



**HAL**  
open science

# Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la régulation de la réponse inflammatoire IL-17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries

Robin Lombard

► **To cite this version:**

Robin Lombard. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la régulation de la réponse inflammatoire IL-17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries. Microbiologie et Parasitologie. Université François Rabelais (Tours), 2013. Français. NNT : . tel-02810070

**HAL Id: tel-02810070**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02810070v1>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

## ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Équipe UMR INRA 1282 - Infectiologie et Santé Publique

# THÈSE

 présentée par :

## Robin LOMBARD

soutenue le : 11 décembre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François Rabelais de TOURS**  
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

## Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la régulation de la réponse inflammatoire IL- 17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries

### THÈSE dirigée par :

**Madame WINTER Nathalie**

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

### RAPPORTEURS :

**Monsieur DELNESTE Yves**

Directeur de Recherche, INSERM Angers

**Monsieur LOCHT Camille**

Directeur de Recherche, INSERM Lille

---

### JURY :

**Monsieur DELNESTE Yves**

Directeur de Recherche, INSERM Angers

**Madame DEMANGEL Caroline**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur Paris

**Madame DIMIER POISSON Isabelle**

Professeur, Université François Rabelais Tours

**Monsieur LOCHT Camille**

Directeur de Recherche, INSERM Lille

**Monsieur SI-TAHAR Mustapha**

Directeur de Recherche, INSERM Tours

**Madame WINTER Nathalie**

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire







# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

*ÉCOLE DOCTORALE SSBCV*

Équipe UMR INRA 1282 - Infectiologie et Santé Publique

## THÈSE

présentée par :

**Robin LOMBARD**

soutenue le : 11 décembre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François Rabelais de TOURS**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

## **Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la régulation de la réponse inflammatoire IL- 17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries**

**THÈSE dirigée par :**

**Madame WINTER Nathalie**

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

**RAPPORTEURS :**

**Monsieur DELNESTE Yves**

Directeur de Recherche, INSERM Angers

**Monsieur LOCHT Camille**

Directeur de Recherche, INSERM Lille

---

**JURY :**

**Monsieur DELNESTE Yves**

Directeur de Recherche, INSERM Angers

**Madame DEMANGEL Caroline**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur Paris

**Madame DIMIER POISSON Isabelle**

Professeur, Université François Rabelais Tours

**Monsieur LOCHT Camille**

Directeur de Recherche, INSERM Lille

**Monsieur SI-TAHAR Mustapha**

Directeur de Recherche, INSERM Tours

**Madame WINTER Nathalie**

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire



*Je dédie ce mémoire:*

*A ma famille*

*A mon "minou"*



# Remerciements

A l'heure de la rédaction de mon mémoire de thèse je fais le bilan de cette expérience. Trois années de travail intense et enrichissant. Au sein de l'équipe Infections Mycobactériennes Animales (IMA) et au contact de toutes les personnes de l'unité d'Infectiologie et Santé Publique (ISP), j'ai pu puiser dans leurs connaissances techniques et scientifiques afin de m'armer pour la suite de mon parcours professionnel. Je souhaite transmettre mes sincères remerciements à toutes les personnes avec qui j'ai pu avoir ces échanges enrichissants. J'ai eu la chance d'être intégré dans un projet riche en collaborations avec les membres d'autres équipes et de plateformes techniques, j'espère n'oublier personne mais, si c'est le cas, sachez que mes plus sincères remerciements vont également vers vous.

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Isabelle Dimier-Poisson d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci aux Dr Yves Delneste et Dr Camille Locht qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs. Je remercie également les Dr Caroline Demangel et Dr Mustapha Si-Tahar qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury. Je remercie également l'INRA et la région Centre pour avoir financé ces trois années de travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Nathalie Winter pour m'avoir pris sous sa direction dans cette thèse. Tu m'as fait confiance et a toujours cru en mes capacités et en ce projet. Tu as été présente pour me guider, me motiver et toujours me pousser vers l'avant.

Je remercie aussi le Dr Franck Biet de m'avoir chaleureusement accueilli au sein de l'équipe IMA.

Je tiens à remercier le Dr Dominique Buzoni-Gatel de m'avoir accueilli dans l'unité ISP. J'ai été honoré d'avoir eu des échanges scientifiques avec toi. Ces points de discussions m'ont réellement permis d'avancer.

Tous mes remerciements vont vers le Dr Emilie Doz qui a su partager avec enthousiasme ses connaissances. Nos discussions en toute simplicité m'ont beaucoup aidé tout au long de cette thèse. Merci aussi à Florence Carreras, nos longs moments autour des souris ou dans le L3 ont créé une réelle complicité. Je me réjouis de cela et j'espère sincèrement garder contact.



Un grand merci à Yves Le Vern pour son aide sur la cytométrie et pour ses précieux conseils et orientations.

Je remercie le Dr Sébastien Holbert sur qui j'ai toujours pu compter. Merci pour ta bonne humeur et ton rire communicatif.

Je souhaiterais remercier les membres de l'équipe IMA, Thierry Cochard, Christelle Bodier-Richer, Armel Souriau, Gaëlle Richard et Maxime Branger. Certains sont partis pour de nouvelles aventures, d'autres viennent de nous rejoindre. Merci d'avoir souvent pris de mes nouvelles et merci pour tous ces bons moments qui resteront gravés dans ma mémoire.

Je tiens à remercier particulièrement Fanny Bauchet. M'impliquer dans l'encadrement de ton stage d'IUT fut un plaisir. J'ai beaucoup appris et tes travaux m'ont réellement aidé.

Je remercie le Dr Sonia Lacroix-Lamandé et le Dr Valérie Quesniaux pour avoir fait partie de mon comité de thèse. Ces discussions à des étapes charnières de ma thèse m'ont beaucoup aidé.

Un grand merci au Dr François Meurens pour ton aide si précieuse. Je constate que l'océan Atlantique n'est pas une barrière à ta disponibilité.

Je remercie également le Dr Patricia Berthon et Christelle Rossignol pour leur aide sur l'histologie.

Merci à Vanaique Guillory et toute son équipe de la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE). Tout particulièrement Arnaud Faurie et Corinne Beaugé pour leur implication et leur aide sur les protocoles d'infection de nos souris.

Je tiens à remercier également Sylvie Darche de l'Institut Pasteur à Paris pour son accueil et ses précieux conseils lors de nos protocoles de souris chimères.

Merci à toi Evelyne Desnoé pour ton professionnalisme et ta disponibilité. Ton aide m'a été bien utile pour me dépêtrer dans les démarches des Ressources Humaines. Merci également à Diana Fontaine pour son efficacité au magasin et commandes.

Tous mes remerciements vont également à mes compagnons doctorants, Aurore Rossignol, Louis Lantier, Perrine Roussel, Mario Delgado-Ortega, Zineb Boumart, Fatemeh Namdari, Daphné Brisard, Simon Gras, Genaro Hurtado. Nous avons tous pu compter les uns sur les autres, nous transmettre nos points forts et les informations lorsqu'un de nous avait un "scoop". Merci également pour votre bonne humeur et spontanéité, je me souviendrai longtemps de nos lundis soir et j'espère vous garder comme amis.



Enfin, merci à toutes les personnes de l'unité ISP qui au quotidien m'ont apporté leur aide. Vous avez tous le souci de venir en aide à vos collègues et de partager vos connaissances, merci pour cela.

Il va de soi que je remercie ma famille, ma mère, mon frère et sa petite tribu et ma sœur pour m'avoir soutenu et toujours avoir eu confiance en moi. Je remercie également ma "belle famille", Marie-France, Georges et Olivier pour leur soutien durant ces années.

Un gros merci à tout mon groupe d'amis, Pierre-Henri, Olivier, Ludovic, Antoine, Thierry et Nicolas. De vous voir me redonne de l'énergie et j'espère que cela restera toujours ainsi. Quel plaisir de constater que malgré les années qui passent nous arrivons toujours à nous retrouver.

Je termine en remerciant la personne la plus chère à mes yeux Laura. "Minou" merci pour ton soutien au quotidien, ton écoute et ta patience. Merci également d'avoir supporté mes irritabilités passagères. Tu as fait tout ton possible pour m'aider et tout mis en œuvre pour que je puisse me concentrer sur mon travail. Sans toi je n'aurais sûrement pas pu être autant investi dans ce travail. Je suis bien chanceux de t'avoir à mes côtés.



## Résumé

La tuberculose (TB) causée par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) est responsable de 1,7 millions de décès chaque année. Le vaccin vivant atténué *M. bovis* Bacille de Calmette Guérin (BCG) est administré largement dans le monde mais n'est pas capable de contrôler la pandémie de TB. Les adultes porteurs asymptomatiques de Mtb représentent un tiers de la population mondiale. Ils sont susceptibles de déclarer une TB active tout au long de leur vie et font courir un risque majeur de transmission de Mtb.

Mtb induit la formation de granulomes qui restreignent la multiplication des bacilles mais qui évoluent vers une réaction inflammatoire exacerbée détruisant le poumon lors de la TB active. Durant cette phase chronique de l'infection, les macrophages et les cellules dendritiques (CD) représentent un réservoir pour les bacilles.

Le rôle des polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la physiopathologie de la TB est controversé. Chez l'Homme, la quantité de PNN circulants est corrélée avec une susceptibilité moindre à l'infection par Mtb. Néanmoins, les PNN sont les cellules les plus abondantes dans les poumons de patients atteints de TB active. Chez la souris, les PNN sont soit favorables à la mise en place de la réponse immunitaire, en coopérant avec les CD pour les aider à présenter les antigènes aux lymphocytes (Lc) T naïfs, soit associés à la destruction du poumon. De plus chez la souris les PNN infectés par Mtb produisent la cytokine immunosuppressive IL-10, favorisant la persistance des bacilles. L'IL-17A est une cytokine pro-inflammatoire dont le rôle principal est de réguler la granulopoïèse. Dans le modèle murin, les Th17 favorisent la mise en place d'une réponse protectrice et les souris déficientes pour l'IL-17A ont un défaut de formation du granulome à mycobactéries. Cependant, une production exacerbée d'IL-17A chez la souris infectée par Mtb et exposée de façon répétée aux mycobactéries détruit le poumon.

L'objectif principal de ma thèse était de clarifier le rôle des granulocytes, dont les PNN, et de l'IL-17A dans la physiopathologie des infections pulmonaires à mycobactéries. Dans une première partie, nous avons montré chez la souris, que les PNN sont recrutés dans le poumon en deux vagues après infection par Mtb ou BCG. Seule la deuxième vague dépend du récepteur IL-17RA exprimé par les cellules non hématopoïétiques, probablement les cellules épithéliales. Les chimiokines CXCL-1 et 5 attirant les PNN semblent impliquées. Dans le poumon, ces PNN ne semblent pas jouer de rôle majeur dans le contrôle direct des bacilles mais produisent de l'IL-10 qui diminue la production d'IL-17A.



Dans une deuxième partie, nous avons montré que les CD infectées par le BCG, telles que celles décrites comme réservoir de bacilles dans le granulome, sécrètent aussi CXCL-1 et attirent fortement les PNN. Un contact entre ces deux types cellulaires s'établit et semble permettre le transfert de bacilles vivants de la CD vers le PNN. Surtout, ce contact favorise la production d'IL-10 par le PNN et non par la CD. L'IL-10 produite par le PNN bloque la production d'IL-17A mais pas d'IFN- $\gamma$  par les LcT CD4<sup>+</sup> activés / mémoires. En effet, seuls les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th17 expriment le récepteur à l'IL-10.

Dans une troisième partie, nous avons observé que les PNN recrutés dans le poumon sont accompagnés d'une autre population de cellules myéloïdes granuleuses. Ces cellules proches mais différentes des PNN sont également recrutées en deux vagues, qui sont toutes deux indépendantes de l'IL-17RA, contrairement aux PNN. Ces cellules ne semblent pas jouer de rôle direct dans la destruction des bacilles mais semblent inhiber la prolifération des LcT via un mécanisme dépendant de l'enzyme "inducible Nitric Oxyde Synthase". Ces données préliminaires indiquent que ces cellules sont des "Myeloid-Derived Suppressor Cells" (MDSC) telles que celles décrites précédemment par notre équipe dans un modèle murin de vaccination intradermique par le BCG. L'ensemble de nos travaux apporte un éclairage nouveau sur le rôle des granulocytes régulateurs, PNN producteurs d'IL-10 et MDSC productrices d'oxyde nitrique dans le contrôle de l'inflammation exacerbée par l'IL-17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries.

Mots clés : tuberculose, polynucléaire neutrophile, IL-17A, IL-10, immunosuppression, inflammation.



## Abstract

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is responsible for 1.7 million death each year. The live attenuated vaccine *M. bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) is widely administered but does not allow to control the TB pandemics. Asymptomatic Mtb infected adults represent one third of the world population. They are at risk to develop active TB throughout life and therefore represent a major threat of Mtb transmission.

Mtb induces formation of granuloma that limit bacilli multiplication. However, granuloma are also sites of exacerbated inflammatory reaction that can lead to lung destruction in active TB patients. During the chronic phase of infection, macrophages and dendritic cells (DCs) represent a reservoir for bacilli.

The role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in TB physiopathology is still debated. In humans, circulating PMN numbers correlate with reduced susceptibility to Mtb infection. However, PMNs are the most abundant cells in the lungs of active TB patients. In mice, PMNs can help to establish the immune response: they can cooperate with DCs to favor mycobacteria antigen presentation to naïve T lymphocytes (LcT). However, if PMNs are in too high numbers, they participate to lung destruction. Moreover in mice, mycobacteria infected PMNs produce the immunosuppressive cytokine IL-10, which favors bacilli persistence. IL-17A is a proinflammatory cytokine which primary role is to regulate granulopoiesis. In the mouse model, Th17 cells promote protection against Mtb and IL-17A deficient mice are impaired in granuloma formation. However, exaggerated IL-17A production in Mtb-infected mice repeatedly exposed to mycobacteria, leads to lung destruction.

The main aim of my thesis is to clarify the role of granulocytes, mainly PMNs, and of the receptor for IL-17A in pulmonary mycobacterial infections in the mouse model. In the first part, we show that PMNs are recruited in two waves after lung infection with Mtb or BCG. The second wave only critically depends on IL-17RA expression by non-hematopoietic cells, probably epithelial cells. PMN attracting CXCL-1 and 5 chemokines seem to be involved. In the lung, PMNs do not play a role in direct bacilli control but produce IL-10, which dampens IL-17A production.

In a second part, we show that BCG infected DCs, such as DCs described as a bacilli reservoir in granuloma, also secrete CXCL-1 and strongly attract PMNs. Contacts that are established between the two cell types allow the transfer of live bacilli of DCs to PMNs, although we did not decipher mechanism involved. More importantly this contact stimulates IL-10 production



by PMNs and not DCs. PMN-derived IL-10 blocks IL-17A production but not IFN- $\gamma$  by activated / memory CD4<sup>+</sup> T Lc. Indeed, only CD4<sup>+</sup> Th17 cells express the IL-10 receptor.

In the third part, we observed that PMN are recruited to the lung together with another myeloid cell population. These cells, that are similar yet different from PMNs, are recruited in two waves, which are both IL-17RA independent, unlike PMNs. These cells do not appear to play a direct role in the bacilli destruction but inhibit LcT proliferation through a mechanism involving inducible Nitric Oxide Synthase. These preliminary results suggest that these cells are Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) such as those described by our team in a murine model of BCG intradermal vaccination. Taken together, the three parts of our work shed new light on the role of regulatory granulocytes, IL-10 producing PMNs and nitric oxide producing MDSCs, in the control of IL-17A driven exacerbated inflammation during lung mycobacterial infection.

Key words : tuberculosis, polymorphonuclear neutrophil, IL-17A, IL-10, immunosuppression, inflammation



## Liste des abréviations

**BCG:** Bacille bilié de Calmette et Guérin  
**CD:** Cellule dendritique  
**CR:** Récepteur au complément  
**CXCL:** Chimiokine avec motif C-X-C  
**CXCR:** Récepteur aux chimiokines (motif C-X-C)  
**G-MDSC:** MDSC de la lignée granulocytaire  
**IFN:** Interféron  
**IL:** Interleukine  
**IL-17R:** Récepteur à L'IL-17  
**iNOS:** "Inductible Nitric Oxide Synthase"  
**jpi:** Jours post-infection  
**LBA:** Lavage broncho-alvéolaire  
**LcB:** Lymphocyte B  
**LcT:** Lymphocyte T  
**LcTreg:** Lymphocyte T régulateur  
**LPS:** Lipopolysaccharide  
**MDSC:** "Myeloid-Derived Suppressor Cell"  
**MIP-2:** "Macrophage inflammatory protein 2"  
**M-MDSC:** MDSC de la lignée monocytaire  
**MP:** Macrophage  
**MPO:** Myeloperoxydase  
**Mtb:** *Mycobacterium tuberculosis*  
**NLR:** "Nod Like Receptor"  
**NO:** "Nitric Oxide"  
**OMS:** Organisation mondiale de la santé  
**PAMP:** "Pathogen-Associated Molecular Pattern"  
**PNN:** Polynucléaire neutrophile  
**PRR:** "Pattern-Recognition Receptor"  
**ROS:** "Reactive Oxygen Species"  
**TB:** Tuberculose  
**TCR:** Récepteur des cellules T

**TGF:** "Transforming Growth Factor"

**Th:** "T helper"

**TLR:** "Toll Like Receptor"

**TNF:** "Tumor Necrosis Factor"

**VIH:** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**WT:** "Wild-Type"

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	6
Abstract .....	8
Liste des abréviations .....	10
Table des matières .....	21
Liste des tableaux .....	13
Liste des figures .....	14
Liste des annexes .....	15
<b>Introduction</b> .....	16
A. La tuberculose .....	17
1. Histoire de la tuberculose .....	17
2. Agent étiologique responsable .....	17
2.1. Taxonomie .....	17
2.2. La paroi mycobactérienne .....	18
3. Plusieurs pathogènes majeurs .....	37
3.1. <i>M. leprae</i> et <i>M. ulcerans</i> .....	37
3.2 Le complexe de <i>M. tuberculosis</i> .....	37
4. Un problème majeur en santé publique .....	21
5. Stratégies de lutte contre la TB .....	22
5.1. Vaccination anti tuberculeuse .....	22
5.1.1. Bacille bilié de Calmette et Guérin (BCG) .....	22
5.1.2. L'efficacité controversée du BCG .....	23
5.1.3. Développement de nouveaux vaccins antituberculeux .....	24
5.2. Traitement .....	25
5.2.1. Les antibiotiques anti-tuberculeux .....	25
5.2.2. Le développement de résistances aux antibiotiques .....	26
5.3. Diagnostic .....	26
B. La TB, infection chronique du poumon .....	27
1. Description générale de l'appareil respiratoire .....	27
2. La barrière physique et mécanique .....	28
	11

3. Les "Pattern-Recognition Receptors" (PRR) .....	28
3.1. Les "Toll-Like Receptors" (TLR) .....	29
3.2. Les "NOD Like Receptor" (NLR) .....	29
3.3. Les lectines de type C .....	30
4. Les cellules de l'immunité innée pulmonaire .....	30
4.1. Les cellules épithéliales pulmonaires .....	30
4.2. Les macrophages alvéolaires (MP) .....	31
4.3. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) .....	32
5. Les cellules dendritiques (CD) à l'interface entre immunité innée et adaptative .....	32
6. Les lymphocytes (Lc) T CD4 <sup>+</sup> .....	32
6.1. La voie "T helper" (Th) 1 .....	33
6.1.1. L'Interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	33
6.1.2. Le "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF- $\alpha$ ) .....	34
6.2. Le paradigme Th1 / Th2 .....	34
6.3. La voie Th17 .....	35
6.3.1. La famille des IL-17 .....	35
6.3.2. Les récepteurs aux IL-17 .....	36
6.4. Les LcT régulateurs (LcTreg) .....	37
6.4.1. L'IL-10 .....	38
7. Les LcT CD8 <sup>+</sup> .....	39
8. Les LcT gamma delta (LcT $\gamma\delta$ ) .....	40
9. Les LcB .....	40
C. Les chimiokines .....	41
1. Chimiokines et récepteurs .....	41
2. Les chimiokines recrutant les PNN .....	41
D. Physiopathologie et formation du granulome .....	42
1. Physiopathologie .....	42
1.1. La TB latente .....	42
1.2. La TB active .....	43
2. Granulome pulmonaire .....	44
2.1 Cellules impliquées .....	44
2.2. Formation du granulome .....	44
2.3.	

