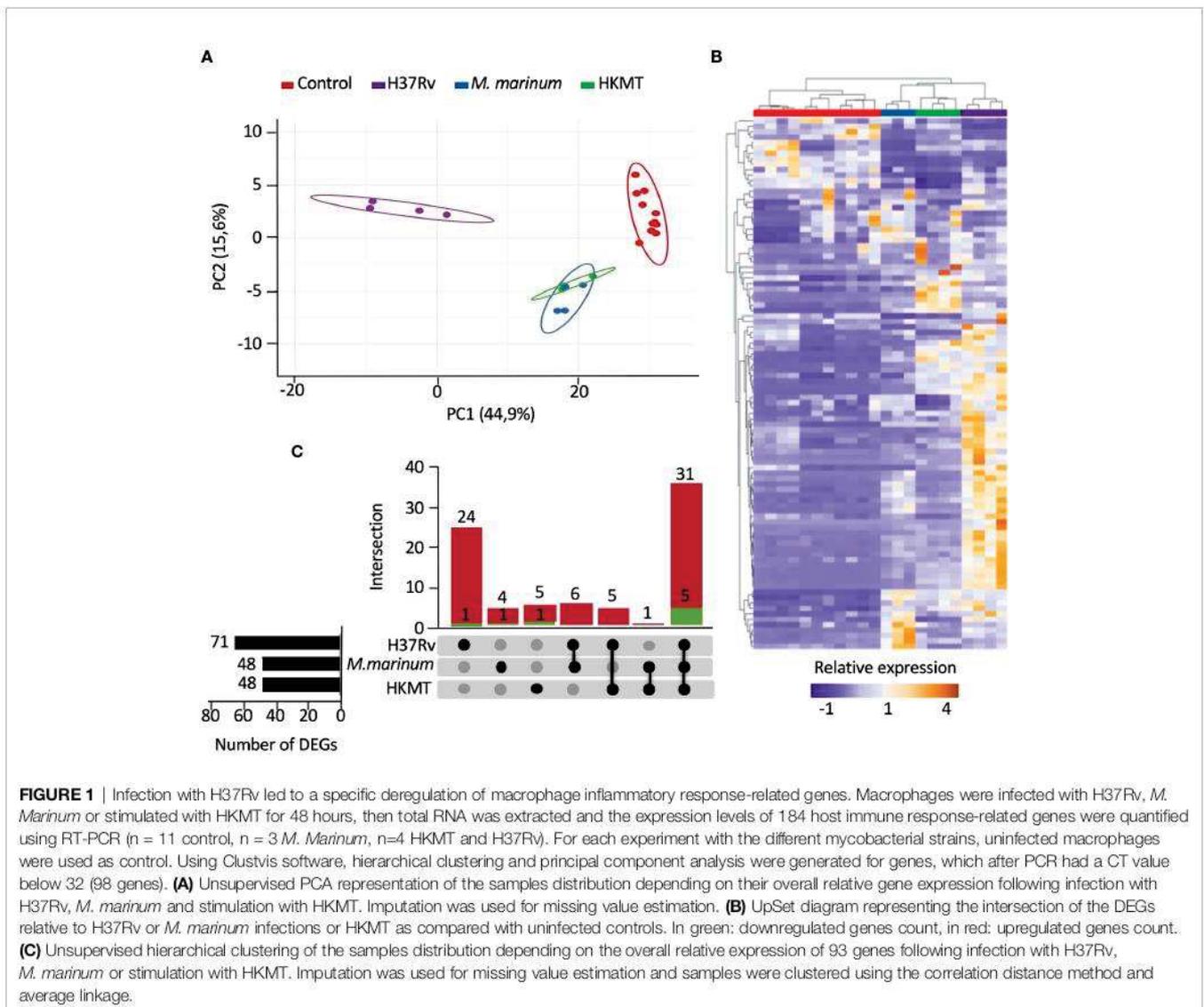


FIGURE 1 | Infection with H37Rv led to a specific deregulation of macrophage inflammatory response-related genes. Macrophages were infected with H37Rv, *M. Marinum* or stimulated with HKMT for 48 hours, then total RNA was extracted and the expression levels of 184 host immune response-related genes were quantified using RT-PCR (n = 11 control, n = 3 *M. Marinum*, n=4 HKMT and H37Rv). For each experiment with the different mycobacterial strains, uninfected macrophages were used as control. Using Clustvis software, hierarchical clustering and principal component analysis were generated for genes, which after PCR had a CT value below 32 (98 genes). **(A)** Unsupervised PCA representation of the samples distribution depending on their overall relative gene expression following infection with H37Rv, *M. marinum* and stimulation with HKMT. Imputation was used for missing value estimation. **(B)** UpSet diagram representing the intersection of the DEGs relative to H37Rv or *M. marinum* infections or HKMT as compared with uninfected controls. In green: downregulated genes count, in red: upregulated genes count. **(C)** Unsupervised hierarchical clustering of the samples distribution depending on the overall relative expression of 93 genes following infection with H37Rv, *M. marinum* or stimulation with HKMT. Imputation was used for missing value estimation and samples were clustered using the correlation distance method and average linkage.

Second, to identify how macrophages specifically respond to H37Rv, we compared the expression levels of all DEGs from the three infections (Table 1 and Figure 2A). For each DEG, we considered that the expression was specific for H37Rv infection if the fold change versus *M. marinum* or HKMT was greater than or equal to 2 and p-value < 0.05. Among the 25 DEGs specific for H37Rv, six genes [CCL17, CCL24, PPBP (CXCL7), CXCR5, CCR9 and TLR7] were significantly deregulated following H37Rv infection only and not in the other two conditions. On the other hand, IL24, IL31RA and TNFSF14 were not significantly deregulated by H37Rv, whereas they were deregulated by HKMT, *M. marinum*, and both, respectively (Table S2 in Supplementary Material).

The majority of the genes that had an expression level specific for H37Rv infection belonged to the common DEGs induced by the three pathogens. Indeed, the H37Rv-specific host response led to a more drastic deregulation of 12 genes by either inducing upregulation of CCR7, IL1R1, TNFRSF9, TNFRSF18, IL1R2, CCL7,

IL10, TNFRSF14, CXCL2, CXCL3, CCL2 and IL15RA or inducing downregulation of CCL21. CCR7 and IL23R both ranked as the first and second most upregulated genes, with fold changes equal to 19 and 115 for CCR7, and 50 and 123 for IL23R, respectively. TLR7 and CCL21 were the only two downregulated genes following H37Rv infection with respect to the uninfected controls. In addition, both genes were even more downregulated when comparing infection with H37Rv and with *M. marinum* or HKMT. CCL21 ranked as the most downregulated gene with a 16-fold downregulation in H37Rv infection as compared with the other two conditions. H37Rv-infection of macrophages did not always lead to extreme expression profiles. Indeed, CXCL11, TNFSF13B, TNFSF10, IL31RA, CXCL9, CXCL10, CCL8 expressions were intermediate, all downregulated as compared with *M. marinum* infection and upregulated as compared with HKMT stimulation. Overall, the H37Rv-specific host inflammatory response included 30 genes (Figure 2A and Table 1). Finally, we validated this finding in primary human

TABLE 1 | H37Rv specific host response gene set.

Gene	Gene description	H37Rv/ <i>M. marinum</i>		H37Rv/Hi-H37Ra	
		Fold change	P-value	Fold change	P-value
Genes upregulated by H37Rv as compared with <i>M. marinum</i> and HKMT					
IL23R	interleukin 23 receptor	49.44	<0.001	123.00	<0.001
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	48.62	0.001	115.06	<0.001
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	8.77	<0.001	8.51	<0.001
TNFSF14 ^(a)	tumor necrosis factor superfamily member 14	8.21	0.001	5.11	0.002
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	8.19	0.001	3.32	<0.001
TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	7.22	0.001	6.81	0.001
CCL17 ^(a)	C-C motif chemokine ligand 17	6.79	0.027	7.52	0.016
PPBP ^(a)	pro-platelet basic protein	5.19	0.013	6.11	0.005
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	4.87	0.017	6.87	0.004
CCR9 ^(a)	chemokine (C-C motif) receptor 9	4.69	0.047	6.52	0.014
CCL7	C-C motif chemokine ligand 7	4.63	0.013	45.49	<0.001
IL24 ^(c)	interleukin 24	4.41	0.005	4.77	0.002
TNFSF9 ^(b)	tumor necrosis factor superfamily member 9	3.99	0.001	3.40	0.002
IL10	interleukin 10	3.94	<0.001	2.65	0.000
TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14	3.75	0.001	4.69	<0.001
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	3.51	0.005	3.42	0.004
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	3.51	0.004	3.43	0.002
CCL24 ^(a)	C-C motif chemokine ligand 24	2.96	0.012	4.50	0.001
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	2.79	0.024	5.92	0.001
IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	2.34	0.032	7.33	<0.001
CXCR5 ^(a)	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	2.04	0.021	2.06	0.017
Genes with intermediate expression: <i>M. marinum</i> H37Rv HKMT					
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	0.42	0.036	26.83	<0.001
CCL8	C-C motif chemokine ligand 8	0.09	0.002	13.57	0.001
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9	0.18	0.003	12.39	<0.001
TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	0.36	0.050	12.33	<0.001
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	0.15	0.001	10.11	<0.001
TNFSF13B	tumor necrosis factor superfamily member 13b	0.37	0.001	4.85	0.001
IL31RA ^(d)	interleukin 31 receptor, alpha	0.27	0.004	3.88	0.003
Genes downregulated by H37Rv as compared with <i>M. marinum</i> and HKMT					
TLR7 ^(a)	toll-like receptor 7	0.26	0.004	0.31	0.009
CCL21	C-C motif chemokine ligand 21	0.06	0.001	0.06	0.001

^(a) Deregulated by H37Rv only; ^(b) deregulated by H37Rv and HKMT; ^(c) deregulated by HKMT only; ^(d) deregulated by *M. marinum* only; ^(e) deregulated by HKMT and *M. marinum*. One hundred and eighty-four host immune response-related genes were quantified in RT-qPCR in THP-1 derived macrophages following two days infection with H37Rv (n=4), *M. marinum* (n=3), or two days stimulation with HKMT (n=4). Genes showing significantly different expression levels following H37Rv infection as compared with *M. marinum* infection and HKMT stimulation were identified using one-way ANOVA and multiple comparisons on $\Delta\Delta Ct$.

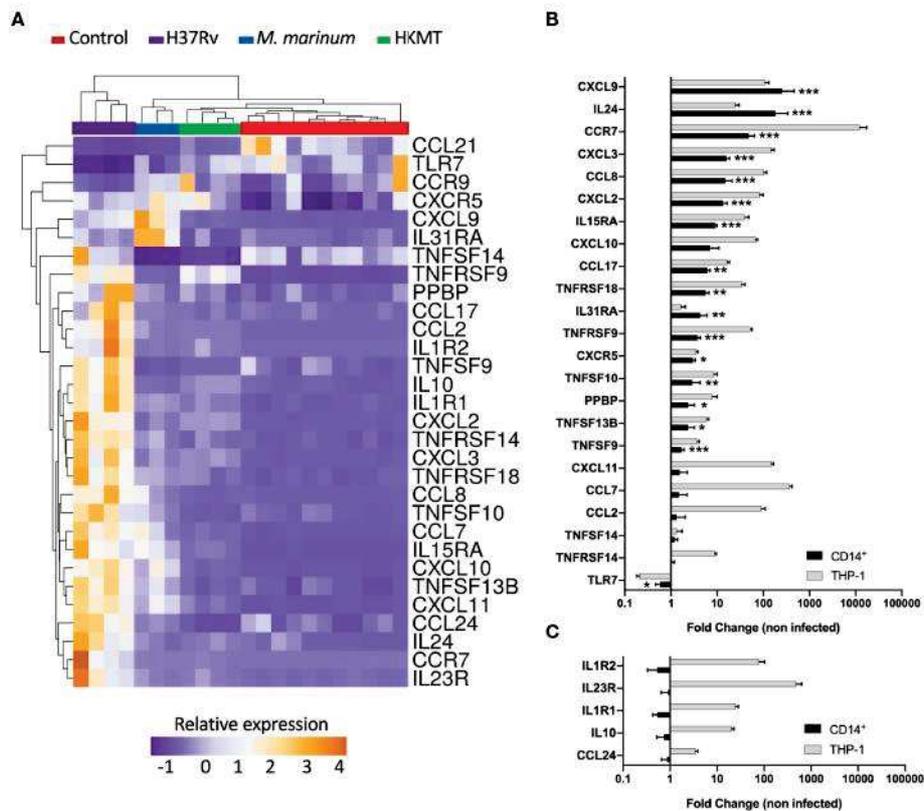


FIGURE 2 | Infection with H37Rv led to a specific and significantly different host inflammatory response. **(A)** THP-1 differentiated into macrophages were infected with H37Rv, *M. Marinum* or stimulated with HKMT for 48 hours, then total RNA was extracted and the expression level of the 184 host immune response-related genes were quantified using RT-PCR ($n = 11$ control, $n = 3$ *M. marinum*, $n = 4$ HKMT and H37Rv). For each experiment with the different mycobacterial strains, uninfected macrophages were used as control, independently. Using Clustvis software, a supervised hierarchical clustering was generated for the 98 genes with CT value below 32. Supervised hierarchical clustering of macrophage samples distribution depending on the relative expression of genes that were significantly deregulated by H37Rv infection as compared with both *M. marinum* infection and HKMT stimulation. Statistical analysis was performed on $\Delta\Delta Ct$ using ANOVA and multiple comparisons. Imputation was used for missing value estimation. Samples were clustered using the correlation distance method and average linkage. **(B, C)** THP-1 and CD14⁺ MDM were infected with H37Rv for 48 hours, then total RNA was extracted and the expression level of the 30 H37Rv-specific host inflammatory response was quantified using RT-PCR ($n = 4$). Graphs represent gene expression fold change compared to uninfected cells. Statistical analysis was performed on $\Delta\Delta Ct$ using Student's t-test. *p value < 0.05, **p value < 0.01, ***p value < 0.001.

macrophages. Using RT-qPCR, we quantified the expression level of the 30 H37Rv-specific genes in Mtb-infected macrophages differentiated from blood CD14⁺ monocytes of healthy donors. Results showed that expression levels were comparable between the human THP-1 macrophage cell line and primary macrophages for more than 80% of the genes (**Figure 2B**). Only 5 out of 30 genes did not show the same variation (**Figure 2C**). While *IL1R2*, *IL23R*, *IL1R1*, *IL-10*, and *CCL24* were highly upregulated upon infection of THP-1 macrophages, their expression was barely affected upon infection of primary macrophages.

H37Rv Infection Leads to the Modulation of 37 miRNAs

To further decipher virulence-mediated changes in the host response, we performed a global miRNA profiling of H37Rv-infected macrophages (**Figure 3, Table 2**). Of the 765 human miRNAs analyzed, up to 54.8% were detectable with a CT value <

32. When considering a fold change > 2 and a p-value < 0.05, 37 miRNAs were significantly deregulated following H37Rv infection as compared to the uninfected controls. Quantification of human miRNA expression levels showed that 17 miRNAs were upregulated and 20 were downregulated. As miRNAs belonging to the same family or cluster suggests that they co-regulate the same biological pathway, it seems relevant to highlight that, among the 37 differentially expressed miRNAs, there were two miRNA families: miR-30 family (miR-30a and miR-30b) and miR-181 family (miR-181a-1-3p and miR-181a-2-3p). We also observed that the miR-132/212 cluster was significantly increased. Using a miRNome published dataset of CD14⁺ isolated from the blood of TB patients (GSE70425), we compared the expression levels of the 37 H37Rv-related miRNAs between Mtb-infected THP-1 and primary CD14⁺. Results showed that 80% of miRNAs displayed comparable expression levels between both conditions (**Figure S1 in Supplementary Material**).

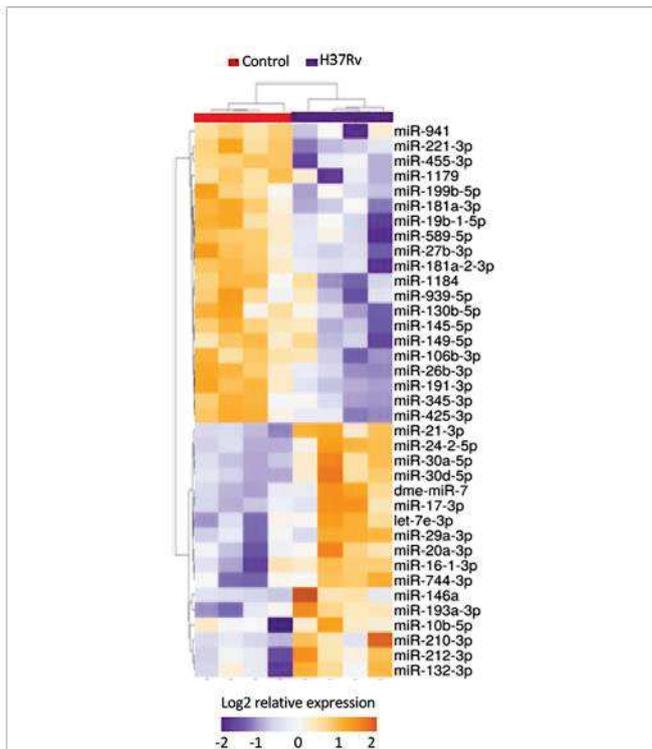


FIGURE 3 | Expression levels of miRNAs significantly deregulated after H37Rv infection. THP-1 differentiated into macrophages were infected with H37Rv for 48 hours ($n = 4$). After total RNA including small RNA extraction, the expression level quantification of 762 human miRNAs was performed using TaqMan[®] Array Human MicroRNA Card. Using Clustvis software, a supervised hierarchical analysis of the distribution of macrophage samples based on relative log2 expression of 37 miRNAs significantly modified by H37Rv infection compared to uninfected controls. Statistical analysis was performed on Δ Ct using Student's *t* test to identify the differently expressed miRNAs compared with uninfected controls. Imputation was used for missing value estimation. Samples were clustered using the correlation distance method and average linkage.

mRNA/miRNA Inflammatory Pathways Specific for H37Rv

To identify predicted target genes and related pathways and to provide experimentally verified information on miRNA-target interactions, we performed an automated text-mining search analysis. The thirty seven miRNAs identified as dysregulated in H37Rv-infected macrophages were examined using miRWalk database (50). We found between 11 and 699 putative target genes for each of the 37 miRNAs. We applied a filter consisting in identifying genes targeted by at least 3 miRNAs and found 320 genes (Table S3 in Supplementary Material). Using the Enrich database (51), gene ontology analysis revealed significant pathways with high Enrich combined score level such as cell cycle, FoxO signaling and P53 pathway with adjusted *p*-values 3.710^{-7} , 1.110^{-5} and 6.210^{-5} , respectively (Table S4 in Supplementary Material). Interestingly, we found that 28 genes were targeted by at least five miRNAs (Table S3 in grey color) and almost 70% of them have already been described as involved in *Mtb* infection (Table S3 in Supplementary

TABLE 2 | H37Rv mediated miRNA deregulation.

miRNA ID	H37Rv/Ctrl	
	Fold Change	P-value
dme-miR-7-5p	6.69	0.012
hsa-miR-21-3p	4.51	0.001
hsa-miR-146a-5p	3.37	0.004
hsa-miR-29a-5p	3.34	0.045
hsa-miR-17-3p	3.26	0.032
hsa-miR-212-3p	2.9	0.002
hsa-miR-10b-5p	2.86	0.018
hsa-miR-24-2-5p	2.72	0.001
hsa-miR-16-1-3p	2.66	0.026
hsa-miR-132-3p	2.44	0.010
hsa-miR-744-3p	2.2	0.024
hsa-miR-210-3p	2.15	0.015
hsa-miR-30a-5p	2.14	0.001
hsa-let-7e-3p	2.13	0.014
hsa-miR-193a-3p	2.11	0.010
hsa-miR-30d-5p	2.07	0.003
hsa-miR-20a-3p	2.01	0.020
hsa-miR-27b-3p	0.49	0.001
hsa-miR-345-5p	0.45	0.006
hsa-miR-19b-1-5p	0.45	0.014
hsa-miR-1179	0.44	0.022
hsa-miR-589-5p	0.43	0.018
hsa-miR-145-5p	0.38	0.001
hsa-miR-130b-5p	0.35	0.013
hsa-miR-181a-3p	0.35	0.004
hsa-miR-941	0.35	0.036
hsa-miR-106b-3p	0.35	0.013
hsa-miR-455-3p	0.34	0.002
hsa-miR-181a-2-3p	0.31	0.007
hsa-miR-26b-3p	0.29	0.001
hsa-miR-939-5p	0.28	0.048
hsa-miR-425-3p	0.25	0.005
hsa-miR-191-3p	0.24	0.001
hsa-miR-149-5p	0.24	0.011
hsa-miR-221-3p	0.23	0.001
hsa-miR-1184	0.23	0.036
hsa-miR-199b-5p	0.15	0.004

THP-1 derived macrophages were infected with H37Rv strain ($n=4$). Two days post-infection, total RNA including small RNA was extracted. Using TaqMan[®] Array Human MicroRNA Cards, the quantification of 765 human miRNAs was performed simultaneously by RT-qPCR method. Statistical analysis was performed on Δ Ct using Student's *t*-test to identified DEGs as compared to the uninfected controls.

Material). The *HSPA1B* gene, also called *HSP72*, is targeted by 9 miRNAs, and the two genes *LDLR* and *NUFIP2* are targeted by 7 miRNAs. The integrative analysis of the 30 and 37 H37Rv-specific host inflammatory response genes and miRNAs, respectively, has been carried out to find possible relationships. In this attempt, we used the Ingenuity Pathway Analysis software program, associated with a miRNA target filter analysis, to identify miRNA-target genes and mRNA-mRNA interactions (Figure 4). miR-939-5p, miR-1184, miR-20a-3p, miR-193a-3p, miR-345-p, miR-26b-3p, miR146a-5p, miR-941, miR589-5p, miR-130b-5p, miR-27b-3p, miR-221-3p, miR-744-3p, miR-425-3p, miR-132-3p, miR-181a-1-3p, miR-181a-2-3p, miR-19b-1-5p, miR-30a-5p, miR-1179, miR-455-3p, miR-199b-5p and miR-21-3p, all targeted at least one inflammatory response genes related to *Mtb* virulence. Together, these 23 miRNAs might regulate 21 of the 34 H37Rv-specific genes: *CCL21*,

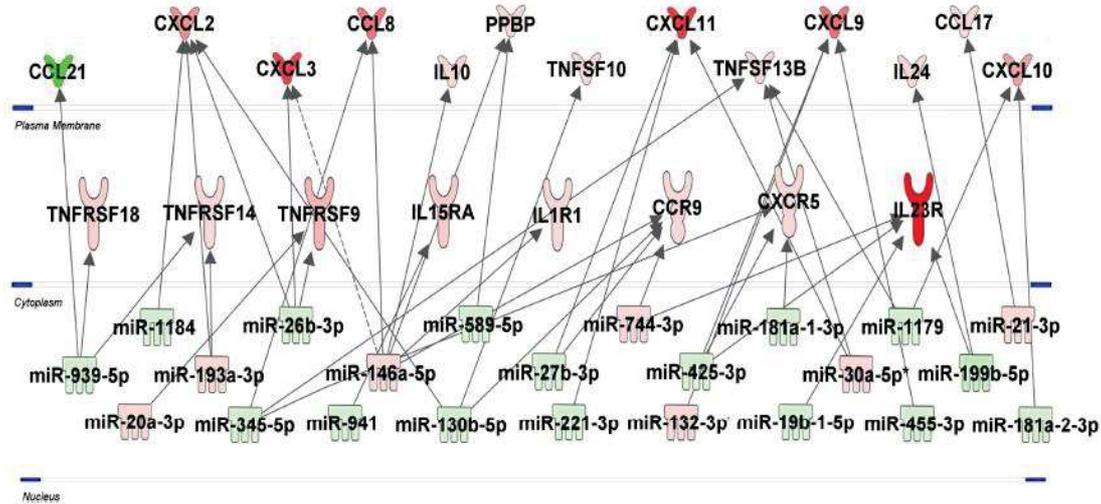


FIGURE 4 | miRNA-mRNA networks generated with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for H37Rv-infected human macrophages. IPA analysis was performed to investigate the connection between the 30 and 37 H37Rv-specific host inflammatory response gene set and miRNAs, respectively. Filters were set to only include experimentally observed or high-confidence-predicted miRNA-mRNA interaction partners. Genes and miRNAs were colored in red or green depending on whether they were upregulated or downregulated (respectively) with respect to their uninfected controls and the shading intensity shows to what degree each miRNA or gene was deregulated. Direct and indirect miRNA-gene interactions are represented with a solid and dotted lines, respectively.

CXCL2, *CXCL3*, *CCL8*, *IL10*, *PPBP*, *TNFSF10*, *CXCL11*, *TNFSF13B*, *CXCL9*, *IL24*, *CCL17*, *CXCL10*, *TNFRSF18*, *TNFRSF14*, *TNFRSF9*, *IL15RA*, *IL1R1*, *CCR9*, *CXCR5* and *IL23R*. Some miRNAs targeted more than 3 genes and thus might be more involved in the H37Rv-specific host inflammatory response than others. MiR-939-5p, miR-345-5p, miR-130b-5p, miR-425-5p, miR-26b-3p targeted 3 to 4 H37Rv-specific host inflammatory response genes and miR-146a targeted 6 genes. The most targeted H37Rv-specific host inflammatory response genes were *CXCL2*, *CXCL11*, *CCR9*, *TNFSF13B*, *CXCL9* and *IL23R*. miR-939-5p, miR-1184, miR-345-5p, miR-26b-3p, miR-941, miR-589-5p, miR-130b-5p, miR-27b-3p, miR-221-3p, miR-425-3p, miR-181a-1-3p, miR-19b-1-5p, miR-1179, miR-455-3p, miR-199b-5p and miR-181a-2-3p targeted *TNFRSF18/TNFRSF14*, *CXCL2*, *CCL8/TNFSF13B/CXCR5*, *CXCL2/CXCL3/TNFRSF9*, *IL15RA*, *PPBP*, *CXCL2/TNFSF10/CCR9*, *CXCL11/CCR9*, *CXCL11*, *CXCL9/CXCR5/IL23R*, *CXCR5*, *IL23R*, *TNFSF13B/CXCL10*, *CXCL9*, *IL23R/IL24* and *CXCL10* with negative correlations (i.e. downregulated miRNAs correlated to upregulated genes), respectively. Altogether, 61% of the H37Rv-specific host inflammatory response gene set was targeted by 62% of the H37Rv deregulated miRNAs.

DISCUSSION

Macrophages are the primary host for Mtb and their inflammatory response is critical for the infection outcome (9). Although Mtb and *M. marinum* can both circumvent the phagolysosome fusion and escape to the cytosol, Mtb remains more virulent than *M. marinum* in humans. We hypothesized

that Mtb virulence is enhanced by its capacity to alter the host inflammatory response. We sought to identify H37Rv-specific mRNA and miRNA genes, to identify pathways of the macrophage inflammatory response that might be related to Mtb virulence. As a model for human macrophages, we used the PMA-differentiated THP-1 cell line (47) to compare the transcriptomic changes induced in the inflammatory response by either H37Rv, *M. marinum* or HKMT. We identified 30 genes and 37 miRNAs that were differently expressed upon H37Rv infection and studied their relationships and associated cellular signaling pathways. Importantly, at least 80% of the H37Rv-specific genes and miRNAs identified with the THP1 model are confirmed in primary macrophage cells, validating our experimental approach.

Our unbiased analysis of the H37Rv-related miRNAs with their target genes experimentally validated, revealed their involvement in Mtb infection. HSP72 and LDLR were the most targeted genes by the H37Rv-specific miRNAs. These genes are involved in the interaction between neutrophils and macrophages during the early phase of the innate immune response to Mtb infection (52) as well as in the control of infectious load and infection-induced changes in lipid metabolism (53), respectively.

Most of the 30 H37Rv-specific host inflammatory response genes identified in the present study are upregulated to affect positively the host-response. These genes lie into the categories of receptors and molecules involved in pro-inflammatory macrophage differentiation (54), recruitment and activation of innate and adaptive immune cells (54–68), type 1 interferon and *IFN-γ* response (69, 70, 71), and apoptosis (72). Almost 30% of those genes are found deregulated in the blood of TB patients and have already been reported to be upregulated during Mtb

infection, entailing positive effects on macrophage defense (58, 61, 66, 68, 70, 71, 73–81). Interestingly, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-345-5p and miR-939, which each target as many as 3 or 4 of the H37Rv-specific host inflammatory response genes, have been reported to be implicated in TB or other cellular processes that are or might be relevant to TB. Our IPA analysis of the H37Rv-specific host inflammatory response genes and miRNAs allowed us to identify strong links between Mtb virulence and these genes, as well as their associated pathways.

Focusing on genes that might benefit or alter macrophages defenses, and pathways in which genes are most targeted by identified miRNAs, we then tried to understand how H37Rv circumvents the macrophage inflammatory response (Figure 5). Among the strongest H37Rv-specific host genes/miRNAs displaying inverse expression levels, *CXCL2* is over-expressed following H37Rv infection, and targeted by 3 miRNAs (miR-1184, miR-26b-3p and miR-130b-5p). It has been shown that blocking *CXCL2* expression significantly reduces Mtb-induced, but not *M. bovis* BCG-induced, IL-1 β secretion through the NLRP3-dependent inflammasome (76, 82), implying that its regulation is related to Mtb virulence. The pro-inflammatory cytokine IL-1 β is essential for Mtb control, responsible for activation, for classical inflammatory polarization of macrophages, and takes part in many defense mechanisms against Mtb including ROS production (83, 84). Sustained upregulation of IL-1 β leads to detrimental effects of exacerbated inflammation and is associated with TB severity

and immunopathology (85–87). The downregulation of miR-1184, miR-26b-3p and miR-130b-5p expressions by H37Rv, might favor *CXCL2* upregulation and the subsequent IL-1 β production. In addition, the expression level of *TNFRSF18*, which is expressed on macrophages, and functions as an inflammatory enhancer by promoting the activation of the NLRP3 inflammasome (88), is inversely correlated with that of miR-939-3p. Interestingly, miR-939-3p directly inhibits iNOS in mouse macrophages (89). iNOS exerts a strong bactericidal activity against Mtb, while preventing an excess of inflammation by inhibiting NLRP3-dependent IL-1 β production and the NF- κ B pathway (90–92). Moreover, miR-26b-3p, which is thought to participate in NLRP3-dependent IL-1 β production through regulation of *CXCL2*, has been shown to participate in the inflammatory response of LPS-stimulated alveolar macrophages by modulating the NF- κ B pathway by regulating PTEN (83). Finally, miR-939-3p and miR-26b-3p, found downregulated in H37Rv-infected macrophages, suggests that NF- κ B plays an important role in H37Rv virulence probably through a dialog involving the NLRP3 inflammasome (84, 85). As for many regulatory mechanisms involved in inflammation, these H37Rv-specific gene/miRNA interactions controlling IL-1 β might benefit both the macrophage and H37Rv, and highlight the crucial implication of IL-1 β -related pathways and the control of pro-inflammatory activation in the virulence of Mtb.

Durable Mtb survival is only possible if their host-cells do not trigger cell death. In the early infection, apoptosis has been

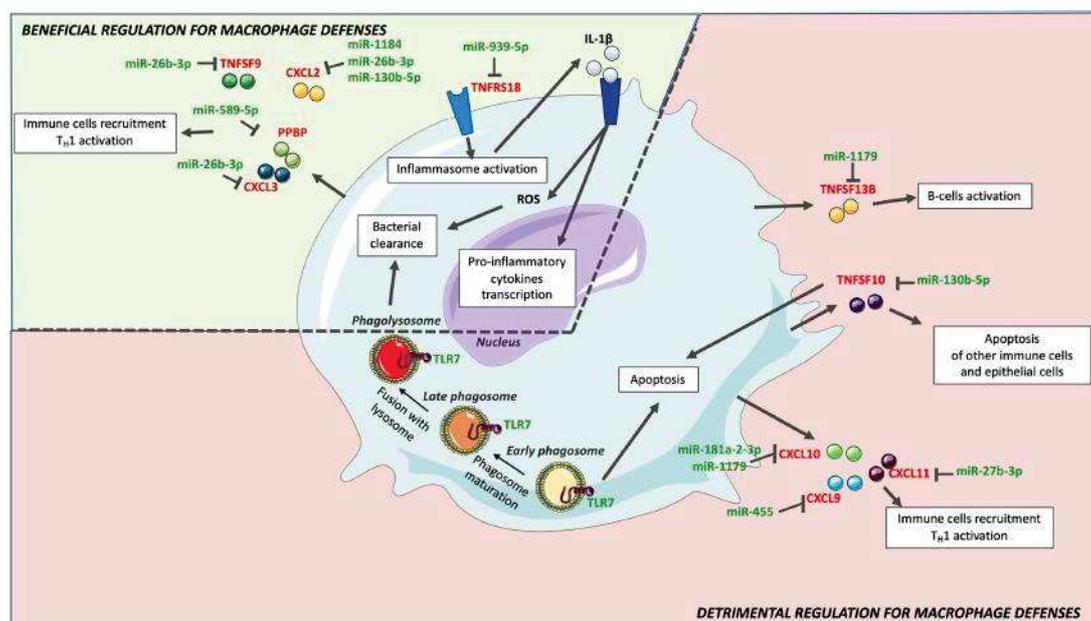


FIGURE 5 | H37Rv-specific macrophage inflammatory response genes and associated miRNAs. Upon H37Rv infection, macrophages upregulated *CXCL2*, *CXCL3*, *IL24*, *PPBP*, *TNFRSF18* and *TNFSF9*, which have a beneficial effect on macrophages defense against Mtb. Downregulation of miR-19b-1-5p, miR-26b-3p, miR-130b-5p, miR-939-5p, miR-589-5p and miR-1184 might however limit the expression of these genes. Although H37Rv led to upregulation of *CCL8*, *CCL17*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *TNFSF10* and *TNFSF13B*, their expression levels were significantly lower than that induced by *Mm*-infection. Hence, H37Rv mediated lower expression of these genes might rather be detrimental for macrophage defense. Their expression might be limited by miR-27b-3p, miR-130b-5p, miR-181a-2-3p, miR-425p, miR-455 and miR-1179.

shown to be detrimental for Mtb to establish a long-term infection (86). *TNFSF10*, previously reported to be strongly induced by Mtb infection (87), prevents alveolar epithelial cell-mediated wound repair by inducing their apoptosis (93). These data suggest that *TNFSF10* could promote fibrosis of the external layers of the granuloma and favor both the containment and the protection of the bacteria. *TNFSF10* is putatively targeted by miR-130b-5p, which is downregulated in H37Rv-infected macrophages in the present study. In addition to the fact that this miRNA has already been shown to be downregulated in Mtb-infected primary human macrophages (94), P Ahluwalia et al. propose that miR-130b is involved in M1/M2 macrophages plasticity and Mtb survival (95). The expression of *TLR7*, an endosomal receptor expressed by macrophages to detect microbes single stranded RNA (96) and trigger apoptosis (97), is not modulated by *M. marinum* but significantly downregulated by H37Rv, which could also be beneficial for Mtb adaptation to the intracellular life survival process. Moreover, predicted miRNAs associated to the regulation of H37Rv-specific host inflammatory response genes were also involved in the regulation of apoptosis. miR-27b-3p, which expression is decreased upon H37Rv infection, favors apoptosis and decreases bacterial burden in Mtb-infected mouse macrophages (98). MiR-193a-3p and miR-1184, which expressions are decreased upon H37Rv infection, and both putatively target *CXCL2*, are also involved in apoptosis. miR-193a-3p upregulation triggers apoptosis through the direct repression of Mcl-1 expression (99), while miR-1184 promotes apoptosis *via* downregulation of its target CSNK2A1 (100). Reduced expression levels of *TNFSF10*, *TLR7*, miR-27b-3p, and miR-1184, in H37Rv-infected macrophages as compared with *M. marinum*-infected cells are concordant with apoptosis being reduced in alveolar macrophages infected with the virulent H37Rv strain as compared with attenuated strains such as *M. bovis* BCG and *M. kansasii* (101). The specific inverse regulation of these genes and miRNAs induced by H37Rv might inhibit apoptosis and enhance Mtb virulence.

Another factor that promotes Mtb long-term infection as compared to other pathogens, is the delay between the activation of innate immunity and the recruitment and activation of adaptive immunity (102). The *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*/*CXCR3* axis and *TNFSF13B* play a role in both these recruitment and activation processes, responsible for attracting Th1 cells, cytotoxic lymphocytes and natural killer cells to the site of the infection, and related to B-cell activation, respectively (65). Although they were upregulated in H37Rv-infected macrophages, this upregulation was lower than that induced by *M. marinum*, suggesting that they are related to Mtb virulence. The fact that three of these genes are among the 6 most miRNA-targeted genes (i.e. *CXCL9*, *CXCL11* and *TNFSF13B*) emphasizes the importance of their role and might explain their lowered expression levels. Upregulation of miR-30a-5p and miR-30d-5p might lower the expression of *CXCL11* and *TNFSF13B*, and upregulation of miR-132-3p that of *CXCL9*. Hence, modulating the expression of those genes and miRNAs might delay the adaptive immunity response and generate

permissive conditions for Mtb survival (102). Additionally, miR-30a-5p upregulation is deleterious for Mtb-infected THP-1 cells, as it directly targets MyD88 (103), which is necessary for the establishment of a proper adaptive immune response in many pathologies (104–106). Furthermore, H37Rv-specific modulation of *CCL8*, *CCL21* and *CXCL2* might also contribute to impairing adaptive immunity. *CCL8* is involved in T-cell activation (107–109) and *CCL21* is a pro-inflammatory cytokine responsible for T-cells attraction to the lungs (110). Hence, as compared with *M. marinum* infection, lowered expression levels of *CXCL9*, *CXCL11*, *TNFSF13B* and *CCL8* and *CCL21*, as well as upregulation of *CXCL2* and miR-30a-5p, might enable H37Rv to expand its population before the burst of adaptive immunity. Consistently with our findings, Goenka et al. (111) also observed lower expression of *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* and higher expression of *CXCL2* in infant alveolar macrophage than in adult counterparts. With infant alveolar macrophages being more permissive to Mtb infection than adult macrophages (111), this is further evidence that *CXCL2*, *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11* are likely involved in Mtb virulence.

CONCLUSION

The fragile balance between beneficial and harmful induction of inflammation might confer to genes and miRNAs paradoxical effects in macrophage defense and Mtb virulence. *CXCL2* induction might both favor IL-1 β -mediated protective immunity and impair the recruitment of adaptive immunity. In the broad spectrum of macrophage polarization and corresponding inflammatory responses, Mtb intracellular-linked virulence might depend mostly on: i) the inhibition of IL-1 β -dependent pro-inflammatory polarization, ii) the repression of apoptosis, as well as iii) the delay of the adaptive immunity recruitment and activation (Figure 5). In this context, macrophage antimicrobial defenses remain low and, once activated, the adaptive immunity maintains this permissive environment.

These miRNA and gene signatures could be the hallmark of the host inflammatory response contribution to Mtb virulence and associated pathways could lead to new host directed therapies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ID-R, FA, and CR supervised the work and designed the experiments. Experimental work was performed by PB, FS, SS,

PL, KK, NC and SL. PB, FA, CR, and ID-R analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was initiated by Sanofi, funded by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier and EVOTEC ID, Lyon. PB received a fellowship from Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, convention Cifre N°2017/1678).

REFERENCES

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. *World Health Organization* (2019). Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329368>
- Diseases TLL. Tuberculosis and Malaria in the Age of COVID-19. *Lancet Infect Dis* (2021) 21:1. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30946-4
- WHO. *Global Tuberculosis Report* (2019). Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (Accessed 2 July 2020).
- Hogan AB, Jewell BL, Sherrard-Smith E, Vesga JF, Watson OJ, Whittaker C, et al. Potential Impact of the COVID-19 Pandemic on HIV, Tuberculosis, and Malaria in Low-Income and Middle-Income Countries: A Modelling Study. *Lancet Global Health* (2020) 8:e1132–41. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30288-6
- Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Bauman L, Davidson KW, Epling JW, et al. Screening for Latent Tuberculosis Infection in Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA* (2016) 316:962–9. doi: 10.1001/jama.2016.11046
- Young D, Hussell T, Dougan G. Chronic Bacterial Infections: Living With Unwanted Guests. *Nat Immunol* (2002) 3:1026–32. doi: 10.1038/ni1102-1026
- Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and Control of Granulomatous Inflammation in Tuberculosis. *Mucosal Immunol* (2011) 4:271–8. doi: 10.1038/mi.2011.14
- Schlossberg D. Acute Tuberculosis. *Infect Dis Clinics North America* (2010) 24:139–46. doi: 10.1016/j.idc.2009.10.009
- Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A Delicate Dance: Host Response to Mycobacteria. *Curr Opin Immunol* (2011) 23:464–72. doi: 10.1016/j.coi.2011.06.002
- Paige C, Bishai WR. Penitentiary or Penthouse Condo: The Tuberculous Granuloma From the Microbe's Point of View. *Cell Microbiol* (2010) 12:301–9. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01424.x
- Rubin EJ. The Granuloma in Tuberculosis — Friend or Foe? *New Engl J Med* (2009) 360:2471–3. doi: 10.1056/NEJMcibr0902539
- Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim M, Homolka S, et al. Mycobacterium Tuberculosis Wears What It Eats. *Cell Host Microbe* (2010) 8:68–76. doi: 10.1016/j.chom.2010.06.002
- Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science* (2010) 328:852–6. doi: 10.1126/science.1184784
- Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J Immunol* (2008) 181:3733–9. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733
- Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation Between the Kinetics of Th1, Th2 Cells and Pathology in a Murine Model of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Immunology* (1996) 89:26–33.
- Lugo-Villarino G, Hudrisier D, Benard A, Neyrolles O. Emerging Trends in the Formation and Function of Tuberculosis Granulomas. *Front Immunol* (2013) 3:405. doi: 10.3389/fimmu.2012.00405
- Méndez-Samperio P. Expression and Regulation of Chemokines in Mycobacterial Infection. *J Infect* (2008) 57:374–84. doi: 10.1016/j.jinf.2008.08.010
- Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu Rev Pathol Mech Dis* (2012) 7:353–84. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132458
- Low Penetrance, Broad Resistance, and Favorable Outcome of Interleukin 12 Receptor β 1 Deficiency. (Accessed 2 July 2020). Rockefeller University Press.
- Impairment of Mycobacterial Immunity in Human Interleukin-12 Receptor Deficiency. (Accessed 2 July 2020).
- Wu K, Dong D, Fang H, Levillain F, Jin W, Mei J, et al. An Interferon-Related Signature in the Transcriptional Core Response of Human Macrophages to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *PLoS One* (2012) 7:e38367. doi: 10.1371/journal.pone.0038367
- Jenner RG, Young RA. Insights Into Host Responses Against Pathogens From Transcriptional Profiling. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3:281–94. doi: 10.1038/nrmicro1126
- Eulalio A, Schulte L, Vogel J. The Mammalian MicroRNA Response to Bacterial Infections. *RNA Biol* (2012) 9:742–50. doi: 10.4161/rna.20018
- Wei Y, Schober A. MicroRNA Regulation of Macrophages in Human Pathologies. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73:3473–95. doi: 10.1007/s00018-016-2254-6
- Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell* (2009) 136:26–36. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.027
- Forster SC, Tate MD, Hertzog PJ. MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response. *Front Immunol* (2015) 6:334. doi: 10.3389/fimmu.2015.00334
- Gantier MP, Sadler AJ, Williams BRG. Fine-Tuning of the Innate Immune Response by MicroRNAs. *Immunol Cell Biol* (2007) 85:458–62. doi: 10.1038/sj.icb.7100091
- Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage Immunoregulatory Pathways in Tuberculosis. *Semin Immunol* (2014) 26:471–85. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.010
- Sabir N, Hussain T, Shah SZA, Peramo A, Zhao D, Zhou X. miRNAs in Tuberculosis: New Avenues for Diagnosis and Host-Directed Therapy. *Front Microbiol* (2018) 9:602. doi: 10.3389/fmicb.2018.00602
- Behrouzi A, Alimohammadi M, Nafari AH, Yousefi MH, Riazi Rad F, Vaziri F, et al. The Role of Host Mimas on Mycobacterium Tuberculosis. *ExRNA* (2019) 1:40. doi: 10.1186/s41544-019-0040-y
- Kim JK, Kim TS, Basu J, Jo E-K. MicroRNA in Innate Immunity and Autophagy During Mycobacterial Infection. *Cell Microbiol* (2017) 19:e12687. doi: 10.1111/cmi.12687
- Kaufmann SH. How Can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis? *Nat Rev Immunol* (2001) 1:20–30. doi: 10.1038/35095558
- Clemens DL. Characterization of the Mycobacterium Tuberculosis Phagosome. *Trends Microbiol* (1996) 4:113–8. doi: 10.1016/0966-842X(96)81528-9
- Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, et al. Disruption of the ESX-5 System of Mycobacterium Tuberculosis Causes Loss of PPE Protein Secretion, Reduction of Cell Wall Integrity and Strong Attenuation. *Mol Microbiol* (2012) 83:1195–209. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08001.x
- Jamwal SV, Mehrotra P, Singh A, Siddiqui Z, Basu A, Rao KVS. Mycobacterial Escape From Macrophage Phagosomes to the Cytoplasm

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support from A. Alam and J. Montegut for scientific advice and A. Upton for careful reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.668060/full#supplementary-material>

- Represents an Alternate Adaptation Mechanism. *Sci Rep* (2016) 6:23089. doi: 10.1038/srep23089
36. Ehrh S, Schnappinger D. Mycobacterial Survival Strategies in the Phagosome: Defense Against Host Stresses. *Cell Microbiol* (2009) 11:1170–8. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x
 37. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, et al. Phagosomal Rupture by Mycobacterium Tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLoS Pathog* (2012) 8:e1002507. doi: 10.1371/journal.ppat.1002507
 38. Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, Liu J, et al. Evidence for Pore Formation in Host Cell Membranes by ESX-1-Secreted ESAT-6 and Its Role in Mycobacterium Marinum Escape From the Vacuole. *Infection Immunol* (2008) 76:5478–87. doi: 10.1128/IAI.00614-08
 39. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, Cameron J, et al. Mycobacterial ESX-1 Secretion System Mediates Host Cell Lysis Through Bacterium Contact-Dependent Gross Membrane Disruptions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114:1371–6. doi: 10.1073/pnas.1620133114
 40. Linell F, Norden A. Mycobacterium Balnei. A New Acid-Fast Bacillus Occurring in Swimming Pools and Capable of Producing Skin Lesions in Humans. *Acta Tuberculosa Scandinavica* (1954) 33:1–84.
 41. Gröschel MI, Sayes F, Shin SJ, Frigui W, Pawlik A, Orgeur M, et al. Recombinant BCG Expressing ESX-1 of Mycobacterium Marinum Combines Low Virulence With Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Rep* (2017) 18:2752–65. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.057
 42. Sato E, Imafuku S, Ishii K, Itoh R, Chou B, Soejima T, et al. Vitamin D-Dependent Cathelicidin Inhibits Mycobacterium Marinum Infection in Human Monocytic Cells. *J Dermatol Sci* (2013) 70:166–72. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.011
 43. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of Genomic Diversity in Mycobacterium Tuberculosis. *Semin Immunol* (2014) 26:431–44. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.012
 44. Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. Mycobacterium Tuberculosis Blocks Annexin-1 Crosslinking and Thus Apoptotic Envelope Completion on Infected Cells to Maintain Virulence. *Nat Immunol* (2008) 9:1189–97. doi: 10.1038/ni.1654
 45. Sohn H, Lee K-S, Kim S-Y, Shin D-M, Shin S-J, Jo E-K, et al. Induction of Cell Death in Human Macrophages by a Highly Virulent Korean Isolate of Mycobacterium Tuberculosis and the Virulent Strain H37Rv. *Scandinavian J Immunol* (2009) 69:43–50. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02188.x
 46. Mariotti S, Teloni R, Iona E, Fattorini L, Giannoni F, Romagnoli G, et al. Mycobacterium Tuberculosis Subverts the Differentiation of Human Monocytes Into Dendritic Cells. *Eur J Immunol* (2002) 32:3050–8. doi: 10.1002/1521-4141(200211)32:11<3050::AID-IMMU3050>3.0.CO;2-K
 47. Madhvi A, Mishra H, Leisching G, Mahlobo P, Baker B. Comparison of Human Monocyte Derived Macrophages and THP1-Like Macrophages as In Vitro Models for M. Tuberculosis Infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (2019) 67:101355. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101355
 48. Metsalu T, Vilo J. Clustvis: A Web Tool for Visualizing Clustering of Multivariate Data Using Principal Component Analysis and Heatmap. *Nucleic Acids Res* (2015) 43:W566–70. doi: 10.1093/nar/gkv468
 49. Lex A, Gehlenborg N, Strobel H, Vuillemot R, Pfister H. Upset: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Trans Vis Comput Graph* (2014) 20:1983–92. doi: 10.1109/TVCG.2014.2346248
 50. Dweep H, Gretz N. Mirwalk2.0: A Comprehensive Atlas of MicroRNA-Target Interactions. *Nat Methods* (2015) 12:697. doi: 10.1038/nmeth.3485
 51. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: Interactive and Collaborative HTML5 Gene List Enrichment Analysis Tool. *BMC Bioinf* (2013) 14:128. doi: 10.1186/1471-2105-14-128
 52. Braian C, Hogue V, Stendahl O. Mycobacterium Tuberculosis-Induced Neutrophil Extracellular Traps Activate Human Macrophages. *J Innate Immun* (2013) 5:591–602. doi: 10.1159/000348676
 53. Johansen MD, Hortle E, Kasparian JA, Romero A, Novoa B, Figueras A, et al. Analysis of Mycobacterial Infection-Induced Changes to Host Lipid Metabolism in a Zebrafish Infection Model Reveals a Conserved Role for LDLR in Infection Susceptibility. *Fish Shellfish Immunol* (2018) 83:238–42. doi: 10.1016/j.fsi.2018.09.037
 54. Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan G-H. The Chemotaxis of M1 and M2 Macrophages Is Regulated by Different Chemokines. *J Leukocyte Biol* (2015) 97:61–9. doi: 10.1189/jlb.1A0314-170R
 55. Gonçalves AS, Appelberg R. The Involvement of the Chemokine Receptor CXCR2 in Neutrophil Recruitment in LPS-Induced Inflammation and in Mycobacterium Avium Infection. *Scand J Immunol* (2002) 55:585–91. doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01097.x
 56. Schenk BI, Petersen F, Flad H-D, Brandt E. Platelet-Derived Chemokines CXC Chemokine Ligand (CXCL)7, Connective Tissue-Activating Peptide III, and CXCL4 Differentially Affect and Cross-Regulate Neutrophil Adhesion and Transendothelial Migration. *J Immunol* (2002) 169:2602–10. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2602
 57. González-Cortés C, Díez-Tascón C, Guerra-Laso JM, González-Cocaño MC, Rivero-Lezcano OM. Non-Chemotactic Influence of CXCL7 on Human Phagocytes. Modulation of Antimicrobial Activity Against L. Pneumophila. *Immunobiology* (2012) 217:394–401. doi: 10.1016/j.imbio.2011.10.015
 58. Boro M, Singh V, Balaji KN. Mycobacterium Tuberculosis-Triggered Hippo Pathway Orchestrates CXCL1/2 Expression to Modulate Host Immune Responses. *Sci Rep* (2016) 6:37695. doi: 10.1038/srep37695
 59. Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, et al. MicroRNA-223 Controls Susceptibility to Tuberculosis by Regulating Lung Neutrophil Recruitment. *J Clin Invest* (2013) 123:4836–48. doi: 10.1172/JCI67604
 60. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 Axis for Immune Activation - A Target for Novel Cancer Therapy. *Cancer Treat Rev* (2018) 63:40–7. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007
 61. Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H. β -Chemokines are Induced by Mycobacterium Tuberculosis and Inhibit Its Growth. *Infect Immun* (2002) 70:1684–93. doi: 10.1128/IAI.70.4.1684-1693.2002
 62. Sakala IG, Eickhoff CS, Blazevic A, Moheno P, Silver RF, Hoft DF. Dipterynyl Calcium Pentahydrate Inhibits Intracellular Mycobacterial Growth in Human Monocytes Via the C-C Chemokine MIP-1 β and Nitric Oxide. *Infect Immun* (2013) 81:1974–83. doi: 10.1128/IAI.01393-12
 63. Hasan Z, Cliff JM, Dockrell HM, Jamil B, Irfan M, Ashraf M, et al. CCL2 Responses to Mycobacterium Tuberculosis Are Associated With Disease Severity in Tuberculosis. *PLoS One* (2009) 4(12):e8459. doi: 10.1371/journal.pone.0008459
 64. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR, Bengali K, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP3) Interacts With Multiple Leukocyte Receptors. C-C CKR1, A Receptor for Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha/Rantes, Is Also a Functional Receptor for MCP3. *J Biol Chem* (1995) 270:22123–8. doi: 10.1074/jbc.270.38.22123
 65. Ley K, Pramod AB, Croft M, Ravichandran KS, Ting JP. How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol* (2016) 7:204. doi: 10.3389/fimmu.2016.00204
 66. Martínez Gómez JM, Koh VHQ, Yan B, Lin W, Ang MLT, Rahim SZZ, et al. Role of the CD137 Ligand (CD137L) Signaling Pathway During Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Immunobiology* (2014) 219:78–86. doi: 10.1016/j.imbio.2013.08.009
 67. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:953–64. doi: 10.1038/nri1733
 68. Slight SR, Khader SA. Chemokines Shape the Immune Responses to Tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* (2012) 24:105–13. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.10.002
 69. Ottenhoff THM, Dass RH, Yang N, Zhang MM, Wong HEE, Sahiratmadja E, et al. Genome-Wide Expression Profiling Identifies Type 1 Interferon Response Pathways in Active Tuberculosis. *PLoS One* (2012) 7:e45839. doi: 10.1371/journal.pone.0045839
 70. Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, Hopewell PC, Daley CL, Krensky AM, et al. IL-24 Modulates IFN- γ Expression in Patients With Tuberculosis. *Immunol Lett* (2008) 117:57–62. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.018
 71. Fernández Do Porto DA, Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, Aspera RH, Musella RM, et al. CD137 Differentially Regulates Innate and Adaptive Immunity Against Mycobacterium Tuberculosis. *Immunol Cell Biol* (2012) 90:449–56. doi: 10.1038/icb.2011.63
 72. Walczak H. Death Receptor-Ligand Systems in Cancer, Cell Death, and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013) 5(5):a008698. doi: 10.1101/cshperspect.a008698

73. Torraca V, Cui C, Boland R, Bebelman J-P, van der Sar AM, Smit MJ, et al. The CXCR3-CXCL11 Signaling Axis Mediates Macrophage Recruitment and Dissemination of Mycobacterial Infection. *Dis Models Mech* (2015) 8:253–69. doi: 10.1242/dmm.017756
74. Kipnis A, Basaraba R, Orme I, Cooper A. Role of Chemokine CCL2 in the Protective Response to Early Murine Pulmonary Tuberculosis. *Immunology* (2003) 109:547–51. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01680.x
75. Kang DD, Lin Y, Moreno J-R, Randall TD, Khader SA. Profiling Early Lung Immune Responses in the Mouse Model of Tuberculosis. *PLoS One* (2011) 6:e16161. doi: 10.1371/journal.pone.0016161
76. Boro M, Balaji KN. CXCL1 and CXCL2 Regulate NLRP3 Inflammasome Activation Via G-Protein-Coupled Receptor CXCR2. *J Immunol* (2017) 199:1660–71. doi: 10.4049/jimmunol.1700129
77. Bloom CI, Graham CM, Berry MPR, Rozakeas F, Redford PS, Wang Y, et al. Transcriptional Blood Signatures Distinguish Pulmonary Tuberculosis, Pulmonary Sarcoidosis, Pneumonias and Lung Cancers. *PLoS One* (2013) 8:e70630. doi: 10.1371/journal.pone.0070630
78. Kaforou M, Wright VJ, Oni T, French N, Anderson ST, Bangani N, et al. Detection of Tuberculosis in HIV-Infected and -Uninfected African Adults Using Whole Blood RNA Expression Signatures: A Case-Control Study. *PLoS Med* (2013) 10:e1001538. doi: 10.1371/journal.pmed.1001538
79. Gupta RK, Turner CT, Venturini C, Esmail H, Rangaka MX, Copas A, et al. Concise Whole Blood Transcriptional Signatures for Incipient Tuberculosis: A Systematic Review and Patient-Level Pooled Meta-Analysis. *Lancet Respir Med* (2020) 8:395–406. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30282-6
80. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An Interferon-Inducible Neutrophil-Driven Blood Transcriptional Signature in Human Tuberculosis. *Nature* (2010) 466:973–7. doi: 10.1038/nature09247
81. Lavalett L, Rodriguez H, Ortega H, Sadee W, Schlesinger LS, Barrera LF. Alveolar Macrophages From Tuberculosis Patients Display An Altered Inflammatory Gene Expression Profile. *Tuberculosis* (2017) 107:156–67. doi: 10.1016/j.tube.2017.08.012
82. Bourigault M-L, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, Vasseur V, et al. Relative Contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the Host Response to Mycobacterium Tuberculosis and Attenuated M. Bovis BCG. *Immun Inflammation Dis* (2013) 1:47–62. doi: 10.1002/iid3.9
83. Microrna-26b Modulates the NF- κ B Pathway in Alveolar Macrophages by Regulating PTEN (Accessed 3 May 2021).
84. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R. NLRP3 Inflammasome Expression Is Driven by NF- κ B in Cultured Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 458:700–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.029
85. Kinoshita T, Imamura R, Kushiyama H, Suda T. Nlrp3 Mediates Nf- κ B Activation and Cytokine Induction in Microbially Induced and Sterile Inflammation. *PLoS One* (2015) 10:e0119179. doi: 10.1371/journal.pone.0119179
86. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GAW. Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. *J Infect Dis* (2005) 192:1201–10. doi: 10.1086/444545
87. Badr MT, Häcker G. Gene Expression Profiling Meta-Analysis Reveals Novel Gene Signatures and Pathways Shared Between Tuberculosis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* (2019) 14:e0213470. doi: 10.1371/journal.pone.0213470
88. Liang S, Liu Y, Wu Y, Ming S, Wu M. G1TR Expressed on Macrophages Functions as an Inflammatory Amplifier by Promoting NLRP3 Inflammasome Activation. *J Immunol* (2020) 204:68.11–1.
89. Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, et al. Microrna-146a Promotes Mycobacterial Survival in Macrophages Through Suppressing Nitric Oxide Production. *Sci Rep* (2016) 6:23351. doi: 10.1038/srep23351
90. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, et al. Nitric Oxide Controls the Immunopathology of Tuberculosis by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-Dependent Processing of IL-1 β . *Nat Immunol* (2013) 14:52–60. doi: 10.1038/ni.2474
91. Mishra BB, Lovewell RR, Olive AJ, Zhang G, Wang W, Eugenin E, et al. Nitric Oxide Prevents a Pathogen-Permissive Granulocytic Inflammation During Tuberculosis. *Nat Microbiol* (2017) 2:1–11. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.72
92. Braverman J, Stanley SA. Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to Mycobacterium Tuberculosis Infection Through Activation of HIF-1 α and Repression of NF- κ B. *J Immunol* (2017) 199:1805–16. doi: 10.4049/jimmunol.1700515
93. Akram KM, Lomas NJ, Spiteri MA, Forsyth NR. Club Cells Inhibit Alveolar Epithelial Wound Repair Via TRAIL-Dependent Apoptosis. *Eur Respir J* (2013) 41:683–94. doi: 10.1183/09031936.00213411
94. Ni B, Rajaram MVS, Lafuse WP, Landes MB, Schlesinger LS. Mycobacterium Tuberculosis Decreases Human Macrophage IFN- γ Responsiveness Through Mir-132 and Mir-26a. *J Immunol* (2014) 193:4537–47. doi: 10.4049/jimmunol.1400124
95. Ahluwalia PK, Pandey RK, Sehajpal PK, Prajapati VK. Perturbed Microrna Expression by Mycobacterium Tuberculosis Promotes Macrophage Polarization Leading to Pro-Survival Foam Cell. *Front Immunol* (2017) 8:107. doi: 10.3389/fimmu.2017.00107
96. Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet M-E, Ploegh HL. UNC93B1 Delivers Nucleotide-Sensing Toll-Like Receptors to Endolysosomes. *Nature* (2008) 452:234–8. doi: 10.1038/nature06726
97. Yu X, Wang Y, Zhao W, Zhou H, Yang W, Guan X. Toll-Like Receptor 7 Promotes the Apoptosis of THP-1-Derived Macrophages Through the CHOP-Dependent Pathway. *Int J Mol Med* (2014) 34:886–93. doi: 10.3892/ijmm.2014.1833
98. Liang S, Song Z, Wu Y, Gao Y, Gao M, Liu F, et al. MicroRNA-27b Modulates Inflammatory Response and Apoptosis During Mycobacterium Tuberculosis Infection. *J Immunol* (2018) 200:3506–18. doi: 10.4049/jimmunol.1701448
99. Kwon J-E, Kim B-Y, Kwak S-Y, Bae I-H, Han Y-H. Ionizing Radiation-Inducible MicroRNA Mir-193a-3p Induces Apoptosis by Directly Targeting Mcl-1. *Apoptosis* (2013) 18:896–909. doi: 10.1007/s10495-013-0841-7
100. Chen S, Wang Y, Xu M, Zhang L, Su Y, Wang B, et al. Mir-1184 Regulates the Proliferation and Apoptosis of Colon Cancer Cells Via Targeting CSNK2A1. *Mol Cell Probes* (2020) 53:101625. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101625
101. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent Mycobacterium Tuberculosis Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. *J Immunol* (2000) 164:2016–20. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2016
102. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, et al. Initiation of the Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis Depends on Antigen Production in the Local Lymph Node, Not the Lungs. *J Exp Med* (2008) 205:105–15. doi: 10.1084/jem.20071367
103. Wu Y, Sun Q, Dai L. Immune Regulation of Mir-30 on the Mycobacterium Tuberculosis-Induced TLR/Myd88 Signaling Pathway in THP-1 Cells. *Exp Ther Med* (2017) 14:3299–303. doi: 10.3892/etm.2017.4872
104. Nance SC, Yi A-K, Re FC, Fitzpatrick EA. Myd88 is Necessary for Neutrophil Recruitment in Hypersensitivity Pneumonitis. *J Leukocyte Biol* (2008) 83:1207. doi: 10.1189/jlb.0607391
105. Babcock AA, Toft-Hansen H, Owens T. Signaling Through Myd88 Regulates Leukocyte Recruitment After Brain Injury. *J Immunol* (2008) 181:6481–90. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6481
106. Loures FV, Pina A, Felonato M, Feriotti C, de Araújo EF, Calich VLG. Myd88 Signaling Is Required for Efficient Innate and Adaptive Immune Responses to Paracoccidioides Brasiliensis Infection. *Infection Immun* (2011) 79:2470. doi: 10.1128/IAI.00375-10
107. Liu H, Liu Z, Chen J, Chen L, He X, Zheng R, et al. Induction of CCL8/MCP-2 by Mycobacteria Through the Activation of TLR2/PI3K/Akt Signaling Pathway. *PLoS One* (2013) 8(2):e56815. doi: 10.1371/journal.pone.0056815
108. Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the Chemotactic Cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 Alpha and MIP-1 Beta on Human Monocytes. *Eur J Immunol* (1995) 25:64–8. doi: 10.1002/eji.1830250113
109. Asano K, Takahashi N, Ushiki M, Monya M, Aihara F, Kuboki E, et al. Intestinal CD169 + Macrophages Initiate Mucosal Inflammation by Secreting CCL8 That Recruits Inflammatory Monocytes. *Nat Commun* (2015) 6:7802. doi: 10.1038/ncomms8802
110. Khader SA, Rangel-Moreno J, Fountain JJ, Martino CA, Reiley WW, Pearl JE, et al. In a Murine Tuberculosis Model, the Absence of Homeostatic Chemokines Delay Granuloma Formation and Protective

- Immunity. *J Immunol* (2009) 183:8004–14. doi: 10.4049/jimmunol.0901937
111. Goenka A, Prise IE, Connolly E, Fernandez-Soto P, Morgan D, Cavet JS, et al. Infant Alveolar Macrophages Are Unable to Effectively Contain Mycobacterium Tuberculosis. *Front Immunol* (2020) 11:486. doi: 10.3389/fimmu.2020.00486

Conflict of Interest: Authors PB, FS, SS, PL, KK, NC, SL and CR were employed by the company Evotec ID.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The authors declare that this study received funding from Evotec ID. The funder had the following involvement with the study: sharing H37rv related protocols, managing training and BSL3 space relative to this study, interpreting data and participating to project meetings.

Copyright © 2021 Bade, Simonetti, Sans, Labouodie, Kissane, Chappat, Lagrange, Apparailly, Roubert and Duroux-Richard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2. Article 2

2.1 Introduction

La caractérisation des gènes de la réponse de l'hôte potentiellement impliqués dans la virulence de Mtb et des miARN associés à leur régulation a permis d'identifier miR-132-3p comme un miARN d'intérêt pour la suite de mes travaux. Cette première étude a montré que la surexpression de miR-132-3p médiée par Mtb pourrait faciliter l'infection en ciblant putativement l'ARNm codant pour CXCL9, une chimiokine appartenant à l'axe CXCL9, 10 et 11 et participant au recrutement des lymphocytes T (Bade *et al.* 2021).

MiR-132-3p a retenu notre attention car ce miARN avait déjà fait l'objet d'une étude dans le contexte de l'infection avec Mtb qui montrait que celui-ci, en synergie avec le miR-26a-5p, ciblait directement le gène *EP300* dans les macrophages infectés en contrôlant négativement la réponse à l'IFN- γ (J. Li *et al.* 2017). De plus miR-132-3p est également impliqué dans l'inhibition de l'activation classique des macrophages, notamment lors de la stimulation avec du LPS (Fang *et al.* 2021; Fen Liu *et al.* 2015c) MiR-132-3p est très conservé dans les espèces, notamment chez l'Homme et la souris. De plus, des analyses *in silico* de recherche des cibles des miARN montrent que de nombreux gènes ciblés par miR-132, notamment impliqués dans la réponse des macrophages, sont identiques entre les deux espèces (Haviv, Oz, et Soreq 2018).

Le deuxième axe de mes travaux de recherche a donc été d'étudier le rôle de miR-132-3p dans la réponse de l'hôte et particulièrement celle des macrophages infectés par Mtb, à la fois chez l'homme et la souris.

Mon travail a permis de montrer, grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide antagoniste, que l'inhibition ciblée de miR-132-3p permettait de réduire la charge bactérienne *in vivo* dans les poumons de souris, dans un modèle murin d'infection aiguë de tuberculose. J'ai également montré *in vitro* que l'inhibition ciblée de miR-132-3p chez l'Homme permettait de réduire la charge bactérienne dans les macrophages différenciés par de la PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) à partir de la lignée monocyttaire THP-1.

Afin de comprendre le mécanisme d'action de miR-132-3p dans le contrôle de la charge bactérienne, j'ai caractérisé les voies de signalisation de la réponse des macrophages à l'infection Mtb qui sont régulées par miR-132. Des études *in silico* m'ont permis d'identifier

des cibles putatives pertinentes de miR-132, conservées à la fois chez l'homme et la souris. Parmi elles, le gène *FOXP1*, a semblé particulièrement intéressant car il est associé à une susceptibilité génétique à la tuberculose (Harishankar, Selvaraj, et Bethunaickan 2018). Ce gène contrôle négativement CSF1R, le récepteur au M-CSF, qui joue un rôle dans la polarisation de type M2 et la différenciation des monocytes en macrophages (C. Shi *et al.* 2008a). L'utilisation d'un système rapporteur luciférase exprimant la région 3'UTR de *FOXP1* qui contient le site de liaison putatif du miARN m'a permis de valider l'interaction directe entre miR-132-3p et le gène *FOXP1*.

Des études de perte de fonction par neutralisation de miR-132-3p dans des macrophages humains (primaires et la lignée THP-1) m'ont permis de démontrer, grâce à des mesures de métabolisme et à la quantification des gènes marqueurs de la polarisation, que miR-132-3p contrôle la polarisation des macrophages par l'inhibition de *FOXP1*.

Ce travail a permis d'établir un lien entre miR-132, sa cible directe *FOXP1*, et le contrôle de la polarisation des macrophages au cours de l'infection. Notre étude est la première à confirmer une implication directe de miR-132-3p dans le contrôle de la charge bactérienne des macrophages, faisant de lui un miARN pertinent dans la recherche pour des thérapies dirigées par l'hôte.

Les principaux résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'un projet d'article que nous avons l'intention de soumettre au journal « Cell Host & Microbe » et que nous avons intitulé « *MiR-132-3p controls mycobacterium tuberculosis-infected macrophage metabolism* ».

MiR-132-3p controls *mycobacterium tuberculosis*-infected-macrophage metabolism

Pauline Bade^{1,2}, Maxime Robin¹, Isabelle Blanc², Laurence Somody², Anna Upton², Stephanie Sans², Khadija Kissane², Sylvain Ribeyro², Caroline Michel², Nicolas Chappat, Deborah Mechin¹, Sophie Lagrange², Florence Apparailly^{1,3}, Christine Roubert²§, and Isabelle Duroux-Richard^{1,§,*}

¹ IRMB, INSERM, University of Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France

² EVOTEC, Neglected Diseases, Lyon, France

³ Clinical department for osteoarticular diseases, University hospital of Montpellier, Montpellier, France

§ These authors contributed equally to this work.

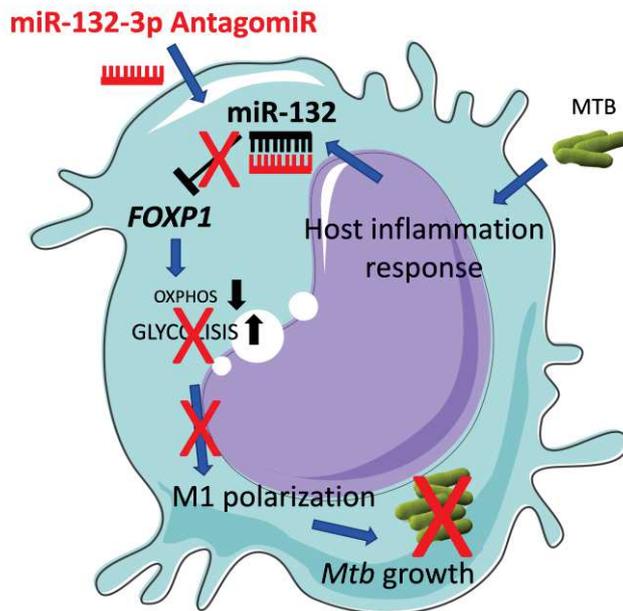
*Correspondence: isabelle.richard@inserm.fr

Summary

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), the etiological agent of tuberculosis (TB), kills millions of people each year. Understanding the mechanisms used by *Mtb* to control macrophages (M ϕ), *Mtb*'s main host cells, is crucial to the development of novel anti-TB strategies. We therefore investigated the role of miR-132, a microRNA upregulated in M ϕ upon *Mtb* infection and its therapeutic potential.

Using loss of function experiments in different *in vivo* and *in vitro* TB models, a high burden mouse model; PMA-differentiated THP-1 macrophages and human primary CD14⁺ monocyte derived macrophages, we investigated the how miR-132-3p is controlling *Mtb* survival. We demonstrated interactions between miR-132-3p and the 3' UTR of the Forkhead box P1 mRNA, a TB susceptibility gene, which is involved in macrophage function. Finally, we tested whether miR-132-3p controls *Mtb*-induced changes in macrophage polarisation and thus modifies *Mtb* growth. We reveal how miR-132/*FOXP1* axis modulate M ϕ metabolism and polarisation during *Mtb* infection.

Graphical Abstract



Keywords

miRNA, *Mycobacterium tuberculosis*, macrophage, metabolism, inflammatory response.

Introduction

Tuberculosis (TB) ranks, after COVID-19, as the second deadliest infectious disease caused by a single pathogen. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) kills 1.4 million people and infects 10 million new individuals each year (Chakaya et al., 2021). One particularity of TB is that *Mtb* holds in check the immune system. As the result of the inability of the innate immunity to control the infection, bacteria are contained inside granulomas, which are cellular structures formed by the aggregation of innate and adaptive immune cells. Five to fifteen percent of primo infections evolve into active disease with severe symptoms (Chakaya et al., 2021b). The very early stages of the infection that rely solely on innate immunity, before granuloma formation, are thus crucial for the control of the disease.

Macrophages are innate immune cells involved in the triggering of the innate and the adaptive immunity. They exert different functions depending on a broad range of polarization states. To simplify the polarization spectrum, two extreme macrophages activations have been described. Classically activated (M1-like) macrophages (in response to LPS and/or IFN- γ)

secrete pro-inflammatory mediators and bactericidal compounds *e.g.* reactive oxygen species and nitrogen monoxide (Gordon and Taylor, 2005). On the other hand, alternatively activated (M2-like) macrophages (in response to IL-4 and IL-13) are poorly bactericidal and participate to the resolution of inflammation (Gordon and Taylor, 2005). Macrophages' polarization is critical for the control of *Mtb* growth. Indeed, they are the first line of defence against *Mtb* and they initiate granulomas formation within which they are the most abundant cells (Egen et al., 2008). M1-like polarization of macrophages contained into the granulomas is linked to better control of the disease (Marino et al., 2015). Unfortunately, during the infection, *Mtb* is able to drift macrophage early M1-like polarization towards a M2-like polarization (Lugo-Villarino et al., 2011). These *Mtb*-infected macrophages harbour both M1-like and M2-like properties and are not able to control *Mtb* growth efficiently and might confer shelter against the host immunity (Rao Muvva et al., 2020).

How *Mtb* shifts macrophage polarization to its benefit is yet to be fully elucidated. Recent studies point towards a critical role of microRNAs (miRNAs) in the regulation of macrophage functions in TB and showed that *Mtb* is able to divert macrophage miRNome (Behrouzi et al., 2019). MiRNAs are a class of short non-coding RNAs (18–22 nucleotides), conserved from worms to mammals, which control gene expression at the posttranscriptional level (Bartel, 2004). More than 2800 miRNAs have been identified in human (miRBase vs22) and each could putatively target more than 500 genes (Dweep and Gretz, 2015; Griffiths-Jones, 2004). Recent work from our group identified 32 miRNAs that are putatively involved in the regulation of macrophage immune response genes related to *Mtb* virulence (Bade et al., 2021). Among them is miR-132, which has been previously identified as upregulated upon *Mtb* infection and limiting the IFN- γ -induced macrophage activation pathway through the targeting of EP300 during *Mtb* infection of human primary monocytes (Ni et al., 2014).

Although miR-132-3p is mostly studied for its implication in neuronal functions (Wanet et al., 2012), it is also known as a regulator of monocyte differentiation into macrophages and macrophage plasticity (Liu et al., 2015; Mehta et al., 2015; Nahid et al., 2013). MiR-132-3p arises from the miR-212/132 cluster located in the intron of a non-coding gene of the human chromosome 17. Both miR-212 and miR-132-3p share close sequences that are highly conserved among species (Wanet et al., 2012). As miR-132-3p sequence is identical in mice and humans, we sought to evaluate whether this miRNA possesses a conserved role in the

host response to TB, particularly in macrophage polarization, and to evaluate its therapeutic potential in a mouse model of TB infection.

In the current study, using three different *in vitro* and *in vivo* TB models, we investigated the impact of miR-132-3p loss-of-function and its role in controlling *Mtb* survival in mice and human. We uncovered interactions between miR-132-3p and the 3' UTR of the Forkhead box P1(*FOXP1*) mRNA, a TB susceptibility gene, which is involved in the function of macrophages, including cytokine production, phagocytosis, and respiratory burst. Finally, we tested if miR-132-3p controls *Mtb*-induced shifts of macrophage polarization and thus alter *Mtb* growth. We characterized miR-132-3p neutralization effect on macrophage polarization by quantifying the expression of M1-like and M2-like markers and by measuring mitochondrial macrophage metabolism on real time.

Materials and Methods

Mouse model of infections: The Mtb highly acute model (HA):

For the highly acute model of tuberculosis (Ballinger et al., 2019; Couturier et al., 2016), the mouse treatment procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Sanofi, Marcy l'Etoile. Female BALB/c mice aged 5 to 7 weeks were purchased from Janvier Laboratories, France. Mice were housed at 5 animals per cage with sterile bedding in HEPA-filtered racks (Tecniplast, France) in certified animal biosafety level 3 (ABSL-3) laboratories. Temperatures were maintained at 65-75°F (~18-23 °C) with 40-60% humidity. Mice had ad libitum access to water and food pellets. Mice were rested 1 week before infection, and they were infected with 10^6 *Mtb* (H37Rv strain ATCC 27294) (50 μ L) from a freshly grown culture by the intranasal route. Five mice were sacrificed the following day to determine the number of CFU implanted in the lungs in order to establish the pre-treatment lung CFU burden. Other mice were sacrificed 11 day after the infection. One third of the lungs of each mouse was collected for RNA extraction. CD11b⁺ cells were positively sorted with magnetic beads (Miltenyi, France) from half of each samples and the sorted cells as well as the rest of the lungs were stored in RNA later at -20°C prior to RNA extraction.

Mouse treatment:

Rifampicin formulated as a 20 mg/kg suspension of 0.6% methylcellulose with 0.5% Tween-80 (MCT), was administered for 3 days by oral gavage. The miR-132-3p inhibitor (Anti-132) (Ambion) and miRNA control inhibitor#1 (anti-CTRL) (Ambion), an oligonucleotide with a random sequence that has been extensively tested in human cell lines and tissues and validated to produce no identifiable effects on known miRNA function, were formulated in complexation buffer (Invitrogen), InvivoFectamine (Invitrogen) and PBS, then intranasally instilled with 50 µl and 20 µl of suspension 1 day and 3 days, respectively, after *Mtb* infection. During the study, the mice were observed and weighed daily. Lungs were aseptically removed and homogenized in PBS/glycerol. Mice were sacrificed 6 days after *Mtb* infection. One third of the lungs were preserved in RNA later at -20°C prior RNA extraction and the rest was used to assess the number of viable organisms which was determined by plating serial dilutions in PBS on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC 10% and glycerol 0.5% and normalized with the lung weight. Plates were incubated at 37 °C for 3 weeks.

Histological studies

Histological studies were performed in independent experiments. Lung were removed and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 days at room temperature to ensure inactivation of all live bacilli. Lungs were then treated to paraffin blocks following routine histology procedures, and hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections were examined by light microscopy

Mycobacterial strains and cultures

For *in-vitro* experiments, *Mtb* expressing GFP, a kind gift from IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse), was grown at 37°C and 5% CO₂ in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% Middlebrook Oleic Albumin Dextrose Catalase (Difco, Livonia, MI). Aliquots of 1.5 ml of mid-log phase cultures (optical density 600 of 0.6) were frozen with 10% glycerol at -80°C prior to infection.

Cell cultures and macrophage differentiation

THP-1 and HEK293 cell lines were grown in RPMI 1640 GlutaMAX™ Supplement (Gibco) or DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin and L-glutamine at 37°C and 5% CO₂, respectively. THP-1 (TIB-202, ATCC) were cultured in 24 well plates at a density of 500.000 cells per well or in 96 well plates at a density of 71.000 cells per well, and differentiated into THP-1 derived macrophages (M ϕ THP-1-1) with 40 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) over-night. Experiments were realized within 22 passages and cell viability was measured before experiments by trypan blue exclusion and was comprised between 85-97%.

CD14⁺ primary human monocytes were sorted from peripheral blood of healthy donors anonymously provided by the French Blood Establishment (EFS, Lyon), and purified from whole blood using autoMACS® Pro Separator, Whole Blood Column Kit and StraightFrom® Whole Blood CD14 MicroBeads (Mitenyi) according to the manufacturer's instruction. Cell viability before proceeding to macrophage differentiation was measured by trypan blue exclusion and was always greater than 80%. CD14⁺ monocytes were then plated in 24 well plates at a density of 400 000 cells per well and differentiated into macrophage (hMDM) for 3 days with 50 μ g/ml Rh-GMCSF (Miltenyi) in RPMI 1640 GlutaMAX™ Supplement with 10% FBS (Sigma-Aldrich) at 37°C, 5% CO₂.

Macrophages were infected with *Mtb* at a multiplicity of infection (MOI) of 1:1 in RPMI 1640 supplemented medium. After 1 hour of infection, cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to discard extracellular mycobacteria. Cells were then kept in RPMI 1640 supplemented medium at 37°C and 5% CO₂ up for 48 hours before RNA extraction.