E. Les granulocytes .....	46
1. Les PNN .....	46
1.1. Une cellule pour tuer.....	46
1.2. L'hématopoïèse .....	47
1.3. Le recrutement du PNN .....	48
1.3.1 Roulement ou "rolling".....	48
1.3.2. L'adhésion ferme .....	48
1.3.3. Transmigration de l'endothélium.....	48
1.4. Mort des PNN .....	49
1.4.1. "Neutrophil Extracellular Traps" (NET).....	97
1.5. Evolution des marqueurs utilisés .....	50
2. Les "Myeloid-Derived-Suppressor Cells" (MDSC).....	50
2.1. Une population hétérogène .....	50
2.2. Phénotype.....	50
2.3. Fonctions.....	51
2.4. L'expansion des MDSC .....	51
2.5. La plasticité cellulaire des MDSC .....	52
<b>Objectifs</b> .....	53
1. Le changement de vision du PNN.....	54
2. Le PNN protecteur ou délétère dans le tissu pulmonaire? .....	54
3. Le rôle du PNN en tant que partenaire de la réponse immunitaire adaptative contre les mycobactéries.....	55
3.1. Coopération avec les CD .....	55
3.2. Production de chimiokines / cytokines .....	56
4. Les PNN régulateurs .....	56
5. L'IL-17A et le recrutement des PNN.....	57
6. Les MDSC dans les infections mycobactériennes .....	58
7. Objectifs de la thèse .....	58
<b>Résultats</b> .....	60
A. Définition du recrutement en PNN dans le parenchyme et la lumière pulmonaire suite à une infection par mycobactéries.....	61
Article n°1 .....	64

B. Communications cellulaires entre les PNN et les autres cellules de l'immunité: les CD et les LcT.....	85
Article n°2.....	88
C. Identification d'une autre population cellulaire phéno-typiquement proche des PNN.....	93
1. Introduction.....	93
2. Matériels et méthodes.....	94
2.1. Marquages cellulaires.....	94
2.2. Test de prolifération cellulaire.....	94
3. Résultats.....	96
3.1. Caractérisation phénotypique et recrutement de cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> différentes des PNN.....	96
3.2. Impact des récepteurs IL-17RA et IFN- $\gamma$ R sur le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> .....	97
3.3. Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> .....	98
4. Discussion et perspectives.....	99
<b>Discussion</b> .....	101
1. Le PNN ami ou ennemi dans la TB : une question de nombre et de cinétique ?.....	102
2. Deux vagues de recrutement des PNN, innée et adaptative.....	102
3. Des mécanismes de recrutement différents pour les deux vagues impliquent-ils l'arrivée de sous-types différents ?.....	103
4. Le rôle régulateur des PNN : une nouvelle vision.....	105
5. Pertinence du modèle et limites.....	106
6. D'autres granulocytes régulateurs : Les MDSC.....	108
Conclusion.....	109
Bibliographie.....	110
Annexe.....	124

## Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques nouveaux candidats vaccins. ....	25
Tableau 2: Structure et fonction des antibiotiques utilisés contre la tuberculose. ....	25
Tableau 3: Lecture d'une IntraDermoRéaction (IDR) à la tuberculine. ....	27
Tableau 4: Les TLR et leurs ligands. ....	29
Tableau 5: Principaux ligands mycobactériens et leurs PRR associés.....	30
Tableau 6: Liste de chimiokines de la classe CXC (classe $\alpha$ ) et de leurs récepteurs.....	41
Tableau 7: Les différents modèles animaux pour l'étude de la TB. ....	45
Tableau 8: Principaux PRR et fonctions chez les PNN. ....	47
Tableau 9: Les différences observées entre PNN et les cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> . ....	99



## Liste des figures

Figure 1: Chronologie de la recherche anti tuberculeuse. ....	17
Figure 2: Mycobactéries colorées par la technique de Ziehl-Neelsen. ....	18
Figure 3: Représentation schématique de l'enveloppe des mycobactéries. ....	18
Figure 4: Répartition géographique des cas de lèpre et d'ulcère de Buruli. ....	19
Figure 5: Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Mycobacterium</i> . ....	19
Figure 6: Colonies de Mtb sur milieu solide. ....	20
Figure 7: Incidence de la TB bovine. ....	20
Figure 8: Incidence de la TB. ....	21
Figure 9: Le problème de co-infection Mtb / Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). ....	21
Figure 10: Taux de prévalence et de mortalité due à la TB. ....	22
Figure 11: Généalogie des différentes souches de BCG. ....	23
Figure 12: Système de sécrétion de ESAT6 et CFP10 codé par la région RD1 de Mtb. ....	23
Figure 13: Incidence des souches résistantes aux antibiotiques. ....	26
Figure 14: Schéma de l'appareil respiratoire humain. ....	27
Figure 15: Représentation comparative des parois des voies aériennes pulmonaires. ....	28
Figure 16: Représentation de la structure des Toll Like Receptors (TLR). ....	29
Figure 17: La synapse immunitaire. ....	32
Figure 18: Mise en place de la réponse adaptative à médiation cellulaire contre Mtb. ....	32
Figure 19: Différenciation des Lc "T helper" naïfs (Th0). ....	33
Figure 20: Relations ligand-récepteur de la famille des IL-17. ....	35
Figure 21: Les différents sous types de LcT régulateurs (LcTreg). ....	37
Figure 22: Evolution de la pathologie tuberculeuse. ....	42
Figure 23: Le cycle infectieux de Mtb. ....	43
Figure 24: Schéma de la structure d'un granulome pulmonaire. ....	44
Figure 25: Destruction pulmonaire associée à la TB. ....	45
Figure 26: Le polynucléaire neutrophile (PNN). ....	46
Figure 27: Les PRR présents sur les PNN. ....	46
Figure 28: Schéma de l'hématopoïèse. ....	48
Figure 29: Schéma du recrutement des PNN sur le site inflammatoire. ....	48
Figure 30: Processus de NETose. ....	49
Figure 31: Les "Myeloid-Derived-Suppressor Cells" (MDSC). ....	50
Figure 32: Voies de signalisation impliquées dans l'expansion des MDSC. ....	52

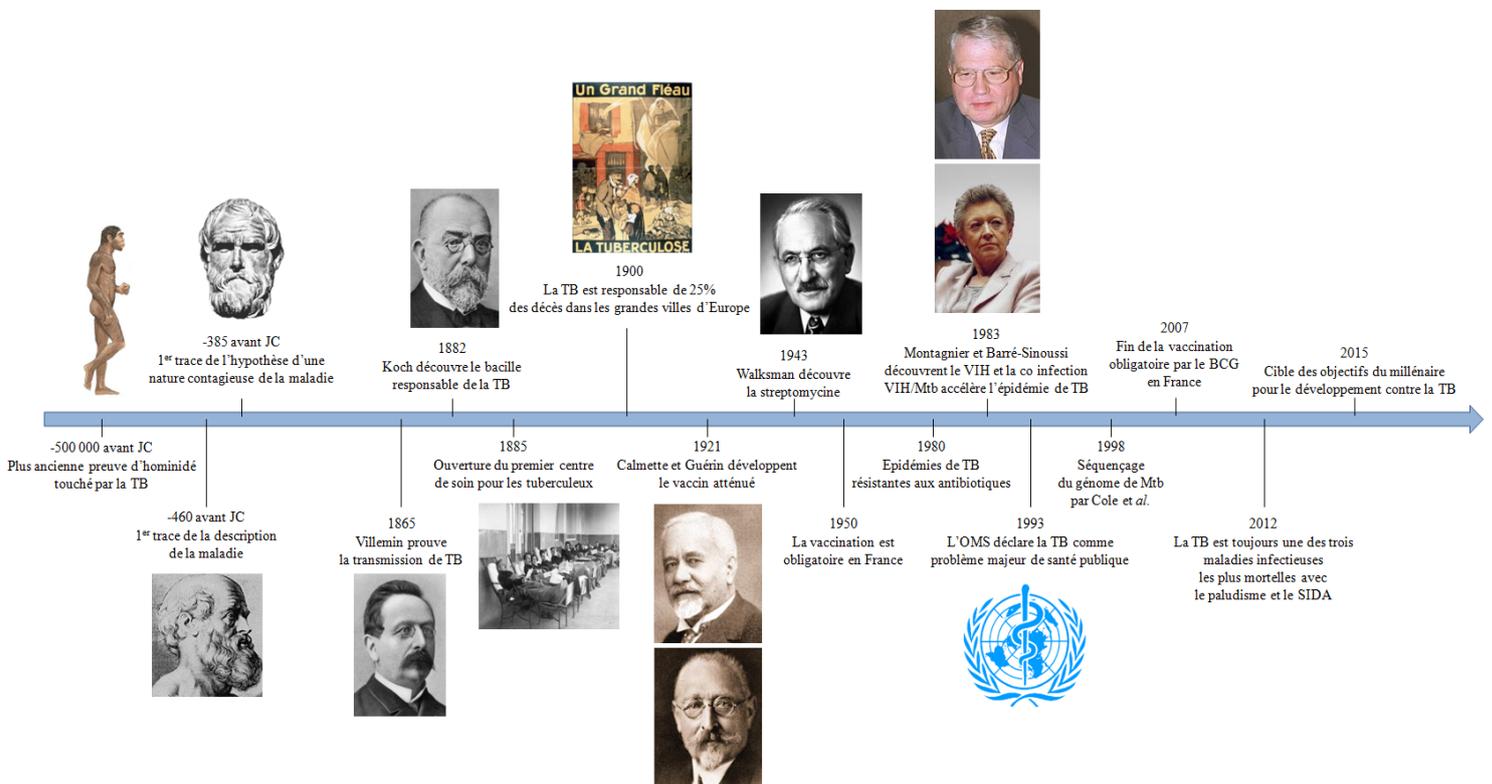
Figure 33: Plasticité cellulaire des MDSC. ....	52
Figure 34: Les molécules produites par les PNN. ....	56
Figure 35: Recrutement de granulocytes dans le modèle de vaccination du derme auriculaire par BCG. ....	58
Figure 36: Les objectifs de la thèse. ....	58
Figure 37: Protocole d'infection intranasale par BCG et Mtb. ....	61
Figure 38: Protocole d'immunomarquage. ....	93
Figure 39: Recrutement bi-phasique de cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> . ....	96
Figure 40: Recrutement inné et adaptatif indépendants de l'IL-17RA et l'IFN- $\gamma$ R. ....	97
Figure 41: Impact des cellules myéloïdes Ly-6G <sup>-</sup> sur la prolifération des LcT. ....	98
Figure 42: L'équilibre inflammatoire dans le granulome. ....	109

## Liste des annexes

Annexe 1: Amorces utilisés pour les analyses en qRT-PCR. ....	125
Annexe 2: Amorces utilisés pour les géotypages des souris. ....	126
Annexe 3: Figures supplémentaires de l'article n°1. ....	127
Annexe 4: Figures supplémentaires de l'article n°2. ....	132



# Introduction



**Figure 1: Chronologie de la recherche anti tuberculose.**

Depuis les premières descriptions de la maladie, puis la découverte du bacille de Koch responsable de l'infection, de grandes avancées ont été obtenues dans la lutte contre la tuberculose (TB). Le développement du vaccin vivant atténué par Calmette et Guérin, la découverte des antibiotiques efficaces contre le bacille, dont la streptomycine découverte par Walksman, jusqu'au séquençage complet du génome de Mtb. Néanmoins, les problèmes de souches multirésistantes et la co-infection avec le VIH maintiennent l'épidémie mondiale à un niveau préoccupant.

## A. La tuberculose

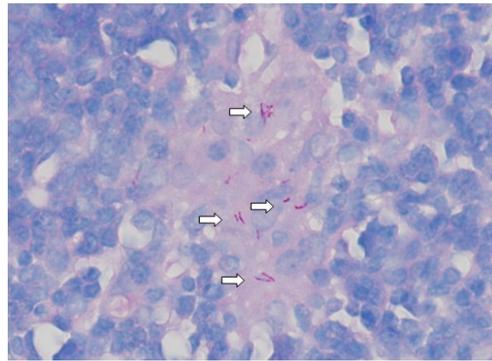
### 1. Histoire de la tuberculose

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse pulmonaire dont les origines semblent remonter à celle de l'Homme [1, 2] (Figure 1). La plus ancienne preuve d'hominidé touché par la TB fut retrouvée sur un fossile *d'Homo erectus* découvert dans l'Ouest de la Turquie daté de -500000 ans avant Jésus Christ [3]. Les premières descriptions de la maladie remontent à la Grèce antique, Hippocrate (vers -460 ans avant Jésus Christ) la nomme sous le terme de phtisie, signifiant le dépérissement progressif des malades atteints. Aristote (vers -385 ans avant Jésus Christ) avait soupçonné sa nature contagieuse, reliant "l'air pernicieux" et la "production de maladie". En 1865 le médecin Villemin prouve, grâce à une méthode expérimentale, la transmissibilité de la TB et affirme en conséquence que cette maladie, de nature jusqu'alors inconnue, est due à un microbe invisible. Le médecin allemand Koch découvre en 1882 le bacille responsable de la TB qu'il fait pousser sur sérum coagulé: le bacille de Koch.

### 2. Agent étiologique responsable

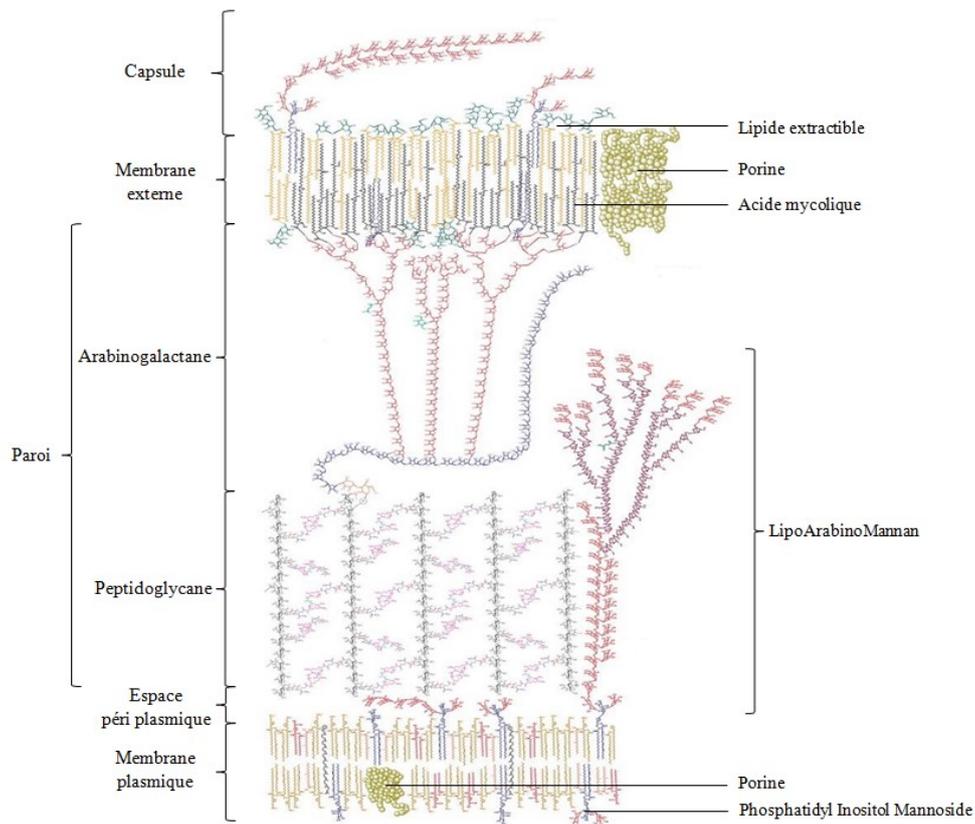
#### 2.1. Taxonomie

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, à l'ordre des *Actinomycetales* et au genre *Mycobacterium* [4]. Ce genre est très homogène d'un point de vue morphologique. En effet toutes les mycobactéries sont des bacilles, fins, aérobies, asporulés et immobiles. Par contre elles sont très hétérogènes en terme de pouvoir pathogène et d'affinité d'hôtes [5]. Le genre *Mycobacterium* regroupe 120 espèces [6], classées en fonction de leur vitesse de croissance en conditions de culture optimales. Les mycobactéries à croissance rapide, comme par exemple *M. xenopi* et *M. smegmatis*, ont un temps de génération de deux à cinq heures et ne nécessitent que quelques jours pour former des colonies visibles sur un milieu solide. Les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération de 24 heures en moyenne et nécessitent plus de 14 jours pour former une colonie visible sur boîte de Pétri.



**Figure 2: Mycobactéries colorées par la technique de Ziehl-Neelsen.**

Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée sur une coupe pulmonaire de souris C57BL/6 infectée 23 jours par Mtb, obtenue au laboratoire (grossissement x400).



**Figure 3: Représentation schématique de l'enveloppe des mycobactéries.**

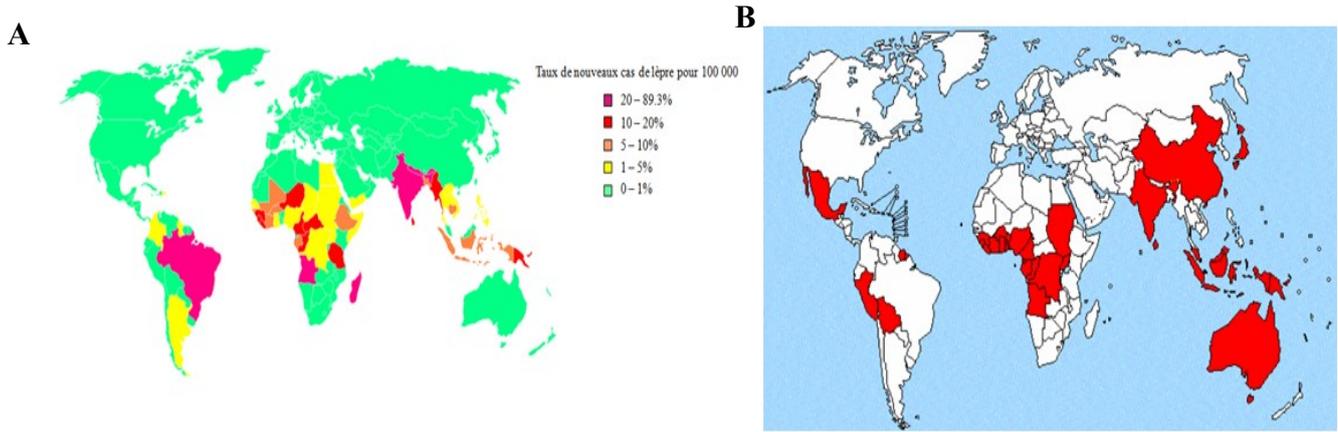
L'enveloppe mycobactérienne est composée de quatre éléments: la membrane plasmique, la paroi, la membrane externe et la capsule. La paroi est constituée d'un complexe de macromolécules liées de manière covalente: peptidoglycane, Phosphatidyl Inositol Mannoside, LipoArabinoMannan et arabinogalactane. Les acides mycoliques forment, avec les lipides extractibles aux solvants, une membrane externe ou "myco-membrane" qui est surmontée d'une capsule majoritairement composée de polysaccharides [7].

## 2.2. La paroi mycobactérienne

La structure très particulière de la paroi mycobactérienne la distingue des autres procaryotes [7]. Elle a des propriétés d'acido-alcool-résistance, mises en lumière par Ehrlich en 1882 et révélées dès 1883 par la méthode de coloration de Ziehl et Neelsen (Figure 2). En effet, contrairement aux autres bactéries, la paroi des mycobactéries retient la fuschine après traitement par un alcool ou un acide [8]. La paroi mycobactérienne peut contenir jusqu'à 60% de lipides, ce qui leur confère une extrême hydrophobicité et une haute résistance aux agents chimiques [9-11] (Figure 3). La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique principalement composée de phospholipides et de protéines, elle est semblable à celle d'autres bactéries [7]. Un espace périplasmique sépare cette membrane plasmique de la paroi mycobactérienne, constituée d'un réseau complexe de peptidoglycane auquel s'attachent des Phosphatidyl Inositol Mannosides, arabinogalactanes et LipoArabinoMannan [10]. La membrane externe, constituée d'acides mycoliques et de lipides, est appelée "myco-membrane" [12, 13]. La surface hydrophobe que constitue cette couche d'acides mycoliques permet l'ancrage d'autres lipides extractibles après traitement par des solvants organiques. La capsule est composée de différents types de polysaccharides (glucanes, arabinanes et arabinomannanes) ainsi que de protéines [14].

La paroi des mycobactéries rend les échanges de nutriments difficiles et une croissance moins rapide que d'autres espèces. Sa fonction première en tant que barrière face à son environnement rend l'accessibilité des antibiotiques à leur cibles potentielles ainsi que l'altération par les mécanismes de défenses de l'hôte difficiles [15]. L'abondance de lipides, tant dans la quantité que dans la qualité, est spécifique de la paroi des mycobactéries [16].

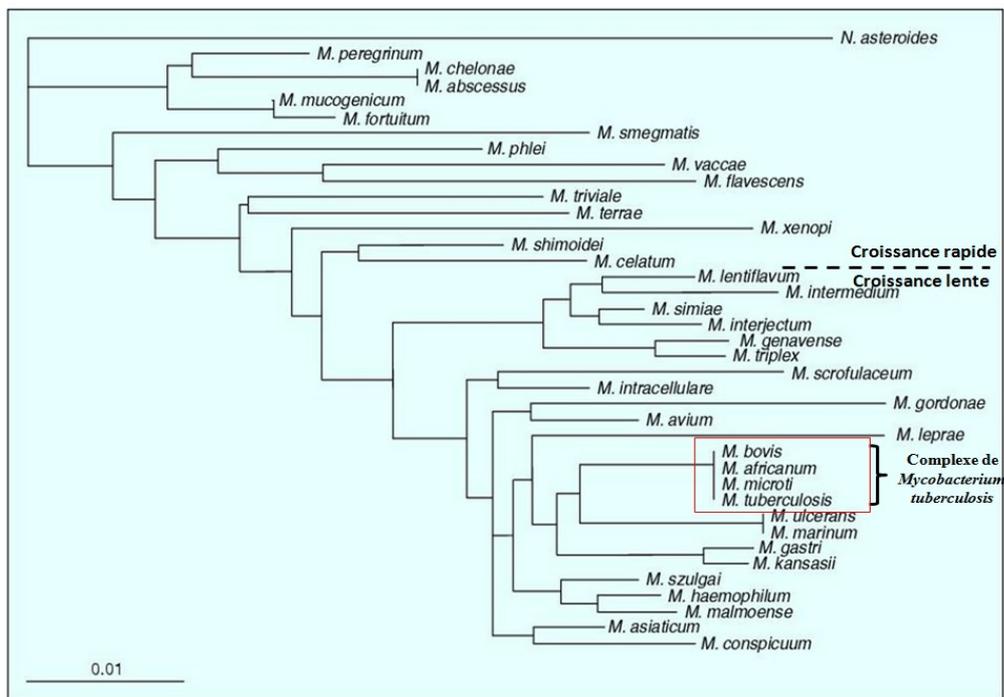
Le rôle des lipides et glycolipides de la paroi mycobactérienne a fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs dizaines d'années. Ces constituants sont mis en cause dans l'induction de lésions granulomateuses chez la souris et chez l'Homme, ainsi que dans des effets toxiques pour l'hôte, des mécanismes d'échappement au système immunitaire ou de tropisme pour certains types cellulaires [17-21]. Ils jouent un rôle primordial à l'interface hôte / pathogène dans les différentes étapes du processus d'infection. Certains composés sont directement impliqués dans la reconnaissance et l'activation des cellules de l'immunité innée, via les "Pathogen-Associated Molecular Patterns" (PAMP) présents à la surface du bacille et reconnus par les "Pattern Recognition receptors" (PRR).



**Figure 4: Répartition géographique des cas de lèpre et d'ulcère de Buruli.**

**A. La lèpre dans le monde.** A l'observation des nouveaux cas de lèpre en 2003 dans les pays surveillés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on constate qu'ils sont majoritairement situés dans les pays au climat tropical et ceci en lien avec des conditions socio-économiques difficiles. La situation du Brésil et de l'Inde sont toujours préoccupantes [22].

**B. L'ulcère de Buruli dans le monde.** Les pays ayant recensé des cas d'ulcère de Buruli (■) en 2001 dans les pays surveillés par l'OMS. Comme pour la lèpre, on constate que les pays au climat chaud, voire tropical, sont les plus touchés, de façon plus indépendante vis à vis du développement économique du pays [22].



**Figure 5: Arbre phylogénétique des espèces du genre *Mycobacterium*.**

Alignement multiple des séquences de gènes des principales mycobactéries permettant de diviser le genre *Mycobacterium* en deux parties corrélées à la vitesse de croissance rapide ou lente [23].

Des lipoprotéines, le LipoArabinoMannan et son précurseur le LipoMannan, les Phosphatidyl Inositol Mannosides et le Thréhalose Di-Mycolate sont entre autres impliqués dans cette reconnaissance (voir paragraphe B.3.).

### 3. Plusieurs pathogènes majeurs

#### 3.1. *M. leprae* et *M. ulcerans*

Les mycobactéries à croissance lente on distingue d'importants pathogènes en santé publique, comme *M. leprae* et *M. ulcerans* [24] responsables respectivement de la lèpre (aussi appelée la maladie de Hansen) et l'ulcère de Buruli (aussi appelé Mbasu) [25, 26].

*M. leprae* a été mis en évidence en 1873 par le médecin norvégien Hansen. La lèpre touche les nerfs périphériques, la peau et les muqueuses, et provoque des infirmités sévères. Elle est endémique dans certains pays (Figure 4A). Près de 182000 personnes, résidant principalement en Asie et en Afrique, étaient infectées au début de 2012 [22].

*M. ulcerans*, décrit en 1897 en Ouganda par Sir Cook, provoque l'ulcère de Buruli. C'est une infection nécrosante des tissus survenant surtout aux membres inférieurs par une petite plaie infectée. Elle se présente sous plusieurs formes suivant son degré d'évolution: nodules, plaques ou ulcères ouverts. Cette maladie est présente surtout dans les régions tropicales (Figure 4B). Chaque année entre 5000 et 6000 cas sont notifiés [22].

D'autres mycobactéries à croissance lente peuvent aussi infecter l'Homme, entre autres *M. avium*, pathogène opportuniste des patients infectés par le VIH et touchant principalement le système digestif ou *M. marinum*, responsable d'infections cutanées.

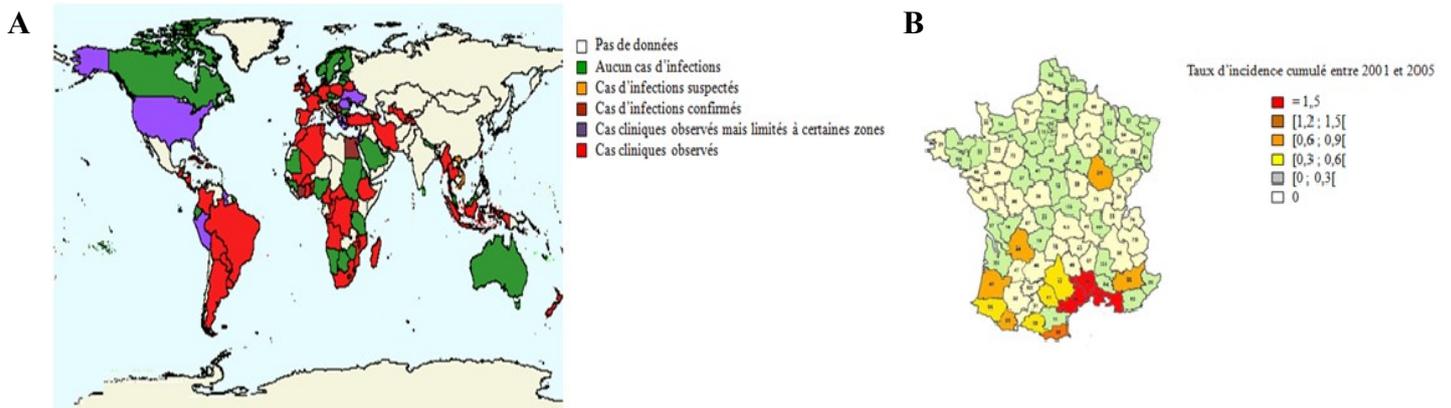
#### 3.2 Le complexe de *M. tuberculosis*

Les pathogènes les plus importants en nombre de cas dans le monde, font partie du complexe de *M. tuberculosis* (Mtb) (Figure 5) comprenant des espèces qui ont 99,95% de similitude au niveau de leur séquence d'ADN [27-29] et 100% de similitude dans leur séquence d'ARN ribosomal 16S [30]. Le complexe de Mtb comprend plusieurs mycobactéries pouvant infecter l'Homme : Mtb, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* [31, 32]. *M. canettii* est une mycobactérie tuberculeuse rare présentant des colonies de phénotype lisse et un polymorphisme au niveau des gènes de ménage contrairement aux autres membres du complexe de Mtb [1].



**Figure 6: Colonies de Mtb sur milieu solide.**

Les colonies de Mtb sont dénombrables après deux à trois semaines de culture sur milieu solide après incubation à 37°C. Ce sont des colonies petites, opaques et de couleur beige-jaunâtre, rugueuses et avec un aspect "verru" ou de "champignon" [33].



**Figure 7: Incidence de la TB bovine.**

**A. Dans le monde.** Les nouveaux cas de TB bovine dans les pays surveillés par l'organisation mondiale de la santé animale en 2005 sont majoritairement situés en Amérique de Sud, Afrique et Asie du Sud Est. Mais les pays de l'ouest de l'Europe, dont la France, ne sont pas épargnés [34].

**B. En France.** La localisation géographique des départements dont le taux d'incidence cumulé entre 2001 et 2005 est importante, se retrouve principalement dans le Sud Ouest et le Sud Est de la France [35].

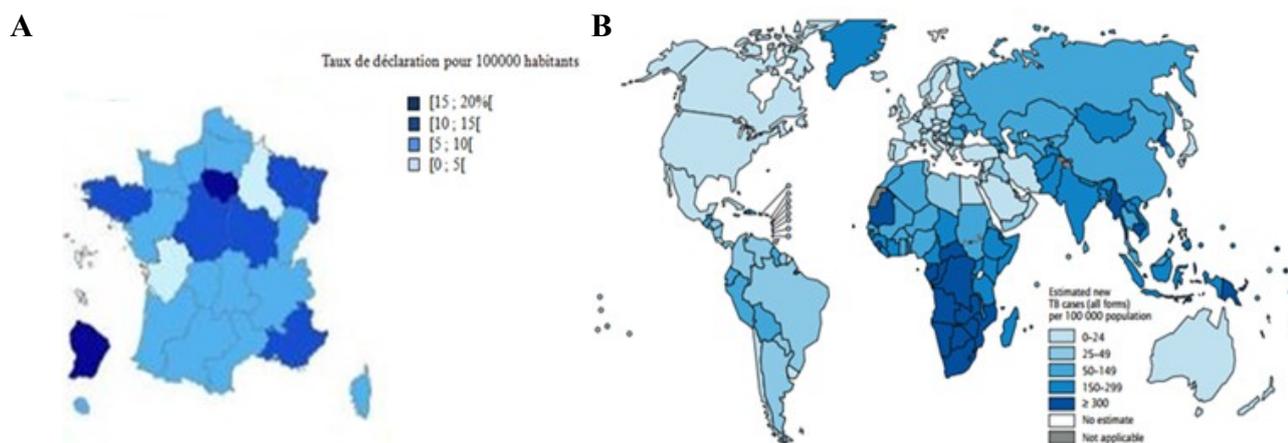
L'épidémie mondiale de TB est due à *Mtb*. Plusieurs souches de *Mtb* sont responsables de la transmission interhumaine, notamment la souche de génotype Beijing. Les colonies de *Mtb* sont petites, de couleur beige-jaunâtre et semblent rugueuses et friables [36] (Figure 6).

*M. bovis* est responsable de la TB bovine, une épizootie pouvant être endémique dans certaines régions (Figure 7A). Au total environ 24% des cheptels vivent dans des régions où la TB bovine n'est pas totalement contrôlée et il en est de même pour 60% des populations humaines [37]. En France, après 43 ans de lutte obligatoire via des programmes d'éradication de la maladie, le bilan épidémiologique est positif au vu de l'évolution des prévalences annuelles [38]. La fréquence de la maladie étant de plus en plus faible, cela a permis à la France d'obtenir le statut "officiellement indemne de TB bovine" par l'Union Européenne en 2000. Néanmoins, la Direction Générale de l'Alimentation, qui suit les cas de TB bovine au niveau départemental, constate que si les données nationales ne montrent pas d'anomalies, au niveau régional, des disparités apparaissent (Figure 7B). L'augmentation significative du nombre de cas dans certaines régions pourrait mettre en péril le statut de la France et apporter des difficultés pour les échanges commerciaux.

Les bovins représentent le réservoir primaire de l'infection, cependant, des animaux de la faune sauvage (notamment sangliers, blaireaux et cerfs) peuvent également contracter l'infection. Ils constituent ainsi un réservoir secondaire de la maladie, et sont susceptibles de contaminer à leur tour les élevages. Cela peut même conduire à la création d'un réservoir primaire comme avec les blaireaux en Grande Bretagne [39-42] et en Irlande [43]. En France, le statut de la faune sauvage est surveillé.

La TB bovine est une maladie à déclaration obligatoire listée dans le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'organisation mondiale de la santé animale. La réglementation européenne impose une surveillance de cette maladie, à la fois dans les élevages et dans les abattoirs.

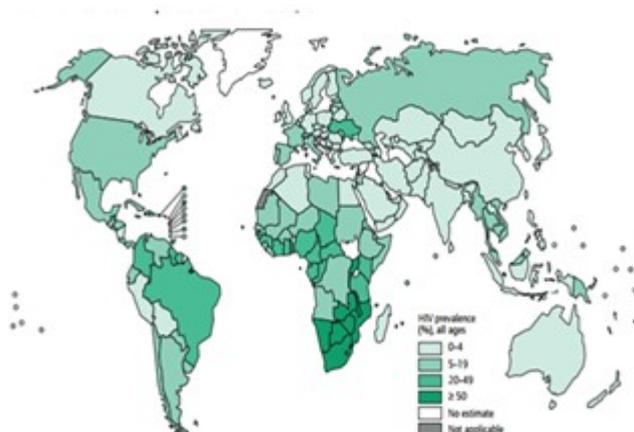
L'infection de l'Homme par *M. bovis* peut se produire par inhalation ou consommation du lait contaminé [44], on parle alors de zoonose [45]. En France, où la pasteurisation du lait est répandue, seulement 38 cas de TB humaine due à *M. bovis* ont été recensés en 1995, soit 0,5% des 7075 cas de TB la même année [46]. La TB humaine à *M. bovis* est identique à celle due à *Mtb*. La transmission respiratoire interhumaine de la TB à *M. bovis* est rare.



**Figure 8: Incidence de la TB.**

**A. En France.** En 2009, malgré la baisse récente des cas de TB constatée au niveau national, l'incidence reste élevée en Île-de-France (15,8 cas pour 100000 habitants), en particulier en Seine-Saint-Denis (93) et à Paris (75); ainsi qu'en Guyane (973) (23,9 cas pour 100000 habitants) [47].

**B. Dans le monde.** Les nouveaux cas de TB dans les pays surveillés par l'OMS en 2011 sont majoritairement situés en Afrique et en Asie, des pays en voie de développement. De nombreux nouveaux cas sont situés en Inde et en Chine en lien avec la densité de la population [48].



**Figure 9: Le problème de co-infection Mtb / Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).**

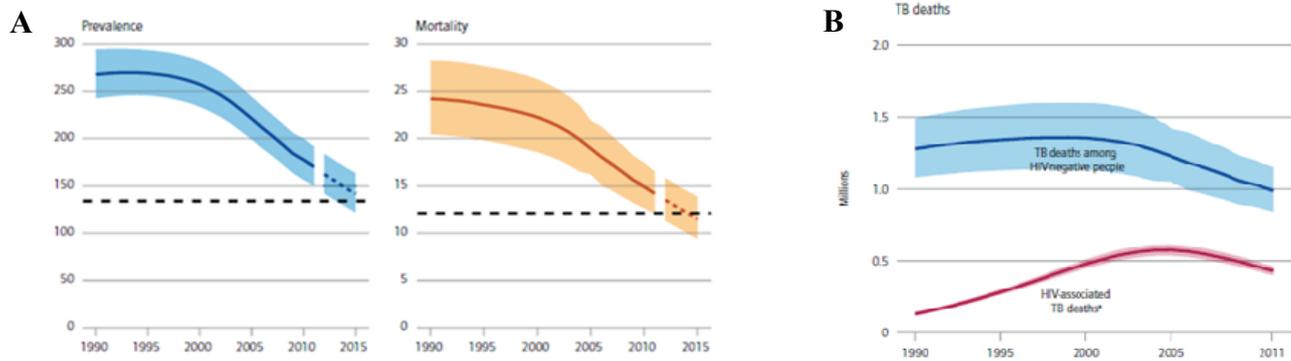
Les cas de co-infection Mtb / VIH dans les pays surveillés par l'OMS en 2011 sont majoritairement situés sur le continent Africain avec une localisation importante en Afrique du Sud [48].

#### 4. Un problème majeur en santé publique

La TB a été reconnue comme problème majeur de santé publique à partir de la révolution industrielle. Au XVIII<sup>ème</sup> et XIX<sup>ème</sup> siècles, elle était responsable de 25% des décès dans les grandes villes européennes. L'incidence de cette maladie a considérablement régressé dans les pays industrialisés à partir des années 1950 grâce à l'amélioration des conditions de vie et à la découverte d'antibiotiques. La diminution des cas de TB est de l'ordre de 5% par an, en France comme dans la majorité des pays développés. Mais depuis les années 1985 la décroissance du nombre de cas de TB a été inversée et aujourd'hui, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté avec 8,4 millions de nouveaux cas et 1,7 millions de décès par an [22, 49]. En France, selon le bilan de l'institut de veille sanitaire de 2009, une légère baisse des cas est observée après plusieurs années de recrudescence (5% en 2007) (Figure 8A). Dans les pays en voie de développement les causes sont multiples, comme les mauvaises conditions socio-économiques et sanitaires [50, 51]. En effet 22 pays totalisent à eux seuls 80% des cas mondiaux [52] (Figure 8B).

Le problème de la TB en Afrique subsaharienne est surtout une conséquence de la co-infection avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) [53, 54]. En effet, on dénote un pourcentage important du VIH dans les nouveaux cas de patients atteints par la TB, particulièrement en Afrique du Sud où cette co-infection est très préoccupante (Figure 9). L'immunodéficience induite par le VIH augmente considérablement la proportion d'individus développant la forme active de la maladie jusqu'aux formes les plus graves, tel que la TB extra-pulmonaire [55-57]. Le développement de l'infection par *Mtb* fragilise aussi l'hôte et accélère la progression vers le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) [58].

D'après le rapport de l'OMS de 2012 [48], l'objectif consistant à réduire de moitié et à commencer à inverser la progression de l'épidémie de TB d'ici à 2015 a été atteint. Aujourd'hui, 20 millions de personnes seraient en vie grâce à la vaccination et aux traitements antituberculeux [48]. La mortalité et le nombre de nouveaux cas de TB sont en diminution depuis plusieurs années et ont chuté respectivement de 41% depuis 1990 et 2,2% depuis 2010 [22] (Figure 10A). Les taux de mortalité et d'incidence sont aussi en baisse dans les 22 pays les plus fortement touchés (regroupant 80% des cas de TB). Ces résultats ont été obtenus par l'investissement des dirigeants des pays endémiques et grâce à une aide internationale. Cependant, l'OMS avertit que la lutte contre la maladie dans le monde reste fragile.



**Figure 10: Taux de prévalence et de mortalité dus à la TB.**

**A. Tendence de la prévalence et de la mortalité des cas de TB.** La prévalence pour une population de 100000 habitants estimée entre 1990 et 2011, puis de 2012 à 2015 une projection des taux en considérant une décroissance continue dans les prochaines années. La ligne noire horizontale en pointillés représente les objectifs du programme "Stop TB", soit une diminution de la prévalence et de la mortalité de 50% par rapport aux années 1990 [48].

**B. Mortalité estimée de la TB.** Bien que la mortalité (en millions d'individus) entre 1990 et 2011 diminue chez les individus VIH négatif, la mortalité chez les individus VIH positif est à un seuil préoccupant [48].

La TB reste l'une des trois maladies infectieuses les plus mortelles aujourd'hui avec le paludisme et le SIDA. La diminution de mortalité chez les individus co-infectés par Mtb et le VIH reste faible (Figure 10B). Tout ceci implique de maintenir et d'amplifier les stratégies de lutte contre l'épidémie.