M ϕ THP-1 and hMDM were transfected with 40 nM of miR-132-3p antagomir (Anti-132) or negative control #1 inhibitors (Applied Biosystems), using Lipofectamine 2000 (Applied Biosystems) and Fugene HD (Promega) as transfection reagents, respectively. In brief, THP-1 or CD14⁺ primary monocytes were plated at a density of 500 000 or 400 000 cells per well, respectively, and starved in Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (Gibco) for 6 hours or for 2 hours, respectively. Then cells were incubated over-night with miR-132-3p or negative control #1 inhibitors complexed with transfection reagents. After 12h, medium was replenished with RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ Supplement (Gibco) with 20% FBS (Sigma-Aldrich) and cells were incubated 6 hours at 37°C and 5% CO₂ prior to macrophage differentiation.

Gene and miRNA quantification

Total RNA including miRNAs was extracted 1-4 days post-infection in THP-1 and 4 days post infection in hMDM. Briefly, RNA was protected from degradation in macrophages with a PBS rinse followed by scraping with Maxwell[®] RSC miRNA Tissue Kit homogenization solution/thioglycerol (50/1) (Promega). Then cells and bacteria were lysed by a 10 min incubation with Maxwell[®] RSC miRNA Tissue Kit lysis buffer (Promega) followed by 5s bead beating into Matrix B tubes containing silica beads (MP Biomedical) with the Super-Fast Prep-1 instrument (MP Biomedical) at full force. Finally, samples were placed into Maxwell[®] RSC cartridges, and RNA extraction was run into Maxwell[®] RSC instrument. RNA concentration was measured with NanoDrop[™] (ThermoFisher Scientific) and integrity was evaluated by automated electrophoresis with TapeStation Systems (Agilent). Total mRNA or miRNAs were reverse transcribed with 100-500 ng total RNA using SuperScript[™] IV VILO[™] Master Mix or Taqman[™] microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), respectively. qPCR amplifications were performed with a QuantStudio[™] 12K Flex system (Applied Biosystems), using TaqMan[®] probe for genes and miR-132-3p ([supplementary Table S1](#)). mRNA and miR-132-3p expressions were normalized to the GAPDH and the snoRNA RNU48, respectively. Normalization, relative expression and expression ratios were calculated following the ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ and $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, respectively. Briefly: $\Delta C_t = C_{t\text{gene}} - C_{t\text{endogenous control}}$ and $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ treated sample} - \Delta C_t \text{ untreated control}$.

Mtb growth measurement

Three days post infection, in 96 well plates, M ϕ THP-1-1 were fixed 30 min with 4% PFA and incubated with HCS CellMask[™] Blue to color their cytoplasm. Then wells were rinsed and replete with PBS. Images were captured with the ArrayScan[™] instrument (ThermoFisher Scientific) with a 4x objective and fluorescence was measured within a minimum of 5000 cells. Spot detector algorithm was used to determine relevant parameters (total cell count, spot intensity, % of cells with high fluorescence intensity).

Real-time monitoring of the mitochondrial energy metabolism

Cells were suspended 48 hours after transfection in XF assay buffer supplemented with 1 mM pyruvate, and 12 mM D-glucose at pH 7.4 and plated (250 000 cells/well) in 100 μ l on the cellTak-coated assay plates (BD Biosciences). Oxygen-consumption rate was measured with a Seahorse Bioscience XF96 extracellular flux analyser (Seahorse Bioscience). Test compounds (Sigma-Aldrich) were injected during the assay at the following final concentrations: 0.9 μ M oligomycin, 0.5 μ M FCCP, 0.9 μ M rotenone and 0.9 μ M antimycin A, according to the manufacturer's instruction. Normalisation was performed with the number of living cells. Seahorse analysis.

Luciferase assay

HEK293 cells transfected with 50 ng of luciferase reporter plasmid GoClone Reporter (SwitchGear Genomics) encoding FOXP1 3'UTR together with 1 to 100 nM of miR-132-3p mimic (miR-132, Ambion), - or miR-132-3p antagonist (Anti-132, Ambion). Kinetic of luciferase activity was measured at 24h, 48h, and 72h, using Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega).

Statistical analysis

Using GraphPad prism software, statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a multiple comparison analysis of variance by Dunnett's test. Unpaired Mann-Whitney were used to compare two groups. p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

MiR-132-3p controls Mycobacterium tuberculosis replication in human and mice macrophages.

To evaluate *in-vivo* the role of miR-132-3p during TB course, we used the preclinical mouse model of highly acute tuberculosis (HA) (Ballinger et al., 2019; Couturier et al., 2016). This mouse model has the particularity of mimicking *Mtb* primary infection, with rapid and predominant macrophage infiltration in the lung, without the development of the pulmonary granuloma, characteristic of long-term TB infection. Briefly, BALB/c mice were infected with

an elevated multiplicity of infection of *Mtb* (10^6 CFU) using inhalation and sacrificed 11 days after infection (Fig.1a). We first used haematoxylin and eosin stainings of formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections from the infected mice to characterize lung lesions. As already described (Lenaerts et al., 2015), we observed a massive infiltration of innate immune cells, in the lungs (Fig.1b), such as neutrophils and macrophages. The Ziehl-Neelsen staining was used to confirm that *Mtb* localized within macrophages (Fig.1c) in this mouse model. As infiltrating macrophages are important contributors to *Mtb* infection (Pisu et al., 2020, 2021) and miR-132-3p is upregulated in *Mtb*-infected macrophages we quantified the expression level of miR-132-3p in the HA mouse model using RT-qPCR. We showed that miR-132-3p expression level was significantly increased by 2.5- and 10-fold in whole lungs (Fig.1d, p-values 0.008) and in lung CD11b⁺ cells, respectively, of HA mice compared to healthy mice (Fig.1e, p-values 0.01).

Next, we determined the therapeutic potential of targeting miR-132-3p during *Mtb* infection, and whether it could affect *Mtb* lung burden *in-vivo* using the HA mouse model. To address this question, mice were treated with a synthetic miR-132-3p antagomiR (Anti-132) through inhalation on day 1 and day 3 post-infection and sacrificed on day 6 (Fig.1f). Efficient silencing of the miR-132-3p antagomir in the lung was validated by measuring a 10-fold decreased expression of miR-132-3p in whole lungs from HA mice, 6 days after infection, as compared to the negative control (Fig.1g). Next, we investigated the effect of miR-132-3p neutralization on *Mtb* load in the lungs using the colony-forming unit (CFU) counts at day 6. We showed that miR-132-3p neutralization reduced the CFU burden by 60% as compared to HA mice treated with a control antagomir whereas 3 days of treatment with rifampicin, one of the most potent drug for TB, elicited 88% reduction of CFU (Fig.1g). Overall, our data suggest that *Mtb*-induced miR-132-3p expression might represent a potent therapeutic target in TB.

As miR-132-3p is highly conserved and has been shown to share same biological functions in human and mice, we tested the hypothesis that miR-132-3p could be targeted for human TB using two different in vitro models: the model of PMA-induced differentiation of human THP-1 monocyte-derived macrophages (M ϕ THP-1-1) that we recently used to identify miRNA signatures related to *Mtb* virulence (Bade et al., 2021), and human primary monocyte-derived macrophages (hMDM) that were used to evidence the upregulation of miR-132-3p upon infection with virulent *Mtb* (Ni et al., 2014). First, we quantified miR-132-3p expression in *Mtb*-infected hMDM and M ϕ THP-1-1 (Fig.1h). Using RTqPCR, we confirmed that miR-132-3p was

significantly upregulated 4 days post-infection, with a 1 Log-fold change as compared with non-infected conditions (Fig.1i-j). In addition, kinetic analysis of miR-132-3p expression in *Mtb*-infected MφTHP-1-1 showed a significant and progressive upregulation upon infection, with a mean of fold change of 4, 5 and 10, at days 2, 3 and 4, respectively (Fig1j). To determine the impact of miR-132-3p neutralization on *Mtb* survival, we scored bacterial CFUs in MφTHP-1-1 transfected with Anti-132 and infected with a green fluorescent protein (GFP)-tagged *Mtb* strain. A 10-fold inhibition of miR-132-3p expression was observed as compared to the control group (Fig.1k). Using a Cellomics ArrayScan VTi platform, we quantified the GFP fluorescence per cell that corresponded to *Mtb* burden. We showed that miR-132-3p neutralization led to a significant decrease in GFP fluorescence in comparison to controls. This reduction of *Mtb* burden was equivalent to the inhibition observed in this model with of a dose of 10 nM of rifampicin treatment (supplementary Figure S1). In conclusion, neutralization of miR-132-3p in *Mtb*-infected human macrophages could reduce bacteria number.

miR-132-3p targets Forkhead box P1 (FOXP1), a tuberculosis-infection susceptibility gene.

To determine the mechanism of how miR-132-3p neutralization reduces *Mtb*, we searched for miR-132-3p target genes using miRWalk2.0 database (Dweep and Gretz, 2015) that simultaneously interrogates several algorithms including TargetScan, Miranda, RNA22 and miRWalk. *In-silico* prediction for miRNA-mRNA binding analysis identified more than 1281 putative miR-132-3p targets conserved between human and mice, with at least two algorithms predicting interaction with miR-132-3p (supplementary data Table S2). We then searched for possible intersection for these 1281 genes and 180 genes involved in tuberculosis pathways (<https://pathcard.genecards.org>) and other genes featured in published studies (supplementary data Table S3). A Venn analysis identified 16 genes at the intersection of miR-132-3p targets and genes involved in TB (supplementary data Table S4), and among these genes, 4 and 3 algorithms predict interaction with the 3'UTR region of *FOXP1* in human and mice, respectively (Fig.2a). Interestingly, a GWAS study with an independent replication study in Moroccan population showed that two *FOXP1* inter- and intra-genic polymorphisms (rs358793 and rs17590261) were associated with pulmonary TB (Grant et al., 2016). To confirm the direct binding of miR-132-3p with *FOXP1* mRNA, we co-transfected HEK-293 cells with miR-132-3p mimics or antagomiR and an expression plasmid containing the human *FOXP1* 3'UTR downstream of the luciferase gene. The relative luciferase activities were

determined at 24, 48 and 72 hours. Results showed that miR-132-3p over-expression significantly decreased luciferase expression as compared with miR-132-3p antagomiR condition (Fig.2b). To further verify the direct regulation of *FOXP1* by miR-132, the expression of *FOXP1* mRNA was quantified in human macrophages transfected with either miR-132-3p or control antagomir (Fig. 2c-d). Human and mouse primary macrophages were *Mtb*-infected and the expression of *FOXP1* mRNA monitored (Fig.2e-fg). Data revealed that *FOXP1* expression level was significantly decreased following *Mtb* infection (2.7-, 2.4- and 2.2-fold reduction in M ϕ THP-1-1, hMDM and CD11b⁺ macrophages, respectively).

FOXP1 binds to the promoter of the colony stimulating factor 1 receptor (*CSF1R*) gene, leading to its negative regulation, and thus participating in the regulation of monocyte differentiation and macrophage functions (Shi et al., 2008). We quantified *CSF1R* expression level using RT-qPCR during macrophage differentiation and after *Mtb* infection. Data confirmed that *CSF1R* expression was significantly increased in hMDM compared to CD14⁺ monocytes, as well as in *Mtb*-infected compared to non-infected hMDM and M ϕ THP-1-1 (supplementary figure S2a, S2b and S2C, respectively). Having shown that miR-132-3p neutralization induced a similar CFU reduction to that obtained by a 10 nM rifampicin treatment in M ϕ THP-1-1 (Fig.1k, supplementary figure S1a), we determined whether miR-132-dependent pathways are involved in the effect of rifampicin biotherapy. We quantified *FOXP1* and *CSF1R* expression levels in the whole lungs of rifampicin-treated HA mice (40 mg/kg), which leads to a 4-log decrease of CFU, and compared to untreated conditions (supplementary Figure S1b). We observed a significant 3.5-fold increase (Fig.2i) of *FOXP1* expression, similar to that observed with miR-132-3p neutralization (Fig.2d-e). In addition, *CSF1R* expression decreased following rifampicin treatment (supplementary figure S2d). In both conditions, we observed an inverse correlation between *FOXP1* and its target *CSF1R* expression levels. Overall, our data identify *FOXP1* as a novel target gene of *Mtb*-upregulated miR-132.

miR-132-3p controls macrophage polarization and mitochondrial metabolism during Mtb infection through FOXP1 silencing.

Mtb infection induces profound metabolic and activation reprogramming in macrophages. In the early phase of *Mtb*-infection, macrophages polarize to classically activated macrophages (M1-like), characterized by a quiescent mitochondrial metabolism and the down-regulation of

pro-inflammatory cytokines /chemokines such as *IL-6* or *CXCL10*, and shift later on to an alternative anti-inflammatory (M2-like) polarization characterized by an increased mitochondrial respiration and the up-regulation of prototypic markers such as *CD163* and *CD206* (also known as Mannose receptor C-type1, *MRC1*) (Martinez et al., 2009). In addition, antibiotics such as rifampin switch macrophages from M1-like to M2-like phenotype (Wang et al., 2017). We next wondered whether and how miR-132-3p and *FOXP1* were involved in macrophage polarization and metabolic switch triggered by *Mtb* infection. First, we validated the *in-vitro* human MφTHP-1-1 model for early *Mtb*-infected macrophages by quantifying the expression levels of M1 and M2 prototypic genes. We showed that *CXCL10* was 4-times more expressed in infected than in non-infected MφTHP-1-1 cells (*p-values*: <0.0001), while *MRC1* expression level was twice reduced (Fig.3a). Then, we quantified miR-132-3p and *FOXP1* expression levels following macrophage polarization. To induce classical (M1-like) and alternative (M2-like) polarization, hMDM were incubated in the presence of IFN-γ/LPS or IL-4/IL-13, respectively, and polarization was confirmed using established markers *CXCL10* and *MRC1* (Fig.3b). We showed that miR-132-3p (Fig.3b) and *FOXP1* (Fig.3c) expression levels were 3-fold higher and 2.5-fold lower in M1-like than in M2-like macrophages, respectively. Since it was demonstrated that classical M1-like macrophages display reduced mitochondrial activity, and conversely, that alternative M2-like macrophages showed high mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), characterized by an enhanced spare respiratory capacity (SRC) (Van den Bossche et al., 2015), we monitored, the mitochondrial energy metabolism in real-time, using the Seahorse technology. Quantification of the oxygen consumption rate (OCR), was measured at the basal state and after addition of oligomycin, FCCP, rotenone and antimycin A (Fig.3d-f). M2-like macrophages displayed an increased basal OCR and SRC, compared with M1-like macrophage consistent with an increased oxidative phosphorylation upon M2-like polarization (Fig.3e-g).

Second, to evaluate if miR-132-3p controls macrophage polarization via *FOXP1* targeting, we performed loss-of-function studies in both types of polarized macrophages and performed real time measurement of macrophage metabolism. Our results showed that miR-132-3p neutralization led to a significant increase in mitochondrial respiration, particularly the basal OCR and SRC (Fig.3e-f), in both M1-like and M2-like macrophages. In addition, as compared to the negative control antagomir, miR-132-3p neutralization led to a significant increase in *MRC1* expression level, in both M1-like and M2-like macrophages (Fig.3g). To confirm that the

observed effect was mediated by increased *FOXP1* expression, we co-transfected cells with miR-132-3p antagomir and anti-Foxp1 siRNA. Results showed that *FOXP1* silencing significantly reduced *FOXP1* expression, and co-transfection with miR-132-3p antagonist reversed significantly this inhibition (Fig.3h) and was associated with a basal OCR that returned to the control level (Fig.3i). Since M2 polarization is associated with a high rate of oxidative metabolism in macrophages, we quantified by RT-qPCR the expression of 2 mitochondrial genes, *mt-DN1* and *mt-ATP6*, in *Mtb*-infected hMDMs following miR-132-3p neutralization (Fig.3k). The expression of both mitochondrial genes was increased in *Mtb*-infected macrophages in which miR-132-3p was neutralized, suggesting a transition towards OXPHOS metabolism and M2-like polarization. Overall, our data demonstrate that miR-132-3p controls *Mtb*-mediated reprogramming of macrophage metabolism through *FOXP1* silencing.

Discussion

In tuberculosis, the very preliminary stages of the infection are determinant as they dictate if the host will successfully eradicate *Mtb* or develop a latent infection that can later turn into active disease (Marino et al., 2018). During these early stages, host immune system relies mostly on macrophages (Egen et al., 2008). This is why *Mtb* has developed several strategies to circumvent host immune responses by modulating macrophage metabolic pathways (Lugo-Villarino et al., 2011; Vrieling et al., 2020). In the early phase of *Mtb* infection, macrophages are classically activated (M1) and characterized by a glycolytic metabolism and an upregulation of pro-inflammatory cytokines. Later, macrophages shift to an alternatively activated phenotype (M2) characterized by an increased mitochondrial respiration and the expression of pro-resolving mediators (Martinez et al., 2009). Among key molecular controls of macrophage functions and host response against pathogens are miRNAs (Eulalio et al., 2012; Gantier et al., 2007; Wei and Schober, 2016, 2016; Xiao and Rajewsky, 2009), which altered expression has been reported in TB (Behrouzi et al., 2019). Although miRNAs potential as therapeutics for TB treatment has been proposed, only few studies have formally demonstrated that miRNAs can control *Mtb* growth in vivo and therefore possibly improve TB outcome. To date, only miR-155, miR-20b and miR-27a have been shown to impact on *Mtb* growth in TB mouse models (Iwai et al., 2015; Singh et al., 2021).

Our present study demonstrates that the neutralization of miR-132-3p reduced *Mtb* burden *in-vitro* using two models of *Mtb*-infected human macrophages and *in-vivo* using the HA mouse model of TB. Previously, Ni *et al* showed that *Mtb* infection upregulates miR-132, limiting the IFN- γ responses of human macrophages by targeting p300 (Ni *et al.*, 2014). Here, we demonstrate that miR-132-3p influenced macrophage polarization and mitochondrial metabolism through the silencing of *FOXP1*, a TB susceptibility gene (Grant *et al.*, 2016). We also validated that miR-132-3p was upregulated in the HA TB mouse model, a high CFU burden model (aerosolized with 10^6 H37Rv) with short duration (11 days). Interestingly, we also quantified miR-132-3p expression level in a chronic murine model of TB infection with low CFU burden (10^2 aerosolized H37Rv) and a longer duration (56 days). We observed that miR-132-3p expression was not modulated in this latter TB model (data not shown). Therefore, miR-132-3p appeared to have a major impact in the early phase of infection and in particular in macrophages, which massively infiltrate the lungs of HA mice, where *Mtb* almost exclusively resides. This is supported by the fact that miR-132-3p was also upregulated in CD11b⁺ macrophages sorted from the lungs of HA mice.

MiR-132-3p possesses well-documented anti-inflammatory effects in macrophages (Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Shaked *et al.*, 2009; Wanet *et al.*, 2012). Interestingly, miR-132-3p limits inflammation by inhibiting the cholinergic pathway in both splenic and alveolar macrophages, which in turn inhibits the LPS response (Shaked *et al.*, 2009; Wanet *et al.*, 2012). Here, we found that miR-132-3p neutralization promoted M2-like polarization and upregulated several anti-inflammatory miR-132-3p targets (*i.e.* *FOXO1*, *FOXO3*, *HBEGF*, *EP300*) (supplementary figure S3), suggesting that miR-132-3p might be implicated in the shift from M1- to M2-type polarization in *Mtb*-infected macrophages. In line with this transcriptomic profile, we showed that miR-132-3p neutralization altered macrophage mitochondrial metabolism by promoting oxidative phosphorylation, which is a specificity for M2 macrophages (Pisu *et al.*, 2021; Viola *et al.*, 2019). Our present work also identified a new target gene for miR-132, *i.e.* *FOXP1*, which participates in macrophages polarization switch. Indeed, *FOXP1* inhibition is necessary for the *CSF1R*-dependent differentiation of monocyte into macrophages and for macrophage functions such as macrophage migratory capacity and phagocytosis (Shi *et al.*, 2008; Tugal *et al.*, 2013). We showed that *FOXP1* inhibition reverted the effect of miR-132-3p neutralization on

macrophage polarization, therefore confirming its implication in this process. In agreement with this, *FOXP1* expression was anti-correlated to that of miR-132-3p and *CSF1R* in *Mtb*-infected M ϕ THP-1-1, as well as in HA mice lungs and CD11b⁺ sorted cells. Furthermore, we observed that the effect of rifampicin treatment in the HA mouse model, which is known to induce M2-like polarization (Wang et al., 2017b), mimicked the inhibition of miR-132, which induces the up- and down expression of *FOXP1* and *CSF1R*, respectively, and decreased the expression of pro-inflammatory genes such as *CXCL2*, *CXCL10*, *IL6*, *IL23A*, *IL7R*, *IL15RA* (supplementary figure S4). Whether miR-132-3p is directly involved in the rifampicin-induced M2-like change still needs to be investigated.

Nevertheless, it seems paradoxical for miR-132-3p inhibition to play a protective role against *Mtb* while promoting M2-like responses, known to be permissive to *Mtb*. Macrophage polarization constitute a versatile spectrum (Mosser and Edwards, 2008), and *Mtb* has been shown to trigger an ambiguous M1/M2-like phenotype to its own benefits (Pisu et al., 2021; Rao Muvva et al., 2019). Although miR-132-3p expression increased while M1-like markers progressively decreased over time after infection, we found that infected M ϕ THP-1-1 showed higher expression of these M1 markers compared to uninfected macrophages. Our data suggest that, upon infection, M ϕ THP-1-1 progressively drifted towards a less pro-inflammatory phenotype but remained pro-inflammatory.

Considering the variety of miR-132-3p targets, it is also possible that miR-132-3p itself might promote both types of polarization, actively participating in the shift to this peculiar macrophage phenotype. This is for example the case for *EP300*, a validated target of miR-132-3p in human macrophages (Ni et al., 201), which functions are versatile. Indeed, although it has recognized M2-like promoting effects (Li et al., 2021), it also has been shown to elicit pro-inflammatory effects (Deng et al., 2004a) including on IFN γ signaling cascade (Ni et al., 2014). Additionally, as *Mtb* uses macrophages to escape host immune responses (Brites and Gagneux, 2015), the beneficial effect of *FOXP1* upregulation in *Mtb* infected macrophages could be due to diminished phagocytosis (Shi et al., 2008), condemning more extracellular *Mtb* to be exposed to secreted antimicrobial compounds such as reactive oxygen species (ROS) (Herb and Schramm, 2021). Indeed, even if *Mtb* has the ability to circumvent macrophage intracellular ROS production, the bacilli possess high vulnerability to extracellular ROS (Tyagi et al., 2015). Thus, we can hypothesize that upregulation of *FOXP1* mediated by

miR-132-3p neutralization, exerts additional beneficial effects on the host response. In contrast, the upregulation of *FOXP1* in dendritic cells acts in favour of inflammation (Guo et al., 2019), implying that the full regulatory spectrum of this transcription factor and its functions in TB are not yet fully elucidated.

In conclusion, we have identified and attributed a novel role to the miR-132/*FOXP1* axis in the response of macrophages to *Mtb* infection: the control of their mitochondrial metabolism and polarization switch. Our work provides insight into the inability of macrophages to control *Mtb* burden during the early stage of infection, and brings in vivo proof-of-concept experiments to control bacterial load by neutralizing miR-132-3p that opens new therapeutic avenues for TB.

Figure and Legends

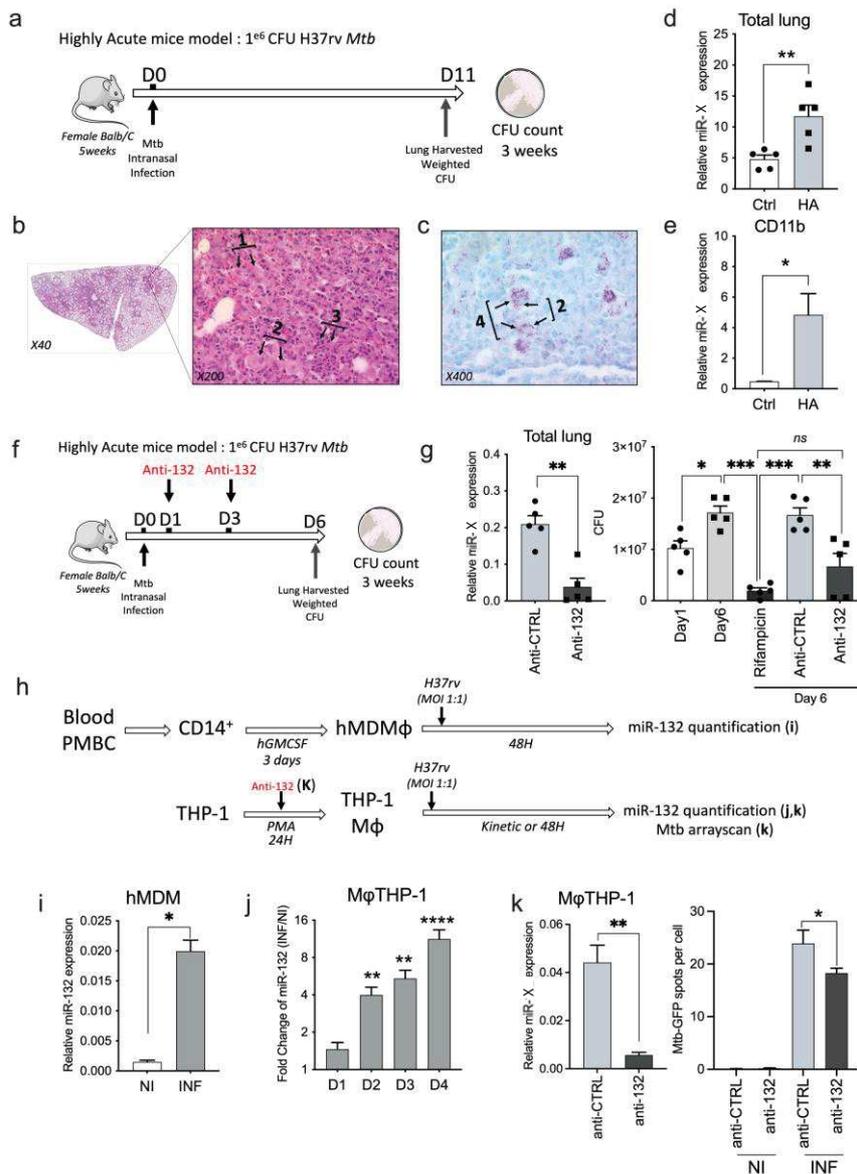


Figure 1: MiR-132-3p controls Mycobacterium tuberculosis replication in human and mice macrophages.
a) Schematic illustration of the highly acute tuberculosis infection mice model (HA). Female C57/BL6 mice were infected with 10^6 *Mtb* by the intranasal route. Mice were sacrificed 11 days after infection and lung were removed and homogenized for mRNA extraction and CFU count. **b**) Haematoxylin and Eosin and **c**) Ziehl-Neelsen staining of lung, with 40, 200 and 400X of magnitude, respectively. Arrows show: 1- macrophage infiltration, 2- large macrophages with bacilli, 3- neutrophil aggregates and 4- Large macrophage containing *Mtb* bacilli in purple. **d-e**) miR-132-3p expression levels in total lung (**d**) or lung CD11b⁺ sorted macrophages (**e**) from HA or healthy mice. **f**) Schematic illustration of miR-132-3p antagonist treatment of HA mice model (HA). Mice were infected with 10^6 *Mtb* and treated 2 times by miR-132-3p (Anti-132) and control (Anti-CTRL) antagoniRs at days 1 and 3, by the intranasal route. Mice were sacrificed 6 days after *Mtb*-infection. **g**) MiR-132-3p expression level in total lung of HA mice treated with miR-132-3p (Anti-132) and control (Anti-CTRL) antagoniRs. Colony-forming unit (CFU) corresponding to 1 day and 6 days after infection were quantified. Bars represents CFU for pre-treatment lung CFU burden, (Day1) or vehicle (Day6); 3 days treatment with 20 mg/kg rifampicin (rifampicin), and treatment with miR-132-3p (Anti-132) or control (Anti-CTRL) antagoniRs **h**) Schematic illustration of *in-vitro* human *Mtb*-infection experiment, in PMA-differentiated THP-1 macrophages (MφTHP-1) and in primary human CD14⁺ monocyte derived macrophages (hMDM). **i-j**) miR-132-3p expression in hMDM (**i**) and MφTHP-1-1(**j**)

infected with *Mtb*. White and grey colors corresponded to Non-Infected (NI) and *Mtb*-infected (INF) conditions, respectively. **k**) miR-132-3p expression levels in *Mtb*-infected M ϕ THP-1-1 and transfected with miR-132-3p (Anti-132) and CTRL (anti-CTRL) antagoniRs. Fluorescence quantification of *Mtb* stained with HCS CellMask™ Blue, using ArrayScan™ instrument. White and grey colors corresponded to Non-Infected (NI) and *Mtb*-infected (INF) conditions, respectively. Light and dark grey colours corresponded to control (Anti-CTRL) and miR-132-3p (Anti-132) antagoniRs, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 to 6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. and *** $p < 0.001$

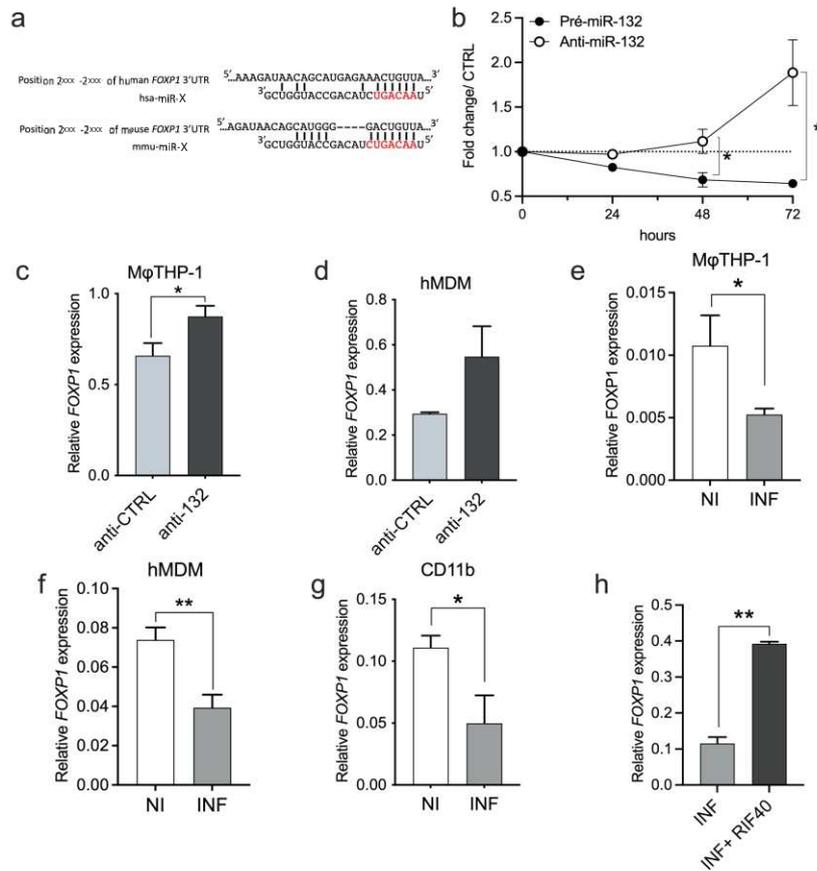


Figure 2: miR-132-3p targets Forkhead box P1 (FOXP1), a tuberculosis-infection susceptibility gene. **a)** schematic representation of the binding site of miR-132-3p on the 3'UTR of *FOXP1* in human **b)** Luciferase activity levels upon co-transfection of HEK293 cells with a luciferase construct (50 ng) containing 3'UTR of *FOXP1* together with control pre-miR, pre-miR-132-3p (premiR-132) or antagomiR-132-3p (Anti-132) (n=4). Kinetics results are shown after transfection and expressed as mean \pm SEM. Data are representative of two independent experiments. *p<0.05 compared with antagomiR-132-3p and pre-miR-132. **c)** *FOXP1* expression levels in MφTHP-1-1(c) and hMDM (d) transfected with miR-132-3p (Anti-132) and CTRL (anti-CTRL) antagonists, at 48 hours post-transfection, respectively. **e-g)** *FOXP1* expression levels in *Mtb*-infected or not MφTHP-1-1(e), hMDM (f) and CD11b⁺ (g) macrophages, at 3-, 4- and 11-days post-infection, respectively. White and grey colours corresponded to Non-Infected (NI) and *Mtb*-infected (INF) conditions, respectively. **h)** *FOXP1* expression levels in *Mtb*-infected lung from HA mouse model, treated or not with Rifampicin (RIF40). Mice received 8 doses of 40 mg/kg and were sacrificed 11 days after infection. Grey and black colours correspond to *Mtb* (INF) and *Mtb* with rifampicin treatment (INF+RIF40) infection conditions, respectively. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 to 6 independent experiments. *p<0.05, and **p<0.01.

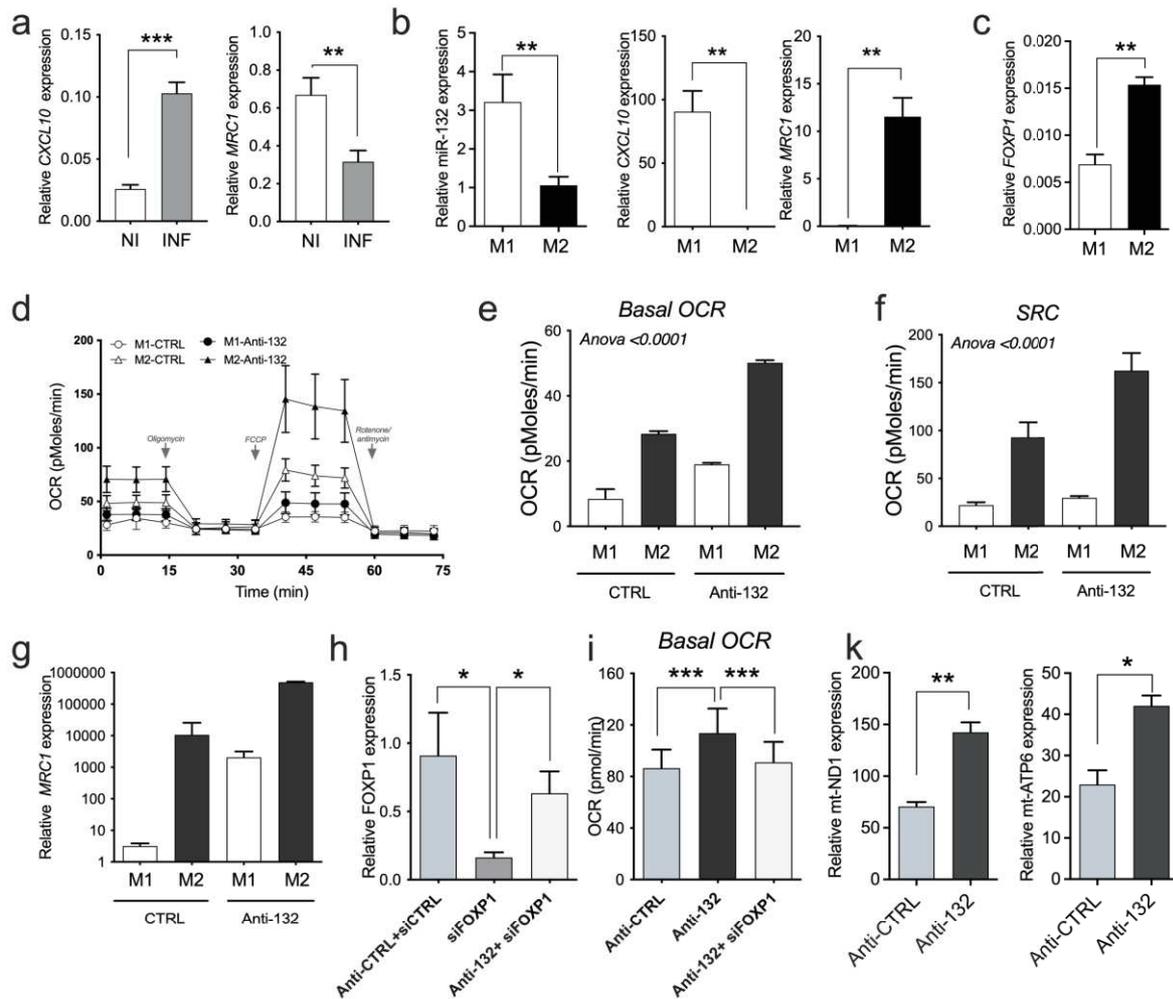


Figure 3: miR-132-3p controls macrophage polarization and mitochondrial metabolism, during *Mtb* infection (a) *CXCL10* and *MRC1* expression levels in *Mtb*-infected hMDM, at 48 hours post-infection. White and grey colours correspond to non-infected (NI) and *Mtb*-infected (INF) conditions, respectively. (b) hMDM were polarized into M1- and M2-like macrophages using IFN γ (20ng/ml) and LPS (100ng/ml), and IL4, IL13 (25ng/ml) stimulation, for 48 hours. MiR-132-3p expression level was quantified using RT-qPCR, and M1- and M2-like polarization phenotype was monitored by quantification of *CXCL10* and *MRC1* mRNA. (c) *FOXP1* expression level was quantified using RT-qPCR. (d) Real time analysis of OCR for M ϕ THP-1-1 polarized into M1- (circles) and M2-like (triangles) macrophage phenotypes. Before polarization, M ϕ THP-1-1 were transfected with miR-132-3p (Black colour) or control (White colour) antagonists. (e) Basal OCR obtained before oligomycin injection, (f) spare respiratory capacity (SRC) calculated as the difference between maximal and basal OCR, and relative proton leak. (g) *MRC1* expression levels in M1-like (White colour) and M2 (Black colour) macrophage phenotypes transfected with miR-132-3p or control antagonists. (h-i) hMDM were transfected with siFOXP1, or Anti-132, or co-transfected with Anti-132 and si-FOXP1 for 48 hours. (h) *FOXP1* expression level was quantified using RT-qPCR. (k) Mitochondrial gene *mt-ND1* and *mt-ATP6* expression levels were quantified in *Mtb*-infected hMDMs transfected with Anti-132 and anti-C1, at 4 days. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 to 10 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001

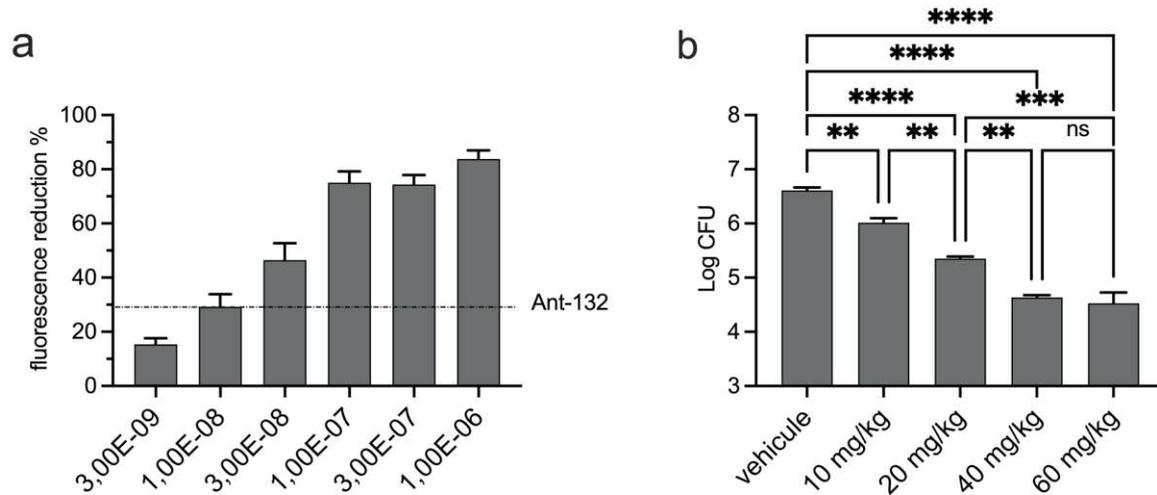


Figure S1: miR-132-3p dependent reduction of *Mtb* burden is equivalent to a 10 nM rifampicin treatment in M ϕ THP-1-1 **a)** Fluorescence of GFP-expressing *Mtb* was measured inside M ϕ THP-1-1 after 3 and 4 days of infection for Anti-132 transfection and rifampicin treatment, respectively. THP-1 monocytes were transfected with Anti-132 36 hours before M ϕ THP-1-1 infection and rifampicin treatment was administered 24 hours after infection in independent M ϕ THP-1-1 cultures. **b)** *Mtb* survival in HA mice lungs after 11 days of daily treatment with 10, 20, 40 or 60 mg/kg Rifampicin. Results are expressed as mean \pm SEM * p <0.05, ** p <0.01. and *** p <0.001