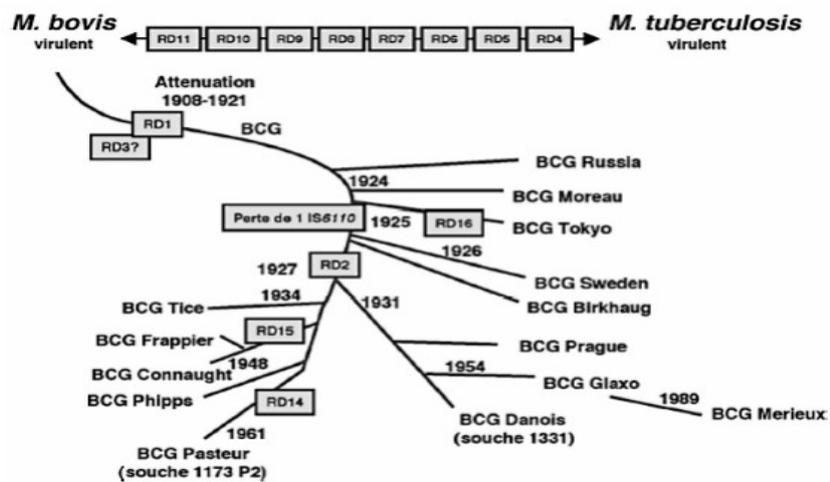
## 5. Stratégies de lutte contre la TB

### 5.1. Vaccination anti tuberculeuse

#### 5.1.1. Bacille bilié de Calmette et Guérin (BCG)

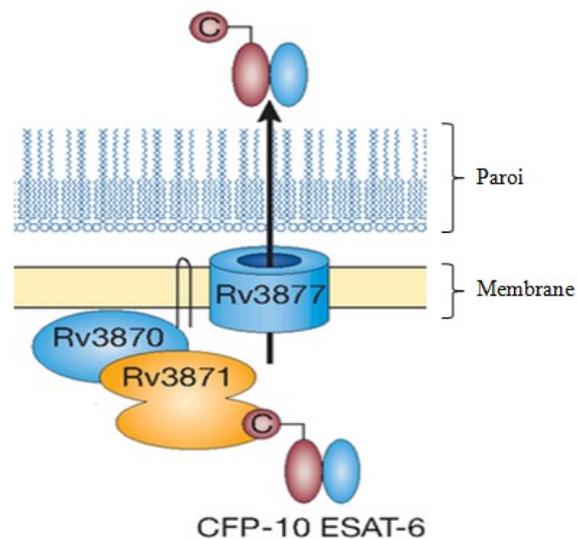
Calmette et Guérin entament des recherches sur la TB en 1900. La majorité des cas de TB se contracte non par l'introduction des bacilles dans les voies aériennes mais par leur ingestion. Le vétérinaire et microbiologiste français Nocard leur fournit un échantillon de lait d'une vache tuberculeuse en 1902, le "Lait Nocard" [59]. Afin de rendre émulsifiable une culture glycinée de la souche Nocard, ils y ajoutent de la bile de bœuf. Calmette et Guérin cultivent ainsi leur souche sur pomme de terre immergée dans de la bile de bœuf stérile durant 230 passages entre 1908 et 1921 [60]. Ils observent une modification de la morphologie du bacille et dès 1912 leur souche initiale devient inoffensive pour le bovin. Puis durant les années suivantes, ils constatent une perte de virulence dans différents modèles animaux [61]. Le bacille ainsi atténué est alors appelé Bacille bilié de Calmette et Guérin (BCG). En 1913, la vaccination par voie orale avec le BCG, protège un veau contre l'infection tuberculeuse.

Sous la pression des autorités publiques, la première immunisation chez l'Homme est pratiquée en 1920 par voie intraveineuse sur un homme adulte et en montre l'innocuité [62]. Puis en 1921, un nouveau-né est vacciné par voie orale. La mère du nouveau-né est morte de la TB quelques heures après l'accouchement et il est appelé à vivre dans un milieu contaminé. L'enfant est protégé contre la TB durant une période d'observation de six mois. Après une période d'observation attentive des premiers sujets, qui bien qu'en contact avec la TB ne développent pas la maladie [63, 64], les campagnes de vaccination commencent. A partir de 1924, Calmette distribue sa souche à de nombreux instituts dans le monde qui préparent le vaccin suivant la même méthode, donnant ainsi naissance à de multiples souches "filles". A Lübeck (Allemagne) en 1931, 72 enfants meurent après avoir reçu un vaccin contaminé par une souche virulente de Mtb. Cette épisode tragique de l'accident de Lübeck jette le discrédit sur le BCG jusqu'en 1940 où à et la fin du procès le BCG est réhabilité.



**Figure 11: Généalogie des différentes souches de BCG.**

Cette classification est basée sur la date de distribution des multiples souches issues de la culture primaire de *M. bovis* BCG et leurs caractéristiques génomiques [65, 66].



**Figure 12: Système de sécrétion de ESAT6 et CFP10 codé par la région RD1 de Mtb**

L'appareil de sécrétion de type III permet la sécrétion d'ESAT-6 et CFP-10. Le domaine C terminal de CFP-10 est reconnu par Rv3871 qui interagit avec Rv3870, un composé de l'appareil de sécrétion inséré dans la membrane de Mtb. CFP-10 et ESAT-6 peuvent traverser la membrane via Rv3877 [67].

Les campagnes de vaccination s'étendent en France et en Europe, mais tous les pays n'adoptent pas la vaccination au BCG. Les USA, le Royaume-Uni ou les Pays-Bas par exemple choisissent de ne pas utiliser ce vaccin.

De nos jours, étant donnée la faible incidence de la TB dans les pays développés, de nombreux pays occidentaux ont arrêté la vaccination systématique mais ciblent les populations à risque. En France, l'obligation de vaccination par le BCG chez l'enfant et l'adolescent a été suspendue officiellement en 2007 (décret n° 2007-1111 du 17 juillet 2007), au profit d'une recommandation de vaccination d'une population à risque plus ciblée [68].

Aujourd'hui, plus de 80 ans depuis le début de son utilisation, le BCG est l'un des vaccins les plus utilisés dans le monde, avec plus de trois milliards de doses administrées [69]. Ce vaccin a de nombreux avantages: protection importante contre les formes infantiles disséminées, injection d'une dose unique, peu coûteux et sans effets secondaires majeurs chez l'individu immunocompétent [70, 71].

Avec les moyens techniques actuels, nous savons que l'atténuation du BCG est due à la perte d'une région génomique de 9,5kb, nommée la Région de Délétion 1 (RD1) [72]. Les différentes souches de BCG obtenues après la distribution de la souche d'origine sont toutes délétées de cette région. Ces différentes souches de BCG peuvent être divisées en deux classes suivant leur date d'obtention: les souches précoces obtenues entre 1924 et 1926 et les souches tardives obtenues après 1931. Cette classification repose sur de nombreuses différences génomiques (Figure 11). De plus la délétion de cette région RD1 chez *Mtb* virulent engendre son atténuation [73], qui suggère donc son rôle de mutation d'atténuation originale [74]. RD1 code un appareil de sécrétion de type VII, permettant la sécrétion de deux protéines, "Early Secreted Antigenic Target 6" (ESAT-6) et "Culture Filtrate Protein 10" (CFP-10), nécessaires à la virulence de *Mtb* mais aussi inductrices fortes de sécrétion d'Interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) par les lymphocytes T (LcT) de sujets infectés par *Mtb* (Figure 12) [75].

### 5.1.2. L'efficacité controversée du BCG

Aujourd'hui l'efficacité du BCG est controversée, les taux de protection reportées variant de 0 à 80% selon les études [76, 77]. Il ressort de ces études que le BCG protège à 80% contre les formes disséminées et méningées de la TB, particulièrement fréquentes et graves chez les jeunes enfants [78, 79]. Par contre chez le jeune adulte la protection contre la forme pulmonaire est estimée au mieux à 50%.



Plusieurs raisons sont proposées pour expliquer la grande disparité des résultats. Tout d'abord il est à noter que différentes préparations vaccinales et souches de BCG ont été utilisées dans les études chez l'Homme. Néanmoins, l'efficacité du BCG n'a pu être reliée à un type de souche à ce jour [80].

D'autre part certaines études montrent une diminution de protection au cours du temps. Cependant, les observations sont contradictoires; la protection apportée par le BCG pouvant être perdue seulement dix ans après la vaccination [81] ou maintenue 60 ans après [82].

L'efficacité du BCG semble corrélée à des paramètres variables de l'hôte et / ou de l'environnement [83]. Une méta-analyse menée sur l'efficacité du BCG a montré que la zone géographique pouvait expliquer plus de 41% de l'hétérogénéité protectrice du BCG [78]. Cette étude reflète la plus grande présence des mycobactéries environnementales dans les régions tropicales [84]. Il est donc proposé qu'une pré-exposition à des mycobactéries de l'environnement interfère avec la protection induite par le vaccin. Cela soit en induisant une protection partielle masquant l'effet protecteur du BCG, soit en stimulant l'immunité cellulaire envers des Ag communs aux différentes mycobactéries, bloquant ainsi l'efficacité du BCG [85]. Cette hypothèse a été confirmée par une étude sur un modèle murin pré sensibilisé par des mycobactéries de l'environnement causant une inhibition de la multiplication initiale du BCG et réduisant ainsi l'effet protecteur du vaccin contre Mtb [86]. Hormis son efficacité controversée, la vaccination par le BCG souffre d'autres défauts. Etant un vaccin vivant, son inoculation à des nouveaux nés VIH positifs peut entraîner des adénites et même une "bécégite généralisée". Par conséquent elle n'est pas recommandée par l'OMS [22, 87, 88].

De plus, le vaccin BCG n'empêche pas l'infection par Mtb. En 1997, l'OMS attribue l'échec de la lutte mondiale contre la TB à plusieurs raisons et notamment à une "confiance exagérée dans le BCG" [89].

### 5.1.3. Développement de nouveaux vaccins antituberculeux

Un nouveau candidat vaccin contre la TB devra protéger contre la forme pulmonaire rencontrée principalement chez l'adulte, quelle que soit la zone géographique et être dénué d'effets secondaires pour pouvoir être administré aux individus VIH positifs. Il devra également conserver tous les avantages du BCG actuel, c'est à dire l'efficacité contre les formes disséminées infantiles, être peu coûteux et facile à administrer. Les efforts de la

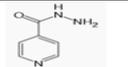
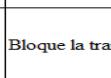
**Tableau 1: Quelques nouveaux candidats vaccins.**

Des nouveaux candidats vaccins pour protéger contre la TB actuellement en essai clinique de phase II ou III [90].

	Vaccin	Status	Stratégie	Description
Vaccin vivant recombinant	VPM1002	Phase IIa	Prime	rBCG exprimant la listeriolysin de <i>Listeria monocytogenes</i>
Vaccin sous unitaire	M72 / AS01	Phase IIb	Prime-boost	Antigènes Rv1196 et Rv0125
	Hybrid1 + IC31	Phase IIa	Prime-boost	Antigènes Ag85B et ESAT-6
	Hybrid 56 + IC31	Phase IIa	Prime-boost	Antigènes Ag85B, ESAT-6 et Rv2660c
	Hybrid 4 + IC31 / AERAS-404	Phase IIa	Prime-boost	Antigènes Ag85B et TB10.4
Vaccin vecteurs viraux	MVA85A / AERAS-485	Phase IIb	Prime-boost	Virus Ankara exprimant l'Ag85A de Mtb
	Crucell Ad35 / AERAS 402	Phase IIb	Prime-boost	Adénovirus exprimant les antigènes 85A, 85B et TB10.4 de Mtb
Vaccin tué	<i>M. vaccae</i>	Phase III terminée	Immuno thérapeutique	<i>M. vaccae</i> tué par la chaleur
	<i>M. indicus pranii</i>	Phase III	Immuno thérapeutique	Toute la mycobactéries <i>M. indicus pranii</i>
	RUTI	Phase IIa	Immuno thérapeutique	Membranes de Mtb fragmenté

**Tableau 2: Structure et fonction des antibiotiques utilisés contre la tuberculose.**

Après la découverte en 1943 de la streptomycine, d'autres antibiotiques permettant de lutter contre la TB ont été développés. L'utilisation simultanée de plusieurs antibiotiques de première ligne, permet de diminuer le développement de pharmaco-résistances.

	Nom commun	Abréviation	Formule chimique	Activité
Antibiotiques de première ligne	Isoniazide	INH		Inhibition de la synthèse des acides mycoliques
	Pyrazinamide	PZA		Réduction du pH intracellulaire, perturbation du transport membranaire
	Rifampicine	RIF		Bloque la transcription par la liaison à l'ARN-polymérase bactérienne
	Ethambutol	EMB		Inhibition de la synthèse de l'arabinogalactane
	Streptomycine	SM		Inhibition de la synthèse protéique
Antibiotiques de seconde ligne	Ethionamide	ETH		Perturbation dans la synthèse des acides mycoliques
	D-cyclosérine	DCS		Inhibition des étapes précoces de la synthèse de la paroi
	Acide para-aminosalicylique	PAS		Inhibition de la formation de mycobactine
	Thioacetazone	T		Inhibition de la synthèse d'arabinogalactane
	Kanamycine	KAN		Inhibition de la synthèse protéique
	Amikacine	AMI		Inhibition de la synthèse protéique
	Fluoroquinolone	FQ		Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien
Antibiotiques pour les souches MDR-TB	Rifabutine			Inhibition de la synthèse protéique par fixation au ribosome
	Aminoside			Perturbation de la traduction des ARN bactériens
	Bedaquiline			Inhibition de la réplication de l'ADN bactérien

recherche des 10 dernières années ont ouvert la voie au développement de nouvelles stratégies vaccinales. Ainsi ont pu être développés des vaccins protéiques administrés avec adjuvants, des souches de mycobactéries recombinantes, ou encore des vecteurs vaccinaux d'origine virale ou bactérienne exprimant des gènes codant des Ag mycobactériens (Tableau 1) [91-94]. Deux stratégies vaccinales sont développées, une immunisation primaire avec le BCG puis rappel avec un vaccin sous-unitaire ou vecteur viral ("prime-boost") ou le remplacement du BCG par un vaccin vivant recombinant plus efficace.

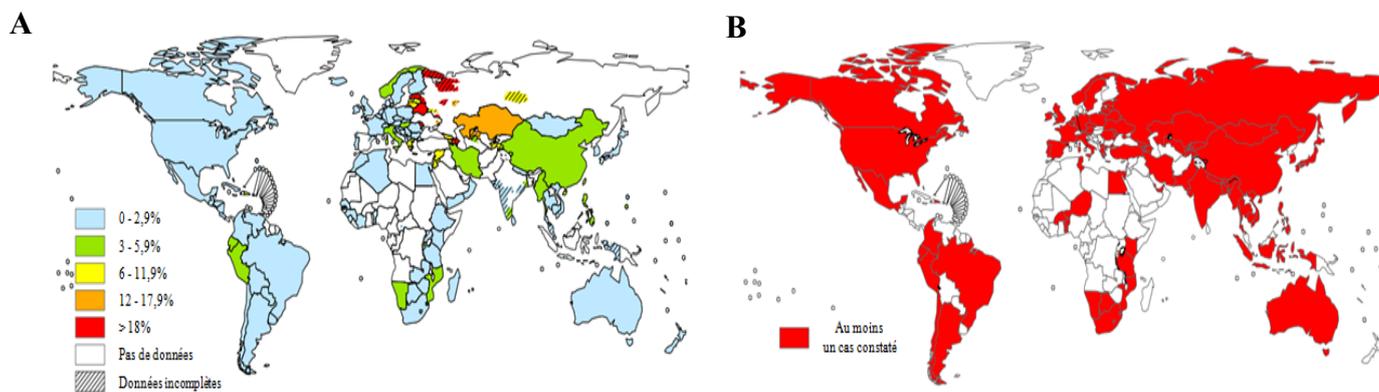
## 5.2. Traitement

### 5.2.1. Les antibiotiques anti-tuberculeux

Les antibiotiques dits de première intention sont l'isoniazide, la pyrazinamide [95, 96], la rifampicine [97], la streptomycine [98] et l'éthambutol [99]. L'éthionamide, la D-cyclosérine, l'acide para-aminosalicylique, la thioacetazone, la kanamycine, l'amikacine et les fluoroquinolones sont utilisés en seconde intention pour traiter les infections causées par des souches résistantes aux antibiotiques de première intention (Tableau 2). La rifabutine et les aminosides sont indiquées dans le traitement des TB multi résistantes (notamment en cas de résistance à la rifampicine) [100]. De plus, la rifabutine interagit moins avec les traitements du VIH et est donc principalement utilisée dans le traitement de la TB chez les sujets infectés par le VIH [100].

L'OMS conseille le recours à la stratégie de traitement "Directly Observed Treatment Short-Course" dès l'observation de la maladie. La conduite rapide d'un régime antituberculeux utilise une phase de deux mois de traitement journalier avec quatre antibiotiques de première intention. Ce régime est suivi d'une thérapie journalière par l'isoniazide plus un des autres antibiotiques de première intention pendant les quatre mois suivants. Un traitement antibiotique réussi donne une conversion d'un crachat positif vers une culture négative en deux mois.

Les traitements antituberculeux sont longs, chers et ont de nombreux effets secondaires indésirables, telles que des atteintes hépatiques, rénales ou du nerf optique, ainsi qu'une augmentation du taux d'acide urique dans le sang. La durée et les effets secondaires du traitement peuvent être responsable d'un manque de suivi du traitement par les patients et ainsi favoriser l'émergence de pharmaco-résistances.



**Figure 13: Incidence des souches résistantes aux antibiotiques.**

**A. Souches Multi-Drug resistant (MDR).** Proportion des souches MDR parmi les nouveaux cas de TB entre 1994 et 2010 dans les pays surveillés par l'OMS [22].

**B. Souches extensive-Drug Resistant (XDR).** Pays ayant reporté au moins un cas TB dû à une souche de Mtb XDR, situation au mois d'octobre 2011 [22].

### 5.2.2. Le développement de résistances aux antibiotiques

Au cours d'épidémies de TB à *Mtb* ou *M. bovis*, survenues dans les pays développés chez des sujets atteints par le VIH, des multi résistances ont été observées [101-103]. Ceci a permis d'attirer l'attention des instances internationales sur ces souches de *Mtb*. Un programme de surveillance de la résistance aux antituberculeux a ainsi été initié sous couvert de l'OMS et de l'Union Internationale Contre la TB et les Maladies Respiratoires [104].

Ces souches dites "Multi-Drug Resistant" (MDR) sont définies comme résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine; les souches dites "eXtensive-Drug Resistant" (XDR) sont résistantes au moins à l'isoniazide et la rifampicine plus à n'importe quelle fluoroquinolone et à au moins un des autres antibiotiques de seconde intention [22].

Actuellement une augmentation de la circulation de souches de *Mtb* résistantes aux antibiotiques est observée [100]. Environ un demi-million de nouveaux cas d'infection par *Mtb* chaque année présentent des résistances aux antibiotiques. La proportion peut atteindre plus de 20% des nouveaux cas, notamment dans certaines régions de Russie [105] (Figure 13). En outre, certains patients séropositifs pour le VIH présentent un risque plus élevé de développer des résistances aux antibiotiques, probablement à cause d'un problème d'absorption de la rifampicine chez ces patients [106, 107].

Récemment, le cas de patients porteurs d'une souche de *Mtb* "Totally-Drug Resistant" (TDR), c'est à dire résistantes à tous les antibiotiques de première et seconde intention a été rapportée [108].

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles molécules. Au début de l'année 2013, la "Food and Drug Administration" a autorisé la mise sur le marché d'un nouvel antibiotique, la bedaquiline, pour le traitement des souches Multi-Drug Resistant [109].

### 5.3. Diagnostic

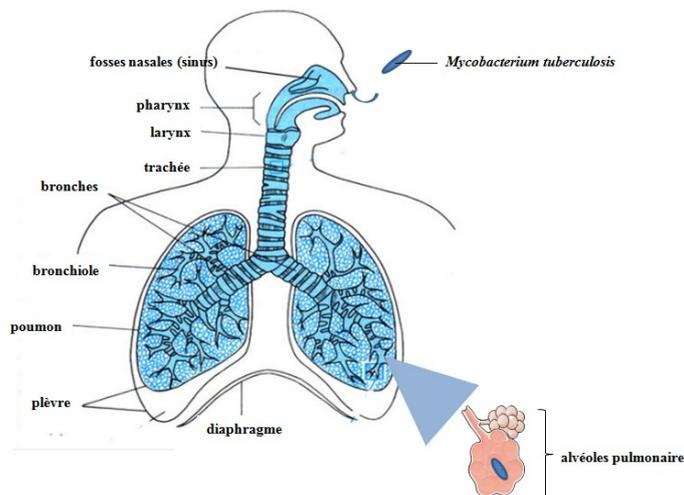
Le dépistage de l'infection tuberculeuse latente est majoritairement basé sur l'IntraDermoRéaction (IDR) à la tuberculine, un dérivé protéique purifié à partir de filtrats de cultures de *Mtb* concentrés et stérilisés. Ce mélange est mal défini et contient de nombreux Ag communs entre *Mtb* et la souche vaccinale BCG ou les mycobactéries de l'environnement. Le test est réalisé sur toute personne ayant eu un contact récent avec un cas de TB, tout adolescent issu de zone de forte incidence ou lors d'immunodépression (VIH, avant mise en route de corticothérapie, greffe ou de traitement anti "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF- $\alpha$ )). Il repose sur la détection au point d'injection d'une réaction d'hypersensibilité retardée,

**Tableau 3: Lecture d'une IntraDermoRéaction (IDR) à la tuberculine.**

L'induration cutanée engendrée suite à l'IDR est lue 72h après l'injection de tuberculine. Suivant l'âge de l'individu et son statut vis à vis de la vaccination au BCG, le résultat est différent [68].