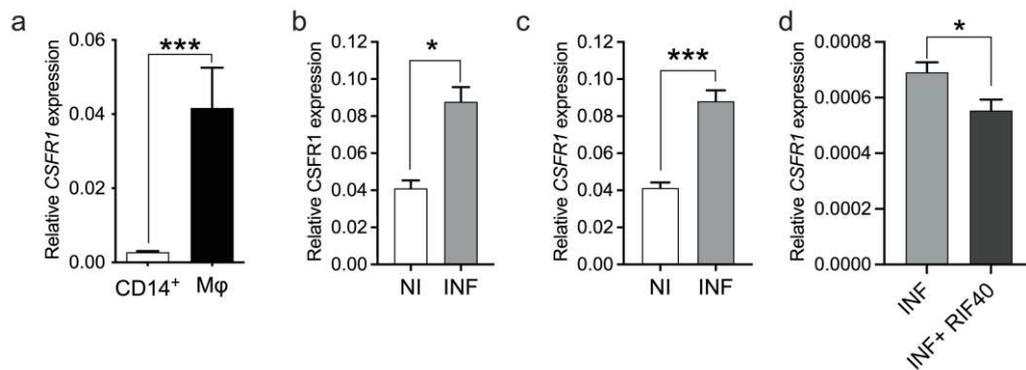


Figure S2: *CSFR1* expression level is inversely correlated with *FOXP1*. **a)** *CSFR1* expression levels in CD14⁺ monocyte and hMDM, using RT-qPCR. **(b-c)** *CSFR1* expression levels in *Mtb*-infected hMDM **b)** and MφTHP-1-1 **c)**, at 72 hours post-infection. White and grey colours corresponded to non-infected (NI) and *Mtb*-infected (INF) conditions, respectively. **d)** *CSFR1* expression levels in *Mtb*-infected lung from HA mouse model; treated or not with Rifampicin (RIF40). Mice received 8 doses of 40 mg/kg and were sacrificed 11 days after infection. Results are expressed as mean ± SEM of 3 to 10 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001

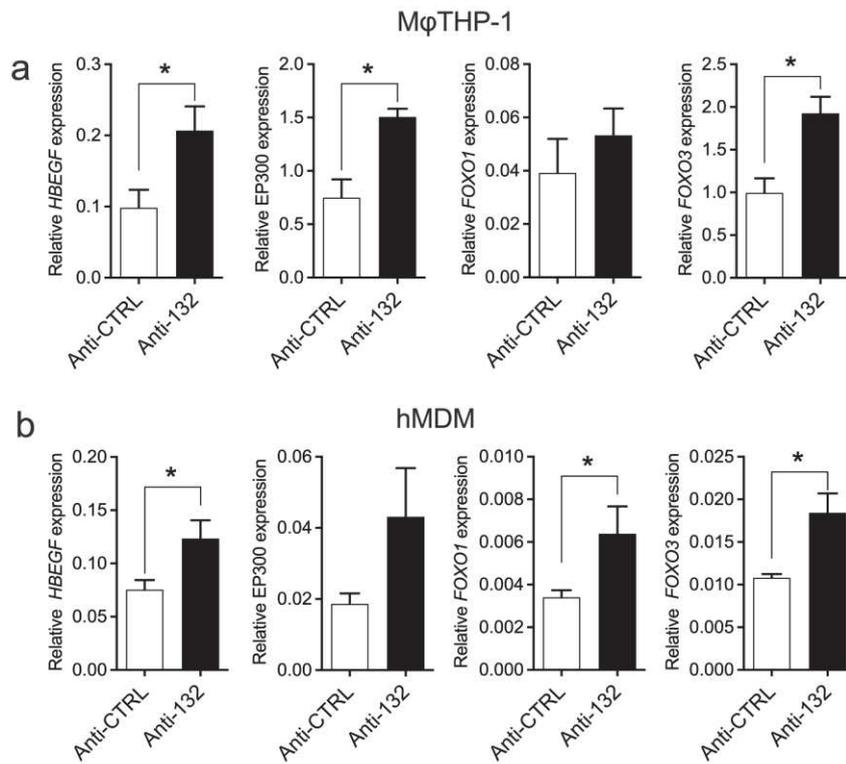


Figure S4: miR-132-3p neutralization increased four validated target genes *HBEGF*, *EP300*, *FOXO1* and *FOXO3*, associated with TB and M2-LIKE polarization mechanism, in *Mtb*-infected macrophages. *Mtb*-Infected hMDM and M ϕ THP-1-1 were transfected with with miR-132-3p (Anti-132) and CTRL (anti-CTRL) antagoniRs. Forty-eight hours post-infection, mRNA was extracted and *HBEGF*, *EP300*, *FOXO1* and *FOXO3* expression levels were quantified using RT-qPCR in M ϕ THP-1-1 (a) and hMDM (b). Results are expressed as mean \pm SEM of 3 to 6 independent experiments. * $p < 0.05$

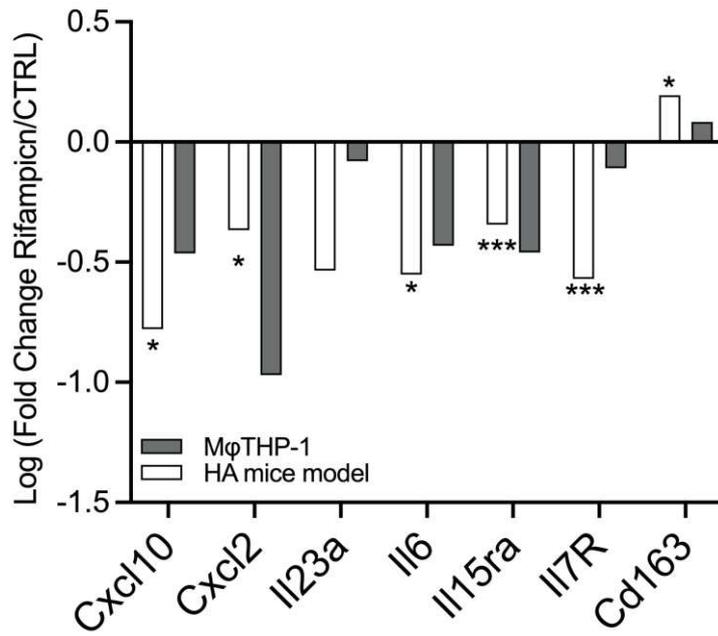


Figure S3: Rifampicin induces a phenotype shift from M2-like to M1-like macrophages infected with *Mtb*
 Expression levels of immune related genes in mice treated with 40 mg/kg of Rifampicin and in MφTHP-1-1 transfected with Anti-132 as compared to untreated controls. Results are expressed as mean ± SEM of 3 to 10 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01. and ***p<0.001

Acknowledgments

This research was initiated by Inserm and Sanofi, funded by Inserm (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier and EVOTEC ID, Lyon. P.B. received a fellowship from Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, convention Cifre N°2017/1678).

Author Contributions

IDR, FA and CR supervised the work and designed the experiments. Experimental work was performed by PB, MR, IB, LS, AU, DM and SL. PB, FA, CR and IDR analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors were involved in reading and editing the manuscript, and approved the final version.

Declaration of Interests

The authors declare no conflict of interest

References

Bade, P., Simonetti, F., Sans, S., Laboudie, P., Kissane, K., Chappat, N., Lagrange, S., Apparailly, F., Roubert, C., and Duroux-Richard, I. (2021). Integrative Analysis of Human Macrophage Inflammatory Response Related to *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. *Front. Immunol.* *12*.

Ballinger, E., Mosior, J., Hartman, T., Burns-Huang, K., Gold, B., Morris, R., Goullieux, L., Blanc, I., Vaubourgeix, J., Lagrange, S., et al. (2019). Opposing reactions in coenzyme A metabolism sensitize *Mycobacterium tuberculosis* to enzyme inhibition. *Science* *363*, eaau8959.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281–297.

Behrouzi, A., Alimohammadi, M., Nafari, A.H., Yousefi, M.H., Riazi Rad, F., Vaziri, F., and Siadat, S.D. (2019). The role of host miRNAs on *Mycobacterium tuberculosis*. *ExRNA* *1*, 40.

Brites, D., and Gagneux, S. (2015). Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev* 264, 6–24.

Chakaya, J., Khan, M., Ntoumi, F., Aklillu, E., Fatima, R., Mwaba, P., Kapata, N., Mfinanga, S., Hasnain, S.E., Katoto, P.D.M.C., et al. (2021). Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. *International Journal of Infectious Diseases*.

Couturier, C., Lair, C., Pellet, A., Upton, A., Kaneko, T., Perron, C., Cogo, E., Menegotto, J., Bauer, A., Scheiper, B., et al. (2016). Identification and optimization of a new series of anti-tubercular quinazolinones. *Bioorg Med Chem Lett* 26, 5290–5299.

Deng, W.-G., Zhu, Y., and Wu, K.K. (2004a). Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 103, 2135–2142.

Deng, W.-G., Zhu, Y., and Wu, K.K. (2004b). Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 103, 2135–2142.

Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12, 697.

Egen, J.G., Rothfuchs, A.G., Feng, C.G., Winter, N., Sher, A., and Germain, R.N. (2008). Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 28, 271–284.

Eulalio, A., Schulte, L., and Vogel, J. (2012). The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol* 9, 742–750.

Gantier, M.P., Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2007). Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol* 85, 458–462.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964.

Grant, A.V., Sabri, A., Abid, A., Rhorfi, I.A., Benkirane, M., Souhi, H., Amrani, H.N., Alaoui-Tahiri, K., Gharbaoui, Y., Lazrak, F., et al. (2016). A genome-wide association study of pulmonary tuberculosis in Morocco. *Hum Genet* 135, 299–307.

Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-111.

Guo, Z., Tao, Y., Yin, S., Song, Y., Lu, X., Li, X., Fan, Y., Fan, X., Xu, S., Yang, J., et al. (2019). The transcription factor *Foxp1* regulates the differentiation and function of dendritic cells. *Mech Dev* 158, 103554.

Herb, M., and Schramm, M. (2021). Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)* 10, 313.

Iwai, H., Funatogawa, K., Matsumura, K., Kato-Miyazawa, M., Kirikae, F., Kiga, K., Sasakawa, C., Miyoshi-Akiyama, T., and Kirikae, T. (2015). MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 95, 246–250.

Lenaerts, A., Barry, C.E., and Dartois, V. (2015). Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. *Immunol Rev* 264, 288–307.

Li, D., Wang, A., Liu, X., Meisgen, F., Grünler, J., Botusan, I.R., Narayanan, S., Erikci, E., Li, X., Blomqvist, L., et al. (2015). MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *J Clin Invest* 125, 3008–3026.

Li, W., Wang, Y., Zhu, L., Du, S., Mao, J., Wang, Y., Wang, S., Bo, Q., Tu, Y., and Yi, Q. (2021). The P300/XBP1s/Herpud1 axis promotes macrophage M2 polarization and the development of choroidal neovascularization. *J Cell Mol Med* 25, 6709–6720.

Liu, F., Li, Y., Jiang, R., Nie, C., Zeng, Z., Zhao, N., Huang, C., Shao, Q., Ding, C., Qing, C., et al. (2015). miR-132 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar macrophages by the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Experimental Lung Research* 41, 261–269.

Lugo-Villarino, G., Vérollet, C., Maridonneau-Parini, I., and Neyrolles, O. (2011). Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. *Front Immunol* 2, 43.

Marino, S., Cilfone, N.A., Mattila, J.T., Linderman, J.J., Flynn, J.L., and Kirschner, D.E. (2015). Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* 83, 324–338.

Marino, S., Hult, C., Wolberg, P., Linderman, J.J., and Kirschner, D.E. (2018). The Role of Dimensionality in Understanding Granuloma Formation. *Computation* 6, 58.

Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451–483.

Mehta, A., Zhao, J.L., Sinha, N., Marinov, G.K., Mann, M., Kowalczyk, M.S., Galimidi, R.P., Du, X., Erikci, E., Regev, A., et al. (2015). The MicroRNA-132 and MicroRNA-212 Cluster Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Survival with Age by Buffering FOXO3 Expression. *Immunity* 42, 1021–1032.

Mishra, N., Friedson, L., Hanin, G., Bekenstein, U., Volovich, M., Bennett, E.R., Greenberg, D.S., and Soreq, H. (2017). Antisense miR-132 blockade via the AChE-R splice variant mitigates cortical inflammation. *Sci Rep* 7, 42755.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.

Nahid, M.A., Yao, B., Dominguez-Gutierrez, P.R., Kesavalu, L., Satoh, M., and Chan, E.K.L. (2013). Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J Immunol* 190, 1250–1263.

Ni, B., Rajaram, M.V.S., Lafuse, W.P., Landes, M.B., and Schlesinger, L.S. (2014). Mycobacterium tuberculosis decreases human macrophage IFN- γ responsiveness through miR-132 and miR-26a. *J Immunol* 193, 4537–4547.

Pisu, D., Huang, L., Grenier, J.K., and Russell, D.G. (2020). Dual RNA-Seq of Mtb-Infected Macrophages In Vivo Reveals Ontologically Distinct Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep* 30, 335-350.e4.

Pisu, D., Huang, L., Narang, V., Theriault, M., L -Bury, G., Lee, B., Lakudzala, A.E., Mzinza, D.T., Mhango, D.V., Mitini-Nkhoma, S.C., et al. (2021). Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J Exp Med* 218, e20210615.

Rao Muvva, J., Parasa, V.R., Lerm, M., Svensson, M., and Brighenti, S. (2019). Polarization of Human Monocyte-Derived Cells With Vitamin D Promotes Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front Immunol* 10, 3157.

Rao Muvva, J., Parasa, V.R., Lerm, M., Svensson, M., and Brighenti, S. (2020). Polarization of Human Monocyte-Derived Cells With Vitamin D Promotes Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front Immunol*. 10.

Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A., and Soreq, H. (2009). MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity* 31, 965–973.

Shi, C., Sakuma, M., Mooroka, T., Liscoe, A., Gao, H., Croce, K.J., Sharma, A., Kaplan, D., Greaves, D.R., Wang, Y., et al. (2008). Down-regulation of the forkhead transcription factor Foxp1 is required for monocyte differentiation and macrophage function. *Blood* 112, 4699–4711.

Singh, A.K., Ghosh, M., Kumar, V., Aggarwal, S., and Patil, S.A. (2021). Interplay between miRNAs and Mycobacterium tuberculosis: diagnostic and therapeutic implications. *Drug Discov Today* 26, 1245–1255.

Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1135–1144.

Tyagi, P., Dharmaraja, A.T., Bhaskar, A., Chakrapani, H., and Singh, A. (2015). Mycobacterium tuberculosis has

diminished capacity to counteract redox stress induced by elevated levels of endogenous superoxide. *Free Radic Biol Med* *84*, 344–354.

Van den Bossche, J., Baardman, J., and de Winther, M.P.J. (2015). Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. *J Vis Exp*.

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., and Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* *10*, 1462.

Vrieling, F., Kostidis, S., Spaink, H.P., Haks, M.C., Mayboroda, O.A., Ottenhoff, T.H.M., and Joosten, S.A. (2020). Analyzing the impact of *Mycobacterium tuberculosis* infection on primary human macrophages by combined exploratory and targeted metabolomics. *Sci Rep* *10*, 7085.

Wanet, A., Tacheny, A., Arnould, T., and Renard, P. (2012). miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res* *40*, 4742–4753.

Wang, S., Zhang, J., Sui, L., Xu, H., Piao, Q., Liu, Y., Qu, X., Sun, Y., Song, L., Li, D., et al. (2017). Antibiotics induce polarization of pleural macrophages to M2-like phenotype in patients with tuberculous pleuritis. *Sci Rep* *7*, 14982.

Wei, Y., and Schober, A. (2016). MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies. *Cell Mol Life Sci* *73*, 3473–3495.

Xiao, C., and Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* *136*, 26–36.

3. Article 3

3.1 Introduction

La réponse immunitaire générée chez l'Homme par l'infection avec Mtb est complexe. Dans un premier temps, elle repose principalement sur les mécanismes de défense mis en place par les macrophages. Très vite, ces derniers recrutent d'autres cellules immunitaires innées, puis, si cette réponse précoce ne parvient pas à éliminer l'infection, un granulome se forme pour contenir la dissémination de Mtb. Le granulome est une structure multicellulaire composée de cellules immunitaires innées et acquises *e.g* macrophages, cellules dendritiques, Natural Killers, lymphocytes B et T (L. Huang et Russell 2017; Mattila *et al.* 2013). La tuberculose est considérée comme une maladie liée à la défaillance du système immunitaire (Crawford et Curtis, 2008). Par conséquent, pour améliorer les thérapies actuelles, l'intérêt de la recherche se porte de plus en plus sur les thérapies dirigées par l'hôte afin d'améliorer la réponse immunitaire au cours de l'infection et optimiser le traitement antibiotique (Abreu, Giri, et Quinn 2020).

Compte tenu du rôle précoce et primordial des macrophages au cours de l'infection (Huynh, Joshi, et Brown 2011; Upadhyay, Mittal, et Philips 2018), de nombreux modèles d'infection intra-macrophages sont utilisés pour la recherche, notamment par l'industrie pharmaceutique. Parmi ces modèles, les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 différenciées en macrophages (M ϕ THP-1) sont très utilisées (Tedesco *et al.* 2018). J'ai, par ailleurs réalisé la quasi-totalité de mes études fonctionnelles dans ce modèle, essentiellement pour des raisons pratiques. En effet, les THP-1 sont des cellules immortalisées, simples à cultiver, et qui permettent une reproductibilité des résultats (Tedesco *et al.* 2018). Cependant, comme toute lignée cellulaire, les THP-1 ont aussi des limites. Au niveau de la réponse inflammatoire, elles ne reproduisent que de façon partielle la réponse des monocytes humains primaires différenciés en macrophages (hMDM) et infectés *ex vivo* (Madhvi *et al.* 2019). A ce jour, aucune étude n'a été menée pour comparer leur réponse à celle des macrophages alvéolaires humains (hAM) *in vivo* et *ex vivo*.

Bien que les modèles d'infection intramacrophages soient simples à mettre en place, ils ne permettent pas de reproduire la complexité de la réponse immunitaire *in vivo*. Ainsi, des modèles *in vitro* plus complexes ont été développés. Par exemple, le modèle *Hollow fiber*

(Cavaleri et Manolis 2015; Kloprogge *et al.* 2019) et des modèles reposants sur des structures organoïdes permettant de reproduire des assemblages cellulaires similaires aux granulomes *in vitro* (Iakobachvili *et al.* 2021). En pharmacologie, les modèles murins de tuberculose sont également très utilisés, du fait de leur praticité (gain de place) et des paramètres qu'ils permettent d'étudier ([pour revue \(Orme et Ordway 2016\)](#)), *e.g.* pharmacocinétique, pharmacodynamique, signes cliniques. J'ai donc également utilisé un modèle murin d'infection précoce (le modèle Highly Acute, HA) pour étudier le rôle de miR-132 au cours de l'étude réalisée en deuxième partie de mes travaux et pour compléter l'utilisation des modèles d'infection *in vitro*.

La troisième partie de mes travaux de recherche a été consacrée à évaluer la réponse inflammatoire des modèles que j'ai utilisés dans mes travaux, *i.e.* M ϕ THP-1, hMDM et macrophages pulmonaires CD11b⁺ de souris infectées selon le modèle HA (HA-CD11b⁺), et à la comparer à celle des hAM infectés *in vivo* et *ex vivo*, grâce à l'exploitation de données provenant d'études transcriptomiques déjà publiées. J'ai également étudié la réponse inflammatoire des M ϕ THP-1 cultivés en conditions hypoxiques (hypoxia-M ϕ THP-1) afin de reproduire une des conditions environnementales présentes dans les granulomes et d'induire, dans ce type cellulaire, l'accumulation de gouttelettes lipidiques. La comparaison a été effectuée à partir des transcriptomes de gènes liés à la réponse de l'hôte en contexte de M ϕ THP-1, hypoxia-M ϕ THP-1, hMDM et HA-CD11b⁺ infectés, et j'ai recherché l'expression de ces gènes dans deux jeux de données publiés par [Lavalett *et al.* \(2017\)](#) et [Papp *et al.* \(2018\)](#).

Ces résultats, pour l'instant très préliminaires, feront l'objet d'un troisième article. J'ai réalisé et analysé le transcriptome de plusieurs autres modèles d'infections, notamment : les macrophages murins de la lignée RAW264.7, les M ϕ THP-1 infectés avec *M. marinum*, les extraits de poumons totaux de modèles d'infection murins HA, chronique et C3Heb/Fej. Ces modèles n'ont pour l'instant pas pu être intégrés à l'analyse car il manque des expériences pour permettre leur exploitation.

Cette troisième partie de mes travaux a donc, à ce jour, permis d'identifier treize gènes qui sont conservés entre les M ϕ THP-1, hMDM et HA-CD11b⁺ infectés, et qui pourraient être utilisés à des fins translationnelles. L'expression de douze de ces gènes serait également conservée dans les hAM infectés *ex vivo* avec *Mtb*. Mes résultats ont également montré que la culture en condition hypoxique permet de reproduire assez fidèlement la réponse

inflammatoire des hAM *in vivo*, dont la caractéristique principale est une faible régulation des gènes de la réponse inflammatoire.

Ces résultats permettent donc une meilleure caractérisation de la réponse inflammatoire des modèles utilisés pour étudier la tuberculose. Cette caractérisation est très importante pour faire une utilisation éclairée de ces modèles, notamment dans le contexte de la recherche de thérapies dirigées par l'hôte.

Which *in vivo* and *in vitro* tuberculosis models for host directed therapies?

Pauline Bade^{1,2}, Lilia Boucinha², Stéphanie Sans², Khadija Kissane², Nicolas Chappat²,
Sophie Lagrange², Isabelle Blanc², Caroline Michel², Pierre Cortez², Florence Apparailly¹,
Isabelle Duroux-Richard and Christine Roubert^{2, #*}

¹ IRMB, INSERM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France

² Evotec ID (Lyon), SAS, 40 avenue Tony Garnier, Lyon, France.

Correspondence: Christine.roubert@evotec.com

* These authors contributed equally to this work.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Tuberculosis (TB) is considered a host immune failure disease. *Mycobacterium tuberculosis* residence within the host induces drug tolerance. Hence, host directed therapies are of interest to improve the immune response and potentiate TB treatment and / or vaccination. Macrophage are the main host cells for Mtb. TB *in vitro* macrophage models and murine TB *in vivo* models, developed to mimic *in vivo* human macrophage or lungs infection, are used for pharmaceutical research. However, the inflammatory response triggered by Mtb infection in TB model is yet to be fully characterized. In our study, we use a transcriptomic approach to quantify 184 human or 181 murine host response related genes in three early macrophage response models (*i.e.* THP-1 differentiated in macrophage M ϕ THP-1, human primary monocyte derived macrophage (hMDM) and CD11b⁺ sorted macrophages from mouse lungs infected following the highly acute TB model (HA-CD11b⁺)), and one late macrophage response model (hypoxia stimulated M ϕ THP-1). We compared their expression profiles to that of *ex vivo* and *in vivo* (from TB patients) human alveolar macrophages (hAM) infected with Mtb. We identified 12 genes that can translate *ex vivo* hAM response of to M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺. We suggests that the hypoxia stimulated M ϕ THP-1 is relevant to mimic *in vivo* hAM response. Or work provides further understanding on TB models

inflammatory response and highlights the importance of choosing the appropriate models due to differences in their inflammatory response.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis models, host directed therapy, macrophage, host response, inflammatory response, hypoxia

Introduction

As reported by WHO (WHO, 2020), Tuberculosis' mortality in 2020 was estimated to be about 1.5 to 1.7 million worldwide, which makes it the second most deadly infectious disease behind Covid-19. But unlike Covid-19, mortality from Tuberculosis (TB) is mostly associated with poverty, and there is widespread drug resistance to the potent four drug combination composed of rifampicin, ethambutol, isoniazid and pyrazinamide used to treat TB. Moreover tuberculosis itself as well as the long six month cure leaves the patients with severe lung damage, reduced respiratory capacity as well as with the many adverse effects of the antibiotics (Yang *et al.* 2017) as well as generate long lasting damage to the microbiome (O'Toole et Gautam 2018). The limitation of current therapies urges the need for protective vaccines. Indeed, upon infection with mycobacterium tuberculosis (Mtb), the causative agent of TB, only 5% of the population will develop an active primary TB in the following 1 to 2 years, whereas 95% of immunocompetent population will either completely eradicate or be able to contain the bacteria to develop a latent tuberculosis infection (LTBI), from which some will relapse into active TB, even years after their first exposure to the bacterium. Although specific biomarkers (Sudbury *et al.* 2020) and exhaustive causes of reactivation are still a matter of debate (Cardona 2016), immune system deficiency is clearly involved: LTBI can be reactivated in immunocompromised individuals, like in the case of human immunodeficiency virus (HIV) or with the use of an anti-tumour necrosis (TNF) factor therapy (Crawford et Curtis 2008). Consequently, targeting the immune response through host directed therapies (HDT) is now considered one of the key strategies in future therapies for TB (Abreu, Giri, et Quinn 2020).

As the implication of the host immune response is an essential factor to vaccine, total cure and HDT, understanding the host response to Mtb infection is a key. When it comes to host cells, macrophages are of particular interest as they are Mtb main cellular niche and for they trigger an inflammatory response that shapes the innate immunity (Upadhyay, Mittal, et Philips 2018). Moreover, Mtb delays the acquired immunity so, during the 4 - 6 first weeks of the infection in humans (12 days in mice), the host response relies entirely on innate immunity, then particularly on macrophages, (Wolf *et al.* 2008), while this period is reduced to 4 – 7 days in other bacterial infections (Charles A Janeway *et al.* 2001). If macrophages fail to clear the infection during this early phase, the recruitment of other innate immune cells and later of adaptive immune cells to the site of the infection leads to the formation of the

tuberculous granuloma into which Mtb can persist to hostile environmental factors (e.g. drugs, hypoxia, nutrient starvation) for years either in an active or in a latent form. Therefore, Mtb has developed many mechanisms to hijack macrophage response to its own benefits and establish successful infection. For instance, Mtb is able to shift macrophage polarisation to settle a pro/anti-inflammatory balanced phenotype that is beneficial for its survival (Upadhyay, Mittal, et Philips 2018). Reciprocally, residence within macrophages influences Mtb physiology and triggers bacterial defence mechanisms involved in drug tolerance (Adams *et al.* 2011). Hence, *in vitro* macrophage models and *in vivo* animal models have been used to predict drugs' efficiency on the different Mtb phenotypes that can only be obtained in human TB (Yuan et Sampson 2018).

The predictive value of *in vitro* and *in vivo* models depends on their ability to mimic TB patients' lung macrophage response. However, most models used in pharmaceutical research have not been extensively studied on the host-pathogen interaction point of view.

In this study, we challenged, in a transcriptional manner, the host response to Mtb infection triggered in four TB models. The host response was measured using RT-qPCR with two custom Taqman low density arrays (TLDA) allowing the quantification of 184 human (described by Bade *et al.* (2021)) or 181 murine genes that encompass the full landscape of host immune responses. As no gold standard exists that comprehends all human TB *in vivo* conditions (Yuan et Sampson 2018), to model the early primo infection of naïve macrophages, we used THP-1 derived macrophages (M ϕ THP-1), *ex vivo* primary human blood monocytes derived into macrophages (hMDM) as well as *ex vivo* macrophages sorted from a short (11 days) highly acute (HA) murine TB infection model (Ballinger *et al.* 2019; Couturier *et al.* 2016). Then, as a late infection cellular model we chose to analyse *in vitro* generated foamy macrophage cells (Daniel *et al.* 2011). We questioned whether these models could recapitulate human disease by introducing two published datasets using PCA analysis: *i) ex vivo* human alveolar macrophages (hAM) infected with Mtb (Papp *et al.* 2018) and *ii) in vivo* hAM collected from bronco-alveolar lavages of TB patients (*in vivo* hAM).

Globally, our analysis is an attempt to characterize commonly used *in vitro* models of infected macrophages, M ϕ THP-1 and hMDM compared to murine (HA-CD11b⁺), sorted from an extensively used murine model in drug discovery. We identified 13 commonly upregulated genes upon infection in these models as a signature of early Mtb infection. Twelve of these 13

genes showed the same tendency observed in *ex vivo* infected hAM dataset. Then, we propose hypoxia-M ϕ THP-1 as a pertinent late infection macrophage model to mimic the *in vivo* hAM response in patient lungs.

Materials and Methods

Mycobacterial strains and cultures

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) was purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC). For *in vitro* intracellular assays, we used fluorescent strains for H37Rv, kind gift from IPBS, Toulouse. H37Rv cultures were grown at 37°C and 5% CO₂ in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% Middlebrook Oleic Albumin Dextrose Catalase (Difco, Livonia, MI). Cultures were grown to a mid-log phase, then frozen with 10% glycerol at –80°C in 1.5 ml aliquots prior to infection.

Cell cultures

The human monocytic cell line THP-1 cells (TIB-202) was purchased from the ATCC. Cells were cultured in 24 well plates (Corning) and differentiated into M ϕ THP-1 or into hypoxia-M ϕ THP-1 24 hours prior to infection with 40 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ Supplement (Gibco) with 10% FBS (Gibco) at 37°C, 5% CO₂ under aerobic or hypoxic conditions, respectively. Hypoxia was induced by incubation into Genbox-jar hermetic chambers (Biomerieux) with Genbox-anaer deoxidizing agent (Biomerieux) similarly as described by Ito *et al.* (2015) and hypoxia was confirmed by the use Anaer-indicator colorimetric assay (Biomerieux). Cell viability before experiments was measured by trypan blue exclusion and was greater than 97%. M ϕ THP-1 were infected with H37Rv at a multiplicity of infection of 1:1, for 1 hour in their respective media RPMI 1640 medium GlutaMAX™ Supplement with 10% HiFBS, then both M ϕ THP-1 and hypoxia- M ϕ THP-1 were cultivated for 48 hours in respective culture conditions post infection.

hMDMs were obtained by extracting CD14⁺ primary human monocytes from peripheral blood of healthy donors anonymously provided by the French Blood Establishment (EFS, Lyon). CD14⁺ monocytes were extracted from whole blood using autoMACS® Pro Separator,

Whole Blood Column Kit and StraightFrom® Whole Blood CD14 MicroBeads (Miltenyi) according to the manufacturer's instruction. Cell viability was measured by trypan blue exclusion and was always greater 80%. CD14⁺ monocytes were then plated in 24 well plates (Corning) or in 96 wells plates (Greiner) at a density of 400 000 cells or 71 000 cells per well respectively. Three days prior to infection, CD14⁺ monocytes were differentiated into CD14⁺ hMDM with 50 µg/ml Rh-GMCSF (Miltenyi) in RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ Supplement (Gibco) with 10% human serum (Sigma-Aldrich) at 37°C, 5% CO₂. hMDMs were infected with H37Rv at a multiplicity of infection of 1:1, for 1 hour in their respective media RPMI 1640 medium GlutaMAX™ Supplement with 10% HiFBS and cells were kept at 37°C, 5% CO₂ for 3 and 5 days.

Mouse models f infections

The mouse treatment procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Sanofi. Female BALB/c mice aged 5 to 7 weeks were purchased from Janvier Laboratories, France. Mice were housed at 5 animals per cage with sterile bedding in HEPA-filtered racks (Tecniplast, France) in certified animal biosafety level 3 (ABSL-3) laboratories. Temperatures were maintained at 65-75°F (~18-23 °C) with 40-60% humidity. Specific pathogen-free status was verified by testing sentinel mice housed within the same rack. Mice had ad libitum access to water and food pellets. Mice were rested 1 week before infection, and then exposed to H37Rv Mtb (ATCC 27294) by the intranasal route. Ten mice were infected following a highly acute (HA) infection scheme (Ballinger *et al.* 2019; Couturier *et al.* 2016). On day 0, mice were infected with 10⁶ bacteria (50 µL) from a freshly grown culture of Mtb. Five mice were sacrificed the following day, their lungs were aseptically removed and homogenized in PBS/glycerol, then lung extracts were plated to determine the number of CFU implanted in the lungs. The number of viable organisms was determined by plating serial dilutions in PBS on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC 10% and glycerol 0.5%. Plates were incubated at 37 °C for 3 weeks. After 11 days of infection, the lungs were aseptically removed and were used either for CFU count, RNA quantification or HA-CD11b⁺ isolation. RNA was extracted from 1/6 of le lungs and preserved in RNA later (Qiagen) at 4°C. Half of the lung was dissociated with the mouse lung dissociation kit (Miltenyi) using the

gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi), then HA-CD11b⁺ were positively sorted with magnetic beads (Miltenyi).

Gene profiling

Total RNA including miRNAs was extracted from lung or macrophages using Maxwell® RSC Instrument (Promega) and Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured with QIAxpert System (Qiagen) and RNA integrity was evaluated by automated electrophoresis with TapeStation Systems (Agilent).

Reverse transcription of total mRNA was performed with 500 ng total RNA using SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Applied Biosystems). mRNA expression profiles were analyzed using customized TaqMan® Array (Sup. Table 1) according to the manufacturer's instructions.

Data and Statistical Analysis

The mRNA content extracted from MφTHP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ was normalized to GAPDH, GAPDH and GUSB or PPIA expression, respectively. Then, relative expression and expression fold changes were calculated following the ΔCt and $2\Delta\Delta\text{Ct}$ methods, respectively. Briefly: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene}} - \text{Ct}_{\text{endogenous control}}$ and $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{treated sample}} - \Delta\text{Ct}_{\text{untreated control}}$. Heatmaps, principal components analysis (PCA) and density of the gene expression were calculated with R software (<https://www.r-project.org/>). Heatmaps were calculated with Pearson's correlation distance method and complete linkage. We used GraphPad Prism 8 for statistical analysis. Student's t-tests were used on ΔCt to compare treated samples to their controls and a $\text{FC} \geq 2$ as well as a $P \text{ value} \leq 0.05$ were used as a cut off to identify significantly deregulated genes (DEGs). Genes with $\text{Ct} \geq 32$ were excluded from heatmap, PCA and DEGs analysis.

Results

Mtb triggers the upregulation of 13 common DEGs in early macrophage response models: MφTHP-1, hMDM and HA-CD11b+

Minimal inhibitory concentration (MIC) of two major anti-TB antibiotics, rifampicin and isoniazid, measured in both hMDM and M ϕ THP-1 are comparable (data not shown) and Mtb-infected M ϕ THP-1 are often used as a reproducible and reliable surrogate for macrophages (Madhvi et al. 2019) in antibiotic drug discovery. However, less is known about the immune environment in early macrophage responses to Mtb infection, we therefore used three models to mimic the early response, described in Table 1: M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺. The host immune response was analysed by RT-qPCR using two custom Taqman low density arrays (TLDA) allowing the quantification of 184 human (described by Bade *et al.* (2021)) or 181 murine genes that encompass the full landscape of host immune responses (sup table 1).

In M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ we were able to analyze 131, 145 and 154 genes above a threshold of Ct >32, respectively. Mtb infection led to the significant upregulation (FC ≥ 2 , P-value ≤ 0.05) of 73, 41 and 35 genes, as well as the downregulation of 9, 3, 28 genes in M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺, respectively (Fig 2A, Table 1). We aimed at identifying the common DEGs that could be used for translational purpose among all models. In order to do so, we performed a Venn analysis which revealed that, as expected, for them both are from human origin, M ϕ THP-1 and hMDM shared more common DEGs than either of them shared with HA-CD11b⁺ (Fig 2B-C). M ϕ THP-1 and hMDM shared 30 upregulated (Fig 2B) and 1 downregulated DEGs (Fig 2C). HA-CD11b⁺ shared 18 and 16 upregulated DEGs with M ϕ THP-1 and hMDM and no downregulated DEGs (Fig 2B-C). Among the upregulated DEGs, 13 were commonly induced by all three conditions: *CCL20*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *IL15*, *IL1A*, *IL1B*, *TNF* and *TNFSF15* (Fig 2A, Table 1).

Altogether, these data demonstrated that *in vitro* M ϕ THP-1 and *ex vivo* hMDM that were both infected *in vitro* with Mtb upregulated more DEGs than HA-CD11b⁺. However, M ϕ THP-1 and hMDM host response could translate the upregulation of 13 host response related genes to the HA-CD11b⁺ host response.

The late macrophage response in vitro model hypoxia- M ϕ THP-1 is unresponsive to Mtb infection

People receiving antituberculous therapy are no longer in the naïve early phase of the infection as TB is diagnosed only when individuals already suffer TB symptoms. At this time of the infection, the infected individual is likely to harbour early or more mature granulomas.

Hence, early macrophage response such as that of M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ and *ex vivo* hAM might not confer the most relevant model to mimic the late *in vivo* hAM response of TB patients in need for a drug treatment. Therefore, as hypoxia is a feature of tuberculous granuloma, we used Mtb-infected hypoxia-M ϕ THP-1 as a late macrophage model (Daniel *et al.* 2011) (Fig 1). As previously described (Daniel *et al.* 2011), these cells develop a foamy-like phenotype with lipid inclusions (data not shown) and Mtb has a non-replicative phenotype (data not shown). We searched for the DEGs induced by Mtb infection as compared to the uninfected controls. Among the 111 genes with Ct \leq 32, we identified only 1 DEG: *CCR6* (FC = 4.23 and p-value = 0.047).

To characterize the differences between early and late macrophage response models, we further compared hypoxia-M ϕ THP-1 RT-qPCR gene expression profile to that of M ϕ THP-1 and hMDM, the two early human macrophage models analysed with the same technology. In 99.1% of hypoxia-M ϕ THP-1 genes had a fold change \leq 2 as compared to the uninfected controls while this proportion dropped to 51%, 40.9% and 33.8% in hMDM, HA-CD11b⁺ and M ϕ THP-1, respectively (Fig 3A-D).

In conclusion, our results show that the main difference observed between the early and late macrophage response to Mtb infection is the overall number of DEGs induced as hypoxia-M ϕ THP-1 were unresponsive to the infection as opposed to the other three early macrophage response models : M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺.

Hypoxia-M ϕ THP-1 + host response is the closest to that of *in vivo* hAM in TB patients

To evaluate if the four previously cited *in vitro* and *ex vivo* early and late macrophage response models (Fig 1) would recapitulate human alveolar macrophage responses, we compared their expression profiles that of two datasets published by Lavalett and colleagues (2017) and Papp and colleagues (2018) obtained from microarray transcriptomics of hAM collected from TB patients broncho alveolar lavage (BAL) and RNA-sequencing of *ex vivo* hAM collected from healthy donors BAL, then infected with Mtb for 24 hours, respectively. We compared the log₂ fold changes of the host response genes (as compared to their relative uninfected controls) of these two published data sets to those of the M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ models in an unsupervised manner using a PCA (Fig 4A). The PCA showed that, the transcriptome of the 184 host response genes that was the most similar to that of *in vivo* hAM

was that triggered hypoxia-M ϕ THP-1, followed by that of *ex vivo* hAM and the HA-CD11b⁺, then hMDM and M ϕ THP-1. In order to confirm these results based on PCA observation, we performed an unsupervised hierarchical clustering of genes, whereas samples were not clustered so similar patterns in gene regulation between each group could be identified without fold changes values interfering with sample distribution (Fig 4B). The heatmap showed that the particular characteristic of *in vivo* hAM host response to Mtb infection was a weaker gene modulation as compared to all the TB models. Comparison of all unsupervised gene expression patterns confirmed that of hypoxia-M ϕ THP-1 shared more similarities with that on *in vivo* hAM with less gene modulation than all the TB models designed to mimic early macrophage response. M ϕ THP-1 response, on the other hand showed a strong tendency to upregulate host response genes after TB infection, as observed, to a lesser extent, in hMDMs. HA-CD11b⁺ exhibited a tampered gene regulation with a comparable proportion of genes showing a tendency of up- and downregulation (Fig 3B), which reflected the up- and downregulated DEGs more balance ratio in this model (Fig 3 B and C).

Finally, with consideration to the limitations of this study, our findings confirmed that, the expression profiles of all models showed that hypoxia-M ϕ THP-1 were more similar to *in vivo* hAM response and the common characteristic of their response was a weaker response as compared to the other models.

Discussion

WHO has declared TB as a global emergency since 1993. Mtb successfulness as a pathogen is due to its ability to manipulate macrophage defence from the beginning of the infection. Macrophages shape the innate immune response to Mtb infection and are either responsible for the early clearance of the infection or for the formation of granulomas when they fail to control Mtb's proliferation (Upadhyay, Mittal, et Philips 2018). Understanding the early macrophage response to TB infection and why they fail to restrict Mtb is crucial for developing therapies based on enhanced trained immunity. Mtb interaction with macrophages can lead to an unprotective host response causing drug tolerance, persistence of the bacteria and acquisition of drug resistance (Vyas et Goswami 2017; Wolf *et al.* 2008; 2008). Hence, new curative and preventive therapies are now focusing on HDT and trained immunity to fight the disease (Abreu, Giri, et Quinn 2020; Benn et al. 2013; Khader et al. 2019). Intra-macrophage and mouse infection models have been extensively used for

pharmaceutical research. However, a better understanding of these models and overall macrophage early naïve as well as late host response is much needed to make progress on deciphering the implication of trained immunity in TB and the discovery of HDT. In this study, we quantified the expressions of 184 human and 181 murine host response genes in four TB models. We used three early macrophage models: M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ (macrophage isolated from HA model, before the strike of adaptive immunity (Wolf et al. 2008)), and another macrophage model: hypoxia-M ϕ THP-1, that mimics conditions encountered by Mtb in later stage of TB infection, *e.g.* hypoxia and high triacylglycerol content as carbon source. We compared their transcription profiles to that of two published datasets obtained from RNA-sequencing of *ex vivo* hAM (Papp *et al.*, 2018) and microarray quantification of *in vivo* hAM (Lavalette *et al.*, 2017) that represent the early naïve and the late macrophage responses to Mtb infection, respectively.

Even though AMs are composed of at least 3 heterogeneous subpopulations with divergent restrictive pro-inflammatory or permissive anti-inflammatory phenotypes; at the population level AMs are less pro-inflammatory and more permissive to Mtb infection than blood monocyte derived macrophages (Pisu *et al.*, 2021). For instance, the lack of oxidative burst from hAM upon pro-inflammatory stimulation as compared to hMDM has been observed since the 80's (Fels et Cohn 1986; Greening et Lowrie 1983). AMs response is predetermined by their nature as Mtb infection of naïve *ex vivo* AM fails to upregulate the transcription of many pro-inflammatory genes as compared to murine bone marrow derived macrophages (Rothchild *et al.*, 2019). Consistently, we showed that murine and human lung macrophages, *i.e.* HA-CD11b⁺ and *ex vivo* hAM, respectively, exhibited a close and more tempered response than that of M ϕ THP-1 and hMDM originating from human healthy blood donors. This observation was in accordance to, Papp *et al.* (2018) study, which showed that hMDM induce more DEGs than hAM following Mtb infection. Rothchild *et al.* (2019) showed that murine AMs early response to *in vivo* Mtb infection does not differ from that of mice inoculation with inert beads. The authors hypothesized that AMs pathogen recognition might be inhibited by lung factors to prevent chronic inflammation from everyday exposure to inhaled particles and microbes. Lung anti-inflammatory factors in non-pathological conditions comprehend the surfactant and the signaling of TGF- β secretion from airway epithelial cells (Woo, Jeong, et Chung 2021). Unfortunately, this non aggressive response is beneficial for Mtb, as globally, murine AMs are more permissive to the infection than recruited

macrophages (Cohen et al. 2018; Huang et al. 2018; Pisu et al. 2021), highlighting the crucial role of a proper inflammatory response to control the infection. Despite the inconsistencies between the different early responses, we identified 13 common upregulated DEGs in M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ that were reported as significantly upregulated by Papp *et al.* (2018) in *ex vivo* hAM as well. Interestingly, all these DEGs except for *IL15* are also identified as upregulated DEGs in hAM Papp *et al.* (2018) study. This suggests that a core regulation of host response genes might exist and could be used for translational studies.

The hypoxia-M ϕ THP-1 late response model and *in vivo* hAMs induced the regulation of a much lower number of host response genes than did all the early response models. Hypoxia-M ϕ THP-1 regulated only 0.9% of the detectable host response genes with only one DEG (*i.e.* *CCR6*) and Lavalette *et al.* (2017) study relates the significant regulation of only five host response genes in *in vivo* hAM: *i.e.* *CCL22*, *CCL5*, *CCL8*, *CD163*, *CXCL5*, *CXCL9*, *IL1B* and *LTB*. Accordingly, Mtb infection dims hAM ability to produce a protective response overtime as *ex vivo* infection of hAM from TB patients triggers a reduced inflammatory response as compared to naïve hAM from healthy individuals (Lavalett, Ortega, et Barrera 2020). These changes likely require systemic modifications of the lung environment, because, on the contrary, *ex vivo* Mtb infection of naïve hAM shifts to a more a more pro-inflammatory response overtime and tends to resemble that of hMDM (Papp *et al.* 2018). TB is diagnosed in individuals that present symptom and that are likely to have developed granulomas. Granulomas are cellular dense structures that deprive the cells from oxygen. Hypoxia triggers a stress response leading to the upregulation of Mtb dormancy regulon *DosR* (Galagan *et al.* 2013; Peterson *et al.* 2020). The bacterial genes controlled by *DosR* cause Mtb replication arrest, which allows immune eviction (Pisu et al. 2021). Hence, this might explain why Hypoxia-M ϕ THP-1 only upregulated one DEG upon Mtb infection and permitted to obtain an expression profile that was even more similar to *in vivo* hAM than that of *ex vivo* hAM.

To conclude, our transcriptional comparison of macrophage response to Mtb infection highlighted the importance of *in vivo* environmental signals shaping the immune response. Therefore, macrophage that do not originate from lungs produced a strong pro-inflammatory response that differed from that of the much-tampered lung macrophages and should be used carefully to study HDT and trained immunity. However, utilisation of an *in vivo* environmental stress such as hypoxia permitted to close the gap between TB patient *in vivo* hAM and M ϕ THP-1 responses.

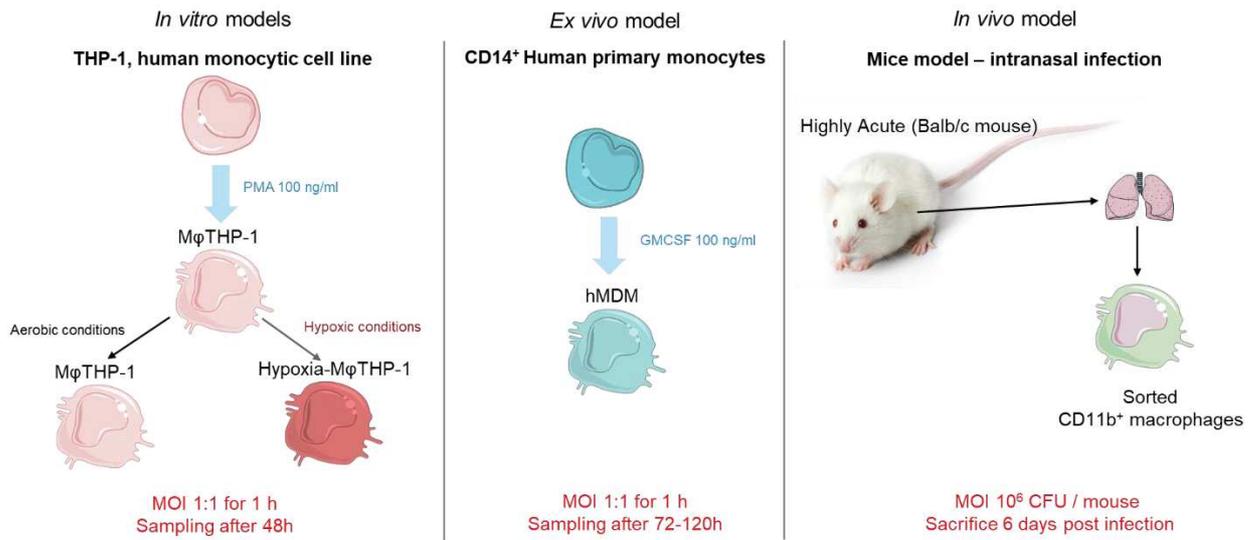


Figure 1 Description of tuberculosis models used in this study. Early macrophage response models: MφTHP-1, hMDM and HA-CD11b⁺. Hypoxia- MφTHP-1 were used as a late infection model. Hypoxia was induced by culture of MφTHP-1 in hermetic chambers in which oxygen was depleted by the use of a deoxidizing agent as described by Ito *et al.* (2015).

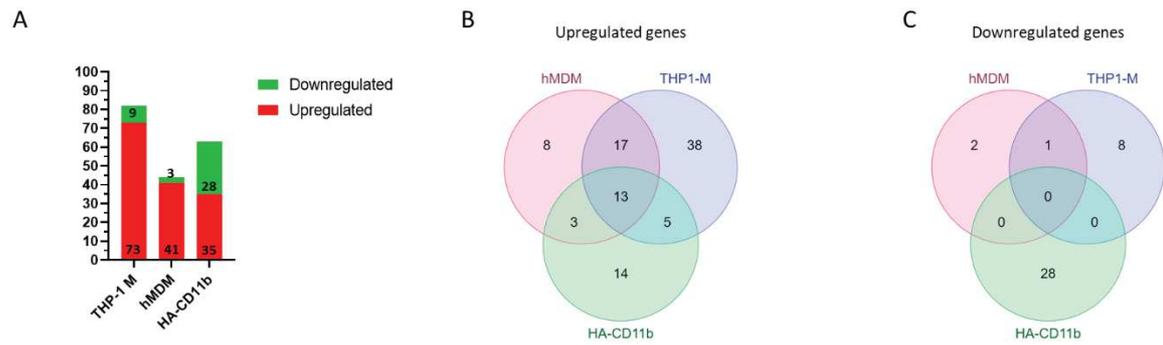


Figure 2. Mtb triggers the upregulation of 13 common DEGs in early macrophage response models: M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺. A) Number of significantly up- and downregulated genes in Mtb-infected-M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ as compared to their relative uninfected controls. Venn diagrams showing the common or specific up- (B) or down- (c) regulated DEGs in M ϕ THP-1, hMDM and HA-CD11b⁺ infected with Mtb.

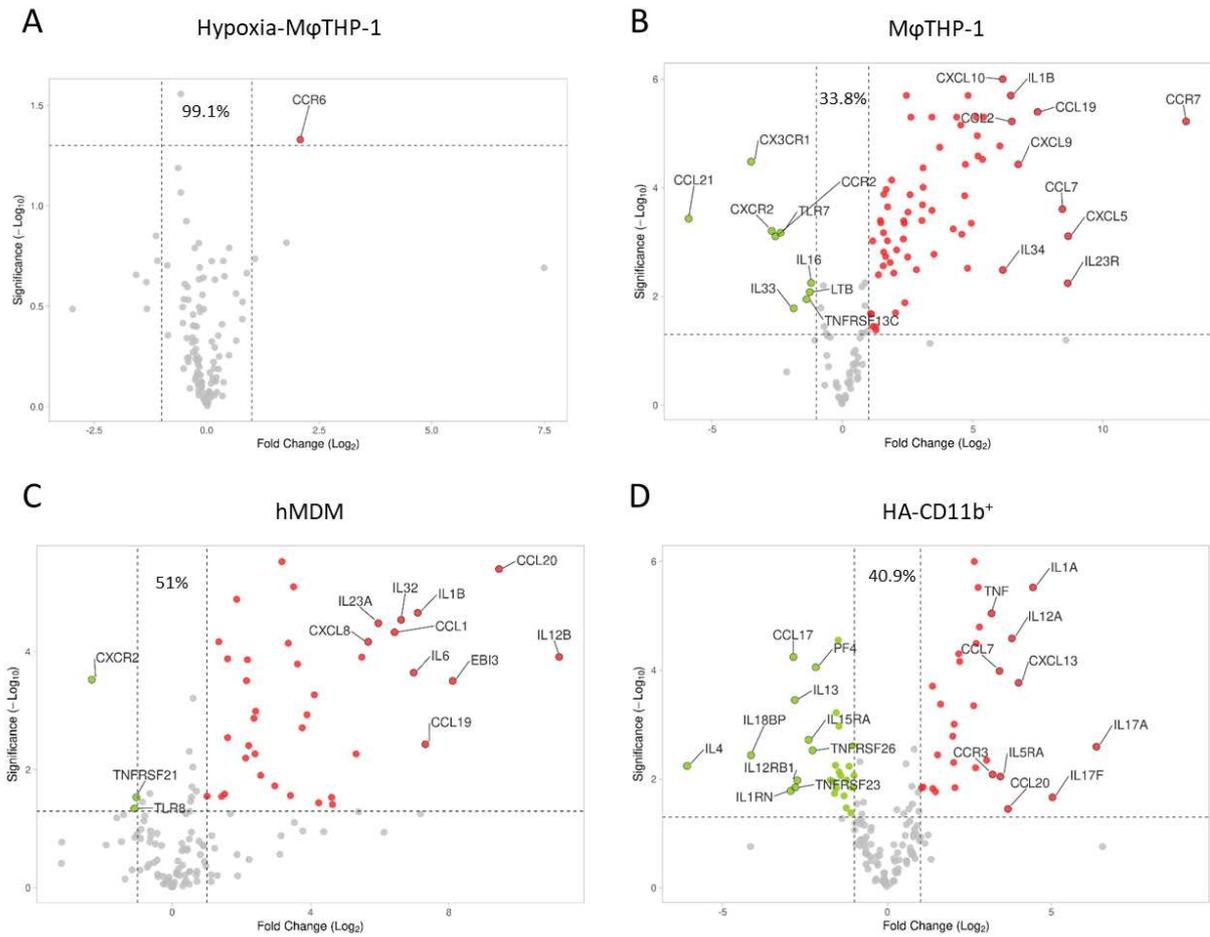


Figure 3. The late macrophage response in vitro model hypoxia- MφTHP-1 is unresponsive to Mtb infection. Volcano plots showing significantly upregulated (red) or downregulated (green) and not significant (grey) genes in hypoxia- MφTHP-1 (A), MφTHP-1 (B), hMDM (C), HA-CD11b⁺ (D).

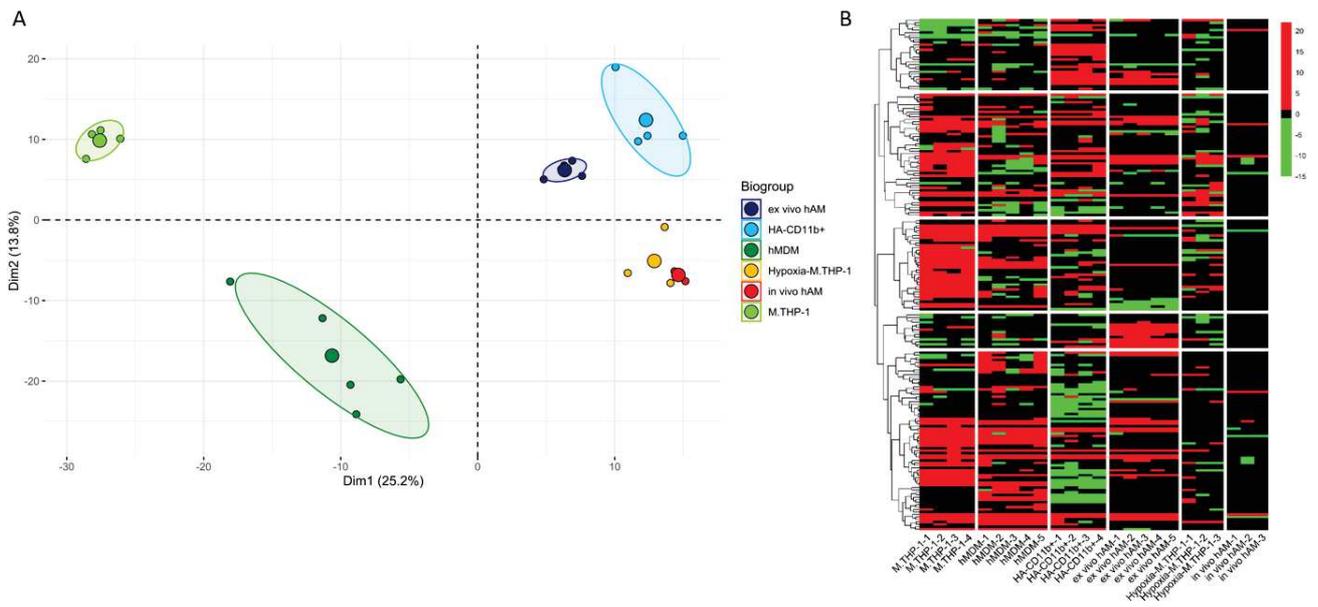


Figure 4. The host response triggered by the late macrophage response in vitro model hypoxia- M ϕ THP-1 mimics that of in vivo hAM of TB patients the best. A) Unsupervised PCA presentation of samples distribution depending on their expression of host response related genes following Mtb infection. B) Unsupervised hierarchical clustering of samples distribution depending on their expression of host response related genes following Mtb infection.

Gene	MφTHP-1		hMDM		HA-CD11b ⁺	
	Fold change	<i>P</i> -value	Fold change	<i>P</i> -value	Fold change	<i>P</i> -value
CCL20	34.70	<0.001	698.93	<0.001	12.59	0.036
CCL3	13.18	<0.001	4.44	<0.001	4.48	<0.001
CCL4	198.64	<0.001	17.26	0.001	6.73	<0.001
CCL5	3.15	0.002	44.66	<0.001	4.02	0.005
CCL8	104.11	<0.001	10.70	0.027	235.73	<0.001
CXCL2	84.33	<0.001	12.31	<0.001	3.06	<0.001
CXCL3	146.02	<0.001	14.90	0.001	6.12	<0.001
CXCL5	409.01	0.001	13.55	0.002	60.05	<0.001
IL15	11.33	0.002	5.33	0.001	4.57	<0.001
IL1A	10.75	<0.001	10.24	<0.001	21.75	<0.001
IL1B	86.94	<0.001	136.90	<0.001	2.58	<0.001
TNF	10.7331378	<0.001	11.58	<0.001	8.92	<0.001
TNFSF15	2.98142077	0.002	5.15	0.001	6.91	<0.001
ACKR4	2.11	0.021	1.05	0.798	ND	ND
AXL	2.76	<0.001	1.64	0.522	0.56	0.005
CCL1	ND	ND	86.16	<0.001	ND	ND
CCL17	23.70	0.001	5.89	0.012	0.14	<0.001
CCL19	182.03	<0.001	159.68	0.004	ND	ND
CCL2	89.51	<0.001	0.84	0.855	1.75	0.003
CCL21	0.02	<0.001	ND	ND	ND	ND
CCL22	2.43	0.042	1.72	0.162	0.36	0.001
CCL24	3.54	0.002	0.75	0.642	0.36	<0.001
CCL7	351.41	<0.001	0.88	0.865	10.53	<0.001
CCR2	0.17	0.001	ND	ND	1.27	0.308
CCR3	1.94	0.044	1.29	0.606	9.11	0.008
CCR4	5.69	<0.001	ND	ND	1.87	0.071
CCR5	2.73	<0.001	1.35	0.218	0.51	0.065
CCR6	8.23	<0.001	3.71	0.626	1.73	0.116
CCR7	9280.58	<0.001	39.95	<0.001	1.73	0.248
CCR9	5.62	0.002	ND	ND	1.19	0.533
CCRL2	5.06	<0.001	1.35	0.230	0.38	0.053
CD163	2.24	0.036	0.33	0.065	4.13	0.014
CD40	6.14	<0.001	3.04	<0.001	0.34	0.006
CD70	1.20	0.256	4.63	0.004	ND	ND
CX3CL1	ND	ND	2.70	0.028	0.43	0.010
CX3CR1	0.09	<0.001	1.76	0.273	3.94	0.002
CXCL10	70.18	<0.001	1.23	0.924	124.59	<0.001
CXCL11	152.54	<0.001	69.65	0.114	520.23	<0.001
CXCL12	3.90	0.004	20.78	0.112	0.62	0.133
Cxcl13	ND	ND	ND	ND	15.74	<0.001
Cxcl15	ND	ND	ND	ND	0.36	0.007
CXCL8	129.61	<0.001	50.70	<0.001	ND	ND
CXCL9	106.01	<0.001	144.91	0.056	268.91	<0.001
CXCR2	0.15	0.001	0.20	<0.001	0.50	0.087
CXCR5	3.29	0.001	2.86	0.026	1.13	0.733

EBI3	42.40	<0.001	276.47	<0.001	1.49	0.069
FAS	5.44	<0.001	1.23	0.414	0.32	0.011
Fasl	ND	ND	ND	ND	0.34	0.015
Ifna1	ND	ND	0.36	0.165	0.38	0.009
IFNA4	27.59	0.003	4.67	0.331	ND	ND
IFNAR1	2.99	<0.001	ND	ND	1.16	0.327
IFNB1	5.16	<0.001	1.28	0.808	0.60	0.027
Ifne	ND	ND	0.27	0.189	0.48	0.014
IFNG	ND	ND	24.88	0.039	2.59	0.015
IFNGR1	0.99	0.948	1.12	0.351	2.75	0.017
IFNGR2	3.31	<0.001	1.49	0.020	0.70	0.089
Ifnk	ND	ND	3.67	0.274	0.45	0.006
IL10	20.74	<0.001	0.64	0.167	2.34	0.107
IL10RA	2.96	0.001	1.47	0.114	1.41	0.044
Il12a	ND	ND	2.46	0.618	13.68	<0.001
IL12B	ND	ND	2336.28	<0.001	2.87	0.004
IL12RB1	1.40	0.099	2.01	0.028	0.15	0.011
Il13	ND	ND	ND	ND	0.14	<0.001
IL15RA	35.83	<0.001	9.01	<0.001	0.19	0.002
IL16	0.43	0.006	0.57	0.074	0.85	0.253
Il17a	ND	ND	1.42	0.529	82.25	0.003
IL17C	ND	ND	24.44	0.029	ND	ND
Il17f	ND	ND	1.42	0.529	32.72	0.022
IL18	2.40	0.036	2.55	<0.001	1.84	0.103
IL18BP	1.32	0.177	0.74	0.338	0.06	0.004
IL18R1	8.50	<0.001	8.86	0.131	1.96	0.136
Il1f9	ND	ND	ND	ND	6.47	<0.001
IL1R1	23.05	<0.001	0.49	0.125	1.68	0.219
IL1R2	65.12	<0.001	0.38	0.057	1.05	0.848
Il1r1	ND	ND	0.45	0.495	6.37	0.006
IL1RN	3.68	<0.001	1.47	0.029	0.13	0.017
IL21R	0.89	0.708	0.90	0.768	0.34	0.001
IL23A	27.97	<0.001	62.16	<0.001	93.44	0.175
IL23R	404.50	0.006	ND	ND	0.46	0.042
IL24	25.56	<0.001	39.92	0.005	ND	ND
IL27	ND	ND	3.04	0.003	6.20	<0.001
IL32	104.04	<0.001	98.29	<0.001	ND	ND
IL33	0.27	0.017	1.64	0.779	0.54	0.057
IL34	70.42	0.003	ND	ND	0.66	0.453
Il4	ND	ND	ND	ND	0.01	0.006
Il5ra	ND	ND	ND	ND	10.73	0.009
IL6	26.1003998	<0.001	126.15	<0.001	0.81	0.349
Il6ra	ND	ND	ND	ND	2.12	0.014
IL7	41.0696287	<0.001	2.21	0.130	1.25	0.522
IL7R	36.3781431	<0.001	4.51	<0.001	0.61	0.163
LTA	1.58776786	0.058	18.83	0.036	1.66	0.246
LTB	0.41841312	0.008	0.93	0.751	4.06	0.001

PF4	ND	ND	7.81	0.019	0.22	<0.001
PPBP	7.11567195	0.003	1.91	0.356	0.56	0.168
TLR1	1.07437676	0.669	1.45	0.034	0.33	0.018
TLR10	5.21981979	0.013	ND	ND	ND	ND
TLR2	0.84833148	0.440	4.37	0.006	0.42	0.034
TLR3	5.02108797	0.001	1.62	0.605	0.71	0.078
TLR4	0.97603176	0.895	0.72	0.181	0.30	0.010
TLR5	2.94649537	0.003	0.55	0.035	1.76	0.084
TLR7	0.19264278	0.001	0.53	0.102	2.04	0.015
TLR8	2.59188193	0.004	0.47	0.045	1.60	0.059
TNFRSF10B	2.14652057	0.021	1.22	0.235	0.89	0.746
TNFRSF11B	18.8697055	0.001	ND	ND	0.64	0.367
TNFRSF12A	3.179941	<0.001	1.09	0.587	1.94	0.039
TNFRSF13C	0.38475181	0.011	ND	ND	1.26	0.445
TNFRSF14	8.47962227	<0.001	1.01	0.942	0.48	0.002
Tnfrsf17	ND	ND	ND	ND	8.04	0.005
TNFRSF18	30.4844159	<0.001	5.26	0.005	2.01	0.117
TNFRSF1B	4.20177818	0.001	0.11	0.384	0.93	0.652
TNFRSF21	2.22067767	0.001	0.49	0.029	1.90	0.018
Tnfrsf23	ND	ND	ND	ND	0.14	0.014
Tnfrsf26	ND	ND	ND	ND	0.21	0.003
TNFRSF4	4.08121864	0.020	11.38	<0.001	0.71	0.319
TNFRSF9	50.074354	<0.001	3.64	<0.001	0.40	0.020
TNFSF10	8.3570861	<0.001	1.86	0.189	1.61	0.215
TNFSF13B	6.00431639	<0.001	1.88	0.195	1.57	0.036
Tnfsf9	ND	ND	1.62	0.023	0.49	0.009

Table 1 DEGs induced by Mtb infection in MφTHP-1, hMDM and HA-CD11b⁺. Expression of genes significantly expressed following Mtb infection in either of each model as compared to their relative uninfected controls. In grey, common DEGs between MφTHP-1, hMDM and HA-CD11b⁺

Acknowledgments

This research was initiated by Inserm and Sanofi, funded by Inserm (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier and EVOTEC ID, Lyon. P.B. received a fellowship from Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, convention Cifre N°2017/1678).

Author Contributions

CR supervised the work and designed the experiments. Experimental work was performed by PB, MR, IB, LS, AU, DM and SL. PB and CR analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. All authors were involved in reading and editing the manuscript, and approved the final version.

Declaration of Interests

The authors declare no conflict of interest

References

Abreu, Rodrigo, Pramod Giri, et Fred Quinn. 2020. « Host-Pathogen Interaction as a Novel Target for Host-Directed Therapies in Tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01553>.

Adams, Kristin N., Kevin Takaki, Lynn E. Connolly, Heather Wiedenhoft, Kathryn Winglee, Olivier Humbert, Paul H. Edelstein, Christine L. Cosma, et Lalita Ramakrishnan. 2011. « Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism ». *Cell* 145 (1): 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>.

Ballinger, Elaine, John Mosior, Travis Hartman, Kristin Burns-Huang, Ben Gold, Roxanne Morris, Laurent Goullieux, et al. 2019. « Opposing Reactions in Coenzyme A Metabolism

Sensitize Mycobacterium Tuberculosis to Enzyme Inhibition ». *Science (New York, N.Y.)* 363 (6426): eaau8959. <https://doi.org/10.1126/science.aau8959>.

Benn, Christine S., Mihai G. Netea, Liisa K. Selin, et Peter Aaby. 2013. « A Small Jab - a Big Effect: Nonspecific Immunomodulation by Vaccines ». *Trends in Immunology* 34 (9): 431-39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.004>.

Cardona, Pere-Joan. 2016. « Reactivation or Reinfection in Adult Tuberculosis: Is That the Question? » *International Journal of Mycobacteriology* 5 (4): 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.017>.

Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, et Mark J. Shlomchik. 2001. « Principles of Innate and Adaptive Immunity ». *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>.

Cohen, Sara B., Benjamin H. Gern, Jared L. Delahaye, Kristin N. Adams, Courtney R. Plumlee, Jessica Winkler, David R. Sherman, Michael Y. Gerner, et Kevin B. Urdahl. 2018. « Alveolar macrophages provide an early Mycobacterium tuberculosis niche and initiate dissemination ». *Cell host & microbe* 24 (3): 439-446.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.001>.

Couturier, Cédric, Christine Lair, Alain Pellet, Anna Upton, Takushi Kaneko, Corinne Perron, Eric Cogo, et al. 2016. « Identification and Optimization of a New Series of Anti-Tubercular Quinazolinones ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26 (21): 5290-99. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.09.043>.

Crawford, Monica, et Jeffrey R. Curtis. 2008. « Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Infection Complications ». *Current rheumatology reports* 10 (5): 383-89.

Daniel, Jaiyanth, Hédia Maamar, Chirajyoti Deb, Tatiana D. Sirakova, et Pappachan E. Kolattukudy. 2011. « Mycobacterium Tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages ». *PLOS Pathogens* 7 (6): e1002093. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002093>.

Fels, A. O., et Z. A. Cohn. 1986. « The Alveolar Macrophage ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 60 (2): 353-69. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.60.2.353>.

Galagan, James E., Kyle Minch, Matthew Peterson, Anna Lyubetskaya, Elham Azizi, Lindsay Sweet, Antonio Gomes, et al. 2013. « The Mycobacterium Tuberculosis Regulatory Network and Hypoxia ». *Nature* 499 (7457): 178-83. <https://doi.org/10.1038/nature12337>.

Greening, A. P., et D. B. Lowrie. 1983. « Extracellular Release of Hydrogen Peroxide by Human Alveolar Macrophages: The Relationship to Cigarette Smoking and Lower Respiratory Tract Infections ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 65 (6): 661-64. <https://doi.org/10.1042/cs0650661>.

Huang, Lu, Evgeniya V. Nazarova, Shumin Tan, Yancheng Liu, et David G. Russell. 2018. « Growth of Mycobacterium Tuberculosis in Vivo Segregates with Host Macrophage Metabolism and Ontogeny ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (4): 1135-52. <https://doi.org/10.1084/jem.20172020>.

Ito, Akira, Tomoki Aoyama, Makoto Yoshizawa, Momoko Nagai, Junichi Tajino, Shoki Yamaguchi, Hirotaka Iijima, Xiangkai Zhang, et Hiroshi Kuroki. 2015. « The effects of short-term hypoxia on human mesenchymal stem cell proliferation, viability and p16INK4A mRNA expression: Investigation using a simple hypoxic culture system with a deoxidizing agent ». *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine* 11 (1): 25-31.

Khader, Shabaana A., Maziar Divangahi, Willem Hanekom, Philip C. Hill, Markus Maeurer, Karen W. Makar, Katrin D. Mayer-Barber, et al. 2019. « Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (9): 3482-91. <https://doi.org/10.1172/JCI128877>.

Lavalett, Lelia, Hector Ortega, et Luis F. Barrera. 2020. « Human Alveolar and Splenic Macrophage Populations Display a Distinct Transcriptomic Response to Infection With Mycobacterium Tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00630>.

Lavalett, Lelia, Hector Rodriguez, Hector Ortega, Wolfgang Sadee, Larry S. Schlesinger, et Luis F. Barrera. 2017. « Alveolar Macrophages from Tuberculosis Patients Display an Altered Inflammatory Gene Expression Profile ». *Tuberculosis* 107 (décembre): 156-67. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.08.012>.

Madhvi, Abhilasha, Hriday Mishra, GR Leisching, PZ Mahlobo, et B Baker. 2019. « Comparison of Human Monocyte Derived Macrophages and THP1-like Macrophages as in

Vitro Models for M. Tuberculosis Infection ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 67 (décembre): 101355. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101355>.

O'Toole, Ronan F., et Sanjay S. Gautam. 2018. « The Host Microbiome and Impact of Tuberculosis Chemotherapy ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 113 (décembre): 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.08.015>.

Papp, Audrey C., Abul K. Azad, Maciej Pietrzak, Amanda Williams, Samuel K. Handelman, Robert P. Igo, Catherine M. Stein, Katherine Hartmann, Larry S. Schlesinger, et Wolfgang Sadee. 2018. « AmpliSeq Transcriptome Analysis of Human Alveolar and Monocyte-Derived Macrophages over Time in Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *PLoS One* 13 (5): e0198221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198221>.

Peterson, Eliza J. R., Abrar A. Abidi, Mario L. Arrieta-Ortiz, Boris Aguilar, James T. Yurkovich, Amardeep Kaur, Min Pan, Vivek Srinivas, Ilya Shmulevich, et Nitin S. Baliga. 2020. « Intricate Genetic Programs Controlling Dormancy in Mycobacterium Tuberculosis ». *Cell Reports* 31 (4): 107577. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107577>.

Pisu, Davide, Lu Huang, Vipin Narang, Monique Theriault, Gabrielle L -Bury, Bernett Lee, Agnes E. Lakudzala, et al. 2021. « Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung ». *Journal of Experimental Medicine* 218 (9). <https://doi.org/10.1084/jem.20210615>.

Rothchild, A. C., G. S. Olson, J. Nemeth, L. M. Amon, D. Mai, E. S. Gold, A. H. Diercks, et A. Aderem. 2019. « Alveolar Macrophages Up-Regulate a Non-Classical Innate Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection in Vivo ». *BioRxiv*, mars, 520791. <https://doi.org/10.1101/520791>.

Sudbury, Eva L., Vanessa Clifford, Nicole L. Messina, Rinn Song, et Nigel Curtis. 2020. « Mycobacterium Tuberculosis-Specific Cytokine Biomarkers to Differentiate Active TB and LTBI: A Systematic Review ». *The Journal of Infection* 81 (6): 873-81. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.032>.

Upadhyay, S, E Mittal, et J A Philips. 2018. « Tuberculosis and the art of macrophage manipulation ». *Pathogens and Disease* 76 (4). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty037>.

Vyas, Shachi Pranjal, et Ritobrata Goswami. 2017. « Striking the Right Immunological Balance Prevents Progression of Tuberculosis ». *Inflammation Research: Official Journal of the*

European Histamine Research Society ... [et Al.] 66 (12): 1031-56.
<https://doi.org/10.1007/s00011-017-1081-z>.

Wolf, Andrea J., Ludovic Desvignes, Beth Linas, Niaz Banaiee, Toshiki Tamura, Kiyoshi Takatsu, et Joel D. Ernst. 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 (1): 105-15.
<https://doi.org/10.1084/jem.20071367>.

Woo, Yeon Duk, Dongjin Jeong, et Doo Hyun Chung. 2021. « Development and Functions of Alveolar Macrophages ». *Molecules and Cells* 44 (5): 292-330.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0058>.

Yang, Tae Won, Hyun Oh Park, Ha Nee Jang, Jun Ho Yang, Sung Hwan Kim, Seong Ho Moon, Joung Hun Byun, Chung Eun Lee, Jong Woo Kim, et Dong Hun Kang. 2017. « Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea ». *Medicine* 96 (28): e7482.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007482>.

Yuan, Tianao, et Nicole S. Sampson. 2018. « Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma ». *Chemical Reviews* 118 (4): 1887-1916.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00602>.

D. Conclusion et perspectives

Comme en témoigne l'intérêt grandissant pour les thérapies dirigées par l'hôte et les immunothérapies, dont certaines sont en cours d'essai clinique (D. L. Costa, Maiga, et Subbian 2021; C. Young, Walzl, et Du Plessis 2020), il est maintenant admis que la réponse immunitaire pourrait être la clef, à la fois dans la prévention mais aussi de la guérison de la tuberculose active, et que les macrophages jouent un rôle crucial dans cette défense contre l'infection (Gideon *et al.* 2015; Jenner et Young 2005; Vyas et Goswami 2017; Abreu, Giri, et Quinn 2020; Paik *et al.* 2018). En ciblant les cellules hôtes plutôt que le bacille, le risque de résistance pourrait être considérablement réduit, tout en menant à une guérison plus rapide de la maladie. Les miARN, dont le rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire des macrophages a été établi dans le contexte de la tuberculose, sont de potentielles cibles thérapeutiques (Alipoor *et al.* 2020; Ruiz-Tagle, Naves, et Balcells 2020; A. K. Singh *et al.* 2021). La découverte de telles thérapies repose sur la compréhension des moyens mis en œuvre par Mtb pour modifier la réponse inflammatoire, et notamment l'expression des miARN par les macrophages. Mes travaux de recherche avaient pour objectif d'approfondir les connaissances dans ce domaine. Dans un premier temps j'ai identifié les gènes de la réponse inflammatoire des macrophages liée à la virulence de Mtb et les miARN qui les régulent. Parmi ces miARN, j'ai caractérisé le rôle joué par miR-132-3p au cours de l'infection *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin. Enfin, j'ai fait une analyse rétrospective de comparaison de la réponse inflammatoire dans les différents modèles de tuberculoses utilisés au cours de mes travaux. Cette analyse a permis d'identifier les similitudes et les dissimilitudes entre ces modèles. La comparaison avec la réponse obtenue dans les hAM infectés *ex vivo* et *in vivo* (chez les patients tuberculeux) m'a permis d'avoir un regard critique sur les résultats que j'ai obtenus.

1. Comparaison et évaluation de la réponse inflammatoire de modèles de tuberculose utilisés dans ces travaux

Au cours de mes travaux, en raison de la variabilité observée entre les donneurs, j'ai été confrontée à la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles avec les macrophages dérivés de monocytes primaires humains. Les études fonctionnelles de l'effet de miR-132-3p et de *FOXP1* ont donc été majoritairement réalisées avec des M ϕ THP-1. Pour les mêmes raisons, la recherche des gènes liés à la virulence de Mtb et des miARN régulés au cours de l'infection a

été effectuée dans le même type cellulaire. Les M ϕ THP-1 sont décrits comme un modèle fiable pour étudier la réponse à l'infection avec Mtb (Madhvi *et al.* 2019). Cependant, comme toutes les lignées cellulaires, les THP-1 présentent à la fois des avantages, principalement liés à leur facilité d'utilisation et la reproductibilité qu'elles permettent dans les expériences, mais aussi des limites. En effet, les M ϕ THP-1 polarisées en M1 ou M2 permettent une reproduction simplifiée et partielle de la réponse des macrophages primaires humains (Tedesco *et al.* 2018). Alors que les M ϕ THP-1 sont couramment utilisées dans la recherche pharmaceutique pour découvrir de nouveaux antibiotiques, ces cellules sont beaucoup moins bien caractérisées comme modèle d'immunothérapie ou de thérapie dirigée par l'hôte. Dans la dernière partie de mes travaux, et comme sujet d'intérêt pour Evotec dans le cadre de ma bourse CIFRE, je me suis posé la question de savoir quel modèle, ou combinaison de modèles, serait le plus comparable aux cellules de patients. J'ai donc comparé l'expression des gènes de la réponse inflammatoire dans différents modèles d'infection : primaires (hMDM, CD11b⁺ extraits des poumons de souris infectées selon un modèle d'infection aiguë), lignée cellulaire (M ϕ THP-1), ainsi que des données publiées provenant d'études transcriptomiques réalisées sur des macrophages alvéolaires de patients tuberculeux (Lavalett *et al.* 2017) et des hAM de donneurs sains, infectés *ex vivo* avec Mtb (Papp *et al.* 2018). Pour les données de patients tuberculeux, il est intéressant de noter que la maladie est diagnostiquée lorsque les patients présentent des symptômes et que probablement ils ont déjà développé des granulomes (Getnet *et al.* 2017). Notamment, dans l'étude de Lavalett et al. (2017), utilisée pour exploiter les données transcriptomiques de hAM de patients tuberculeux, les patients présentaient tous des lésions pulmonaires. Au vu des résultats préliminaires obtenus, j'ai également souhaité inclure dans mon étude des M ϕ THP-1 infectés par Mtb en condition hypoxique (hypoxia-M ϕ THP-1). Ces cellules présentent en effet beaucoup d'inclusions lipidiques (Daniel *et al.* 2011), comme cela est observé dans le cas des macrophages spumeux. Ces deux conditions, hypoxie et forte concentration en lipides, sont également retrouvées dans le stress environnemental généré par les granulomes (Sarathy et Dartois, 2020).