Chez une personne de moins de 15 ans		
Statut vis-à-vis de la vaccination BCG	Taille de l'IDR	Résultat
Si aucune vaccination au BCG	$\geq 5\text{mm}$	Infection tuberculeuse latente
Si vaccination BCG datant de 10 ans ou plus	$\geq 10\text{mm}$	Infection tuberculeuse latente
Si vaccination BCG datant de moins de 10 ans	$\geq 15\text{mm}$	Infection tuberculeuse latente

Chez une personne de plus de 15 ans		
Statut vis-à-vis de la vaccination BCG	Taille de l'IDR	Résultat
Vaccination BCG probablement de 10 ans ou plus	0-4mm	Infection tuberculeuse peu probable
	5-9mm	Réaction probablement due à la vaccination BCG
	10-14mm	Infection tuberculeuse latente probable
	$\geq 15\text{mm}$	Infection tuberculeuse probablement récente

**Figure 14: Schéma de l'appareil respiratoire humain.**

L'appareil respiratoire est l'ensemble des organes permettant les échanges gazeux entre l'organisme et l'environnement. La voie respiratoire supérieure est constituée des fosses nasales puis du pharynx et du larynx. L'appareil respiratoire inférieur est constitué de la trachée puis les bronches et bronchioles, amenant aux alvéoles pulmonaires, lieu des échanges gazeux. Le feuillet pariétal (plèvre) recouvre la loge contenant les poumons. Les MP alvéolaires sont localisés dans les alvéoles pulmonaires [110].

signature d'une infection préalable par le bacille.

Ces tests sont également utilisés pour le suivi des professionnels de santé et de recherche exposés à Mtb. La fiabilité de ce test n'est toutefois pas très bonne (Tableau 3).

Depuis quelques années des alternatives sont proposées. La détection de la production d'IFN- $\gamma$  par test IFN- $\gamma$  Release Assay (IGRA) en réponse aux Ag spécifiques de Mtb et absent de BCG, ESAT-6 et CFP-10. Ce test est appliqué à toute personne présentant des symptômes de TB et aux populations les plus à risque de développer une TB tels que les migrants de pays endémiques récemment arrivés sur le territoire, les professionnels exposés, les détenus ou sans domicile fixe [68].

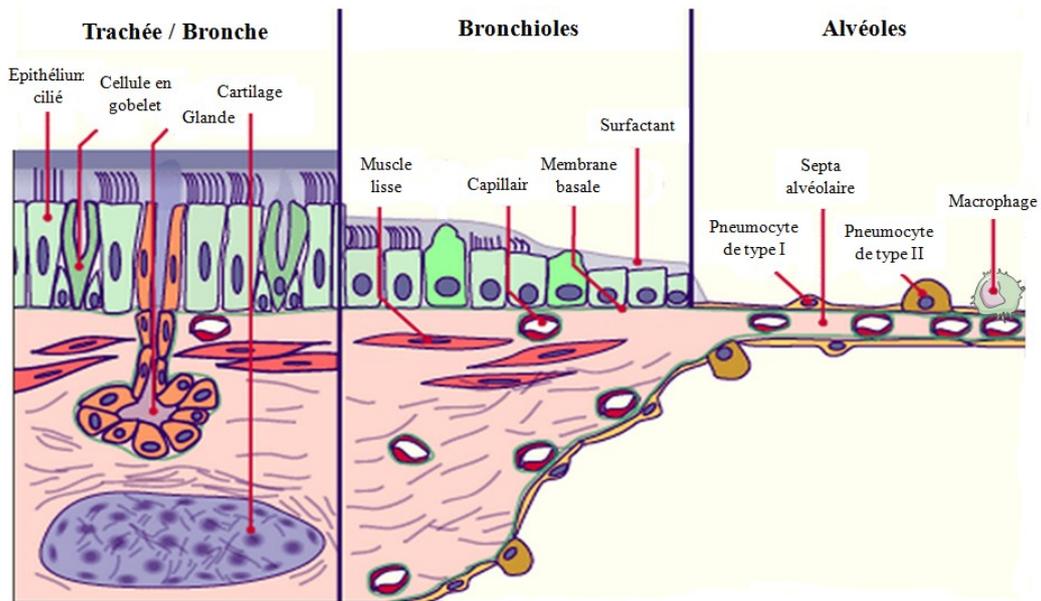
Un autre mode de diagnostic très utilisé est aussi la recherche de la présence de bacilles tuberculeux dans les crachats des patients après coloration ou après culture sur des milieux appropriés.

La TB fait l'objet d'une déclaration obligatoire. Tout cas de TB doit déclencher une enquête pour la recherche des sujets-contacts, afin qu'ils bénéficient d'un test de diagnostic de la TB.

## **B. La TB, infection chronique du poumon**

### **1. Description générale de l'appareil respiratoire**

L'appareil respiratoire présente une vaste surface d'échange avec l'air extérieur. Sa fonction essentielle est d'assurer un échange d'O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> entre le sang des veines et l'air atmosphérique, fonction remplie au niveau des alvéoles pulmonaires. L'air inspiré descend dans la trachée, jusqu'aux bronches, qui se séparent pour pénétrer dans le poumon droit ou gauche. Les bronches elles-mêmes se ramifient en plusieurs bronchioles, qui se divisent en une demi-douzaine de canaux alvéolaires, d'étroits conduits s'ouvrant dans les sacs alvéolaires (Figure 14). La surface alvéolaire est d'environ 75m<sup>2</sup> pour une épaisseur de 4-8 $\mu$ m entre l'espace alvéolaire et la microcirculation. Cette configuration est optimale pour les échanges gazeux mais augmente aussi la vulnérabilité du poumon vis-à-vis des pathogènes, des particules et des gaz toxiques inhalés. Cette exposition constante du tractus respiratoire aux microorganismes nécessite la présence d'un système immunitaire efficace permettant d'initier rapidement la lutte anti-infectieuse. Deux types de réponse immunitaire participent à la protection du poumon: la défense immunitaire innée, non spécifique et la réponse immunitaire acquise ou adaptative, spécifique.



**Figure 15: Représentation comparative des parois des voies aériennes pulmonaires.**

Dans le poumon on distingue les épithélia des voies de conduction de l'air et des voies respiratoires. L'épithélium de la trachée et des bronches est épais présent des glandes séro-muqueuses ainsi que du cartilage. L'épithélium des bronchioles est dépourvu de ces structures et l'épithélium des alvéoles pulmonaires est plus fin afin de permettre les échanges gazeux [111].

## 2. La barrière physique et mécanique

La première ligne de défense du poumon inclue différents mécanismes: la barrière physique, les défenses mécaniques et la réponse des cellules de l'immunité innée présentes constitutivement dans le poumon. Le nez constitue la première barrière physique qui filtre les grosses particules ( $>10\mu\text{m}$ ). La couverture mucociliaire tapissant la surface des voies aériennes contient des mucines capables de piéger les microorganismes. Ces particules sont éliminées mécaniquement par la clairance mucociliaire, les particules de diamètre  $\leq 5\mu\text{m}$  échappent à ces défenses. Mtb est un bacille de 2 à  $10\mu\text{m}$  de long sur 0,3 à  $0,5\mu\text{m}$  de large, il accède donc aux alvéoles pulmonaires.

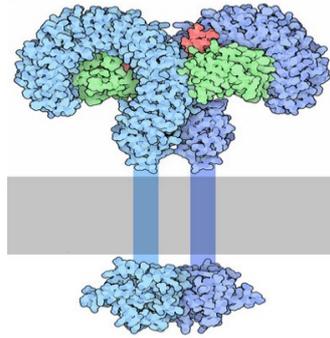
Les épithélia des voies respiratoires ont une organisation différente en fonction des compartiments respiratoires (Figure 15). L'épithélium trachéobronchique est pseudo stratifié et largement composé de cellules ciliées et cellules à mucus. Les bronchioles présentent un épithélium simple avec des cellules ciliées ou non. L'épithélium alvéolaire est composé de pneumocytes de type I, permettant les échanges gazeux, de pneumocytes de types II sécrétant un surfactant. Dans les alvéoles pulmonaires se retrouve les MP, cellules clés dans l'élimination des bacilles tuberculeux (décrit en paragraphe B.4.2.).

Le surfactant, un mélange de phospholipides et protéines qui tapissent les parois des alvéoles. Les collectines "Surfactant Protein" SP-A et SP-D modulent la phagocytose de Mtb par les MP alvéolaires. Des souris déficientes pour ces protéines ont une susceptibilité accrue à l'infection pulmonaire par Mtb [112]. D'autres études montrent que SP-A permet au contraire une meilleure adhésion de Mtb à la paroi de l'alvéole pulmonaire. Des patients VIH positifs présentent une surexpression de SP-A en corrélation avec une charge de bacilles tuberculeux dans leurs Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA) supérieure [113].

Les cellules épithéliales alvéolaires produisent également des défensines. Leur rôle contre Mtb est peu étudié. Une étude récente suggère que les  $\beta$ -défensines ont un rôle protecteur contre Mtb en induisant la maturation des Cellules Dendritiques (CD) contribuant à l'établissement d'une réponse Lymphocyte (Lc) T helper (Th) 1 protectrice [114].

## 3. Les "Pattern-Recognition Receptors" (PRR)

Les PRR ont pour fonction de détecter des motifs répétés et fonctionnels des pathogènes, nommés "Pathogen-Associated Molecular Patterns" (PAMP) et autres signaux de



**Figure 16: Représentation de la structure des Toll Like Receptors (TLR).**

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I comportant: un domaine extracellulaire en forme de fer à cheval, récepteur du signal de danger, riche en leucine. Un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire permettant la transduction du signal d'activation [115].

**Tableau 4: Les TLR et leurs ligands.**

A ce jour, 10 TLR sont décrits chez l'homme et 12 chez la souris. Ils sont majoritairement exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée. Certains ligands ne sont pas encore clairement identifiés, comme pour le TLR10, TLR12 et TLR13 [116].

<sup>a</sup> TLR2 forme des hétéro-dimères avec le TLR1 et le TLR6. <sup>b</sup> TLR présents dans des endosomes.

Recepteur	Ligand	Origine des ligands
TLR1	Triacyl lipopetides	Bactéries Gram -
	Facteurs solubles	Bactéries Gram +
TLR2 <sup>a</sup>	Lipoprotéines et lipopeptides	Bactéries Gram -
	Peptidoglycane	Mycobactéries
	Acide lipoteichoïque	Parasites
	Lipoarabinomannan	Champignons
	Glycoinositolphospholipides	
	Glycolipides	
	Porines	
TLR3 <sup>b</sup>	ARN double brin	Virus
	TLR4	Lipopolysaccharides
TLR4	Taxol	Plantes
	Protéine de fusion	Virus
	Protéine d'enveloppe	
	TLR5	Flagelline
TLR6	Diacyl lipopeptide	Bactéries Gram -
	Acide lipoteichoïque	Mycoplasmes
	Zymosan	Champignons
TLR7 <sup>b</sup>	ARN simple brin	Virus
TLR8 <sup>b</sup>	ARN simple brin	Virus
TLR9 <sup>b</sup>	ADN contenant le motif CpG	Bactéries Gram -
		Bactéries Gram +
		Virus
TLR10		
TLR11	Profiline	Parasites
		Bactéries Uropathogènes
TLR12		
TLR13		

danger [117]. La famille des PRR inclue différents types de récepteurs dont les "Toll-Like Receptors" (TLR), les lectines de type C et les "NOD-Like Receptors" (NLR).

### 3.1. Les "Toll-Like Receptors" (TLR)

Les TLR sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface des cellules de l'immunité innée principalement, à l'exception des TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 qui sont localisés dans les endosomes [118]. Ils ont une forme de fer à cheval, riches en leucine ("Leucine-Rich Repeat") permettant l'interaction avec les PAMP (Figure 16). À ce jour, 10 TLR sont décrits chez l'homme (TLR1 à TLR10), contre 12 chez la souris (TLR1 à TLR13, le TLR10 étant un pseudogène) [119]. Des analyses cristallographiques des ectodomains des TLR ont permis de comprendre les interactions entre les TLR et les PAMP [120]. Ces derniers peuvent être des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques provenant de bactéries, virus, champignons ou parasites [121] (Tableau 4). De plus, la reconnaissance des PAMP par les TLR peut se faire dans différents compartiments cellulaires, dont la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes [121]. Les TLR sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires, comme les polynucléaires neutrophiles (PNN), qui chez l'Homme expriment TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 [122] (voir paragraphe F). Ils peuvent aussi être exprimés par des cellules non immunitaires, telles que les cellules épithéliales [121].

La ligation du TLR entraîne une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription, comme Nuclear Factor-kappa B (NFκB) et à l'expression des gènes codants les cytokines pro-inflammatoires.

### 3.2. Les "NOD Like Receptor" (NLR)

Les TLR reconnaissent les pathogènes soit à la surface membranaire, soit à l'intérieur des lysosomes ou des endosomes. Le système TLR ne peut donc pas être utilisé pour la détection des pathogènes intracytosoliques [121]. A ce jour, deux systèmes détectant les PAMP cytoplasmiques, les NLR et les "RIG-I-Like Receptors".

La famille des NLR comporte plus de 20 membres, répondant aux PAMP ainsi qu'à des signaux de danger, ce qui provoque des réponses pro-inflammatoires [123]. Les NLR ont été découverts récemment, les mieux caractérisés sont NOD1 et NOD2 présents dans les cellules

**Tableau 5: Principaux ligands mycobactériens et leurs PRR associés.**

Les PAMP présents chez les mycobactéries peuvent activer les cellules de l'immunité innée via la reconnaissance par les PRR. Ces récepteurs peuvent se lier aux mycobactéries, voire les internaliser et activer les cellules, afin qu'elles produisent des cytokines et chimiokines [16, 124-126].

Ligands mycobactériens	Pattern Recognition Receptor (PRR)
Glyco/lipo protéines (LpqH, Apa, LprA, LprG...)	Récepteur au mannose
	DC-SIGN
	TLR2/1
	TLR2/6?
Phosphatidyl Inositol Manoside 6	CR3
	Récepteur au mannose
	DC-SIGN
	TLR2/1
LipoMannan	Récepteur au mannose
	DC-SIGN
	TLR2/1
LipoarAbinoMannane	TLR2/1
	CR3
	Récepteur au mannose
	DC-SIGN
Tréhalose DiMycolate	Mincle
	TLR2/1
DiAminoPinelic acide (DAP)-type peptidoglycane	NOD1
Muramyl DiPeptide	NOD2
?	Dectine-1
?	Scavenger receptor

de l'épithélium pulmonaire [127, 128]. NOD1 peut reconnaître le "Diaminopimelic acide (DAP)-type peptidoglycane" [126] et NOD2 le "Muramyl DiPeptide" [125] deux composés présents dans l'enveloppe mycobactérienne (Tableau 5). La transduction du signal via NOD1 et NOD2 aboutit à l'activation de la voie NFκB [129].

### 3.3. Les lectines de type C

Les lectines de type C sont des récepteurs solubles ou membranaires qui possèdent un ou plusieurs domaines de reconnaissance des sucres et de carbohydrates. Les Récepteurs au Mannose, le récepteur au complément 3 (CR3), DC-SIGN, MINCLE et Dectine-1 sont impliqués dans la reconnaissance de Mtb dans le poumon, [130-134] (Tableau 5).

Les polysaccharides présents dans la capsule de Mtb permettent l'adhésion au CR3 [135]. Le "Phenolic Glycolipid 1" (PGL-1) permet aux mycobactéries de rentrer plus efficacement dans les MP via le CR3 ce qui semble lui permettre de persister à l'intérieur du phagosome [136].

Dectine-1 et MINCLE, en synergie avec les TLR2/1 et 4 permettent la production d'une cytokine immunosuppressive par les PNN murins, l'IL-10 (décrit en paragraphe C) [137, 138].

## 4. Les cellules de l'immunité innée pulmonaire

### 4.1. Les cellules épithéliales pulmonaires

Les cellules épithéliales sont parmi les premières en contact avec le bacille dans le poumon. Elles peuvent reconnaître les PAMP grâce à leurs PRR [139, 140], jouant un rôle important dans la réponse immunitaire innée [121, 141] induisant la production de chimiokines et de cytokines qui servent au recrutement et à l'activation des cellules phagocytaires, principalement les PNN et les MP, au site de l'infection [142, 143]. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de bacilles dans des cellules non macrophagiques et notamment des cellules épithéliales [144-146].

Mtb peut traverser l'épithélium pulmonaire par transcytose via l'interaction avec l'"Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin" (HBHA) présent à la surface des cellules épithéliales [147]. Ce mécanisme permet au bacille de disséminer dans l'organisme indépendamment des MP [148].



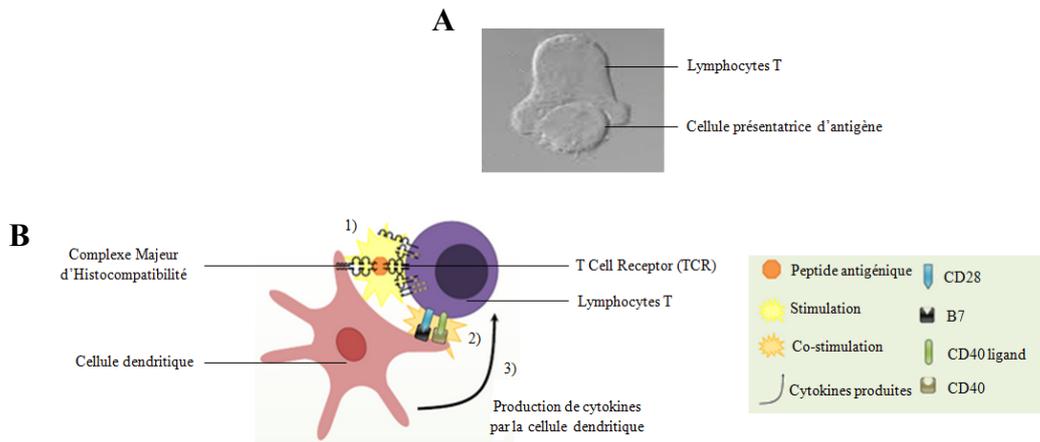
## 4.2. Les macrophages alvéolaires (MP)

Les MP alvéolaires sont des cellules immunitaires résidentes du poumon. Ils ont une durée de vie de plusieurs mois et sont dérivés de monocytes sanguins. Une étape de maturation dans le parenchyme pulmonaire est nécessaire à la différenciation des monocytes sanguins en MP alvéolaires, puis ils peuvent proliférer [149]. Ils sont indispensables à la défense pulmonaire pour garantir la stérilité dans les alvéoles pulmonaires. C'est la première ligne de défense phagocytaire contre les agents pathogènes [150]. L'interaction des ligands de la membrane mycobactérienne avec les PRR permet la phagocytose du bacille. Lorsque le bacille est opsonisé par les molécules du complément la phagocytose se fait via des interactions avec le CR3 [151].

L'élimination des bactéries par les MP dépend de la maturation du phagosome, et de sa fusion avec les lysosomes [152, 153], qui acidifie le milieu pour activer la dégradation des bacilles par les enzymes [154]. Ce mécanisme joue un rôle central dans l'élimination des bacilles dans les alvéoles pulmonaires [155]. Néanmoins les Mtb peut inhiber la maturation du phagosome et empêche ainsi la fusion avec le lysosome par différents mécanismes [156-158]. Le LipoArabinoMannan à coiffe mannosylée purifié inhibe la fusion du phagosome avec le lysosome [159] via un défaut de recrutement de la protéine EEA1 associée aux endosomes est nécessaire à la fusion des deux compartiments [159]. Les Phosphatidyl Inositol Mannoside ont de même un effet inhibiteur de l'acidification du phagosome en stimulant la fusion du phagosome avec les endosomes précoces [160].

Lors de la réponse immunitaire adaptative, la production d'IFN- $\gamma$  par les Lc Th1 active les MP et les arme plus efficacement pour freiner la croissance de Mtb. Une fois activés, les MP produisent des "Nitric Oxide" auxquels les bacilles intracellulaires sont sensibles [161]. Via des réarrangements du cytosquelette d'actine, Mtb empêche l'augmentation de la concentration de Nitric Oxide dans le phagosome [162]. La protéine membranaire OmpA de Mtb est impliquée dans la résistance à l'environnement du phagosome en maintenant l'homéostasie de la mycobactérie [163, 164].