La comparaison au niveau du transcriptome de la réponse immunitaire m'a permis de constater : (i) que la réponse inflammatoire des M ϕ THP-1 et des hMDM infectés en condition aérobie est plus intense que celle des macrophages de patients tuberculeux, pour lesquels l'expression de ces mêmes gènes est très peu modulée, comme c'est le cas dans le modèle

des THP1 hypoxiques, (ii) que les macrophages alvéolaires de donneurs sains infectés *ex vivo* miment une infection plus précoce, et (iii) que les macrophages CD11b⁺ murins infectés *in vivo* présentent une réponse inflammatoire qui se rapproche le plus de celle des macrophages alvéolaires humains infectés *ex vivo*.

Cette étude a été réalisée à la fin de ma thèse et donc, malheureusement, toutes les conditions que je souhaitais comparer n'ont pas pu être intégrées. Notamment, l'intégration de transcriptomes de macrophages infectés et non infectés traités à la rifampicine ou stimulés par des signaux de polarisation de type M1 et de type M2. La réponse des macrophages polarisés naïfs aurait permis de définir les repères d'un axe d'inflammation visualisable sur la représentation graphique d'une analyse en composante principale. Cet axe ferait de l'analyse en composante principale un outil intuitif permettant d'évaluer la réponse inflammatoire des modèles avant et après infection. De même, cet outil paraissait intéressant pour étudier, de façon chronologique, l'effet des composés antituberculeux testés à Evotec sur la réponse des macrophages. L'un des aspects ayant motivé cette comparaison est qu'elle pourrait peut-être permettre de caractériser des marqueurs d'échec ou de réussite thérapeutique, afin d'identifier rapidement des composés qui induisent une réponse protectrice des macrophages.

Toutefois, une des limitations de ce travail est que la réponse inflammatoire, bien qu'elle occupe le rôle de maître d'orchestre dans la défense des macrophages au cours de l'infection, ne permet pas une analyse exhaustive des voies détournées par Mtb pour assurer sa survie. Afin de compléter cette analyse, il serait très intéressant d'ajouter une comparaison de l'expression des miARN. De même, une approche transcriptomique plus globale, comme le RNA-seq permettrait, bien évidemment, une meilleure caractérisation des modèles. Par ailleurs, la caractérisation de l'état métabolique de Mtb et la réalisation de son transcriptome dans chaque modèle serait un élément déterminant pour évaluer plus précisément l'effet de chaque modèle sur le cours de l'infection.

2. Identification des gènes de la réponse de l'hôte et des miARN liés à la virulence de Mtb

L'un des axes de mon travail fut de caractériser comment l'infection par Mtb modifie la transcription des gènes de la réponse inflammatoire des macrophages, et ce qui fait de celle-

ci une réponse particulière par rapport à celle induite par des mycobactéries non virulentes chez l'Homme : *M. marinum* et H37Ra. Mes résultats ont identifié 30 gènes de la réponse inflammatoire spécifiquement liée à la virulence dont l'expression était putativement contrôlée par 37 miARN, également régulés au cours de l'infection. Ces gènes sont principalement impliqués dans l'activation de l'inflammasome, le recrutement des autres cellules immunitaires et dans l'induction de l'apoptose.

Cette analyse a été effectuée *in vitro* dans des M ϕ THP-1 et d'après la comparaison des modèles de tuberculose que j'ai effectuée, il apparaît évident qu'il faudrait confirmer ces résultats dans d'autres modèles comme les hAM infectés *ex vivo*, ou *in vivo* dans le modèle murin HA. Toutefois, la liste de ces gènes, et des miARN qui les régulent, offre de nouvelles pistes à explorer pour mieux comprendre la façon dont Mtb détourne la réponse inflammatoire du macrophage. Grâce à la capacité qu'ont les miARN de cibler plusieurs mARN différents (Saliminejad *et al.* 2019), il est de surcroit possible de rechercher, parmi leurs cibles, des gènes d'intérêt impliqués dans d'autres voies que la réponse inflammatoire. C'est ainsi, en recherchant les cibles les plus pertinentes, pour leur implication connue dans l'inflammation et la tuberculose, que j'ai identifié le couple miR-132-3p / *FOXP1*, dont l'étude a défini l'axe principal de mon projet de recherche.

3. Etude du rôle de miR-132-3p dans la réponse inflammatoire des macrophages infectés par Mtb

MiR-132-3p est un miARN conservé dans l'évolution des espèces et les cibles de ce miARN sont également conservées, notamment entre l'Humain et la souris ([Haviv *et al.* 2018](#)). Une analyse *in silico* menée par la même équipe prédisait que miR-132-3p était impliqué dans les processus inflammatoires à la fois chez l'Homme et la souris, ce qui sous-entendait qu'il pourrait être déterminant dans l'infection. De plus, le gène *FOXP1*, cible de miR-132, est un marqueur de susceptibilité à la tuberculose (Grant *et al.* 2016; Harishankar, Selvaraj, et Bethunaickan 2018), qui est de surcroit impliqué dans des mécanismes clés de la défense des macrophages (C. Shi *et al.* 2008b). L'étude de l'implication de l'axe miR-132-3p / *FOXP1* dans l'infection par Mtb a permis de mettre en évidence pour la première fois : (i) le rôle délétère de miR-132-3p pour la défense de l'hôte *in vitro* dans les macrophages humains et *in vivo* chez la souris, (ii) son interaction directe avec la région 3'-UTR du gène *FOXP1*, et (iii) l'implication

de cet axe de régulation dans le changement de la polarisation des macrophages. Ces résultats feront l'objet d'un article que nous envisageons de soumettre au journal « Cell Host and Microbe ».

A court terme, pour enrichir cet article avant sa soumission, je souhaite confirmer que la surexpression du gène *FOXP1*, suite à l'inhibition de miR-132, se traduit par une augmentation de la quantité de la protéine FOXP1. Des expériences complémentaires de quantification de FOXP1 par western blot sont actuellement en cours. Les résultats préliminaires, qui doivent certes être reproduits, montrent une augmentation de l'expression de FOXP1 à hauteur de 20%. Mes résultats ont montré que l'inhibition de miR-132-3p était capable de diminuer la charge bactérienne dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de tuberculose. Il serait ainsi intéressant d'explorer le rôle de sa cible, *FOXP1*, lors de l'infection avec Mtb, par exemple, en inhibant *FOXP1* par ARN interférence avant de mesurer la charge bactérienne dans ces mêmes modèles. D'après les transcriptomes de la réponse inflammatoire que j'ai réalisés pour comparer les modèles de tuberculose utilisés au cours de ma thèse, il serait très intéressant d'évaluer le rôle fonctionnel de miR-132-3p et de *FOXP1* dans les macrophages murins CD11b⁺ et dans le modèle des THP1–hypoxiques, pour essayer de s'approcher des conditions physiologiques de l'infection tardive chez l'Homme. Par ailleurs, une expérience est en cours pour à la fois répéter et enrichir les résultats obtenus dans le modèle HA *in vivo*. L'étude est répétée avec le même protocole, et en parallèle, avec un sacrifice plus tardif des souris (11 jours après infection) et des doses plus fortes d'inhibiteur de miR-132-3p (1 mg/kg contre 0,2 et 0,5 mg/kg utilisés dans mon étude).

Le rôle protecteur de l'inhibiteur de miR-132-3p que j'ai observé dans les phases précoces de l'infection, suggère qu'il pourrait être intéressant d'envisager une inhibition de miR-132-3p pour potentialiser l'effet immunisant des vaccins, dans le cadre d'une stratégie d'entraînement de l'immunité innée. Les thérapies préventives ciblant l'immunité innée reposent sur la capacité des cellules immunitaires innées à garder une stimulation en mémoire, afin de répondre plus efficacement au même stress par la suite ([Khader et al., 2019](#); [Netea et al., 2016](#); [Sheedy et Divangahi, 2021](#)). Cette mémoire semble liée à des régulations épigénétiques, notamment dans les macrophages stimulés avec BCG ([Pisu et al. 2021](#)). Il serait donc très intéressant d'analyser le profil de régulation épigénétique des macrophages traités avec l'inhibiteur de miR-132, d'évaluer si cette régulation perdure et se révélerait

prometteuse, en complémentarité de la vaccination, pour prévenir l'infection. Par ailleurs, la mise sur le marché des vaccins à ARNm pour lutter contre l'épidémie de COVID-19 ([Commissioner, 2021](#)) ouvre une voie encourageante pour les thérapies basées sur les miARN, notamment comme adjuvants des vaccins.

Les macrophages alvéolaires ont un faible taux de renouvellement et peuvent résider plusieurs années dans les poumons (Woo, Jeong, et Chung 2021). En ce qui concerne les macrophages recrutés, ils sont renouvelés plus rapidement et leur durée de vie est plus courte (Evren, Ringqvist, et Willinger 2020). Par conséquent, dans le cas d'une thérapie préventive, il est plus bénéfique de cibler les macrophages alvéolaires. L'étude que j'ai menée sur miR-132-3p dans le modèle murin HA ne ciblait pas les macrophages alvéolaires qui expriment peu l'intégrine CD11b et fortement l'intégrine CD11c (CD11b^{low}CD11c^{hi}). A l'inverse, les macrophages recrutés ont un phénotype CD11b^{hi}CD11c^{low}. Comme ces populations répondent différemment à l'infection (L. Huang *et al.* 2018; Pisu *et al.* 2021), et que les macrophages interstitiels recrutés au cours de l'infection finissent par constituer plus de 70% de la totalité des macrophages pulmonaires (Pisu *et al.* 2021), en réalisant un tri positif des macrophages CD11b⁺, mes résultats reflètent en grande majorité la réponse des macrophages interstitiels. Il serait donc très intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de miR-132-3p spécifiquement dans les macrophages alvéolaires infectés. De plus, la caractérisation récente des différentes populations de macrophages alvéolaires et interstitiels à l'état naïf et au cours de l'infection avec Mtb (Pisu *et al.* 2021; Chakarov *et al.* 2019; Westphalen *et al.* 2014) suggère que l'inhibition de miR-132-3p pourrait avoir un effet différent dans chacune de ces sous populations. L'étude de l'inhibition de miR-132-3p sur la défense de ces populations de macrophages au cours de l'infection permettrait d'identifier le type cellulaire le plus avantageux pour inhiber miR-132-3p afin d'obtenir une réponse protectrice. De nombreuses méthodes ont été développées dans le but d'adresser les miARN à un type cellulaire spécifique (Yong Fu, Chen, et Huang 2019). L'adressage spécifique de petit ARN dans les macrophages, à l'échelle de la population globale, mais principalement à la sous population des macrophages anti-inflammatoires, est possible grâce à l'utilisation de groupement de résidus mannose reconnus par le récepteur MRC1 des macrophages (Kaps *et al.* 2020). Du fait que la caractérisation des sous-population de macrophages pulmonaires ait été réalisée par RNAseq dans les études parues à ce jour, aucun marqueur membranaire permettant de les discriminer

n'a été identifié (Evren *et al.* 2021; Pisu *et al.* 2021; Chakarov *et al.* 2019; Westphalen *et al.* 2014). A ce jour, la méthode la plus couramment utilisée pour cibler les macrophages pulmonaires demeure l'instillation par voie nasale ou intratrachéale qui ne permettent malheureusement pas de cibler un sous-type de macrophages pulmonaires particulier. Cette voie d'inoculation permet tout de même de limiter la diffusion systémique des miARN. *In fine*, ils sont également distribués dans de nombreux organes, notamment dans le foie, les reins, la rate et le cœur, mais à des concentrations moindres (Schlosser, Taha, et Stewart 2018). Ainsi, le développement de nouveaux vecteurs pour cibler spécifiquement des sous-populations de macrophages sera favorable à l'application, en tuberculose, de thérapies basées sur l'inhibition de miR-132. Par ailleurs, un ciblage précis permettra de limiter les effets non spécifiques « off-target ». Ces effets constituent l'une des premières limites à l'utilisation d'un miARN ou d'un inhibiteur de miARN chez l'Homme, en raison des centaines d'ARNm que les miARN sont susceptibles de contrôler (S. Zhang *et al.* 2021), et du fait que cette régulation dépend beaucoup du type cellulaire (Nam *et al.* 2014). Cependant, une étude clinique en phase Ib montre l'inocuité de l'injection par intraveineuse d'un inhibiteur de miR-132-3p afin de lutter contre les déficiences cardiaques (Taubel *et al.* 2021). Ces résultats sont à confirmer dans le contexte de l'infection avec *Mtb* mais ouvrent une voie prometteuse pour l'inhibition de miR-132-3p afin de traiter d'autres pathologies.

La thérapie curative actuelle pour soigner la tuberculose repose sur une combinaison de quatre antibiotiques (Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol et Pyrazinamide) et, dans le cas de la tuberculose multi-résistante, sur une nouvelle combinaison de trois antibiotiques (Bédaquiline, Prétonamid et Linézolide) approuvée en 2019 par la FDA (Conradie *et al.* 2020). Comme le montrent les essais thérapeutiques récents (D. L. Costa, Maiga, et Subbian 2021; C. Young, Walzl, et Du Plessis 2020), les immunothérapies ciblant la réponse de l'hôte ne seront jamais envisagées en tant que monothérapie. D'après les résultats que j'ai obtenus, l'inhibition ciblée de miR-132-3p semble prometteuse pour améliorer la défense de l'hôte à une étape précoce de l'infection mais cela restera à vérifier dans des conditions expérimentales se rapprochant d'une thérapie envisageable chez l'Homme. Ainsi, une perspective intéressante, issue de mon travail, serait de mesurer si une co-administration d'un inhibiteur de miR-132-3p avec des antibiotiques pourrait avoir des effets bénéfiques dans un modèle murin de tuberculose. En prenant en compte la complexité et l'importance de la

cinétique de la réponse immunitaire de l'hôte dans la pathologie de la tuberculose, et comme pour toutes les immunothérapies, le moment optimal d'administration de l'inhibiteur de miR-132-3p sera crucial. Par exemple, la stimulation des cellules Mucosal-associated invariant T (MAIT) peut avoir un effet délétère ou bénéfique selon que l'infection est respectivement à un stade précoce ou tardif (Sakai *et al.* 2021). Les modèles que j'ai utilisés pour les études de perte de fonction avec un inhibiteur de miR-132, sont des modèles d'infection précoce. En effet, *in vitro*, les macrophages ont été infectés entre 2 et 5 jours, et *in vivo* les souris infectées, traitées avec l'inhibiteur de miR-132, ont été sacrifiées après 6 jours d'infection. Nous avons ciblé les mécanismes précoces de réponse à l'infection, avant que l'immunité adaptative ne soit recrutée (Wolf *et al.* 2008; Charles A Janeway *et al.* 2001). Afin de déterminer, le moment optimal pour administrer l'inhibiteur de miR-132, il serait alors intéressant d'utiliser des modèles murins qui permettent une infection à long terme ou des modèles humanisés dans lesquels on observe la formation de granulomes pour contenir l'infection, comme observé dans des modèles murins d'infection chronique de la souris C3HeB/FeJ (Irwin *et al.* 2015). Cette caractérisation pourra également être réalisée *in vitro* sur des hMDM qui, expérimentalement, sont des modèles permettant de maintenir une infection à long terme (14 jours et plus). D'autre part, dans un même système biologique et au cours du temps, un miARN peut avoir des rôles régulateurs différents, voire même opposés (Nam *et al.* 2014). Par exemple, miR-155 a un effet délétère pour la souris au début de l'infection avec Mtb (Iwai *et al.* 2015), et un effet protecteur dans les phases tardives (Rothchild *et al.* 2016). Il sera donc essentiel d'étudier l'effet à long terme de l'inhibition de miR-132-3p pour évaluer comment cet effet perdure dans le temps.

Pour conclure, les études transcriptomiques et fonctionnelles réalisées au cours de mes travaux ont permis d'apporter plus de lumière sur la réponse inflammatoire des macrophages infectés par Mtb et des miARN qui contrôlent cette réponse. Dans un premier temps, l'analyse intégrative des gènes de la réponse inflammatoire liée à la virulence de Mtb et des miARN associés a permis de réduire la liste des gènes et miARN d'intérêt à, respectivement, trente et trente-sept candidats potentiels. Parmi ces miARN j'ai identifié miR-132, un nouveau candidat lié à la virulence de Mtb. Mes résultats ont montré que ce miARN contrôle le métabolisme et la polarisation des macrophages au cours de l'infection et que son effet est délétère pour la

réponse contre l'infection. Ce nouveau rôle attribué à miR-132 permet de mieux comprendre l'incapacité des macrophages à contrôler Mtb pendant la phase précoce de l'infection. Mes résultats apportent également, et pour la première fois, une preuve de concept *in vivo* de l'efficacité de l'inhibition ciblée de miR-132-3p pour diminuer la charge bactérienne dans les poumons des souris infectées. Dans le contexte de l'intérêt porté actuellement sur l'immunité entraînée, les thérapies dirigées par l'hôte et la nouvelle utilisation des vaccins à ARNm, mes travaux ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques pour la tuberculose, basées sur la régulation de l'expression de miR-132-3p et des gènes qu'il régule.

E. Références bibliographiques

Abdalla, Abualgasim Elgaili, Hasan Ejaz, Mahjoob Osman Mahjoob, Ayman Ali Mohammed Alameen, Khalid Omer Abdalla Abosalif, Mohammed Yagoub Mohammed Elamir, et Mohammed Alsadig Mousa. 2020. « Intelligent Mechanisms of Macrophage Apoptosis Subversion by Mycobacterium ». *Pathogens* 9 (3): 218. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030218>.

Abreu, Rodrigo, Pramod Giri, et Fred Quinn. 2020. « Host-Pathogen Interaction as a Novel Target for Host-Directed Therapies in Tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 11 (juillet): 1553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01553>.

Adams, Kristin N., Kevin Takaki, Lynn E. Connolly, Heather Wiedenhoft, Kathryn Winglee, Olivier Humbert, Paul H. Edelstein, Christine L. Cosma, et Lalita Ramakrishnan. 2011. « Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism ». *Cell* 145 (1): 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>.

Aegerter, Helena, Justina Kulikauskaite, Stefania Crotta, Harshil Patel, Gavin Kelly, Edith M. Hessel, Matthias Mack, Soren Beinke, et Andreas Wack. 2020. « Influenza-Induced Monocyte-Derived Alveolar Macrophages Confer Prolonged Antibacterial Protection ». *Nature Immunology* 21 (2): 145-57. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0568-x>.

Agarwal, Pooja, Theo W. Combes, Fariba Shojaee-Moradie, Barbara Fielding, Siamon Gordon, Valerie Mizrahi, et Fernando O. Martinez. 2020. « Foam Cells Control Mycobacterium tuberculosis Infection ». *Frontiers in Microbiology* 11 (juillet): 1394. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01394>.

Agarwal, Vikram, George W Bell, Jin-Wu Nam, et David P Bartel. 2015. « Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs ». Édité par Elisa Izaurralde. *eLife* 4 (août): e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.

Ahluwalia, Pankaj Kumar, Rajan Kumar Pandey, Prabodh Kumar Sehajpal, et Vijay Kumar Prajapati. 2017. « Perturbed microRNA Expression by Mycobacterium tuberculosis Promotes Macrophage Polarization Leading to Pro-survival Foam Cell ». *Frontiers in Immunology* 8 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00107>.

Alipoor, Shamila D., Ian M. Adcock, Payam Tabarsi, Gert Folkerts, et Esmaeil Mortaz. 2020. « MiRNAs in Tuberculosis: Their Decisive Role in the Fate of TB ». *European Journal of Pharmacology* 886 (novembre): 173529. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173529>.

Alonso, Henar, Julien Parra, Wladimir Malaga, Delphine Payros, Chia-Fang Liu, Céline Berrone, Camille Robert, et al. 2017. « Protein O-Mannosylation Deficiency Increases LprG-Associated Lipoarabinomannan Release by Mycobacterium Tuberculosis and Enhances the TLR2-Associated Inflammatory Response ». *Scientific Reports* 7 (1): 7913. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08489-7>.

Amaral, Eduardo P., Diego L. Costa, Sivaranjani Namasivayam, Nicolas Riteau, Olena Kamenyeva, Lara Mittereder, Katrin D. Mayer-Barber, Bruno B. Andrade, et Alan Sher. 2019. « A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 216 (3): 556-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20181776>.

Ambarus, C. A., S. Krausz, M. van Eijk, J. Hamann, T. R. D. J. Radstake, K. A. Reedquist, P. P. Tak, et D. L. P. Baeten. 2012. « Systematic Validation of Specific Phenotypic Markers for in Vitro Polarized Human Macrophages ». *Journal of Immunological Methods* 375 (1-2): 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.10.013>.

Arji, Naima, Marc Busson, Ghali Iraqi, Jamal Eddine Bourkadi, Abdelaziz Benjouad, Abdellatif Bouayad, Christina Mariaselvam, et al. 2014. « Genetic Diversity of TLR2, TLR4, and VDR Loci and Pulmonary Tuberculosis in Moroccan Patients ». *Journal of Infection in Developing Countries* 8 (4): 430-40. <https://doi.org/10.3855/jidc.3820>.

Armstrong, J. A., et P. D. Hart. 1971. « Response of Cultured Macrophages to Mycobacterium Tuberculosis, with Observations on Fusion of Lysosomes with Phagosomes ». *The Journal of Experimental Medicine* 134 (3 Pt 1): 713-40. <https://doi.org/10.1084/jem.134.3.713>.

Astarie-Dequeker, Catherine, Laurent Le Guyader, Wladimir Malaga, Fam-Ky Seaphanh, Christian Chalut, André Lopez, et Christophe Guilhot. 2009. « Phthiocerol Dimycocerosates of M. Tuberculosis Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids ». *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000289. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000289>.

Atri, Chiraz, Fatma Z. Guerfali, et Dhafer Laouini. 2018. « Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

Augenstreich, Jacques, Ainhoa Arbues, Roxane Simeone, Evert Haanappel, Alice Wegener, Fadel Sayes, Fabien Le Chevalier, et al. 2017. « ESX-1 and Phthiocerol Dimycocerosates of Mycobacterium Tuberculosis Act in Concert to Cause Phagosomal Rupture and Host Cell Apoptosis ». *Cellular Microbiology* 19 (7). <https://doi.org/10.1111/cmi.12726>.

Axelrod, Sofia, Hartmut Oschkinat, Jana Enders, Brigitte Schlegel, Volker Brinkmann, Stefan H. E. Kaufmann, Albert Haas, et Ulrich E. Schaible. 2008. « Delay of Phagosome Maturation by a Mycobacterial Lipid Is Reversed by Nitric Oxide ». *Cellular Microbiology* 10 (7): 1530-45. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01147.x>.

Bade, Pauline, Fabrizio Simonetti, Stephanie Sans, Patricia Laboudie, Khadija Kissane, Nicolas Chappat, Sophie Lagrange, Florence Apparailly, Christine Roubert, et Isabelle Duroux-Richard. 2021. « Integrative Analysis of Human Macrophage Inflammatory Response Related to Mycobacterium tuberculosis Virulence ». *Frontiers in Immunology* 12: 2434. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.668060>.

Baek, Daehyun, Judit Villén, Chanseok Shin, Fernando D. Camargo, Steven P. Gygi, et David P. Bartel. 2008. « The impact of microRNAs on protein output ». *Nature* 455 (7209): 64-71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>.

Baker, Emma H., Nicholas Clark, Amanda L. Brennan, Donald A. Fisher, Khin M. Gyi, Margaret E. Hodson, Barbara J. Philips, Deborah L. Baines, et David M. Wood. 2007. « Hyperglycemia and Cystic Fibrosis Alter Respiratory Fluid Glucose Concentrations Estimated by Breath Condensate Analysis ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 102 (5): 1969-75. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01425.2006>.

Balaban, Nathalie Q., Kenn Gerdes, Kim Lewis, et John D. McKinney. 2013. « A Problem of Persistence: Still More Questions than Answers? » *Nature Reviews Microbiology* 11 (8): 587-91. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3076>.

Balcewicz-Sablinska, M. K., H. Gan, et H. G. Remold. 1999. « Interleukin 10 Produced by Macrophages Inoculated with Mycobacterium Avium Attenuates Mycobacteria-Induced

Apoptosis by Reduction of TNF-Alpha Activity ». *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4): 1230-37. <https://doi.org/10.1086/315011>.

Baseler, Walter A., Luke C. Davies, Laura Quigley, Lisa A. Ridnour, Jonathan M. Weiss, S. Perwez Hussain, David A. Wink, et Daniel W. McVicar. 2016. « Autocrine IL-10 functions as a rheostat for M1 macrophage glycolytic commitment by tuning nitric oxide production ». *Redox Biology* 10 (septembre): 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.005>.

Batlle, Eduard, et Joan Massagué. 2019. « Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer ». *Immunity* 50 (4): 924-40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.

Behar, Samuel M., Maziar Divangahi, et Heinz G. Remold. 2010. « Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? » *Nature reviews. Microbiology* 8 (9): 668-74. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2387>.

Behling, C. A., R. L. Perez, M. R. Kidd, G. W. Staton, et R. L. Hunter. 1993. « Induction of Pulmonary Granulomas, Macrophage Procoagulant Activity, and Tumor Necrosis Factor-Alpha by Trehalose Glycolipids ». *Annals of Clinical and Laboratory Science* 23 (4): 256-66.

Behrouzi, Ava, Marjan Alimohammadi, Amir Hossein Nafari, Mohammad Hadi Yousefi, Farhad Riazi Rad, Farzam Vaziri, et Seyed Davar Siadat. 2019. « The Role of Host MiRNAs on Mycobacterium Tuberculosis ». *ExRNA* 1 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0040-y>.

Benoit, Marie, Benoît Desnues, et Jean-Louis Mege. 2008. « Macrophage Polarization in Bacterial Infections ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (6): 3733-39.

Bernard EM, Fearn A, Bussi C, Santucci P, Peddie CJ, Lai RJ, Collinson LM, Gutierrez MG. M. tuberculosis infection of human iPSC-derived macrophages reveals complex membrane dynamics during xenophagy evasion. *J Cell Sci.* 2020 Nov 25;134(5):jcs252973. doi: 10.1242/jcs.252973. PMID: 32938685; PMCID: PMC7710011.

Betts, Joanna C., Pauline T. Lukey, Linda C. Robb, Ruth A. McAdam, et Ken Duncan. 2002. « Evaluation of a Nutrient Starvation Model of Mycobacterium Tuberculosis Persistence by Gene and Protein Expression Profiling ». *Molecular Microbiology* 43 (3): 717-31.

Bibbins-Domingo, Kirsten, David C. Grossman, Susan J. Curry, Linda Bauman, Karina W. Davidson, John W. Epling, Francisco A. R. García, et al. 2016. « Screening for Latent

Tuberculosis Infection in Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement ». *JAMA* 316 (9): 962-69. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11046>.

Borchert, Glen M., William Lanier, et Beverly L. Davidson. 2006. « RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1097-1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>.

Bottini, Silvia, David Pratella, Valerie Grandjean, Emanuela Repetto, et Michele Trabucchi. 2018. « Recent computational developments on CLIP-seq data analysis and microRNA targeting implications ». *Briefings in Bioinformatics* 19 (6): 1290-1301. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx063>.

Brace, Patience T., Liku B. Tezera, Magdalena K. Bielecka, Toby Mellows, Diana Garay, Shuye Tian, Lucinda Rand, et al. 2017. « Mycobacterium Tuberculosis Subverts Negative Regulatory Pathways in Human Macrophages to Drive Immunopathology ». *PLOS Pathogens* 13 (6): e1006367. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006367>.

Broughton, James P., Michael T. Lovci, Jessica L. Huang, Gene W. Yeo, et Amy E. Pasquinelli. 2016. « Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity ». *Molecular Cell* 64 (2): 320-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>.

Budak, Hikmet, Reyhan Bulut, Melda Kantar, et Burcu Alptekin. 2016. « MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription ». *Briefings in Functional Genomics* 15 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elv026>.

Bukhari, M., M. A. Aslam, A. Khan, Q. Iram, A. Akbar, A. G. Naz, S. Ahmad, et al. 2015. « TLR8 Gene Polymorphism and Association in Bacterial Load in Southern Punjab of Pakistan: An Association Study with Pulmonary Tuberculosis ». *International Journal of Immunogenetics* 42 (1): 46-51. <https://doi.org/10.1111/iji.12170>.

Cáceres, Neus, Gustavo Tapia, Isabel Ojanguren, Frederic Altare, Olga Gil, Sergio Pinto, Cristina Vilaplana, et Pere-Joan Cardona. 2009. « Evolution of Foamy Macrophages in the Pulmonary Granulomas of Experimental Tuberculosis Models ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 89 (2): 175-82. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.11.001>.

Cambier, C. J., Stanley Falkow, et Lalita Ramakrishnan. 2014. « Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium Tuberculosis ». *Cell* 159 (7): 1497-1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>.

Capuano, Saverio V., Denise A. Croix, Santosh Pawar, Angelica Zinovik, Amy Myers, Philana L. Lin, Stephanie Bissel, Carl Fuhrman, Edwin Klein, et JoAnne L. Flynn. 2003. « Experimental Mycobacterium Tuberculosis Infection of Cynomolgus Macaques Closely Resembles the Various Manifestations of Human M. Tuberculosis Infection ». *Infection and Immunity* 71 (10): 5831-44. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5831-5844.2003>.

Carvalho, Natália B., Fernanda S. Oliveira, Fernanda V. Durães, Leonardo A. de Almeida, Manuela Flórido, Luana O. Prata, Marcelo V. Caliar, Rui Appelberg, et Sérgio C. Oliveira. 2011. « Toll-Like Receptor 9 Is Required for Full Host Resistance to Mycobacterium avium Infection but Plays No Role in Induction of Th1 Responses ». *Infection and Immunity* 79 (4): 1638-46. <https://doi.org/10.1128/IAI.01030-10>.

Cavaleri, Marco, et Efthymios Manolis. 2015. « Hollow Fiber System Model for Tuberculosis: The European Medicines Agency Experience ». *Clinical Infectious Diseases* 61 (suppl_1): S1-4. <https://doi.org/10.1093/cid/civ484>.

Chakarov, Svetoslav, Hwee Ying Lim, Leonard Tan, Sheau Yng Lim, Peter See, Josephine Lum, Xiao-Meng Zhang, et al. 2019. « Two Distinct Interstitial Macrophage Populations Coexist across Tissues in Specific Subtissular Niches ». *Science (New York, N.Y.)* 363 (6432): eaau0964. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>.

Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, et Mark J. Shlomchik. 2001. « Principles of Innate and Adaptive Immunity ». *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>.

Chaudhuri, Aadel A., Alex Yick-Lun So, Nikita Sinha, William S. J. Gibson, Konstantin D. Taganov, Ryan M. O'Connell, et David Baltimore. 2011. « MicroRNA-125b Potentiates Macrophage Activation ». *The Journal of Immunology* 187 (10): 5062-68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102001>.

Chautard, Romain, Sajida Ibrahim, Maxime Guéguinou, Thierry Lecomte, et William Raoul. 2020. « Micro-ARN et cancer colorectal ». *Hépatogastro & Oncologie Digestive* 27 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1684/hpg.2019.1896>.

Chawla, Ajay, Yaacov Barak, Laszlo Nagy, Debbie Liao, Peter Tontonoz, et Ronald M. Evans. 2001. « PPAR- γ Dependent and Independent Effects on Macrophage-Gene Expression in Lipid

Metabolism and Inflammation ». *Nature Medicine* 7 (1): 48-52. <https://doi.org/10.1038/83336>.

Chen, Der-Yuan, Yi-Ming Chen, Chin-Fu Lin, Che-Min Lo, Hung-Jen Liu, et Tsai-Ling Liao. 2020. « MicroRNA-889 Inhibits Autophagy To Maintain Mycobacterial Survival in Patients with Latent Tuberculosis Infection by Targeting TWEAK ». *mBio* 11 (1): e03045-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03045-19>.

Chen, Zhi, Tongjian Wang, Zhen Liu, Guangyu Zhang, Jinhe Wang, Shisheng Feng, et Jianqin Liang. 2015. « Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by Mycobacteria Tuberculosis as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages ». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 68 (5): 420-24. <https://doi.org/10.7883/yoken.JIID.2014.466>.

Coleman, M. Teresa, Pauline Maiello, Jaime Tomko, Lonnie James Frye, Daniel Fillmore, Christopher Janssen, Edwin Klein, et Philana Ling Lin. 2014. « Early Changes by (18)Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Coregistered with Computed Tomography Predict Outcome after Mycobacterium Tuberculosis Infection in Cynomolgus Macaques ». *Infection and Immunity* 82 (6): 2400-2404. <https://doi.org/10.1128/IAI.01599-13>.

Comas, Iñaki, Mireia Coscolla, Tao Luo, Sonia Borrell, Kathryn E. Holt, Midori Kato-Maeda, Julian Parkhill, et al. 2013. « Out-of-Africa Migration and Neolithic Coexpansion of Mycobacterium Tuberculosis with Modern Humans ». *Nature Genetics* 45 (10): 1176-82. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>.

Commissioner, Office of the. 2021. « COVID-19 Vaccines ». *FDA*, octobre. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-vaccines>.

Conradie, Francesca, Andreas H. Diacon, Nosipho Ngubane, Pauline Howell, Daniel Everitt, Angela M. Crook, Carl M. Mendel, et al. 2020. « Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis ». *New England Journal of Medicine*, mars. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901814>.

Coscolla, Mireia, et Sebastien Gagneux. 2014. « Consequences of Genomic Diversity in Mycobacterium Tuberculosis ». *Seminars in Immunology* 26 (6): 431-44. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012>.

Cosma, Christine L., David R. Sherman, et Lalita Ramakrishnan. 2003. « The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria ». *Annual Review of Microbiology* 57 (1): 641-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091033>.

Costa, Diego L., Mamoudou Maiga, et Selvakumar Subbian. 2021. « Editorial: Host-Directed Therapies for Tuberculosis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 736. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.742053>.

Costa, Tiago R. D., Catarina Felisberto-Rodrigues, Amit Meir, Marie S. Prevost, Adam Redzej, Martina Trokter, et Gabriel Waksman. 2015. « Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria: Structural and Mechanistic Insights ». *Nature Reviews. Microbiology* 13 (6): 343-59. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>.

Court, Nathalie, Stéphanie Rose, Marie-Laure Bourigault, Sophie Front, Olivier R. Martin, Jennifer K. Dowling, Elaine F. Kenny, Luke O'Neill, François Erard, et Valerie F. J. Quesniaux. 2011. « Mycobacterial PIMs Inhibit Host Inflammatory Responses through CD14-Dependent and CD14-Independent Mechanisms ». *PloS One* 6 (9): e24631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024631>.

Cowin, Allison. 2018. *Wound Repair and Regeneration*. MDPI.

Crawford, Monica, et Jeffrey R. Curtis. 2008. « Tumor Necrosis Factor Inhibitors and Infection Complications ». *Current rheumatology reports* 10 (5): 383-89.

Curtale, Graziella, Massimiliano Mirolo, Tiziana Ada Renzi, Marzia Rossato, Flavia Bazzoni, et Massimo Locati. 2013. « Negative Regulation of Toll-like Receptor 4 Signaling by IL-10-Dependent MicroRNA-146b ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (28): 11499-504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219852110>.

Curtale, Graziella, Marcello Rubino, et Massimo Locati. 2019. « MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation ». *Frontiers in Immunology* 10: 799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00799>.

Cyktor, Joshua C., Bridget Carruthers, Rachel A. Kominsky, Gillian L. Beamer, Paul Stromberg, et Joanne Turner. 2013. « IL-10 Inhibits Mature Fibrotic Granuloma Formation during Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (6): 2778-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202722>.

Daffé, Mamadou. 2015. « The Cell Envelope of Tubercle Bacilli ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 95 Suppl 1 (juin): S155-158. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.024>.

Dalgic, Nazan, Deniz Tekin, Zeliha Kayaalti, Erkan Cakir, Tulin Soylemezoglu, et Mesut Sancar. 2011. « Relationship between Toll-Like Receptor 8 Gene Polymorphisms and Pediatric Pulmonary Tuberculosis ». *Disease markers* 31 (1): 33-38. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0800>.

Daniel, Jaiyanth, Hédia Maamar, Chirajyoti Deb, Tatiana D. Sirakova, et Pappachan E. Kolattukudy. 2011. « Mycobacterium Tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages ». *PLoS Pathogens* 7 (6): e1002093. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002093>.

Danilchanka, Olga, Jim Sun, Mikhail Pavlenok, Christian Maueröder, Alexander Speer, Axel Siroy, Joeli Marrero, et al. 2014. « An outer membrane channel protein of Mycobacterium tuberculosis with exotoxin activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (18): 6750-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400136111>.

Dannenbergh, Arthur M. 2003. « Macrophage turnover, division and activation within developing, peak and “healed” tuberculous lesions produced in rabbits by BCG ». *Tuberculosis* 83 (4): 251-60. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(03\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(03)00048-9).

Davis, J. Muse, Hilary Clay, Jessica L. Lewis, Nafisa Ghori, Philippe Herbomel, et Lalita Ramakrishnan. 2002. « Real-Time Visualization of Mycobacterium-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos ». *Immunity* 17 (6): 693-702. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00475-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00475-2).

De Nardo, Dominic, Katherine R. Balka, Yamel Cardona Gloria, Vikram R. Rao, Eicke Latz, et Seth L. Masters. 2018. « Interleukin-1 receptor–associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (39): 15195-207. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003314>.

Deretic, Vojo, Tatsuya Saitoh, et Shizuo Akira. 2013. « Autophagy in Infection, Inflammation and Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (10): 722-37. <https://doi.org/10.1038/nri3532>.

Dheda, Keertan, Helen Booth, Jim F. Huggett, Margaret A. Johnson, Alimuddin Zumla, et Graham A. W. Rook. 2005. « Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis ». *The Journal of Infectious Diseases* 192 (7): 1201-10. <https://doi.org/10.1086/444545>.

Ding, Shuqin, Yuliang Qu, Shaoqi Yang, Ya'e Zhao, et Guangxian Xu. 2019. « Novel MiR-1958 Promotes Mycobacterium Tuberculosis Survival in RAW264.7 Cells by Inhibiting Autophagy Via Atg5 ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (6): 989-98. <https://doi.org/10.4014/jmb.1811.11062>.

Diseases, The Lancet Infectious. 2021. « Tuberculosis and Malaria in the Age of COVID-19 ». *The Lancet Infectious Diseases* 21 (1): 1. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30946-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30946-4).

Divangahi, Maziar, Samuel M. Behar, et Heinz Remold. 2013. « Dying to Live: How the Death Modality of the Infected Macrophage Affects Immunity to Tuberculosis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 783: 103-20. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_6.

Dixon, Scott J., Kathryn M. Lemberg, Michael R. Lamprecht, Rachid Skouta, Eleina M. Zaitsev, Caroline E. Gleason, Darpan N. Patel, et al. 2012. « Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death ». *Cell* 149 (5): 1060-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.

Dkhar, Hedwin Kitdorlang, Ravikanth Nanduri, Sahil Mahajan, Sandeep Dave, Ankita Saini, Arun Kumar Somavarapu, Ashish Arora, et al. 2014. « Mycobacterium Tuberculosis Keto-Mycolic Acid and Macrophage Nuclear Receptor TR4 Modulate Foamy Biogenesis in Granulomas: A Case of a Heterologous and Noncanonical Ligand-Receptor Pair ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (1): 295-305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400092>.

Dorhoi, Anca, Marco Iannaccone, Maura Farinacci, Kellen C. Faé, Jörg Schreiber, Pedro Moura-Alves, Geraldine Nouailles, et al. 2013. « MicroRNA-223 Controls Susceptibility to Tuberculosis by Regulating Lung Neutrophil Recruitment ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (11): 4836-48. <https://doi.org/10.1172/JCI67604>.

Doz, Emilie, Stéphanie Rose, Jérôme Nigou, Martine Gilleron, Germain Puzo, François Erard, Bernhard Ryffel, et Valerie F. J. Quesniaux. 2007. « Acylation Determines the Toll-like Receptor (TLR)-Dependent Positive versus TLR2-, Mannose Receptor-, and SIGIRR1-Independent

Negative Regulation of pro-Inflammatory Cytokines by Mycobacterial Lipomannan ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26014-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702690200>.

Drennan, Michael B., Delphine Nicolle, Valerie J. F. Quesniaux, Muazzam Jacobs, Nasiema Allie, Joseph Mpagi, Cécile Frémond, Hermann Wagner, Carsten Kirschning, et Bernhard Ryffel. 2004. « Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Succumb to Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *The American Journal of Pathology* 164 (1): 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63095-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63095-7).