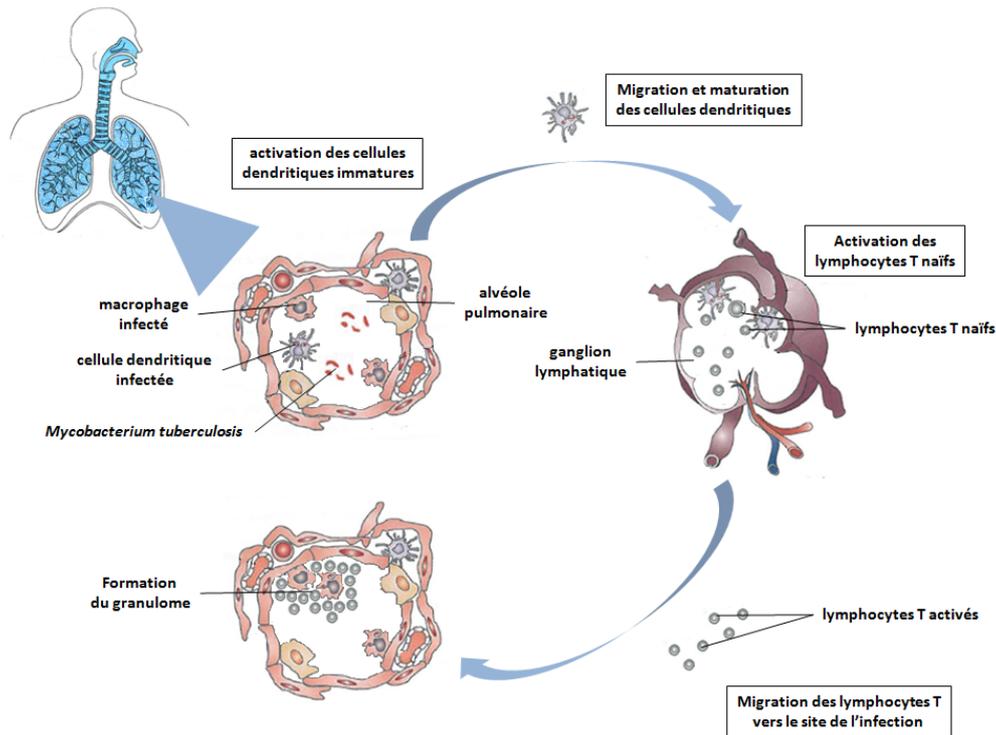
Grâce à leur capacité à aménager le compartiment phagosomal les bacilles peuvent ainsi survivre et se multiplier dans les MP [165], ce qui leur permet d'échapper à la réponse immunitaire innée.



**Figure 17: La synapse immunitaire.**

**A. Liaison entre la cellule présentatrice d'Ag et le LcT.** Photographie au microscope confocal de la présentation d'un Ag par une Cellule Présentatrice d'Antigène à un LcT naïf humain [166, 167].

**B. Schéma de la synapse immunitaire.** Schéma d'interprétation de la communication entre la CD et le LcT naïf. Les trois signaux pour la maturation du LcT naïfs sont: l'interaction entre le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) présentant le peptide antigénique et le récepteur des cellules T, la co-stimulation par l'interaction des molécules de co-stimulation et la production de cytokines par la CD permettant la polarisation du LcT naïf [167].



**Figure 18: Mise en place de la réponse adaptative à médiation cellulaire contre Mtb.**

Les CD immatures au sein des alvéoles pulmonaires ont la capacité de phagocyter tout corps étranger présent dans leur environnement. L'internalisation de Mtb déclenche leur activation, elles perdent alors leur fonction de phagocytose et migrent vers les ganglions lymphatiques drainant. Pendant leur migration, les CD mûrissent. Dans le ganglion lymphatique elles activent les LcT naïfs. Les LcT ainsi activés migrent sur le site de l'infection dans le poumon où ils vont former le granulome mature [168].

### 4.3. Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les PNN sont des cellules sanguines appartenant à la lignée leucocytaire. Ces cellules qui ont un rôle clé dans le système immunitaire seront décrites au paragraphe E.

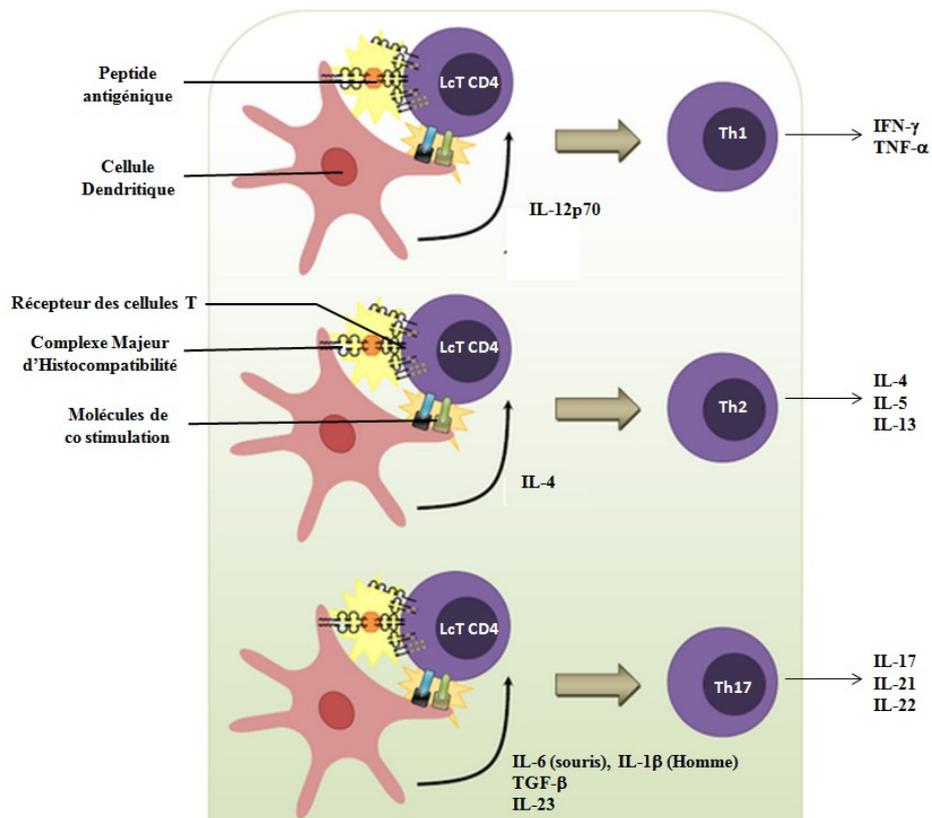
### 5. Les cellules dendritiques (CD) à l'interface entre immunité innée et adaptative

Les CD permettent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles se situent principalement à l'état immature sur les sites en contact avec le milieu extérieur [169]. Contrairement aux autres cellules de l'immunité innée, les CD sont des cellules spécialisées dans l'apprêtement et la présentation d'Ag [170], ce sont des Cellules Présentatrices d'Ag professionnelles et n'ont pas pour fonction d'éliminer les pathogènes. Les CD expriment les protéines CD1, nécessaires à la présentation des Ag lipidiques de Mtb [171].

Les CD immatures localisées dans la muqueuse tapissant les parois des alvéoles pulmonaires [168] phagocytent les mycobactéries [172, 173] et apprêtent les Ag et les localisent à leur membrane en association avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, de classe II ou le CD1 [174, 175]. Pendant ce processus, les CD migrent vers les ganglions lymphatiques [176] expriment des taux élevés de molécules présentatrices d'Ag [177]. La CD mature établit des interactions efficaces avec les LcT naïfs dans la synapse immunitaire (Figure 17) [177]. Les interactions avec les LcT naïfs dans les ganglions lymphatiques induisent leur prolifération, l'expression de leurs propriétés effectrices et leur recrutement sur le site de l'infection via la circulation sanguine [170]. C'est la mise en place de la réponse adaptative spécifique de l'Ag [178], qui aboutit à la formation du granulome pulmonaire à mycobactéries (Figure 18).

### 6. Les lymphocytes (Lc) T CD4<sup>+</sup>

La réponse LcT CD4<sup>+</sup> est indispensable pour le contrôle de l'infection par Mtb [179]. Dans le modèle murin, une semaine après l'infection par Mtb le nombre des LcT CD4<sup>+</sup> activés dans le ganglion lymphatique drainant le poumon augmente [180]. Entre deux et quatre semaines après l'infection les LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> migrent dans les poumons, aboutissant à la formation du granulome pulmonaire à mycobactéries. Ils expriment les marqueurs de LcT effecteurs / mémoires: CD44<sup>hi</sup>, CD45<sup>low</sup> et CD62L<sup>-</sup>; indiquant qu'ils ont été activés par des Cellules Présentatrices d'Ag, notamment les CD [181]. De multiples études dans le modèle murin avec des déplétions des LcT CD4<sup>+</sup> [182], des transferts adoptifs [183], ou déficientes



**Figure 19: Différenciation des Lc "T helper" naïfs (Th0).**

L'activation et la différenciation des LcT Th0 en LcT effecteur diffèrent en fonction de la production de cytokines par la CD. L'IL-12p70 orientant vers une voie Th1, caractéristique de la réponse contre les pathogènes intracellulaires. L'IL-4 oriente vers une voie Th2, caractéristique de la réponse contre les pathogènes extracellulaires. L'IL-6 / IL-1 $\beta$ , le TGF- $\beta$  et l'IL-23 orientent vers la voie Th17 qui recrute les PNN actifs contre les pathogènes extracellulaires [167].

en LcT CD4<sup>+</sup> [184] ont montré que ces cellules sont essentielles au contrôle de l'infection. Chez l'Homme VIH positif, la perte de LcT CD4<sup>+</sup> due au virus augmente fortement la susceptibilité à Mtb [185].

## 6.1. La voie "T helper" (Th) 1

Lors du contact entre le Lc "T helper" naïf (Th0) et la CD mature, en présence de cytokines spécifiques, les LcT sont polarisés en Lc "T helper" (Th) vers différents axes. Pour la plupart des agents pathogènes intracellulaires, l'orientation de la réponse immune protectrice est de type Th1, avec la production majoritaire d'IFN- $\gamma$ . La cytokine clé pour la polarisation Th1 est l'Interleukine (IL)-12p70 produite par les CD (Figure 19) [186]. Cette orientation Th1 est indispensable pour la mise en place d'une réponse immune de type cellulaire permettant le contrôle de l'infection par Mtb [187]. Les Lc Th1 sont caractérisés par la production importante d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  [188].

### 6.1.1. L'Interféron gamma (IFN- $\gamma$ )

Les IFN de type II, dont l'unique représentant est l'IFN- $\gamma$ , se fixent sur l'IFN- $\gamma$ R possédant deux sous-unités, l'IFN- $\gamma$ R1 et l'IFN- $\gamma$ R2 [189]. L'IFN- $\gamma$  joue un rôle immuno-modulateur prédominant. Il est produit par un répertoire réduit de cellules immunitaires, les LcT et les cellules "Natural Killer" en réponse à une stimulation immunologique ou inflammatoire. L'IFN- $\gamma$  augmente l'expression du CMH II et donc la présentation antigénique [189, 190], ainsi que la production de molécules d'adhésion vasculaires et de chimiokines, ce qui participe à l'accumulation de Lc sur le site de l'infection [190]. L'IFN- $\gamma$  possède surtout des fonctions activatrices sur les MP pour augmenter leur capacités microbicides, ils sont plus efficaces pour détruire les bacilles tuberculeux. De plus, L'IFN- $\gamma$  est capable de participer lui-même à la polarisation des cellules Th0 vers la voie Th1, amplifiant ainsi cette polarisation [189]. La production d'IFN- $\gamma$  est stimulée par l'IL-12p70 alors que l'IL-10 inhibe sa production [191].

La production de l'IFN- $\gamma$  par lesTh1 est indispensable à la protection contre Mtb [187]. Chez des souris déficientes en LcT CD4<sup>+</sup> la diminution de la production d'IFN- $\gamma$  corrèle avec des MP moins efficaces contre le bacille [184]. Des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  sont plus sensibles à l'infection par Mtb [192]. Les jeunes enfants présentant des déficiences génétiques



pour l'IFN- $\gamma$ R [193, 194], STAT-1 [195] ou l'IL12p70 [196] sont plus sensibles à l'infection par Mtb ou la vaccination BCG.

De plus l'IFN- $\gamma$  aide au contrôle de la TB dans les phases chroniques, dans un modèle murin d'infection par Mtb, la déplétion dans les phases chroniques en LcT CD4<sup>+</sup> producteurs d'IFN- $\gamma$  engendre la réactivation de la TB [197]. Certaines études suggèrent que la réactivation de la TB latente chez l'Homme est en lien avec une baisse de l'IFN- $\gamma$  [198, 199]

### 6.1.2. Le "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF- $\alpha$ )

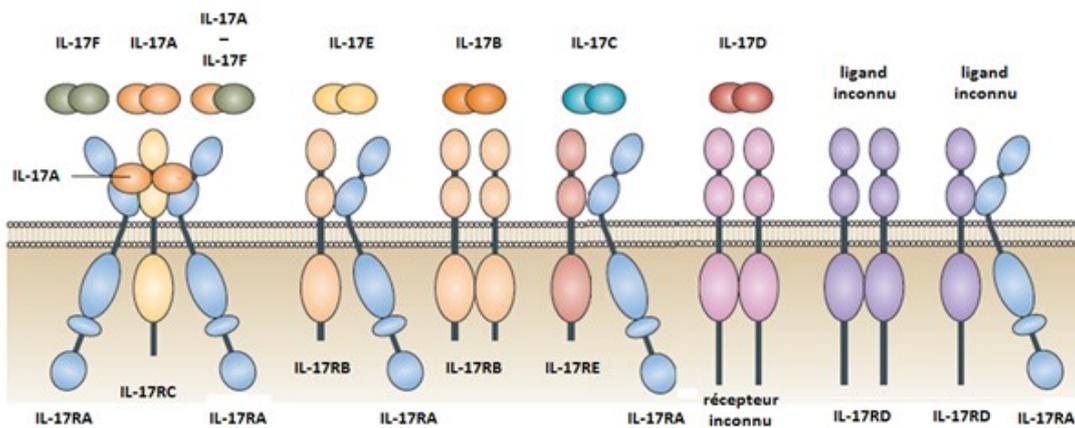
Le TNF- $\alpha$  participe à chacune des étapes de la mise en place et du maintien de l'immunité anti-mycobactérienne. En effet, lors de l'étape d'immunité innée, il favorise le recrutement de leucocytes au site de l'infection par la production de chimiokines. L'apoptose des MP alvéolaires infectés, qui constitue un mécanisme de défense anti-mycobactérienne, est favorisée en partie par le TNF- $\alpha$  via l'activation de la voie des caspases.

Des souris déficientes en TNF- $\alpha$  ou en TNF- $\alpha$ R meurent rapidement après l'infection par Mtb et ceci est en lien avec une augmentation de la charge mycobactérienne par rapport aux souris de type sauvage [200]. Par ailleurs dans un modèle murin, l'administration d'Ac anti-TNF- $\alpha$  dans les phases chroniques de l'infection conduit à une réactivation fatale pour l'animal [201]. Chez l'Homme les traitements anti-TNF- $\alpha$ , prescrits contre les inflammations chroniques sévères, engendrent une réactivation importante de la TB chez les personnes infectées par Mtb [202], pouvant conduire à des TB disséminées [203]. Sous traitement anti-TNF- $\alpha$  la fusion phago-lysosomale est inhibée et la production d'IFN- $\gamma$  protecteur diminuée [204]. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans le maintien du granulome pulmonaire et donc dans la contention du bacille [200, 205]. Mais l'excès de TNF- $\alpha$  est aussi associé à la destruction du poumon [165, 206, 207].

Les cytokines pro-inflammatoires de la voie Th1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  jouent donc un rôle majeur dans la protection contre Mtb [192].

## 6.2. Le paradigme Th1 / Th2

Lors d'infection par des organismes extracellulaires tels que les helminthes, la production d'IL-4 par CD polarise les Th0 vers l'axe Th2 (Figure 19). Les cellules de type Th2 produisent majoritairement de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13, et jouent un rôle primordial dans la production d'anticorps (Ac) spécifiques par les LcB [188]. La voie Th2 n'est pas



**Figure 20: Relations ligand-récepteur de la famille des IL-17.**

La famille des IL-17 comporte six membres (IL-17A à IL-17F) et cinq récepteurs de la famille des IL-17R ont été identifiés (IL-17RA à IL-17RE). Il existe plusieurs combinaisons de sous-unités de récepteurs en hétérodimères et hétéro-trimères, sur lesquels se fixent les IL-17. Le ligand de l'IL-17RD/RD et de l'IL-17RD/RA, ainsi que le récepteur pour l'IL-17D sont encore inconnus [208].

indispensable au contrôle de l'infection par Mtb [187].

L'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 sont des antagonistes et donc les voies Th1 ou Th2 sont considérées comme mutuellement exclusifs. La sécrétion d'IL-4 pourrait donc moduler la croissance mycobactérienne en modulant l'effet du TNF- $\alpha$  [209].

Le paradigme Th1 / Th2, présenté pour la première fois par Coffman et Mosmann permet d'expliquer un grand nombre de phénomènes de l'immunité adaptative [210, 211], mais récemment une sous population de Th produisant majoritairement de l'IL-17A (Th17), a été découverte [212-214].

### 6.3. La voie Th17

La base de cette découverte est que l'IL-12p40 (sous-unité de l'hétéro-dimère de l'IL-12) est également une sous-unité de l'IL-23 (avec la sous-unité IL-23p19) [215, 216]. Cette IL-23 amplifie la production d'IL-17A par les Th17 (Figure 19) [217, 218]. Ce nouveau sous-type de Th a été découvert dans les modèles d'études de la Sclérose En Plaque [219, 220] et reste souvent associé à l'induction d'inflammations pathologiques [221-224]. Chez la souris, la voie Th17 est induite par l'IL-6 et le "Tumor Growth Factor" (TGF)- $\beta$  et chez l'Homme par l'IL-1 $\beta$  et le TGF- $\beta$  [225, 226]. La voie Th17 est amplifiée par l'IL-21 et stabilisée par l'IL-23 chez la souris comme chez l'Homme [227].

Dans le contexte des infections pulmonaires par Mtb, les Th17 ont montré un rôle important dans la mise en place de la réponse protectrice [228]. Ils produisent les cytokines pro-inflammatoires, IL-17A et F, IL-21 et IL-22 [229].

#### 6.3.1. La famille des IL-17

La famille des IL-17 a été découverte chez le rongeur [230], puis confirmée chez l'Homme [231]. Cette famille regroupe six cytokines dont la plus connue est l'IL-17A (ou IL-17), ainsi que l'IL-17B, C, D, E (ou IL-25) et F (Figure 20) [232, 233]. Ces IL-17 forment des homo-dimères, hormis l'IL-17A et l'IL-17F qui peuvent former un hétéro-dimère [234]. L'hétéro-dimère IL-17A/F est majoritairement produit *in vitro* par les monocytes humains [235], mais la forme prédominante *in vivo* n'est pas clairement définie [236]. Les IL-17A et F sont très proches, avec 55% d'homologie de séquence protéique. Elles peuvent toutes deux être produites par les Th17, les LcT gamma delta (LcT  $\gamma\delta$ ), les cellules "Natural Killer", les PNN et les éosinophiles [229, 237, 238]. L'IL-17A est produite majoritairement par les LcT  $\gamma\delta$  [239, 240].



Ce sont donc des cytokines pro-inflammatoires produites aussi bien par les cellules de l'immunité innée que de l'immunité adaptative, suggérant un rôle clé dans ce passage vers la réponse adaptative [241, 242].

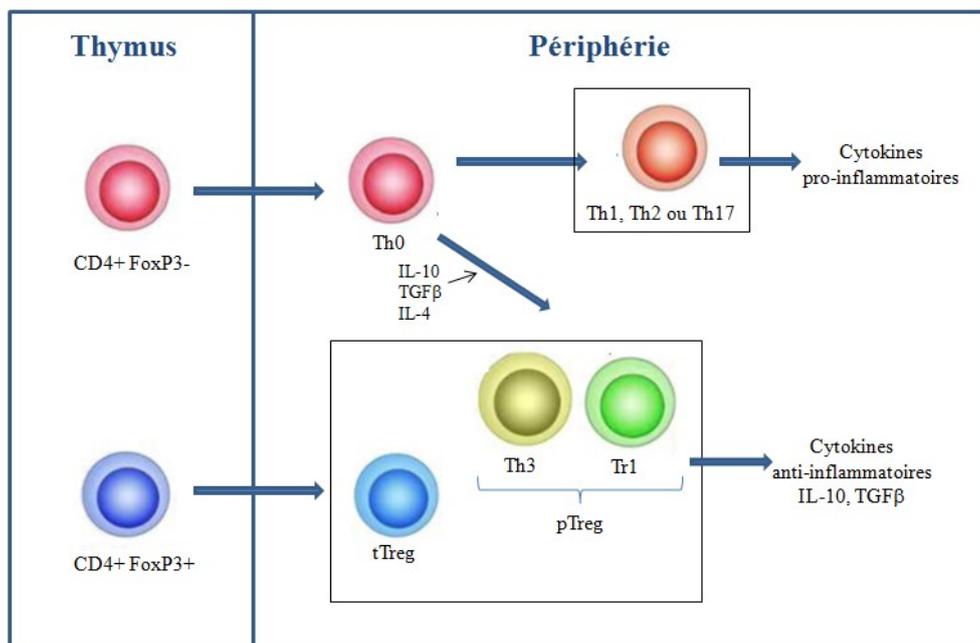
L'IL-17A est produite de façon précoce lors d'infections par différents pathogènes comme *Klebsiella pneumoniae* [243], *Aspergillus fumigatus* [244] ou aussi *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* [245, 246]. Elle est également impliquée dans les maladies chroniques à granulome [247]. Elle induit l'expression d'une large variété de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, comme par exemple le "Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor" (GM-CSF) et le "Granulocyte Colony-Stimulating Factor" (G-CSF), majeures dans la granulopoïèse [248]. Ces facteurs de croissance hématopoïétiques sont indispensables pour la contention du bacille dans le granulome et pour préserver la structure des alvéoles pulmonaires [249, 250].