Druszczyńska, Magdalena, Marcin Włodarczyk, Marek Fol, et Wiesława Rudnicka. 2011. « [Recognition of mycobacterial antigens by phagocytes] ». *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 65 (janvier): 28-39. <https://doi.org/10.5604/17322693.931545>.

Dutta, Rajesh Kumar, Mahesh Kathania, Manoj Raje, et Sekhar Majumdar. 2012. « IL-6 Inhibits IFN- γ Induced Autophagy in Mycobacterium Tuberculosis H37Rv Infected Macrophages ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (6): 942-54. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.021>.

Ehlers, Stefan, et Ulrich E. Schaible. 2013. « The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host-Pathogen Collusion ». *Frontiers in Immunology* 3 (janvier): 411. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>.

El-Zayat, Salwa Refat, Hiba Sibaii, et Fathia A. Manna. 2019. « Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview ». *Bulletin of the National Research Centre* 43 (1): 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.

Ernst, Orna, Yifat Glucksam-Galnoy, Bibek Bhatta, Muhammad Athamna, Iris Ben-Dror, Yair Glick, Doron Gerber, et Tsaffrir Zor. 2019. « Exclusive Temporal Stimulation of IL-10 Expression in LPS-Stimulated Mouse Macrophages by cAMP Inducers and Type I Interferons ». *Frontiers in Immunology* 10: 1788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01788>.

Etna, Marilena P., Alessandro Sinigaglia, Angela Grassi, Elena Giacomini, Alessandra Romagnoli, Manuela Pardini, Martina Severa, et al. 2018. « Mycobacterium Tuberculosis-Induced MiR-155 Subverts Autophagy by Targeting ATG3 in Human Dendritic Cells ». *PLoS Pathogens* 14 (1): e1006790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006790>.

Eulalio, Ana, Leon Schulte, et Jörg Vogel. 2012. « The Mammalian MicroRNA Response to Bacterial Infections ». *RNA Biology* 9 (6): 742-50. <https://doi.org/10.4161/rna.20018>.

Evren, Elza, Emma Ringqvist, Kumar Parijat Tripathi, Natalie Sleiers, Inés C6 Rives, Arlisa Alisjahbana, Yu Gao, et al. 2021. « Distinct Developmental Pathways from Blood Monocytes Generate Human Lung Macrophage Diversity ». *Immunity* 54 (2): 259-275.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.003>.

Evren, Elza, Emma Ringqvist, et Tim Willinger. 2020. « Origin and Ontogeny of Lung Macrophages: From Mice to Humans ». *Immunology* 160 (2): 126-38. <https://doi.org/10.1111/imm.13154>.

Fang, Hua, Hua-Feng Li, Qin Pan, Hon-Ling Jin, Miao Yang, Ru-Rong Wang, Quan-Yun Wang, et Jian-Ping Zhang. 2021. « MiR-132-3p Modulates MEKK3-Dependent NF- κ B and p38/JNK Signaling Pathways to Alleviate Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury by Hindering M1 Polarization of Macrophages ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 80. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.570451>.

Fatima, Samreen, Anjna Kumari, Gobardhan Das, et Ved Prakash Dwivedi. 2020. « Tuberculosis Vaccine: A Journey from BCG to Present ». *Life Sciences* 252 (juillet): 117594. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117594>.

Fauvart, Maarten, Valerie N. De Groote, et Jan Michiels. 2011. « Role of Persister Cells in Chronic Infections: Clinical Relevance and Perspectives on Anti-Persister Therapies ». *Journal of Medical Microbiology* 60 (Pt 6): 699-709. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030932-0>.

Finnegan, Emily F., et Amy E. Pasquinelli. 2013. « MicroRNA biogenesis: Regulating the Regulators ». *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 48 (1): 51-68. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.738643>.

Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, et A. O'Garra. 1991. « IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147 (11): 3815-22.

Fisher, Aron B. 2009. « Redox Signaling Across Cell Membranes ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (6): 1349-56. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2378>.

Flores-Valdez, Mario Alberto, Cristian Alfredo Segura-Cerda, et Jorge Gaona-Bernal. 2018. « Modulation of Autophagy as a Strategy for Development of New Vaccine Candidates against Tuberculosis ». *Molecular Immunology* 97 (mai): 16-19. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.006>.

Flynn, J. L., J. Chan, et P. L. Lin. 2011. « Macrophages and Control of Granulomatous Inflammation in Tuberculosis ». *Mucosal Immunology* 4 (3): 271-78. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.14>.

Flynn, JoAnne L, et John Chan. 2003. « Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy ». *Current Opinion in Immunology* 15 (4): 450-55. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00075-X).

Flynn, Joanne L., et Edwin Klein. 2016. « Pulmonary Tuberculosis in Monkeys ». A Color Atlas of Comparative Pathology of Pulmonary Tuberculosis. 19 avril 2016. <https://doi.org/10.1201/EBK1439835272-11>.

Forster, Samuel C., Michelle D. Tate, et Paul J. Hertzog. 2015. « MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response ». *Frontiers in Immunology* 6 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00334>.

Franco-Zorrilla, José Manuel, Adrián Valli, Marco Todesco, Isabel Mateos, María Isabel Puga, Ignacio Rubio-Somoza, Antonio Leyva, Detlef Weigel, Juan Antonio García, et Javier Paz-Ares. 2007. « Target Mimicry Provides a New Mechanism for Regulation of MicroRNA Activity ». *Nature Genetics* 39 (8): 1033-37. <https://doi.org/10.1038/ng2079>.

Fratti, Rutilio A., Jennifer Chua, Isabelle Vergne, et Vojo Deretic. 2003. « Mycobacterium Tuberculosis Glycosylated Phosphatidylinositol Causes Phagosome Maturation Arrest ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5437-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737613100>.

Freemerman, Alex J., Amy R. Johnson, Gina N. Sacks, J. Justin Milner, Erin L. Kirk, Melissa A. Troester, Andrew N. Macintyre, Pankuri Goraksha-Hicks, Jeffery C. Rathmell, et Liza Makowski. 2014. « Metabolic Reprogramming of Macrophages: GLUCOSE TRANSPORTER 1 (GLUT1)-MEDIATED GLUCOSE METABOLISM DRIVES A PROINFLAMMATORY PHENOTYPE* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (11): 7884-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>.

Fu, Guodong, Jelena Brkić, Heyam Hayder, et Chun Peng. 2013. « MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 5519-44. <https://doi.org/10.3390/ijms14035519>.

Fu, Yong, Jiangning Chen, et Zhen Huang. 2019. « Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease ». *ExRNA* 1 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0024-y>.

Fu, Yurong, Zhengjun Yi, Xiaoyan Wu, Jianhua Li, et Fuliang Xu. 2011. « Circulating MicroRNAs in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 49 (12): 4246-51. <https://doi.org/10.1128/JCM.05459-11>.

Fukuda, Takeshi, Takayuki Matsumura, Manabu Ato, Maho Hamasaki, Yukiko Nishiuchi, Yoshiko Murakami, Yusuke Maeda, et al. 2013. « Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of Mycobacteria and Pathogenesis of Tuberculosis ». *MBio* 4 (1): e00472-00412. <https://doi.org/10.1128/mBio.00472-12>.

Furci, Lucinda, Elisa Schena, Paolo Miotto, et Daniela M. Cirillo. 2013. « Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with Mycobacterium tuberculosis ». *International Journal of Mycobacteriology* 2 (3): 128-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2013.04.006>.

Ganguli, Geetanjali, Kali Prasad Pattanaik, Manaswini Jagadeb, et Avinash Sonawane. 2020. « Mycobacterium Tuberculosis Rv3034c Regulates MTORC1 and PPAR- γ Dependant Pexophagy Mechanism to Control Redox Levels in Macrophages ». *Cellular Microbiology* 22 (9): e13214. <https://doi.org/10.1111/cmi.13214>.

Gantier, Michael P., Anthony J. Sadler, et Bryan R. G. Williams. 2007. « Fine-Tuning of the Innate Immune Response by MicroRNAs ». *Immunology & Cell Biology* 85 (6): 458-62. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100091>.

Getnet, Fentabil, Meaza Demissie, Nega Assefa, Bizatu Mengistie, et Alemayehu Worku. 2017. « Delay in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Low-and Middle-Income Settings: Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMC Pulmonary Medicine* 17 (1): 202. <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0551-y>.

Ghoneim, Hazem E., Paul G. Thomas, et Jonathan A. McCullers. 2013. « Depletion of Alveolar Macrophages during Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (3): 1250-59. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300014>.

Gideon, Hannah Priyadarshini, JiaYao Phuah, Amy J. Myers, Bryan D. Bryson, Mark A. Rodgers, M. Teresa Coleman, Pauline Maiello, et al. 2015. « Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization ». *PLoS Pathogens* 11 (1): e1004603. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004603>.

Glinge, Charlotte, Sebastian Clauss, Kim Boddum, Reza Jabbari, Javad Jabbari, Bjarke Risgaard, Philipp Tomsits, et al. 2017. « Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs – Pre-Analytic Methodological Considerations ». *PLoS ONE* 12 (2): e0167969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167969>.

Gordon, Stephen V., et Tanya Parish. 2018. « Microbe Profile: Mycobacterium Tuberculosis: Humanity's Deadly Microbial Foe ». *Microbiology (Reading, England)* 164 (4): 437-39. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000601>.

Graff, Joel W., Anne M. Dickson, Gwendolyn Clay, Anton P. McCaffrey, et Mary E. Wilson. 2012. « Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (26): 21816-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327031>.

Grant, A. V., A. Sabri, A. Abid, I. Abderrahmani Rhorfi, M. Benkirane, H. Souhi, H. Naji Amrani, et al. 2016. « A genome-wide association study of pulmonary tuberculosis in Morocco ». *Human genetics* 135 (3): 299-307. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1633-2>.

Graustein, A. D., D. J. Horne, M. Arentz, N. D. Bang, T. T. H. Chau, G. E. Thwaites, M. Caws, N. T. T. Thuong, S. J. Dunstan, et T. R. Hawn. 2015. « TLR9 Gene Region Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis in Vietnam ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 95 (2): 190-96. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.12.009>.

Gröschel, Matthias I., Fadel Sayes, Roxane Simeone, Laleh Majlessi, et Roland Brosch. 2016. « ESX Secretion Systems: Mycobacterial Evolution to Counter Host Immunity ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (11): 677-91. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.131>.

Guerrini, Valentina, et Maria Laura Gennaro. 2019. « Foam cells: one size doesn't fit all ». *Trends in immunology* 40 (12): 1163-79. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.10.002>.

Guerrini, Valentina, Brendan Prideaux, Landry Blanc, Natalie Bruiners, Riccardo Arrigucci, Sukhwinder Singh, Hsin Pin Ho-Liang, et al. 2018. « Storage Lipid Studies in Tuberculosis Reveal

That Foam Cell Biogenesis Is Disease-Specific ». *PLoS Pathogens* 14 (8): e1007223. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007223>.

Guo, Le, Linlin Zhou, Qian Gao, Aijun Zhang, Jun Wei, Dantong Hong, Yuankui Chu, Xiangguo Duan, Ying Zhang, et Guangxian Xu. 2017. « MicroRNA-144-3p Inhibits Autophagy Activation and Enhances Bacillus Calmette-Guérin Infection by Targeting ATG4a in RAW264.7 Macrophage Cells ». *PloS One* 12 (6): e0179772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179772>.

Gupta, Shashi K., Claudia Bang, et Thomas Thum. 2010. « Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease ». *Circulation Cardiovascular Genetics* 3 (5): 484-88. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958363>.

H, Kim. s. d. « The Transcription Factor MafB Promotes Anti-Inflammatory M2 Polarization and Cholesterol Efflux in Macrophages. - PubMed - NCBI ». Consulté le 6 novembre 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28790455>.

Ha, Minju, et V. Narry Kim. 2014. « Regulation of MicroRNA Biogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (8): 509-24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.

Hammond, Scott M. 2015. « An overview of microRNAs ». *Advanced drug delivery reviews* 87 (juin): 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>.

Hanna, Johora, Gazi S. Hossain, et Jannet Kocerha. 2019. « The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research ». *Frontiers in Genetics* 10: 478. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00478>.

Harishankar, Murugesan, Paramasivam Selvaraj, et Ramalingam Bethunaickan. 2018. « Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility ». *Frontiers in Medicine* 5: 213. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00213>.

Hartman, Michelle L., et Hardy Kornfeld. 2011. « Interactions between Naïve and Infected Macrophages Reduce Mycobacterium Tuberculosis Viability ». *PloS One* 6 (11): e27972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027972>.

Hartman, Travis E., Zhe Wang, Robert S. Jansen, Susana Gardete, et Kyu Y. Rhee. 2017. « Metabolic Perspectives on Persistence ». *Microbiology spectrum* 5 (1):

10.1128/microbiolspec.TBTB2-0026-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0026-2016>.

Hashimoto, Daigo, Andrew Chow, Clara Noizat, Pearline Teo, Mary Beth Beasley, Marylene Leboeuf, Christian D. Becker, et al. 2013. « Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes ». *Immunity* 38 (4): 792-804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.

Haviv, Rotem, Eden Oz, et Hermona Soreq. 2018. « The Stress-Responding MiR-132-3p Shows Evolutionarily Conserved Pathway Interactions ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 38 (1): 141-53. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0515-z>.

Henan, Xin, Yu YANG, Jianmin Liu, Xiangwei li, Mufei Li, Boxuan Feng, Zhen Li, et al. 2016. « Association between tuberculosis and circulating microRNA hsa-let-7b and hsa-MIR-30b: A pilot study in a Chinese population ». *Tuberculosis* 99 (avril). <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.04.005>.

Henkel, James S., Michael R. Baldwin, et Joseph T. Barbieri. 2010. « Toxins from Bacteria ». *EXS* 100: 1-29. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_1.

Herb, Marc, et Michael Schramm. 2021. « Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (2): 313. <https://doi.org/10.3390/antiox10020313>.

Hernández-Pando, R, H Orozcoe, A Sampieri, L Pavón, C Velasquillo, J Larriva-Sahd, J M Alcocer, et M V Madrid. 1996. « Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. » *Immunology* 89 (1): 26-33.

Hervé, C., E. Bergot, N. Veziris, et F. -X. Blanc. 2015. « La tuberculose en 2015 : du diagnostic à la détection des formes résistantes ». *Revue des Maladies Respiratoires* 32 (8): 784-90. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2015.06.008>.

Hirayama, Daisuke, Tomoya Iida, et Hiroshi Nakase. 2017. « The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1): 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>.

Hölscher, Christoph, Norbert Reiling, Ulrich E. Schaible, Alexandra Hölscher, Clara Bathmann, Daniel Korbel, Insa Lenz, 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 (3): 680-94. <https://doi.org/10.1002/eji.200736458>.

Höner zu Bentrup, K., et D. G. Russell. 2001. « Mycobacterial Persistence: Adaptation to a Changing Environment ». *Trends in Microbiology* 9 (12): 597-605.

Hou, Jin, Pin Wang, Li Lin, Xingguang Liu, Feng Ma, Huazhang An, Zhugang Wang, et Xuetao Cao. 2009. « MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (3): 2150-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900707>.

Huang, Cheng, Xue-jiao Liu, QunZhou, Juan Xie, Tao-tao Ma, Xiao-ming Meng, et Jun Li. 2016. « MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages ». *International Immunopharmacology* 32 (mars): 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.009>.

Huang, Jian, Junhua Jiao, Weihua Xu, Huayang Zhao, Chunxiao Zhang, Yan Shi, et Zhijian Xiao. 2015. « miR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3 ». *Molecular Medicine Reports* 12 (5): 7102-8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4250>.

Huang, Lu, Evgeniya V. Nazarova, Shumin Tan, Yancheng Liu, et David G. Russell. 2018. « Growth of Mycobacterium Tuberculosis in Vivo Segregates with Host Macrophage Metabolism and Ontogeny ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (4): 1135-52. <https://doi.org/10.1084/jem.20172020>.

Huang, Lu, et David G. Russell. 2017. « Protective Immunity against Tuberculosis: What Does It Look like and How Do We Find It? ». *Current Opinion in Immunology* 48 (octobre): 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.08.001>.

Huang, Stanley Ching-Cheng, Bart Everts, Yulia Ivanova, David O'Sullivan, Marcia Nascimento, Amber M. Smith, Wandy Beatty, et al. 2014. « Cell-Intrinsic Lysosomal Lipolysis Is Essential for Alternative Activation of Macrophages ». *Nature Immunology* 15 (9): 846-55. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>.

Huang, Zikun, Qing Luo, Yang Guo, Jie Chen, Guoliang Xiong, Yiping Peng, Jianqing Ye, et Junming Li. 2015. « Mycobacterium Tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro ». *PLoS One* 10 (6): e0129744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129744>.

Huynh, Cassidy K., Shilpa A. Joshi, et Eric J. Brown. 2011. « A Delicate Dance: Host Response to Mycobacteria ». *Current Opinion in Immunology* 23 (4): 464-72. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.06.002>.

Iakobachvili, Nino, Stephen Adonai Leon-Icaza, Kèvin Knoops, Norman Sachs, Serge Mazères, Roxane Simeone, Antonio Peixoto, et al. 2021. « Mycobacteria-Host Interactions in Human Bronchiolar Airway Organoids ». *Molecular Microbiology*, octobre. <https://doi.org/10.1111/mmi.14824>.

Indrigo, Jessica, Robert L. Hunter, et Jeffrey K. Actor. 2003. « Cord Factor Trehalose 6,6'-Dimycolate (TDM) Mediates Trafficking Events during Mycobacterial Infection of Murine Macrophages ». *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 8): 2049-59. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26226-0>.

Infantino, Vittoria, Vito Iacobazzi, Alessio Menga, Maria Laura Avantaggiati, et Ferdinando Palmieri. 2014. « A Key Role of the Mitochondrial Citrate Carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -Triggered Inflammation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839 (11): 1217-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.013>.

Infantino, Vittoria, Vito Iacobazzi, Ferdinando Palmieri, et Alessio Menga. 2013. « ATP-Citrate Lyase Is Essential for Macrophage Inflammatory Response ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440 (1): 105-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.037>.

Irwin, Scott M., Emily Driver, Edward Lyon, Christopher Schrupp, Gavin Ryan, Mercedes Gonzalez-Juarrero, Randall J. Basaraba, Eric L. Nueremberger, et Anne J. Lenaerts. 2015. « Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (6): 591-602. <https://doi.org/10.1242/dmm.019570>.

Iwai, Hiroki, Keiji Funatogawa, Kazunori Matsumura, Masako Kato-Miyazawa, Fumiko Kirikae, Kotaro Kiga, Chihiro Sasakawa, Tohru Miyoshi-Akiyama, et Teruo Kirikae. 2015.

« MicroRNA-155 Knockout Mice Are Susceptible to Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 95 (3): 246-50. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.03.006>.

Janssen, William J., Lea Barthel, Alaina Muldrow, Rebecca E. Oberley-Deegan, Mark T. Kearns, Claudia Jakubzick, et Peter M. Henson. 2011. « Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (5): 547-60. <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1891OC>.

Janssen, William J., Donna L. Bratton, Claudia V. Jakubzick, et Peter M. Henson. 2016. « Myeloid Cell Turnover and Clearance ». *Microbiology Spectrum* 4 (6): 4.6.05. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0005-2015>.

Jenner, Richard G., et Richard A. Young. 2005. « Insights into Host Responses against Pathogens from Transcriptional Profiling ». *Nature Reviews Microbiology* 3 (4): 281-94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1126>.

Ji, Zhenhua, Miaomiao Jian, Taigui Chen, Lisha Luo, Lianbao Li, Xiting Dai, Ruolan Bai, et al. 2019. « Immunogenicity and Safety of the M72/AS01E Candidate Vaccine Against Tuberculosis: A Meta-Analysis ». *Frontiers in Immunology* 10: 2089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02089>.

Jin, Yi, Zujian Chen, Xiqiang Liu, et Xiaofeng Zhou. 2013. « Evaluating the MicroRNA Targeting Sites by Luciferase Reporter Gene Assay ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 936: 117-27. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-083-0_10.

Kaps L, Leber N, Klefenz A, Choteschovsky N, Zentel R, Nuhn L, Schuppan D. In Vivo siRNA Delivery to Immunosuppressive Liver Macrophages by α -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles. *Cells*. 2020 Aug 15;9(8):1905. doi: 10.3390/cells9081905. PMID: 32824208; PMCID: PMC7465192.

Karakousis, Petros C., Tetsuyuki Yoshimatsu, Gyanu Lamichhane, Samuel C. Woolwine, Eric L. Nuermberger, Jacques Grosset, et William R. Bishai. 2004. « Dormancy Phenotype Displayed by Extracellular Mycobacterium Tuberculosis within Artificial Granulomas in Mice ». *Journal of Experimental Medicine* 200 (5): 647-57. <https://doi.org/10.1084/jem.20040646>.

Kaufmann, S. H. 2001. « How Can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis? » *Nature Reviews. Immunology* 1 (1): 20-30. <https://doi.org/10.1038/35095558>.

Khader, Shabaana A., Maziar Divangahi, Willem Hanekom, Philip C. Hill, Markus Maeurer, Karen W. Makar, Katrin D. Mayer-Barber, et al. 2019. « Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination ». *The Journal of Clinical Investigation* 129 (9): 3482-91. <https://doi.org/10.1172/JCI128877>.

Kim, Jin Kyung, Tae Sung Kim, Joyoti Basu, et Eun-Kyeong Jo. 2017. « MicroRNA in Innate Immunity and Autophagy during Mycobacterial Infection ». *Cellular Microbiology* 19 (1): e12687. <https://doi.org/10.1111/cmi.12687>.

Kim, Jin Kyung, Hye-Mi Lee, Ki-Sun Park, Dong-Min Shin, Tae Sung Kim, Yi Sak Kim, Hyun-Woo Suh, et al. 2016. « MIR144* inhibits antimicrobial responses against Mycobacterium tuberculosis in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2 ». *Autophagy* 13 (2): 423-41. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1241922>.

Kim, Jin Kyung, Jae-Min Yuk, Soo Yeon Kim, Tae Sung Kim, Hyo Sun Jin, Chul-Su Yang, et Eun-Kyeong Jo. 2015. « MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (11): 5355-65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402557>.

Kim, Mi-Jeong, Helen C Wainwright, Michael Locketz, Linda-Gail Bekker, Gabriele B Walther, Corneli Dittrich, Annalie Visser, et al. 2010. « Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism ». *EMBO Molecular Medicine* 2 (7): 258-74. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000079>.

Kim, V. Narry, Jinju Han, et Mikiko C. Siomi. 2009. « Biogenesis of Small RNAs in Animals ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2): 126-39. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>.

Kim, Young-Kook, Boseon Kim, et V. Narry Kim. 2016. « Re-Evaluation of the Roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in MicroRNA Biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (13): E1881-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>.

Kleinsteuber, Katja, Kerrin Heesch, Stefanie Schattling, Malte Kohns, Claudia Sander-Jülch, Gerhard Walzl, Anneke Hesselting, et al. 2013. « Decreased Expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4+ T Cells and Peripheral Blood from Tuberculosis Patients ». *PLoS ONE* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061609>.

Kloprogge, Frank, Robert Hammond, Karin Kipper, Stephen H. Gillespie, et Oscar Della Pasqua. 2019. « Mimicking In-Vivo Exposures to Drug Combinations in-Vitro: Anti-Tuberculosis Drugs in Lung Lesions and the Hollow Fiber Model of Infection ». *Scientific Reports* 9 (1): 13228. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49556-5>.

Kobayashi, K., R. Yuliwulandari, H. Yanai, I. Naka, L. T. Lien, N. T. L. Hang, M. Hijikata, N. Keicho, et K. Tokunaga. 2012. « Association of TLR Polymorphisms with Development of Tuberculosis in Indonesian Females ». *Tissue Antigens* 79 (3): 190-97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01821.x>.

Koo, Sue-jie, et Nisha J. Garg. 2019. « Metabolic Programming of Macrophage Functions and Pathogens Control ». *Redox Biology* 24 (juin): 101198. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101198>.

Köster, Stefan, Sandeep Upadhyay, Pallavi Chandra, Kadamba Papavinasasundaram, Guozhe Yang, Amir Hassan, Steven J. Grigsby, et al. 2017. « Mycobacterium Tuberculosis Is Protected from NADPH Oxidase and LC3-Associated Phagocytosis by the LCP Protein CpsA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (41): E8711-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707792114>.

Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, et Sam Griffiths-Jones. 2019. « miRBase: from microRNA sequences to function ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155-62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.

Krüger, Jan, et Marc Rehmsmeier. 2006. « RNAhybrid: MicroRNA Target Prediction Easy, Fast and Flexible ». *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server issue): W451-454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl243>.

Kulikauskaite, Justina, et Andreas Wack. 2020a. « Teaching Old Dogs New Tricks? The Plasticity of Lung Alveolar Macrophage Subsets ». *Trends in Immunology* 41 (10): 864-77. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.08.008>.

———. 2020b. « Teaching Old Dogs New Tricks? The Plasticity of Lung Alveolar Macrophage Subsets ». *Trends in Immunology* 41 (10): 864-77. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.08.008>.

Kumar, Manish, Sanjaya Kumar Sahu, Ranjeet Kumar, Arijita Subuddhi, Ranjan Kumar Maji, Kuladip Jana, Pushpa Gupta, et al. 2015. « MicroRNA let-7 Modulates the Immune Response

to Mycobacterium tuberculosis Infection via Control of A20, an Inhibitor of the NF- κ B Pathway ». *Cell Host & Microbe* 17 (3): 345-56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.007>.

Kumar, Ranjeet, Priyanka Halder, Sanjaya K. Sahu, Manish Kumar, Mandavi Kumari, Kuladip Jana, Zhumur Ghosh, Pawan Sharma, Manikuntala Kundu, et Joyoti Basu. s. d. « Identification of a Novel Role of ESAT-6-Dependent MiR-155 Induction during Infection of Macrophages With Mycobacterium Tuberculosis ». *Cellular Microbiology* 14 (10): 1620-31. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01827.x>.

Kumar, Ranjeet, Sanjaya Kumar Sahu, Manish Kumar, Kuladip Jana, Pushpa Gupta, Umesh D. Gupta, Manikuntala Kundu, et Joyoti Basu. 2016. « MicroRNA 17-5p Regulates Autophagy in Mycobacterium Tuberculosis-Infected Macrophages by Targeting Mcl-1 and STAT3 ». *Cellular Microbiology* 18 (5): 679-91. <https://doi.org/10.1111/cmi.12540>.

Lai, Yung-Fa, Tsun-Mei Lin, Chiou-Huey Wang, Pei-Yi Su, Jiun-Ting Wu, Meng-Chih Lin, et Hock-Liew Eng. 2016. « Functional Polymorphisms of the TLR7 and TLR8 Genes Contribute to Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 98 (mai): 125-31. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.008>.

Lam, Adam, Rohan Prabhu, Christine M. Gross, Lee Ann Riesenber, Vinodkumar Singh, et Saurabh Aggarwal. 2017. « Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 313 (2): L218-29. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00162.2017>.

Lang, Roland, Divyen Patel, John J. Morris, Robert L. Rutschman, et Peter J. Murray. 2002. « Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10 ». *The Journal of Immunology* 169 (5): 2253-63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2253>.

Lavalett, Lelia, Hector Rodriguez, Hector Ortega, Wolfgang Sadee, Larry S. Schlesinger, et Luis F. Barrera. 2017. « Alveolar Macrophages from Tuberculosis Patients Display an Altered Inflammatory Gene Expression Profile ». *Tuberculosis* 107 (décembre): 156-67. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.08.012>.

Lawless, Simon J., Nidhi Kedia-Mehta, Jessica F. Walls, Ryan McGarrigle, Orla Convery, Linda V. Sinclair, Maria N. Navarro, James Murray, et David K. Finlay. 2017. « Glucose Represses Dendritic Cell-Induced T Cell Responses ». *Nature Communications* 8 (1): 15620. <https://doi.org/10.1038/ncomms15620>.

Lee, Jinhee, Michelle Hartman, et Hardy Kornfeld. 2009. « Macrophage Apoptosis in Tuberculosis ». *Yonsei Medical Journal* 50 (1): 1-11. <https://doi.org/10.3349/ymj.2009.50.1.1>.

Lee, Jinhee, Heinz G. Remold, Michael H. Jeong, et Hardy Kornfeld. 2006. « Macrophage Apoptosis in Response to High Intracellular Burden of Mycobacterium Tuberculosis Is Mediated by a Novel Caspase-Independent Pathway ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (7): 4267-74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4267>.

Lee, Rosalind C., Rhonda L. Feinbaum, et Victor Ambros. 1993. « The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14 ». *Cell* 75 (5): 843-54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).

Lee, Yoontae, Chiyong Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, et al. 2003. « The Nuclear RNase III Droscha Initiates MicroRNA Processing ». *Nature* 425 (6956): 415-19. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.

Lerner, Thomas R., Sophie Borel, et Maximiliano G. Gutierrez. 2015. « The Innate Immune Response in Human Tuberculosis: Innate Immune Response in Tuberculosis ». *Cellular Microbiology* 17 (9): 1277-85. <https://doi.org/10.1111/cmi.12480>.

Lewis, Kim. 2010. « Persister Cells ». *Annual Review of Microbiology* 64: 357-72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.

Li, Guanwei, Huajian Ren, Xiuwen Wu, Qiongyuan Hu, Zhiwu Hong, Gefei Wang, Guosheng Gu, Jianan Ren, et Jieshou Li. 2020. « Follistatin like Protein-1 Modulates Macrophage Polarization and Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis ». *International Immunopharmacology* 83 (juin): 106456. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106456>.

Li, Juan, Yue Liang, Hao Lv, Hui Meng, Gang Xiong, Xingying Guan, Xuedan Chen, Yun Bai, et Kai Wang. 2017. « MiR-26a and MiR-26b Inhibit Esophageal Squamous Cancer Cell Proliferation through Suppression of c-MYC Pathway ». *Gene* 625 (août): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.05.001>.

Lin, Philana Ling, Christopher B. Ford, M. Teresa Coleman, Amy J. Myers, Richa Gawande, Thomas Ioerger, James Sacchettini, Sarah M. Fortune, et JoAnne L. Flynn. 2014. « Sterilization of Granulomas Is Common in Active and Latent Tuberculosis despite Within-Host Variability in Bacterial Killing ». *Nature Medicine* 20 (1): 75-79. <https://doi.org/10.1038/nm.3412>.

Liu, Fen, Yong Li, Rong Jiang, Cheng Nie, Zhenguo Zeng, Ning Zhao, Caixue Huang, et al. 2015b. « MiR-132 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Alveolar Macrophages by the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway ». *Experimental Lung Research* 41 (5): 261-69. <https://doi.org/10.3109/01902148.2015.1004206>.

Liu, Fen, Yong Li, Rongcai Jiang, Cheng Nie, Zhenguo Zeng, Ning Zhao, Caixue Huang, et al. 2015c. « MiR-132 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar macrophages by the cholinergic anti-inflammatory pathway ». *Experimental Lung Research* 41 (juin). <https://doi.org/10.3109/01902148.2015.1004206>.

Liu, Feng, Jianxia Chen, Peng Wang, Haohao Li, Yilong Zhou, Haipeng Liu, Zhonghua Liu, et al. 2018. « MicroRNA-27a Controls the Intracellular Survival of Mycobacterium Tuberculosis by Regulating Calcium-Associated Autophagy ». *Nature Communications* 9 (1): 4295. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06836-4>.

Liu, H.-Y. 2016. « Down-Regulation of MiR-144 after Mycobacterium Tuberculosis Infection Promotes Inflammatory Factor Secretion from Macrophages through the Tpl2/ERK Pathway ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 62 (2): 87-93. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06836-4>.

Liu, Li, Jincheng Liu, Guoqiang Niu, Qianhong Xu, et Qiliang Chen. 2015. « Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein induces Toll-like receptor 2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and promotes inflammatory responses in human macrophages ». *Molecular Medicine Reports* 11 (4): 2921-26. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3070>.

Liu, Yanhua, Ruo Wang, Jing Jiang, Bingfen Yang, Zhihong Cao, et Xiaoxing Cheng. 2015. « MiR-223 Is Upregulated in Monocytes from Patients with Tuberculosis and Regulates Function of Monocyte-Derived Macrophages ». *Molecular Immunology* 67 (2 Pt B): 475-81. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.08.006>.

Liu, Zhen, Guoyong Zhou, Xiangdong Deng, Qi Yu, Yongliang Hu, Huijie Sun, Zhongyuan Wang, Hongbing Chen, Chiyu Jia, et Di Wang. 2014. « Analysis of MiRNA Expression Profiling in Human Macrophages Responding to Mycobacterium Infection: Induction of the Immune Regulator MiR-146a ». *The Journal of Infection* 68 (6): 553-61. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.12.017>.

Loeb, Gabriel B., Aly A. Khan, David Canner, Joseph B. Hiatt, Jay Shendure, Robert B. Darnell, Christina S. Leslie, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Transcriptome-Wide MiR-155 Binding Map Reveals Widespread Noncanonical MicroRNA Targeting ». *Molecular Cell* 48 (5): 760-70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.002>.

Lou, Jun, Yongli Wang, Zhimin Zhang, et Weiqiang Qiu. 2017. « MiR-20b Inhibits Mycobacterium Tuberculosis Induced Inflammation in the Lung of Mice through Targeting NLRP3 ». *Experimental Cell Research* 358 (2): 120-28. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.007>.

Lugo-Villarino, Geanncarlo, Denis Hudrisier, Alan Benard, et Olivier Neyrolles. 2013. « Emerging Trends in the Formation and Function of Tuberculosis Granulomas ». *Frontiers in Immunology* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00405>.

Lv, Yan, Shuai Guo, Xue-Gang Li, Jing-Yu Chi, Yi-Qing Qu, et Hai-Lai Zhong. 2016. « Sputum and Serum MicroRNA-144 Levels in Patients with Tuberculosis before and after Treatment ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 43 (février): 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.014>.

Ly, Angel, et Jun Liu. 2020. « Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11): 3985. <https://doi.org/10.3390/ijms21113985>.

Ma, Yuting, Lorenzo Galluzzi, Laurence Zitvogel, et Guido Kroemer. 2013. « Autophagy and Cellular Immune Responses ». *Immunity* 39 (2): 211-27. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.017>.

Machiels, Bénédicte, Mickael Dourcy, Xue Xiao, Justine Javaux, Claire Mesnil, Catherine Sabatel, Daniel Desmecht, et al. 2017. « A Gammaherpesvirus Provides Protection against Allergic Asthma by Inducing the Replacement of Resident Alveolar Macrophages with Regulatory Monocytes ». *Nature Immunology* 18 (12): 1310-20. <https://doi.org/10.1038/ni.3857>.

Madhvi, Abhilasha, Hriday Mishra, GR Leisching, PZ Mahlobo, et B Baker. 2019. « Comparison of Human Monocyte Derived Macrophages and THP1-like Macrophages as in Vitro Models for M. Tuberculosis Infection ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 67 (décembre): 101355. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101355>.

Mahajan, Sahil, H. Kitdorlang Dkhar, Vemika Chandra, Sandeep Dave, Ravikanth Nanduri, Ashok Kumar Janmeja, Javed N. Agrewala, et Pawan Gupta. 2012. « Mycobacterium Tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (11): 5593-5603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103038>.

Mahesh, Guruswamy, et Roopa Biswas. 2019. « MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 39 (6): 321-30. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0155>.

Majlessi, Laleh, Rafael Prados-Rosales, Arturo Casadevall, et Roland Brosch. 2015. « Release of Mycobacterial Antigens ». *Immunological Reviews* 264 (1): 25-45. <https://doi.org/10.1111/imr.12251>.

Malyshev, Igor, et Yuri Malyshev. 2015. « Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype ». *BioMed Research International* 2015: 341308. <https://doi.org/10.1155/2015/341308>.

Mangtani, Punam, Ibrahim Abubakar, Cono Ariti, Rebecca Beynon, Laura Pimpin, Paul E. M. Fine, Laura C. Rodrigues, et al. 2014. « Protection by BCG Vaccine against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 58 (4): 470-80. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>.

Mantovani, Alberto, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunciata Vecchi, et Massimo Locati. 2004. « The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization ». *Trends in Immunology* 25 (12): 677-86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.

Marakalala, Mohlopheni J., Ravikiran M. Raju, Kirti Sharma, Yanjia J. Zhang, Eliseo A. Eugenin, Brendan Prideaux, Isaac B. Daudelin, et al. 2016. « Inflammatory Signaling in Human Tuberculosis Granulomas Is Spatially Organized ». *Nature Medicine* 22 (5): 531-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4073>.

Marino, Simeone, Nicholas A. Cilfone, Joshua T. Mattila, Jennifer J. Linderman, JoAnne L. Flynn, et Denise E. Kirschner. 2015. « Macrophage Polarization Drives Granuloma Outcome during *Mycobacterium tuberculosis* Infection ». *Infection and Immunity* 83 (1): 324-38. <https://doi.org/10.1128/IAI.02494-14>.

Marrakchi, Hedia, Marie-Antoinette Lanéelle, et Mamadou Daffé. 2014. « Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond ». *Chemistry & Biology* 21 (1): 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>.

Martin, Constance J., Matthew G. Booty, Tracy R. Rosebrock, Cláudio Nunes-Alves, Danielle M. Desjardins, Iris Keren, Sarah M. Fortune, Heinz G. Remold, et Samuel M. Behar. 2012. « Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism ». *Cell Host & Microbe* 12 (3): 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.010>.

Martin, Constance J., Anthony M. Cadena, Vivian W. Leung, Philana Ling Lin, Pauline Maiello, Nathan Hicks, Michael R. Chase, JoAnne L. Flynn, et Sarah M. Fortune. 2017. « Digitally Barcoding *Mycobacterium Tuberculosis* Reveals In Vivo Infection Dynamics in the Macaque Model of Tuberculosis ». *MBio* 8 (3): e00312-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00312-17>.

Martinez, Fernando O., Laura Helming, Ronny Milde, Audrey Varin, Barbro N. Melgert, Christina Draijer, Benjamin Thomas, et al. 2013. « Genetic Programs Expressed in Resting and IL-4 Alternatively Activated Mouse and Human Macrophages: Similarities and Differences ». *Blood* 121 (9): e57-69. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436212>.

Mattila, Joshua T., Olabisi O. Ojo, Diane Kepka-Lenhardt, Simeone Marino, Jin Hee Kim, Seok Yong Eum, Laura E. Via, et al. 2013. « Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (2): 773-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300113>.

McClellan, Colleen M., et David M. Tobin. 2016. « Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases ». *Pathogens and Disease* 74 (7). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw068>.

McCune, R. M., F. M. Feldmann, H. P. Lambert, et W. McDermott. 1966. « Microbial Persistence. I. The Capacity of Tubercle Bacilli to Survive Sterilization in Mouse Tissues ». *The Journal of Experimental Medicine* 123 (3): 445-68.

McDERMOTT, W. 1958. « Microbial Persistence ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 30 (4): 257-91.

Medley, Jeffrey C., Ganesh Panzade, et Anna Y. Zinovyeva. 2021. « microRNA strand selection: Unwinding the rules ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 12 (3): e1627. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>.

Mehra, Alka, Aleena Zahra, Victor Thompson, Natalie Sirisaengtaksin, Ashley Wells, Maura Porto, Stefan Köster, et al. 2013. « Mycobacterium Tuberculosis Type VII Secreted Effector EsxH Targets Host ESCRT to Impair Trafficking ». *PLOS Pathogens* 9 (10): e1003734. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003734>.

Méndez-Samperio, Patricia. 2008. « Expression and Regulation of Chemokines in Mycobacterial Infection ». *The Journal of Infection* 57 (5): 374-84. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.08.010>.

Meunier, Etienne, et Olivier Neyrolles. 2019. « Die another way: Ferroptosis drives tuberculosis pathology ». *The Journal of Experimental Medicine* 216 (3): 471-73. <https://doi.org/10.1084/jem.20190038>.

Michlewski, Gracjan, et Javier F. Cáceres. 2019. « Post-transcriptional control of miRNA biogenesis ». *RNA* 25 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1261/rna.068692.118>.

Miller, Jessica L., Kamalakannan Velmurugan, Mark J. Cowan, et Volker Briken. 2010. « The Type I NADH Dehydrogenase of Mycobacterium Tuberculosis Counters Phagosomal NOX2 Activity to Inhibit TNF-Alpha-Mediated Host Cell Apoptosis ». *PLoS Pathogens* 6 (4): e1000864. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000864>.

Mills, Charles D. 2012. « M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease ». *Critical Reviews in Immunology* 32 (6): 463-88. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10>.