Il est à noter que l'IL-17E est une exception car elle est produite uniquement par les cellules de la voie Th2 [251]. Elle limite la voie Th17 en induisant la production d'IL-13 par les CD ou en inhibant la production d'IL-23 par les MP [252]. Enfin, la fonction des IL-17B, C et D est actuellement mal définie.

La voie Th17 est importante dans la résolution d'infections, en effet les souris génétiquement invalidées pour l'IL-17RA souffrent d'une sévère déficience dans la défense contre les pathogènes, comme *Candida albicans* [253, 254], *Klebsiella pneumoniae* [255] ou *Toxoplasma gondii* [256]. Ceci est corrélé avec un défaut de production en chimiokines recrutant les PNN, et par conséquent un délai significatif dans leur mobilisation sur le site de l'infection. Des souris déficientes pour l'IL-17A infectées par les mycobactéries ont un développement anormal du granulome associé à un recrutement diminué des PNN [247, 257]. La voie Th17 induit une réponse cellulaire rapide sur le site de l'infection via le recrutement de PNN [248, 258], notamment via l'induction de la granulopoïèse [259].

### 6.3.2. Les récepteurs aux IL-17

Les récepteurs aux IL-17 sont constitués de cinq sous-unités, dont la plus connue est la sous-unité RA (IL-17RA). Les autres sous-unités sont l'IL-17RB (ou IL-25R), C, D et E [208]. Ces sous-unités s'associent pour former des homo-dimères, hétéro-dimères ou hétéro-trimères (Figure 20). L'hétéro-trimère IL-17RA/RC est le récepteur impliqué dans la reconnaissance de l'IL-17A et F.



**Figure 21: Les différents sous types de LcT régulateurs (LcTreg).**

Les LcTreg sont classés en fonction de leur origine et de leur mécanisme d'action. Les "thymus-derived Treg cell" (tTreg) (ou nTreg) dérivent directement du thymus alors que les "peripherally-derived Treg cell" (pTreg) (ou iTreg) sont issus des Lc Th0 de la périphérie. Cette dénomination tTreg et pTreg ne peut être utilisée que si la localisation anatomique de développement des Treg est clairement démontrée. Malgré une grande complexité dans leurs phénotypes, tous les Treg ont des propriétés immunosuppressives via la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF-β [260].

La sous-unité IL-17RA est exprimée de façon ubiquitaire [261], alors que la sous-unité IL-17RC est majoritairement exprimée sur les cellules non immunitaires des tissus, comme les cellules de reconnaissance de l'IL-17A et F [262], bien qu'avec une plus grande affinité pour l'IL-17A [263] cellules épithéliales et les fibroblastes [264]. Cette différence d'expression des sous-unités d'un même hétéro-trimère pourrait soutenir un mécanisme de signalisation spécifique du tissu pour l'IL-17A et / ou F. Chez l'Homme, l'IL-17RA fixe avec une haute affinité l'IL-17A et de façon bien plus faible l'IL-17F, alors que l'IL-17RC fixe avec une plus haute affinité l'IL-17F par rapport à l'IL-17A [254]. La situation est légèrement différente chez la souris où l'IL-17RA lie avec la même affinité l'IL-17A et F; et l'IL-17RC fixant plus fortement l'IL-17F.

Il existe d'autres hétéro-dimères récepteurs pour des IL-17, impliquant le plus souvent la sous-unité IL-17RA, comme par exemple l'IL-17RA/RB récepteur de l'IL-17E [265], exprimé dans les tissus endocriniens (reins, foie) et les cellules Th2 [266]. L'IL-17RA/RE récepteur de l'IL-17C, spécifiquement exprimé sur les cellules Th17 serait impliqué dans la potentialisation de la voie Th17 [267]. La sous-unité IL-17RA serait également impliquée dans un autre hétéro-dimère récepteur avec l'IL-17RD, mais le ligand est actuellement indéterminé [268]. L'IL-17RA/RD est le plus ancien hétéro-dimère récepteur de la famille des IL-17R [269] et les études dans le modèle *zebrafish* montrent une fonction originelle de cette famille IL-17R dans le contrôle du développement [270].

#### 6.4. Les LcT régulateurs (LcTreg)

Les LcTreg se caractérisent par leur capacité à inhiber la réponse Th et T cytotoxique. Ces cellules se distinguent par un profil de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Deux groupes de LcTreg sont distingués, les "thymus-derived Treg cell" (tTreg) (ou natural Treg (nTreg)) et les "peripherally-derived Treg cell" (pTreg cell) (ou induced Treg (iTreg)) [271] (Figure 21).

Les tTreg (ou nTreg) sont des cellules spécifiques des Ag du soi sélectionnés dans le thymus et représentent 5 à 10% des LcT circulants. Ils expriment les marqueurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et FoxP3<sup>+</sup>.

Les pTreg (ou iTreg) sont issus de la conversion d'un LcT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> naïf en présence de certaines cytokines inhibitrices en cellules régulatrices. Les pTreg sont



spécifiques d'Ag non présents dans le thymus tels que les Ag issus de pathogènes [272]. Le phénotype de ces cellules varie, ce qui rend leur caractérisation difficile.

Un LcT CD4<sup>+</sup> ayant des propriétés immunosuppressives peut être considéré comme un LcTreg mais sans pouvoir affirmer son origine [271].

Les LcT reg jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la tolérance du soi et la tolérance à la flore commensale à l'homéostasie, notamment intestinale [273]. Des études récentes suggèrent que les pTreg induits *in vivo* contre des Ag bactériens favorisent la persistance du pathogène en supprimant la réponse Th1 protectrice [274]. Ainsi, dans le cadre d'infection par Mtb, les pTreg pourraient empêcher la mise en place rapide d'une réponse Th1, qui favorise normalement l'élimination du bacille tuberculeux [275]. Chez l'Homme en TB latente ou active la quantité de LcTreg est plus importante que chez un individu sain [276].

#### 6.4.1. L'IL-10

Cette cytokine anti-inflammatoire est produite par de nombreux types cellulaires tels que les LcT, LcB, mastocytes, éosinophiles, monocytes et MP [277, 278]. Durant l'infection par Mtb, l'IL-10 est produite dans les temps précoces par les cellules myéloïdes phagocytaires, puis dans les temps tardifs par les LcTreg [279].

Les deux chaînes formant le récepteur de l'IL-10 sont IL-10R1 (ou récepteur de haute affinité) et IL-10R2 (ou récepteur de basse affinité). Les deux chaînes du récepteur à l'IL-10 sont exprimées par la plupart des cellules hématopoïétiques, comme les Lc, monocytes et PNN.

La première fonction décrite a été l'inhibition de la production de cytokines par des Lc Th1 et les fonctions effectrices des monocytes et MP [280]. Depuis, de nombreuses activités biologiques de l'IL-10 ont été décrites [281]. Sa fonction principale est l'inhibition de la réponse inflammatoire. Ce rôle dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation est mis en évidence *in vivo* chez des souris génétiquement invalidées pour l'IL-10 qui développent des réactions de type Th1 [282] ou Th17 [283] exacerbées, associée à l'expression de pathologies inflammatoires [284, 285].

Des souris exprimant de façon constitutive l'IL-10 sont incapables de contrôler l'infection par Mtb et développent une réactivation accrue de la TB dans les phases chroniques de l'infection [286, 287]. Au contraire, dans un modèle murin déficient pour l'IL-10, la mise en place de la réponse Th1 protectrice est plus efficace avec un contrôle amélioré de la dispersion des



bacilles [288]. La production d'IL-10 peut aider à la survie du bacille et à la chronicité de l'infection en instaurant un environnement anti-inflammatoire bloquant les mécanismes mycobactéricides [279, 289].

L'IL-10 inhibe la capacité de présentation des Ag par les MP et les CD [290, 291]. Elle diminue la production, par les monocytes et les MP activés, de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-18, le GM-CSF, le G-CSF, le M-CSF et le TNF- $\alpha$ ; et l'IL-10 elle-même [292]. L'IL-10 possède aussi des effets anti-inflammatoires directement sur les LcT CD4<sup>+</sup> [291]. Elle diminue leur production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que leur prolifération. Ces effets anti-inflammatoires sont certainement imputables à sa capacité de neutraliser les effets de l'activation de NF $\kappa$ B [293, 294] et donc l'expression de cytokines pro inflammatoires.

L'IL-10 inhibe également la production de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes, CD, PNN et LcT [295]. L'IL-10 peut induire la production d'autres molécules anti-inflammatoires telles que des antagonistes des récepteurs à l'IL-1 (IL-1RA) ou au TNF- $\alpha$  (p55 et p75) [296, 297], mais aussi le TGF- $\beta$  [298].

L'ajout TGF- $\beta$  à une culture de MP avec Mtb inhibe la phagocytose et l'élimination du bacille [299]. L'IL-10 et le TGF- $\beta$  agissent en coopération sur la modulation de la réponse immunitaire en stimulant les réponses anti-inflammatoires [300, 301]. Ces observations confèrent à l'IL-10 un potentiel anti-inflammatoire important associé à une diminution de la capacité à éliminer les microorganismes. Ces puissantes capacités anti-inflammatoires sont indispensables afin de maintenir un équilibre avec les cytokines pro-inflammatoires et ainsi éviter une exacerbation de l'inflammation délétère pour l'hôte.

## 7. Les LcT CD8<sup>+</sup>

Plusieurs études ont montré la contribution des LcT CD8<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire contre Mtb [182, 302-304]. Des souris déficientes pour le CMH I sont plus sensibles à l'infection tuberculeuse [305]. Ces cellules exercent une activité cytotoxique contre les cellules infectées par le bacille [306, 307], via la libération de granules contenant de la perforine et granulysine [308]. De plus, les LcT CD8<sup>+</sup> produisent de l'IFN- $\gamma$  [307] qui a un rôle majeur contre l'infection mycobactérienne.



## 8. Les LcT gamma delta (LcT $\gamma\delta$ )

Les LcT  $\gamma\delta$  possèdent un récepteur constitué d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$ . Les LcT  $\gamma\delta$  ne représentent que 1 à 5% des LcT totaux [309, 310]. Ils peuvent néanmoins être présents dans les sites épithéliaux et il a été montré que ces cellules s'accumulent dans les lésions occasionnées par Mtb [311].

Les LcT  $\gamma\delta$  humains reconnaissent les phosphoantigènes des mycobactéries [312, 313], des protéines de la famille des "Heat Shock Protein" (HSP) [314, 315], ainsi que des produits biologiques des mycobactéries comme les alkyl phosphates chargés négativement [316] et les alkylamines chargés positivement [317] via le TCR  $V\gamma9/V\delta2$ , ce qui active une production importante de cytokines pro-inflammatoires [318].

Chez la souris, la nature des ligands mycobactériens reconnus par le TCR des LcT  $\gamma\delta$ , notamment  $V\gamma4/V\delta1$  [319], n'est pas clairement définie. Mais la réactivité anti-mycobactérienne des LcT  $\gamma\delta$  murins est associée dans diverses études à la famille des HSP [320].

Bien que le rôle exact des LcT  $\gamma\delta$  dans l'immunité anti-mycobactérienne se soit pas clairement établi, il semblerait que ces lymphocytes dits "non conventionnels" jouent un rôle important dans les phases précoces de l'infection à Mtb [321]. Les LcT  $\gamma\delta$  sont une source importante d'IL-17A chez la souris [238, 247] et chez l'homme [322]. En plus d'une production importante de cytokines, les LcT  $\gamma\delta$  sont cytotoxiques et peuvent ainsi lyser les cellules infectées par les mycobactéries [323, 324]. En outre, les LcT  $\gamma\delta$  ont montré leur capacité à détruire la forme de Mtb extracellulaire libre par dégranulation de granulysine et perforine [324].

De plus, dans un modèle de souris déficiente pour les LcT  $\gamma\delta$  la formation des granulomes semble altérée [325]. Malgré ces observations, des études *in vivo* montrent que les LcT  $\gamma\delta$  ne seraient pas indispensables pour le contrôle de l'infection à Mtb [325, 326].

## 9. Les LcB

Le rôle principal des LcB est de produire des Ac. La réponse immunitaire cellulaire est plus importante dans le contrôle de l'infection par Mtb que la réponse humorale. Cependant, des souris ayant reçu par voie intranasale des IgA anti- $\alpha$ -crystalline montrent une protection plus élevée que des souris contrôle, à court terme contre l'infection par Mtb [327]. Chez l'Homme, des IgG protecteur anti-Ag85 de Mtb ont été observés dans une population indienne

**Tableau 6: Liste de chimiokines de la classe CXC (classe  $\alpha$ ) et de leurs récepteurs.**

Toutes les chimiokines qui attirent les PNN possèdent un motif CXC et appartiennent donc à la classe  $\alpha$  des chimiokines. Chez la souris, CXCL-1, 2, 5 et 15 semblent le plus souvent impliqués dans le recrutement des PNN pulmonaires [328-330].

Classe	Chimiokines	Nom(s) commun(s)		Produite par	Récepteurs	Cellules attirées	Effets principaux
		Humain	Souris				
Classe $\alpha$	CXCL-1	GRO $\alpha$	KC	Monocytes, Fibroblastes, Endothélium	CXCR-2 > CXCR-1	PMN, LcT naïfs, Fibroblastes	Active les PMN, Fibroplasie, Angiogenèse
	CXCL-2	GRO $\beta$	MIP-2	Monocytes, Fibroblastes, Endothélium	CXCR-2	PMN, LcT naïfs, Fibroblastes	Active les PMN, Fibroplasie, Angiogenèse
	CXCL-3	GRO $\gamma$	GRO	Monocytes, Fibroblastes, Endothélium	CXCR-2	PMN, LcT naïfs, Fibroblastes	Active les PMN, Fibroplasie, Angiogenèse
	CXCL-4	PF-4	PF-4		Inconnu		
	CXCL-5	ENA-78	LIX		CXCR-2	PMN	
	CXCL-6	GCP-2	GCP-2		CXCR-1, CXCR-2		
	CXCL-7	NAP-2	Inconnu	Plaquettes	CXCR-2	PMN	Active les PMN, Résorption du caillot Angiogenèse
	CXCL-8	IL-8	Inconnu	Monocytes, Macrophages, Fibroblastes, Kératinocytes, Cellules endothéliales	CXCR-1, CXCR-2	PMN, LcT naïfs	Mobilise, active et dégranule les PMN Angiogenèse
	CXCL-9	Mig	Mig		CXCR-3		
	CXCL-10	IP-10	IP-10	Kératinocytes, Monocytes, LcT, Fibroblastes, Endothélium	CXCR-3	LcT, Cellules NK, Monocytes	Immunostimulant Th1, Anti-angiogène
	CXCL-11	I-TAC	I-TAC		CXCR-3		
	CXCL-12	SDF-1 $\alpha/\beta$	SDF-1	Cellules stromales	CXCR-4	LcT naïfs, Progéniteurs des LcB	Développement des LcB, Recrutement Lc
	CXCL-13	BCA-1	BLC	Cellules stromales	CXCR-5	LcB	Recrutement des Lc
	CXCL-14	BRAX	BRAX		Inconnu		
	CXCL-15	Inconnu	Lungkine		Inconnu	PMN	
	CXCL-16	SR-PSOX	Inconnu		CXCR-6		

au Mexique [331]. Les Ac spécifiques anti-Mtb pourraient avoir un rôle bénéfique au cours de l'infection par le bacille tuberculeux [332].

Des modèles de déplétion en LcB montrent un impact sur la voie inflammatoire Th17 [333, 334]. Dans un modèle de souris déficientes en LcB, une inflammation exacerbée a été observée, corrélée avec un recrutement de PNN augmenté [335].

Récemment, une étude a montré que les LcB seraient impliqués indirectement dans le recrutement en PNN via la régulation négative de la production d'IL-17A [336].

## C. Les chimiokines

### 1. Chimiokines et récepteurs

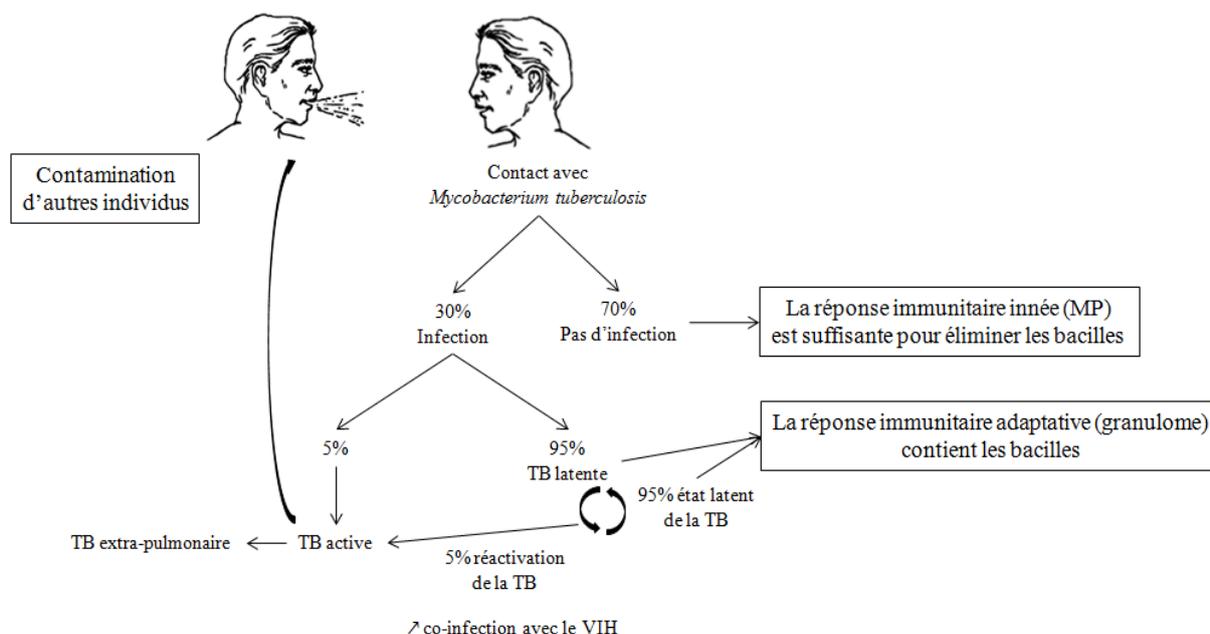
Les chimiokines possèdent un motif de quatre cystéines en position N-terminale hautement conservées et séparées par un simple résidu pour les chimiokines CXC (ou sous classe  $\alpha$ ), ou bien le résidu est adjacent aux cystéines pour les chimiokines CC (ou sous classe  $\beta$ ). Durant l'infection par les mycobactéries, l'établissement d'un gradient de chimiokines permet le recrutement de cellules inflammatoires, crucial dans l'agrégation de cellules aboutissant à la formation du granulome.

Les chimiokines CXC sont responsables du recrutement des PNN. Elles forment une famille hétérogène de 16 protéines (CXCL-1 à 16). Peu de récepteurs aux chimiokines ont été identifiés (CXCR-1 à 6), une chimiokine peut se lier et agir au travers de plusieurs récepteurs [337] (Tableau 6). Cette complexité rend difficile la définition du rôle de chacune dans la réponse anti mycobactérienne et dans la formation du granulome.

Chez les patients atteints de TB active, une forte concentration de CXCL-8 (ou IL-8) est retrouvée dans les LBA [338], ainsi que dans le liquide cébrospinal de patients ayant une TB méningée [339]. Chez la souris exposée par voie intranasale à de la tuberculine de Mtb, de fortes concentrations de CXCL-1 (ou KC), 2 (ou MIP-2) et 5 (ou LIX) sont produites après 48h [340]. Ces chimiokines recrutent des PMN sur le site de l'infection pulmonaire.