Misharin, Alexander V., Luisa Morales-Nebreda, Paul A. Reyfman, Carla M. Cuda, James M. Walter, Alexandra C. McQuattie-Pimentel, Ching-I Chen, et al. 2017. « Monocyte-derived

alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span ». *Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2387-2404. <https://doi.org/10.1084/jem.20162152>.

Mitchell, Patrick S., Rachael K. Parkin, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogosova-Agadjanyan, Amelia Peterson, et al. 2008. « Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (30): 10513-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>.

Mitchison, D. A. 1979. « Basic Mechanisms of Chemotherapy ». *Chest* 76 (6): 771-80. <https://doi.org/10.1378/chest.76.6.771>.

Moore, Kathryn J., Frederick J. Sheedy, et Edward A. Fisher. 2013. « Macrophages in Atherosclerosis: A Dynamic Balance ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (10): 709-21. <https://doi.org/10.1038/nri3520>.

Moyle, Richard L., Lilia C. Carvalhais, Lara-Simone Pretorius, Ekaterina Nowak, Gayathery Subramaniam, Jessica Dalton-Morgan, et Peer M. Schenk. 2017. « An Optimized Transient Dual Luciferase Assay for Quantifying MicroRNA Directed Repression of Targeted Sequences ». *Frontiers in Plant Science* 8: 1631. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01631>.

Murray, Peter J., et Thomas A. Wynn. 2011. « Obstacles and Opportunities for Understanding Macrophage Polarization ». *Journal of Leukocyte Biology* 89 (4): 557-63. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710409>.

Murthy, M S, et S V Pande. 1987. « Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (2): 378-82.

Nagata, Shigekazu. 2018. « Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells ». *Annual Review of Immunology* 36 (avril): 489-517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>.

Nam, Jin-Wu, Olivia S. Rissland, David Koppstein, Cei Abreu-Goodger, Calvin H. Jan, Vikram Agarwal, Muhammed A. Yildirim, Antony Rodriguez, et David P. Bartel. 2014. « Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting ». *Molecular cell* 53 (6): 1031-43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.013>.

Nathan, Carl. 2006. « Role of INOS in Human Host Defense ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5782): 1874-75; author reply 1874-1875. <https://doi.org/10.1126/science.312.5782.1874b>.

Nathan, Carl, et Michael U. Shiloh. 2000. « Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates in the Relationship between Mammalian Hosts and Microbial Pathogens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (16): 8841-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>.

Netea, Mihai G., Leo A. B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H. G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A. J. O'Neill, et Ramnik J. Xavier. 2016. « Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6284): aaf1098. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>.

Ng, Vincent H., Jeffery S. Cox, Alexandra O. Sousa, John D. MacMicking, et John D. McKinney. 2004. « Role of KatG Catalase-Peroxidase in Mycobacterial Pathogenesis: Countering the Phagocyte Oxidative Burst ». *Molecular Microbiology* 52 (5): 1291-1302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04078.x>.

Ngabonziza, Jean Claude Semuto, Chloé Loiseau, Michael Marceau, Agathe Jouet, Fabrizio Menardo, Oren Tzfadia, Rudy Antoine, et al. 2020. « A Sister Lineage of the Mycobacterium Tuberculosis Complex Discovered in the African Great Lakes Region ». *Nature Communications* 11 (1): 2917. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16626-6>.

Nguyen, Huy, Nicky Gazy, et Vishwanath Venketaraman. 2020. « A Role of Intracellular Toll-Like Receptors (3, 7, and 9) in Response to Mycobacterium Tuberculosis and Co-Infection with HIV ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17): E6148. <https://doi.org/10.3390/ijms21176148>.

Ni, Bin, Murugesan V. S. Rajaram, William P. Lafuse, Michelle B. Landes, et Larry S. Schlesinger. 2014. « Mycobacterium Tuberculosis Decreases Human Macrophage IFN- γ Responsiveness through MiR-132 and MiR-26a ». *The Journal of Immunology* 193 (9): 4537-47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400124>.

Nigou, Jérôme, Claudia Zelle-Rieser, Martine Gilleron, Martin Thurnher, et Germain Puzo. 2001. « Mannosylated Lipoarabinomannans Inhibit IL-12 Production by Human Dendritic Cells: Evidence for a Negative Signal Delivered Through the Mannose Receptor ». *The Journal of Immunology* 166 (12): 7477-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7477>.

O'Brien, Jacob, Heyam Hayder, Yara Zayed, et Chun Peng. 2018. « Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.

Ochoa, Juan B., Andrew C. Bernard, William E. O'Brien, Margaret M. Griffen, Mary E. Maley, Anna K. Rockich, Betty J. Tsuei, Bernard R. Boulanger, Paul A. Kearney, et Sidney M. Morris. 2001. « Arginase I Expression and Activity in Human Mononuclear Cells After Injury ». *Annals of Surgery* 233 (3): 393-99.

Oga-Omenka, Charity, Jody Boffa, Joseph Kuye, Patrick Dakum, Dick Menzies, et Christina Zarowsky. 2020. « Understanding the gaps in DR-TB care cascade in Nigeria: A sequential mixed-method study ». *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 21 (octobre): 100193. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2020.100193>.

O'Garra, Anne, Paul S. Redford, Finlay W. McNab, Chloe I. Bloom, Robert J. Wilkinson, et Matthew P. R. Berry. 2013. « The Immune Response in Tuberculosis ». *Annual Review of Immunology* 31: 475-527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.

O'Leary, Seónadh, Mary P. O'Sullivan, et Joseph Keane. 2011. « IL-10 Blocks Phagosome Maturation in Mycobacterium tuberculosis–Infected Human Macrophages ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45 (1): 172-80. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0319OC>.

Orecchioni, Marco, Yanal Ghosheh, Akula Bala Pramod, et Klaus Ley. 2019. « Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10: 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.

Orme, Ian M., et Randall J. Basaraba. 2014. « The Formation of the Granuloma in Tuberculosis Infection ». *Seminars in Immunology*, Immunity to Mycobacterium tuberculosis, 26 (6): 601-9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.009>.

Orme, Ian M., et Diane J. Ordway. 2016. « Mouse and Guinea Pig Models of Tuberculosis ». *Microbiology Spectrum* 4 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0002-2015>.

Ouimet, Mireille, Stefan Koster, Erik Sakowski, Bhama Ramkhelawon, Coen van Solingen, Scott Oldebeken, Denuja Karunakaran, et al. 2016. « Mycobacterium Tuberculosis Induces the

MiR-33 Locus to Reprogram Autophagy and Host Lipid Metabolism ». *Nature Immunology* 17 (6): 677-86. <https://doi.org/10.1038/ni.3434>.

Paik, Seungwha, Jin Kyung Kim, Chaeuk Chung, et Eun-Kyeong Jo. 2018. « Autophagy: A new strategy for host-directed therapy of tuberculosis ». *Virulence* 10 (1): 448-59. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1536598>.

Palsson-McDermott, Eva M, Anne M Curtis, Gautam Goel, Mario AR Lauterbach, Frederick J Sheedy, Laura E Gleeson, Mirjam WM van den Bosch, et al. 2015. « Pyruvate Kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction, and is a critical determinant of the Warburg Effect in LPS-activated macrophages ». *Cell metabolism* 21 (1): 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>.

Papp, Audrey C., Abul K. Azad, Maciej Pietrzak, Amanda Williams, Samuel K. Handelman, Robert P. Igo, Catherine M. Stein, Katherine Hartmann, Larry S. Schlesinger, et Wolfgang Sadee. 2018. « AmpliSeq Transcriptome Analysis of Human Alveolar and Monocyte-Derived Macrophages over Time in Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *PLoS One* 13 (5): e0198221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198221>.

Patel, Naimish R., Katharine Swan, Xin Li, Souvenir D. Tachado, et Henry Koziel. 2009. « Impaired M. Tuberculosis-Mediated Apoptosis in Alveolar Macrophages from HIV+ Persons: Potential Role of IL-10 and BCL-3 ». *Journal of Leukocyte Biology* 86 (1): 53-60. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908574>.

Patin, Emmanuel C., Anna C. Geffken, Sam Willcocks, Christoph Leschczyk, Albert Haas, Falk Nimmerjahn, Roland Lang, Theresa H. Ward, et Ulrich E. Schaible. 2017. « Trehalose Dimycolate Interferes with Fc γ R-Mediated Phagosome Maturation through Mincle, SHP-1 and Fc γ RIIB Signalling ». *PLOS ONE* 12 (4): e0174973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174973>.

Perrin, Pascale. 2015. « Human and Tuberculosis Co-Evolution: An Integrative View ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 95 Suppl 1 (juin): S112-116. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.016>.

Peyron, Pascale, Julien Vaubourgeix, Yannick Poquet, Florence Levillain, Catherine Botanch, Fabienne Bardou, Mamadou Daffé, et al. 2008. « Foamy Macrophages from Tuberculous

Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for M. Tuberculosis Persistence ». *PLoS Pathogens* 4 (11): e1000204. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000204>.

Pisu, Davide, Lu Huang, Vipin Narang, Monique Theriault, Gabrielle L -Bury, Bennett Lee, Agnes E. Lakudzala, et al. 2021. « Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung ». *Journal of Experimental Medicine* 218 (9). <https://doi.org/10.1084/jem.20210615>.

Place, David E, SangJoon Lee, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2021. « PANoptosis in microbial infection ». *Current Opinion in Microbiology* 59 (février): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.012>.

PrabhuDas, Mercy R., Cynthia L. Baldwin, Paul L. Bollyky, Dawn M. E. Bowdish, Kurt Drickamer, Maria Febbraio, Joachim Herz, et al. 2017. « A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (10): 3775-89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>.

Puvacic, Sandra, Jadranka Dizdarevic, Z Santic, et M Mulaomerovic. 2004. « PROTECTIVE EFFECT OF NEONATAL BCG VACCINES AGAINST TUBERCULOUS MENINGITIS ». *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 4 (1): 46-49.

Qi, Yuhua, Lunbiao Cui, Yiyue Ge, Zhiyang Shi, Kangchen Zhao, Xiling Guo, Dandan Yang, et al. 2012. « Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection ». *BMC Infectious Diseases* 12 (décembre): 384. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-384>.

Qin, Yongwei, Qinglan Wang, Youlang Zhou, Yinong Duan, et Qian Gao. 2016. « Inhibition of IFN- -Induced Nitric Oxide Dependent Antimycobacterial Activity by MiR-155 and C/EBP  ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4): 535. <https://doi.org/10.3390/ijms17040535>.

Qu, Yuliang, Shuqin Ding, Zhanbing Ma, Dan Jiang, Xiangrong Xu, Ying Zhang, Aijun Zhang, et Guangxian Xu. 2019. « MiR-129-3p Favors Intracellular BCG Survival in RAW264.7 Cells by Inhibiting Autophagy via Atg4b ». *Cellular Immunology* 337 (mars): 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.004>.

Queval, Christophe J., Roland Brosch, et Roxane Simeone. 2017. « The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis ». *Frontiers in Microbiology* 8 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02284>.

Rabold, Katrin, Mihai G. Netea, Gosse J. Adema, et Romana T. Netea-Maier. 2017. « Cellular Metabolism of Tumor-Associated Macrophages – Functional Impact and Consequences ». *FEBS Letters* 591 (19): 3022-41. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12771>.

Rajaram, Murugesan V. S., Michelle N. Brooks, Jessica D. Morris, Jordi B. Torrelles, Abul K. Azad, et Larry S. Schlesinger. 2010. « Mycobacterium Tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses ». *The Journal of Immunology* 185 (2): 929-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>.

Rajaram, Murugesan V. S., Bin Ni, Jessica D. Morris, Michelle N. Brooks, Tracy K. Carlson, Baskar Bakthavachalu, Daniel R. Schoenberg, Jordi B. Torrelles, et Larry S. Schlesinger. 2011. « Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (42): 17408-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112660108>.

Rajaram, Murugesan V.S., Bin Ni, Claire E. Dodd, et Larry S. Schlesinger. 2014. « Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis ». *Seminars in immunology* 26 (6): 471-85. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.010>.

Ramakrishnan, Lalita. 2012. « Revisiting the Role of the Granuloma in Tuberculosis ». *Nature Reviews. Immunology* 12 (5): 352-66. <https://doi.org/10.1038/nri3211>.

Rao Muvva, Jagadeeswara, Venkata Ramanarao Parasa, Maria Lerm, Mattias Svensson, et Susanna Brighenti. 2020. « Polarization of Human Monocyte-Derived Cells With Vitamin D Promotes Control of Mycobacterium tuberculosis Infection ». *Frontiers in Immunology* 10 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03157>.

Reeh, Heike, Nadine Rudolph, Ulrike Billing, Henrike Christen, Stefan Streif, Eric Bullinger, Monica Schliemann-Bullinger, et al. 2019. « Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental

insights and dynamic modelling ». *Cell Communication and Signaling* 17 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0356-0>.

Refai, Amira, Mohamed-Ridha Barbouche, et Makram Essafi. 2018. « Mycobacterium tuberculosis Virulent Factor ESAT-6 Drives Macrophage Differentiation Toward the Pro-inflammatory M1 Phenotype and Subsequently Switches It to the Anti-inflammatory M2 Phenotype ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, août. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00327>.

Riepsaame, Joey, Adri van Oudenaren, Berlinda J. H. den Broeder, Wilfred F. J. van Ijcken, Joris Pothof, et Pieter J. M. Leenen. 2013. « MicroRNA-Mediated Down-Regulation of M-CSF Receptor Contributes to Maturation of Mouse Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Frontiers in Immunology* 4: 353. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00353>.

Rothchild, Alissa C., James R. Sissons, Shahin Shafiani, Christopher Plaisier, Deborah Min, Dat Mai, Mark Gilchrist, et al. 2016. « MiR-155-Regulated Molecular Network Orchestrates Cell Fate in the Innate and Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (41): E6172-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608255113>.

Ruby, J. Graham, Calvin H. Jan, et David P. Bartel. 2007. « Intronic MicroRNA Precursors That Bypass Drosha Processing ». *Nature* 448 (7149): 83-86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>.

Ruiz-Tagle, Cinthya, Rodrigo Naves, et María Elvira Balcells. 2020. « Unraveling the Role of MicroRNAs in Mycobacterium Tuberculosis Infection and Disease: Advances and Pitfalls ». *Infection and Immunity* 88 (3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00649-19>.

Russell, David G., Clifton E. Barry, et JoAnne L. Flynn. 2010. « Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us ». *Science* 328 (5980): 852-56. <https://doi.org/10.1126/science.1184784>.

Rustad, Tige R., Maria I. Harrell, Reiling Liao, et David R. Sherman. 2008. « The Enduring Hypoxic Response of Mycobacterium Tuberculosis ». *PloS One* 3 (1): e1502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001502>.

Ruytinx, Pieter, Paul Proost, Jo Van Damme, et Sofie Struyf. 2018. « Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions ». *Frontiers in Immunology* 9 (septembre): 1930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01930>.

Sabir, Naveed, Tariq Hussain, Syed Zahid Ali Shah, Antonio Peramo, Deming Zhao, et Xiangmei Zhou. 2018. « miRNAs in Tuberculosis: New Avenues for Diagnosis and Host-Directed Therapy ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mars). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00602>.

Saito, Kohta, Thulasi Warriar, Selin Somersan-Karakaya, Lina Kaminski, Jianjie Mi, Xiuju Jiang, Suna Park, et al. 2017. « Rifamycin Action on RNA Polymerase in Antibiotic-Tolerant Mycobacterium Tuberculosis Results in Differentially Detectable Populations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (24): E4832-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705385114>.

Sakai, Shunsuke, Keith D. Kauffman, Sangmi Oh, Christine E. Nelson, Clifton E. Barry, et Daniel L. Barber. 2021. « MAIT Cell-Directed Therapy of Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Mucosal Immunology* 14 (1): 199-208. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0332-4>.

Saliminejad, Kioomars, Hamid Reza Khorram Khorshid, Shahrzad Soleymani Fard, et Seyed Hamidollah Ghaffari. 2019. « An Overview of MicroRNAs: Biology, Functions, Therapeutics, and Analysis Methods ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (5): 5451-65. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>.

Salmanidis, Marika, Katherine Pillman, Gregory Goodall, et Cameron Bracken. 2014. « Direct Transcriptional Regulation by Nuclear MicroRNAs ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 54 (septembre): 304-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.010>.

Salmena, Leonardo, Laura Poliseno, Yvonne Tay, Lev Kats, et Pier Paolo Pandolfi. 2011. « A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? » *Cell* 146 (3): 353-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>.

Salomon, Joshua A., James O. Lloyd-Smith, Wayne M. Getz, Stephen Resch, María S. Sánchez, Travis C. Porco, et Martien W. Borgdorff. 2006. « Prospects for Advancing Tuberculosis Control Efforts through Novel Therapies ». *PLoS Medicine* 3 (8): e273. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030273>.

Sánchez, Dulfary, Mauricio Rojas, Israel Hernández, Danuta Radzioch, Luis F. García, et Luis F. Barrera. 2010. « Role of TLR2- and TLR4-Mediated Signaling in Mycobacterium Tuberculosis-Induced Macrophage Death ». *Cellular Immunology* 260 (2): 128-36. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.10.007>.

Sarathy, Jansy P., et Véronique Dartois. 2020. « Caseum: A Niche for Mycobacterium Tuberculosis Drug-Tolerant Persisters ». *Clinical Microbiology Reviews* 33 (3): e00159-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00159-19>.

Sarathy, Jansy P., Laura E. Via, Danielle Weiner, Landry Blanc, Helena Boshoff, Eliseo A. Eugenin, Clifton E. Barry, et Véronique A. Dartois. 2018. « Extreme Drug Tolerance of Mycobacterium tuberculosis in Caseum ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (2). <https://doi.org/10.1128/AAC.02266-17>.

Sassetti, Christopher M., Dana H. Boyd, et Eric J. Rubin. 2003. « Genes Required for Mycobacterial Growth Defined by High Density Mutagenesis ». *Molecular Microbiology* 48 (1): 77-84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x>.

Scheller, Jürgen, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, et Stefan Rose-John. 2011. « The Pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813 (5): 878-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.

Scheu, Stefanie, Shafaqat Ali, Christina Ruland, Volker Arolt, et Judith Alferink. 2017. « The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11): 2306. <https://doi.org/10.3390/ijms18112306>.

Schlosser, Kenny, Mohamad Taha, et Duncan J. Stewart. 2018. « Systematic Assessment of Strategies for Lung-targeted Delivery of MicroRNA Mimics ». *Theranostics* 8 (5): 1213-26. <https://doi.org/10.7150/thno.22912>.

Schreiber, Tanja, Stefan Ehlers, Lisa Heitmann, Alexandra Rausch, Jörg Mages, Peter J. Murray, Roland Lang, et Christoph Hölscher. 2009. « Autocrine IL-10 Induces Hallmarks of Alternative Activation in Macrophages and Suppresses Antituberculosis Effector Mechanisms without Compromising T Cell Immunity ». *The Journal of Immunology* 183 (2): 1301-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803567>.

Schyns, Joey, Qiang Bai, Cecilia Ruscitti, Coraline Radermecker, Sebastiaan De Schepper, Svetoslav Chakarov, Frédéric Farnir, et al. 2019. « Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung ». *Nature Communications* 10 (septembre): 3964. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>.

Segal, William, et Hubert Bloch. 1956. « BIOCHEMICAL DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS GROWN IN VIVO AND IN VITRO¹² ». *Journal of Bacteriology* 72 (2): 132-41.

Sheedy, Frederick J., et Maziar Divangahi. 2021. « Targeting Immunometabolism in Host Defence against Mycobacterium Tuberculosis ». *Immunology* 162 (2): 145-59. <https://doi.org/10.1111/imm.13276>.

Shi, Can, Masashi Sakuma, Toshifumi Mooroka, Alison Liscoe, Huiyun Gao, Kevin J. Croce, Arjun Sharma, et al. 2008a. « Down-Regulation of the Forkhead Transcription Factor Foxp1 Is Required for Monocyte Differentiation and Macrophage Function ». *Blood* 112 (12): 4699-4711. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-137018>.

———. 2008b. « Down-regulation of the forkhead transcription factor Foxp1 is required for monocyte differentiation and macrophage function ». *Blood* 112 (12): 4699-4711. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-137018>.

Shi, Ge, Guofeng Mao, Kejie Xie, Dongdong Wu, et Wei Wang. 2018. « MiR-1178 Regulates Mycobacterial Survival and Inflammatory Responses in Mycobacterium Tuberculosis-Infected Macrophages Partly via TLR4 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (9): 7449-57. <https://doi.org/10.1002/jcb.27054>.

Shiloh, Michael U., et Patricia A. DiGiuseppe Champion. 2010. « To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about Mycobacterium tuberculosis pathogenesis? » *Current opinion in microbiology* 13 (1): 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.006>.

Shiloh, Michael U., Paolo Manzanillo, et Jeffery S. Cox. 2008. « Mycobacterium Tuberculosis Senses Host-Derived Carbon Monoxide during Macrophage Infection ». *Cell Host & Microbe* 3 (5): 323-30. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.007>.

Siméone, Roxane, Patricia Constant, Christophe Guilhot, Mamadou Daffé, et Christian Chalut. 2007. « Identification of the Missing Trans-Acting Enoyl Reductase Required for

Phthiocerol Dimycocerosate and Phenolglycolipid Biosynthesis in Mycobacterium Tuberculosis ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4597-4602. <https://doi.org/10.1128/JB.00169-07>.

Simeone, Roxane, Fadel Sayes, Okryul Song, Matthias I. Gröschel, Priscille Brodin, Roland Brosch, et Laleh Majlessi. 2015. « Cytosolic Access of Mycobacterium Tuberculosis: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo ». *PLOS Pathogens* 11 (2): e1004650. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004650>.

Singh, Amit Kumar, Mrinmoy Ghosh, Vimal Kumar, Sumit Aggarwal, et Shripad A. Patil. 2021. « Interplay between MiRNAs and Mycobacterium Tuberculosis: Diagnostic and Therapeutic Implications ». *Drug Discovery Today* 26 (5): 1245-55. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.021>.

Singh, Varshneya, Charanpreet Kaur, Vijay K. Chaudhary, Kanury V. S. Rao, et Samrat Chatterjee. 2015. « M. Tuberculosis Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation ». *Scientific Reports* 5 (1): 12906. <https://doi.org/10.1038/srep12906>.

Song, Ying, Christine Quach, et Chengyu Liang. 2020. « UVRAG in autophagy, inflammation, and cancer ». *Autophagy* 16 (2): 387-88. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1709768>.

Srivastava, Smita, Joel D. Ernst, et Ludovic Desvignes. 2014. « Beyond Macrophages: The Diversity of Mononuclear Cells in Tuberculosis ». *Immunological Reviews* 262 (1): 179-92. <https://doi.org/10.1111/imr.12217>.

Stanton, Lee-Anne, Gael Fenhalls, Andrew Lucas, Peter Gough, David R Greaves, James A Mahoney, Paul Van Helden, et Siamon Gordon. 2003. « Immunophenotyping of macrophages in human pulmonary tuberculosis and sarcoidosis ». *International Journal of Experimental Pathology* 84 (6): 289-304. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2003.00365.x>.

Steinberg, Daniel. 2013. « In celebration of the 100th anniversary of the lipid hypothesis of atherosclerosis ». *Journal of Lipid Research* 54 (11): 2946-49. <https://doi.org/10.1194/jlr.R043414>.

Stöger, J. Laurant, Marion J. J. Gijbels, Saskia van der Velden, Marco Manca, Chris M. van der Loos, Erik A. L. Biessen, Mat J. A. P. Daemen, Esther Lutgens, et Menno P. J. de Winther.

2012. « Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 225 (2): 461-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013>.

Swanson, Karen V., Meng Deng, et Jenny P.-Y. Ting. 2019. « The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics ». *Nature Reviews Immunology* 19 (8): 477-89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.

Tabas, Ira. 2005. « Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (11): 2255-64. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000184783.04864.9f>.

Taganov, Konstantin D., Mark P. Boldin, Kuang-Jung Chang, et David Baltimore. 2006. « NF-KappaB-Dependent Induction of MicroRNA MiR-146, an Inhibitor Targeted to Signaling Proteins of Innate Immune Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (33): 12481-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>.

Tak, Uday, Jiri Vlach, Acely Garza-Garcia, Doreen William, Olga Danilchanka, Luiz Pedro Sório de Carvalho, Jamil S. Saad, et Michael Niederweis. 2019. « The tuberculosis necrotizing toxin is an NAD⁺ and NADP⁺ glycohydrolase with distinct enzymatic properties ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (9): 3024-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005832>.

Tan, Belinda H., Christoph Meinken, Max Bastian, Heiko Bruns, Annaliza Legaspi, Maria Teresa Ochoa, Stephan R. Krutzik, et al. 2006. « Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (3): 1864-71.

Tanzer, Andrea, et Peter F. Stadler. 2006. « Evolution of MicroRNAs ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 342: 335-50. <https://doi.org/10.1385/1-59745-123-1:335>.

Jörg Täubel, Wilfried Hauke, Steffen Rump, Janika Viereck, Sandor Batkai, Jenny Poetzsch, Laura Rode, Henning Weigt, Celina Genschel, Ulrike Lorch, Carmen Theek, Arthur A Levin, Johann Bauersachs, Scott D Solomon, Thomas Thum, Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study, *European Heart Journal*, Volume 42, Issue 2, 7 January 2021, Pages 178–188, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa898>

Tedesco, Serena, Federica De Majo, Jieun Kim, Annalisa Trenti, Lucia Trevisi, Gian Paolo Fadini, Chiara Bolego, Peter W. Zandstra, Andrea Cignarella, et Libero Vitiello. 2018.

« Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? » *Frontiers in Pharmacology* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>.

Tong, Hoang van, Thirumalaisamy P. Velavan, Thorsten Thye, et Christian G. Meyer. 2017. « Human Genetic Factors in Tuberculosis: An Update ». *Tropical Medicine & International Health* 22 (9): 1063-71. <https://doi.org/10.1111/tmi.12923>.

Torres-García, Diana, Alfredo Cruz-Lagunas, Ma Cecilia García-Sancho Figueroa, Rosario Fernández-Plata, Renata Baez-Saldaña, Criselda Mendoza-Milla, Rodrigo Barquera, et al. 2013. « Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population ». *Journal of Translational Medicine* 11 (septembre): 220. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-220>.

Tripathi, Ashutosh, Vishal Srivastava, et Bhupendra N. Singh. 2018. « Hsa-Let-7b-5p Facilitates Mycobacterium Tuberculosis Survival in THP-1 Human Macrophages by Fas Downregulation ». *FEMS Microbiology Letters* 365 (7). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny040>.

Tüfekci, Kemal Uğur, Meryem Gülfem Öner, Ralph Leo Johan Meuwissen, et Şermin Genç. 2014. « The Role of MicroRNAs in Human Diseases ». In *MiRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, édité par Malik Yousef et Jens Allmer, 33-50. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_3.

Uden, Patrick van, Niall S. Kenneth, et Sonia Rocha. 2008. « Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha by NF-KappaB ». *The Biochemical Journal* 412 (3): 477-84. <https://doi.org/10.1042/BJ20080476>.

Ulrichs, Timo, George A. Kosmiadi, Vsevolod Trusov, Sabine Jörg, Lydia Pradl, Marina Titukhina, Vladimir Mishenko, Nadya Gushina, et Stefan H. E. Kaufmann. 2004. « Human Tuberculous Granulomas Induce Peripheral Lymphoid Follicle-like Structures to Orchestrate Local Host Defence in the Lung ». *The Journal of Pathology* 204 (2): 217-28. <https://doi.org/10.1002/path.1628>.

Upadhyay, S, E Mittal, et J A Philips. 2018. « Tuberculosis and the art of macrophage manipulation ». *Pathogens and Disease* 76 (4). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty037>.

Uribe-Querol, Eileen, et Carlos Rosales. 2020. « Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process ». *Frontiers in Immunology* 11: 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>.

Van Lookeren Campagne, Menno, Christian Wiesmann, et Eric J. Brown. 2007. « Macrophage Complement Receptors and Pathogen Clearance ». *Cellular Microbiology* 9 (9): 2095-2102. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x>.

Varga, Tamas, Zsolt Czimmerer, et Laszlo Nagy. 2011. « PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1812 (8): 1007-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>.

Vasudevan, Shobha. 2012. « Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs ». *WIREs RNA* 3 (3): 311-30. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>.

Velez, Digna Rosa, Christian Wejse, Martin E. Stryjewski, Eduardo Abbate, William F. Hulme, Jamie L. Myers, Rosa Estevan, et al. 2010. « Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans ». *Human genetics* 127 (1): 65-73. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0741-7>.

Vergadi, Eleni, Katerina Vaporidi, Emmanuel E. Theodorakis, Christina Doxaki, Eleni Lagoudaki, Eleftheria Ieronymaki, Vassilia I. Alexaki, et al. 2014. « Akt2 Deficiency Protects from Acute Lung Injury via Alternative Macrophage Activation and MiR-146a Induction in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (1): 394-406. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300959>.

Vergne, Isabelle, Jennifer Chua, et Vojo Deretic. 2003. « Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca²⁺/Calmodulin-PI3K HVP534 Cascade ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (4): 653-59. <https://doi.org/10.1084/jem.20030527>.

Via, Laura E., Dan Schimel, Danielle M. Weiner, Veronique Dartois, Emmanuel Dayao, Ying Cai, Young-Soon Yoon, et al. 2012. « Infection Dynamics and Response to Chemotherapy in a Rabbit Model of Tuberculosis using [18F]2-Fluoro-Deoxy-d-Glucose Positron Emission Tomography and Computed Tomography ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4391-4402. <https://doi.org/10.1128/AAC.00531-12>.

Volkman, Hannah E., Hilary Clay, Dana Beery, Jennifer C. W. Chang, David R. Sherman, et Lalita Ramakrishnan. 2004. « Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a Mycobacterium Virulence Determinant ». *PLoS Biology* 2 (11): e367. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020367>.

Volkman, Hannah E., Tamara C. Pozos, John Zheng, J. Muse Davis, John F. Rawls, et Lalita Ramakrishnan. 2010. « Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5964): 466-69. <https://doi.org/10.1126/science.1179663>.

Voskuil, M. I., K. C. Visconti, et G. K. Schoolnik. 2004. « Mycobacterium Tuberculosis Gene Expression during Adaptation to Stationary Phase and Low-Oxygen Dormancy ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 84 (3-4): 218-27. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2004.02.003>.

Voskuil, Martin I., Dirk Schnappinger, Kevin C. Visconti, Maria I. Harrell, Gregory M. Dolganov, David R. Sherman, et Gary K. Schoolnik. 2003. « Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a Mycobacterium Tuberculosis Dormancy Program ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5): 705-13. <https://doi.org/10.1084/jem.20030205>.

Vyas, Shachi Pranjal, et Ritobrata Goswami. 2017. « Striking the Right Immunological Balance Prevents Progression of Tuberculosis ». *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 66 (12): 1031-56. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1081-z>.

Wagh, Vishal, Anant Urhekar, et Deepak Modi. 2017. « Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy ». *Tuberculosis* 102 (janvier): 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.10.007>.

Wakamoto, Yuichi, Neeraj Dhar, Remy Chait, Katrin Schneider, François Signorino-Gelo, Stanislas Leibler, et John D. McKinney. 2013. « Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria ». *Science* 339 (6115): 91-95. <https://doi.org/10.1126/science.1229858>.

Wallis, R. S., S. Patil, S. H. Cheon, K. Edmonds, M. Phillips, M. D. Perkins, M. Joloba, et al. 1999. « Drug Tolerance in Mycobacterium Tuberculosis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (11): 2600-2606.

Wang, Chuan, Shun Yao Yang, Gang Sun, Xuying Tang, Shuihua Lu, Olivier Neyrolles, et Qian Gao. 2011. « Comparative MiRNA Expression Profiles in Individuals with Latent and Active Tuberculosis ». *PLOS ONE* 6 (10): e25832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025832>.

Wayne, L. G., et L. G. Hayes. 1996. « An in Vitro Model for Sequential Study of Shiftdown of Mycobacterium Tuberculosis through Two Stages of Nonreplicating Persistence ». *Infection and Immunity* 64 (6): 2062-69.

Wayne, L. G., et C. D. Sohaskey. 2001. « Nonreplicating Persistence of Mycobacterium Tuberculosis ». *Annual Review of Microbiology* 55: 139-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.139>.

Weerasuriya, C. K., R. A. Clark, R. G. White, et R. C. Harris. 2020. « New Tuberculosis Vaccines: Advances in Clinical Development and Modelling ». *Journal of Internal Medicine* 288 (6): 661-81. <https://doi.org/10.1111/joim.13197>.

Wei, Yuanyuan, et Andreas Schober. 2016. « MicroRNA Regulation of Macrophages in Human Pathologies ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (18): 3473-95. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2254-6>.

Weiss, Günter, et Ulrich E Schaible. 2015. « Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria ». *Immunological Reviews* 264 (1): 182-203. <https://doi.org/10.1111/imr.12266>.

Wel, Nicole van der, David Hava, Diane Houben, Donna Fluitsma, Maaïke van Zon, Jason Pierson, Michael Brenner, et Peter J. Peters. 2007. « M. Tuberculosis and M. Lepae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells ». *Cell* 129 (7): 1287-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059>.

Welin, Amanda. 2021. « Survival strategies of Mycobacterium tuberculosis inside the human macrophage », octobre.

Westphalen, Kristin, Galina A. Gusarova, Mohammad N. Islam, Manikandan Subramanian, Taylor S. Cohen, Alice S. Prince, et Jahar Bhattacharya. 2014. « Sessile Alveolar Macrophages Communicate with Alveolar Epithelium to Modulate Immunity ». *Nature* 506 (7489): 503-6. <https://doi.org/10.1038/nature12902>.

WHO. 2020. « Global Tuberculosis Report 2020 - World ». ReliefWeb. 15 octobre 2020. <https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-report-2020>.

Williams, Niamh C., et Luke A. J. O'Neill. 2018. « A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 9: 141. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00141>.

Wolf, Andrea J., Ludovic Desvignes, Beth Linas, Niaz Banaiee, Toshiki Tamura, Kiyoshi Takatsu, et Joel D. Ernst. 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 (1): 105-15. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>.

Woo, Yeon Duk, Dongjin Jeong, et Doo Hyun Chung. 2021. « Development and Functions of Alveolar Macrophages ». *Molecules and Cells* 44 (5): 292-330. <https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0058>.

Woods, Parker S., Lucas M. Kimmig, Angelo Y. Meliton, Kaitlyn A. Sun, Yufeng Tian, Erin M. O'Leary, Gizem A. Gökalp, Robert B. Hamanaka, et Gökhan M. Mutlu. 2020. « Tissue-Resident Alveolar Macrophages Do Not Rely on Glycolysis for LPS-Induced Inflammation ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 62 (2): 243-55. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0244OC>.

Wu, Linlin, Yi Hu, Dange Li, Weili Jiang, et Biao Xu. 2015. « Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population ». *BMC Medical Genetics* 16 (avril): 19. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0166-1>.

Xi, Xiue, Chunxiao Zhang, Wei Han, Huayang Zhao, Huiqiang Zhang, et Junhua Jiao. 2015. « MicroRNA-223 Is Upregulated in Active Tuberculosis Patients and Inhibits Apoptosis of Macrophages by Targeting FOXO3 ». *Genetic testing and molecular biomarkers* 19 (octobre). <https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0090>.

Xiao, Changchun, et Klaus Rajewsky. 2009. « MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles ». *Cell* 136 (1): 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.027>.

Xuan, Wenjuan, Qing Qu, Biao Zheng, Sidong Xiong, et Guo-Huang Fan. 2015. « The Chemotaxis of M1 and M2 Macrophages Is Regulated by Different Chemokines ». *Journal of Leukocyte Biology* 97 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1189/jlb.1A0314-170R>.

Yang, Tae Won, Hyun Oh Park, Ha Nee Jang, Jun Ho Yang, Sung Hwan Kim, Seong Ho Moon, Joung Hun Byun, Chung Eun Lee, Jong Woo Kim, et Dong Hun Kang. 2017. « Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea ». *Medicine* 96 (28): e7482. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007482>.

Young, C., G. Walzl, et N. Du Plessis. 2020. « Therapeutic Host-Directed Strategies to Improve Outcome in Tuberculosis ». *Mucosal Immunology* 13 (2): 190-204. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0226-5>.

Young, Douglas, Tracy Hussell, et Gordon Dougan. 2002. « Chronic Bacterial Infections: Living with Unwanted Guests ». *Nature Immunology* 3 (11): 1026-32. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1026>.

Yunna, Chen, Hu Mengru, Wang Lei, et Chen Weidong. 2020. « Macrophage M1/M2 Polarization ». *European Journal of Pharmacology* 877 (juin): 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

Zaki, H. Y., K. H. Leung, W. C. Yiu, N. Gasmelseed, N. E. M. Elwali, et S. P. Yip. 2012. « Common Polymorphisms in TLR4 Gene Associated with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis in the Sudanese ». *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 16 (7): 934-40. <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0517>.

Zha, Beth Shoshana, et Payam Nahid. 2019. « Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis ». *Clinics in Chest Medicine* 40 (4): 763-74. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.07.006>.

Zhang, Chunye, Ming Yang, et Aaron C. Ericsson. 2021. « Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms ». *Frontiers in Immunology* 12: 635. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620510>.

Zhang, Song, Zhujun Cheng, Yanan Wang, et Tianyu Han. 2021. « The Risks of MiRNA Therapeutics: In a Drug Target Perspective ». *Drug Design, Development and Therapy* 15 (février): 721-33. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S288859>.

Zhang, Xing, Jing Guo, Shufeng Fan, Yanyuan Li, Liliang Wei, Xiuyun Yang, Tingting Jiang, et al. 2013. « Screening and Identification of Six Serum microRNAs as Novel Potential Combination Biomarkers for Pulmonary Tuberculosis Diagnosis ». *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081076>.

Zhang, Yajuan, Guanzhen Yu, Huiying Chu, Xiongjun Wang, Lingling Xiong, Guoqing Cai, Ruilong Liu, et al. 2018. « Macrophage-Associated PGK1 Phosphorylation Promotes Aerobic Glycolysis and Tumorigenesis ». *Molecular Cell* 71 (2): 201-215.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.023>.

Zhang, Ying. 2005. « The Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 529-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120>.

Zhang, Ying, Wing Wai Yew, et Michael R. Barer. 2012. « Targeting Persisters for Tuberculosis Control ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2223-30. <https://doi.org/10.1128/AAC.06288-11>.

Zhang, Yingying, Mengying Zhang, Min Zhong, Qifeng Suo, et Kun Lv. 2013. « Expression Profiles of MiRNAs in Polarized Macrophages ». *International Journal of Molecular Medicine* 31 (4): 797-802. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1260>.

Zhang, Zhi-Min, Ai-Rong Zhang, Min Xu, Jun Lou, et Wei-Qiang Qiu. 2017. « TLR-4/miRNA-32-5p/FSTL1 signaling regulates mycobacterial survival and inflammatory responses in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages ». *Experimental Cell Research* 352 (2): 313-21. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.025>.

Zheng, Chao, Jingtao Chen, Fengna Chu, Jie Zhu, et Tao Jin. 2020. « Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12: 314. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00314>.

Zheng, Lin, Eric Leung, Nelson Lee, Grace Lui, Ka-Fai To, Raphael C. Y. Chan, et Margaret Ip. 2015. « Differential MicroRNA Expression in Human Macrophages with Mycobacterium

Tuberculosis Infection of Beijing/W and Non-Beijing/W Strain Types ». *PLOS ONE* 10 (6): e0126018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126018>.

Zheng, Meng-Li, Nai-Kang Zhou, et Cheng-Hua Luo. 2016. « MiRNA-155 and miRNA-132 as potential diagnostic biomarkers for pulmonary tuberculosis: A preliminary study ». *Microbial Pathogenesis* 100 (novembre): 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.005>.

Zhu, Jun-Hao, Bi-Wei Wang, Miaomiao Pan, Yu-Na Zeng, Hesper Rego, et Babak Javid. 2018. « Rifampicin Can Induce Antibiotic Tolerance in Mycobacteria via Paradoxical Changes in RpoB Transcription ». *Nature Communications* 9 (1): 4218. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06667-3>.

Zhuang Guoqing, Meng Cong, Guo Xin, Cheruku Patali S., Shi Lei, Xu Hang, Li Honggui, et al. 2012. « A Novel Regulator of Macrophage Activation ». *Circulation* 125 (23): 2892-2903. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087817>.