### 2. Les chimiokines recrutant les PNN

Chez l'Homme, CXCL-8 a été la première chimiokine identifiée dans le recrutement des PNN. Elle est produite dans le surnageant de monocytes stimulés par du LPS. *In vitro*, les



**Figure 22: Evolution de la pathologie tuberculeuse.**

Après un contact avec Mtb, la réponse immunitaire innée parvient à éliminer les bacilles dans 70% des cas. Ceci est majoritairement dû aux capacités mycobactéricides du MP. Dans 30% des cas, Mtb persiste dans les alvéoles pulmonaires. La mise en place de la réponse immunitaire adaptative aboutit à la contention des bacilles dans le granulome dans 95% de ces cas. La TB latente peut durer toute la vie du patient, mais dans certaines conditions défavorables, la TB est réactivée. Seulement 10% des individus développent une TB active, 5% directement lors de la primo-infection et 5% tout au long de leur vie lors de la réactivation d'une TB latente. Lors de la TB active, les bacilles sont majoritairement localisés dans les poumons et peuvent être excrétés pour contaminer d'autres individus. Certaines formes de TB extra-pulmonaire sont plus défavorables pour la survie du patient.

cellules épithéliales alvéolaires humaines (lignée A549) produisent du CXCL-8 en réponse à Mtb [341, 342]. Chez la souris les chimio-attractants majeurs des PNN pulmonaires sont: CXCL-1, 2, 5 et 15. Elles sont produites par les cellules de l'immunité innée présentes dans les tissus et donc en contact avec l'agent pathogène, incluant les MP, les monocytes, les cellules épithéliales et les PNN eux-mêmes [343-345]. Les chimiokines interagissent avec le récepteur CXCR-2, activant les PNN et engendrant leur adhésion à la surface de l'endothélium [346, 347].

Ces CXC chimiokines ont un rôle crucial mais non exclusif dans le recrutement et l'activation des PNN circulants [348, 349]. D'autres familles de protéines comme les cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion, les métalloprotéinases matrice (une sous-famille des chimiokines) peuvent également participer au recrutement des PNN [350-352]. L'activation des TLR présent sur les cellules épithéliales par les PAMP, augmente l'expression de molécules d'adhésion qui permettent le recrutement direct de PNN [353].

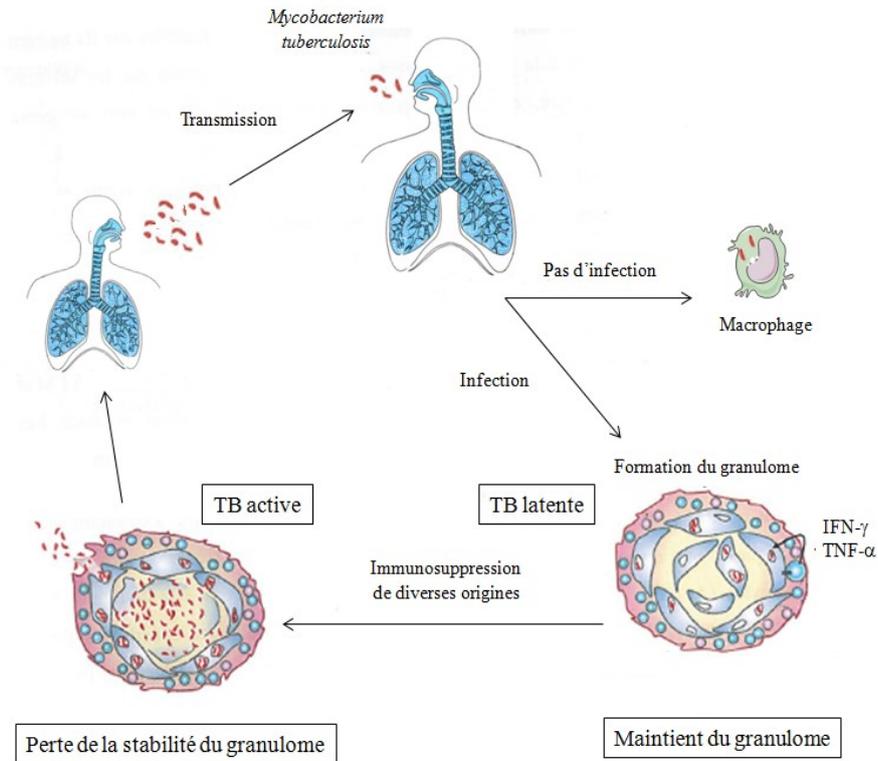
## **D. Physiopathologie et formation du granulome**

### **1. Physiopathologie**

La TB est une pathologie principalement pulmonaire, sur les 10% développant une TB active, 85% des individus immuno compétents ne développeront pas de formes extra pulmonaire [354]. Mais dans certains cas de TB extra-pulmonaires, les bacilles se retrouvent dans d'autres organes, notamment les formes gravissimes de TB méningée [355].

#### **1.1. La TB latente**

La contamination pulmonaire par Mtb est due à l'inhalation de gouttelettes de Pflügge contenant le bacille infectieux. Ces gouttelettes d'eau microscopiques en suspension dans l'air, forment un aérosol et sont expulsées lors de la toux d'un individu atteint de TB active. Un à trois bacilles suffisent à infecter un nouvel hôte [356]. Après avoir été inhalés, les germes transitent dans les voies aériennes supérieures, la trachée, les bronches, et pénètrent dans les alvéoles pulmonaires. Le cycle infectieux de Mtb est rythmé par la réponse immunitaire et les mécanismes mis en place par les mycobactéries pour la déjouer.



**Figure 23: Le cycle infectieux de Mtb.**

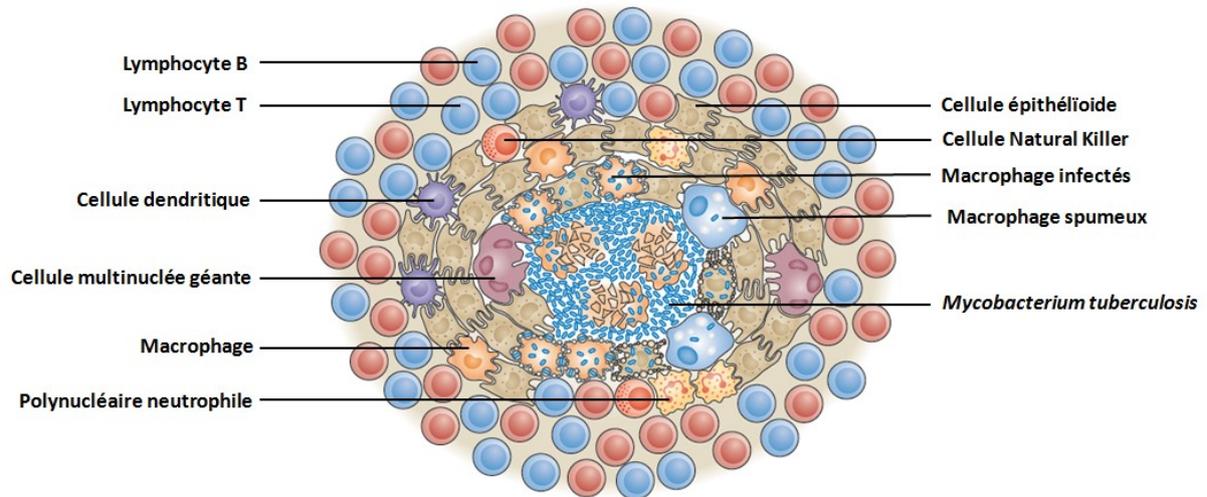
L'inhalation de quelques bacilles tuberculeux suffit à infecter un individu. Dans la majorité des cas l'individu immunocompétent est capable de contenir l'infection. La mise en place de la réponse immunitaire induit la formation du granulome pulmonaire. Mais au cours de la vie de l'individu infecté, une immunodéficience peut être la cause d'une réactivation de la TB avec la perte de la fonction de contention du granulome. L'individu développe alors la TB active et devient contagieux [357].

Les MP alvéolaires phagocytent et détruisent les bacilles tuberculeux. Dans près de 70% des cas, cette étape d'immunité innée suffit à résoudre l'infection. En effet, seulement 30% des individus en contact avec le bacille montrent des signes immunologiques d'infection et deviennent positifs à l'IDR (Figure 22) [358]. Si les mycobactéries persistent, l'immunité adaptative est déclenchée. Les CD ayant phagocyté Mtb migrent vers le ganglion lymphatique drainant où elles jouent un rôle de présentation des Ag aux LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs conduisant à leur activation et à leur prolifération. Une fois activés, ces LcT affluent sur le poumon. Les LcT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sécrètent des facteurs bactéricides qui aident les MP à contenir les mycobactéries. L'activation des LcT CD4<sup>+</sup> conduit à un profil de différenciation Th1 et Th17 caractérisé par la production d'IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  et IL-17A respectivement.

Au terme de ces étapes, dans près de 95% des cas, le granulome se forme correctement et l'individu ne développe pas de TB active. Cependant, les bacilles sont toujours présents, majoritairement dans les MP infectés entourés de LcT et de fibroblastes, c'est la TB latente. L'individu est alors un porteur asymptomatique de bacilles tuberculeux, état pouvant durer plusieurs dizaines d'années [359-361]. Ces porteurs asymptomatiques qui représentent 1/3 de la population mondiale font de l'Homme un vaste réservoir pour Mtb [362].

## 1.2. La TB active

Chez près de 5% des patients en TB latente à l'occasion d'une immunosuppression de diverses origines: vieillissement, traitement corticoïde ou thérapie anti TNF- $\alpha$  [363], le bacille se multiplie à nouveau. Cette réactivation de la TB peut survenir plusieurs dizaines d'années après l'infection initiale [364]. Elle survient en cas de défaillance des mécanismes de défense par les effets d'une immunosuppression D'autres facteurs aggravants sont le tabac, l'alcool ou le diabète [365, 366] (Figure 23). L'immunodéficience induite par le VIH augmente considérablement le risque de développer une TB active, 10% des individus co-infectés par le VIH et Mtb développent une TB active dans l'année suivant la co-infection, alors que les individus infectés uniquement par Mtb montrent 10% de risque de développer la forme active tout au long de leur vie [56, 57]. Ceci est dû à la destruction des LcT CD4<sup>+</sup> par le virus, cellules indispensables à la formation du granulome [367]. Le développement de l'infection par Mtb fragilise aussi l'hôte et accélère la progression vers le SIDA [58].



**Figure 24: Schéma de la structure d'un granulome pulmonaire.**

Le granulome tuberculeux est un agrégat compact et organisé de MP entourés de Lc. D'autres types cellulaires se retrouvent également dans cette structure, comme les PNN, CD, cellules Natural Killer et fibroblastes. Des cellules épithéliales s'agglomèrent autour du granulome (non montrée sur ce schéma), formant une couronne participant également au maintien du granulome mature. Mtb se retrouve majoritairement dans la zone centrale plus ou moins caséifiée [368].

De plus, cette co-infection augmente la proportion d'individus développant des TB extra pulmonaires [55].

Les patients en TB active peuvent montrer différents symptômes: toux persistante, anorexie, perte de poids, douleur dans la poitrine et sueurs nocturnes. Mais ces symptômes peuvent être totalement absents, tout particulièrement dans les premiers stades du développement de la maladie [364].

## 2. Granulome pulmonaire

### 2.1 Cellules impliquées

La réponse immunitaire adaptative forme le granulome pulmonaire. Il est constitué d'une zone centrale plus ou moins caséifiée [369], comprenant majoritairement des MP; mais aussi des Cellules Multinuclées Géantes, des cellules épithélioïdes, des CD et des PNN, entourée d'une couronne de fibroblastes, LcT et cellules épithéliales [370, 371] (Figure 24).

Les MP "spumeux" (ou "foamy macrophages") contiennent de nombreux granules lipidiques, pouvant constituer un réservoir de nutriments utilisé par Mtb lors de sa persistance à long terme [372]. Les Cellules Multinuclées Géantes résultent de la fusion de plusieurs MP et sont une marque caractéristique des structures granulomateuses [373, 374]. Les cellules épithélioïdes ont une morphologie différente des MP et ressemblent à des cellules épithéliales. Le granulome est une structure cellulaire clé dans la contention et la destruction du bacille [375].

### 2.2. Formation du granulome

La formation du granulome peut se définir en plusieurs étapes: l'initiation, la maturation puis la résolution ou la calcification [376]. L'initiation a lieu dans les alvéoles pulmonaires, lors de la phagocytose des bacilles par les MP à l'intérieur desquels ils survivent et se multiplient. La sécrétion de cytokines et chimiokines, par les cellules de l'immunité innée présentes sur le site de l'infection, conduit au recrutement des monocytes et LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [377, 378]. L'afflux des LcT est responsable de la destruction de la plus grande partie des bacilles et aboutit à la maturation du granulome [184, 379].

Les cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ), sont indispensables pour le maintien de la structure du granulome pulmonaire à Mtb [380-382]. Dans d'autres types de granulomes, comme par exemple ceux induits par des helminthes, d'autres cytokines



**Figure 25: Destruction pulmonaire associée à la TB.**

La réactivation de la TB est généralement associée à des lésions cavitaires localisées aux segments supérieurs des lobes ou aux apex pulmonaires. Lorsqu'une lésion tuberculeuse érode l'arbre bronchique, le matériel nécrotique de la lésion s'écoule et ainsi fait apparaître l'aspect d'une "caverne tuberculeuse" [383].

**Tableau 7: Les différents modèles animaux pour l'étude de la TB.**

Avantages et inconvénients des différents modèles animaux pour l'étude de la TB [384].

		Souris	Cobaye	Lapin	Macaque Cynomolgus	Macaque rhesus
Manifestation de la maladie	Sensibilité à l'infection	+	++	+	++	++++
	Tuberculose extra-pulmonaire	++	++	++	++	++
	Formation du granulome	++	++	++	++	++
	Nécrose et caséification	-	++	++	++	++
	Formation de caverne tuberculeuses	-	-	++	+	+
	Hypersensibilité retardée	+/-	++	++	-	-
	Protection par le vaccin BCG	+	++	++	+++	+
Outils disponibles	Réactifs immunologiques	++++	+	++	++	++
	Lignées consanguines	+	-	-	-	-
	Animaux génétiquement invalidés	+	-	-	-	-
Coût et maintenance	Espaces requis	+	++	+++	++++	++++
	Coût d'achat des animaux	+	++	+++	++++	++++
	Coût de la maintenance	+	++	+++	++++	++++

inflammatoires de type Th2 sont requises (IL-4, IL-5 et IL-13) pour le maintien de la structure [385].

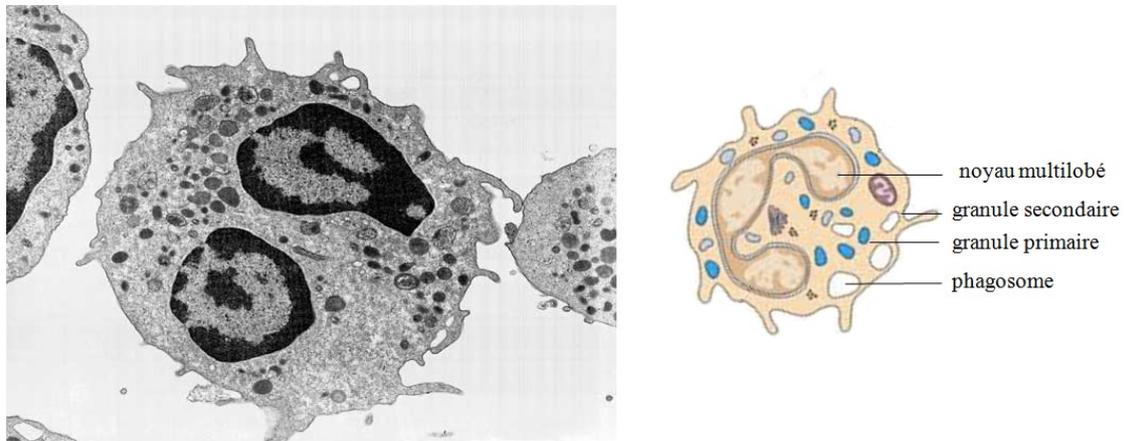
Une fois que le rôle de contention et destruction du granulome est accompli, la structure peut se disperser. Mais le granulome à Mtb est parfois insuffisant pour l'élimination complète du bacille et l'accumulation du recrutement de fibroblastes entourant le granulome forme une structure fibreuse. Les cytokines comme, l'IL-4, l'IL-13 et le TGF- $\beta$  régulent l'activation des fibroblastes ainsi que la formation et le dépôt des molécules de collagène (Figure 24) [386, 387]. L'intérieur du granulome peut ainsi évoluer vers la caséification, engendrant progressivement la destruction du tissu. Cette destruction tissulaire est à la base des symptômes dans les pathologies granulomateuses. Le caséum de la zone centrale peut se liquéfier et s'écouler lors de la rupture de la structure du granulome. Il en résulte l'apparition de lésions appelées "cavernes tuberculeuses" [372] (Figure 25).

Le granulome peut être défini comme un pacte immunitaire entre la mycobactérie et son hôte où l'équilibre entre le contrôle des bacilles et la destruction des tissus se réalise. Donc malgré un rôle protecteur, le granulome est aussi le lieu d'une réaction inflammatoire qui, quand elle est exacerbée, aboutit à la destruction des tissus.

### 2.3. Modèle d'étude

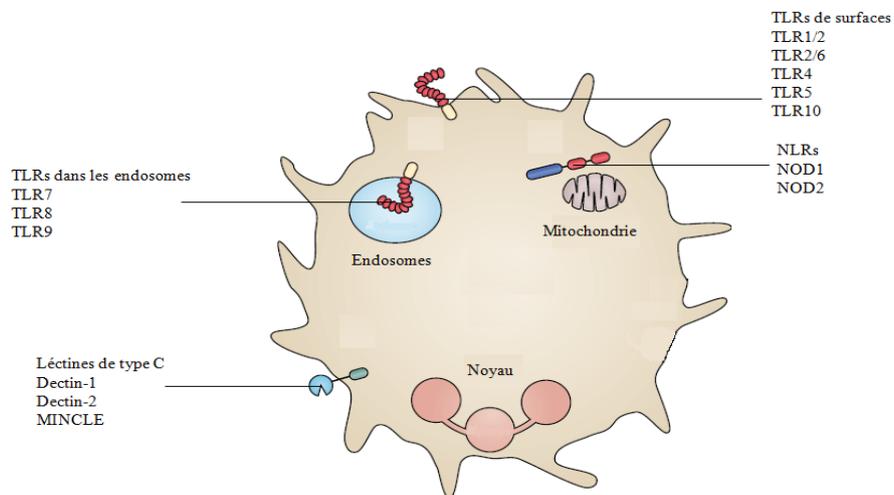
Plusieurs modèles animaux peuvent être employés pour l'étude de la TB: la souris, le cobaye, le lapin et le primate. Chacun de ces modèles présente des avantages et inconvénients (Tableau 7). Le cobaye et le lapin sont des animaux intéressants pour étudier la physiopathologie de l'infection tuberculeuse car ils développent les différents stades de la maladie observés chez l'Homme, comme la caséification jusqu'à l'apparition de cavernes tuberculeuses pour le lapin. Toutefois le coût élevé de ces animaux et leur maintenance, ainsi que la faible disponibilité en lignées génétiquement invalidées limitent l'utilisation de ces deux modèles. Bien que les primates non humains soient susceptibles à la TB, ces espèces ont été peu exploitées pour l'étude de la TB pour les mêmes problématiques.

La souris présente de nombreux avantages comme l'existence de différentes lignées consanguines et la disponibilité de nombreux outils immunologiques pour la détection ou la quantification des réponses induites par l'infection. La souris est un modèle adapté pour la caractérisation des événements immunitaires se mettant en place au cours de l'infection pulmonaire par Mtb.



**Figure 26: Le polynucléaire neutrophile (PNN).**

Photographie en microscopie électronique à transmission et schéma d'interprétation d'un PNN. En plus des lobes caractéristiques du noyau polylobé, de nombreux granules sont visibles dans le cytoplasme, correspondant aux granules primaires et secondaires [388].



**Figure 27: Les PRR présents sur les PNN.**

Les PNN possèdent plusieurs PRR à leur surface ou dans les endosomes permettant la détection de nombreux PAMP [137].

## E. Les granulocytes

### 1. Les PNN

#### 1.1. Une cellule pour tuer

Le PNN est communément caractérisé par son noyau polylobé et la présence de nombreux granules cytoplasmiques (Figure 26). Les PNN constituent la plus importante population leucocytaire du sang circulant (60 à 70% des leucocytes sanguins chez l'Homme) et représentent les principales cellules phagocytaires dans la circulation sanguine. Les PNN contiennent quatre types de granules: primaires (ou granules azurophiles), secondaires (ou granules spécifiques), tertiaires (ou granules gélatinases) et les vésicules sécrétoires. La formation de ces divers granules est initiée au stade précoce de la différenciation du PNN dans la moelle osseuse. Ils sont classés en fonction de leur contenu protéique et leur capacité à être exocytés après l'activation du PNN par un stimulus inflammatoire [389]. Les granules primaires contribuent à la dégradation intracellulaire des microorganismes et à l'élimination du pathogène à l'intérieur du phagolysosome. Ils sont définis par leur haut contenu en MyéloPerOxydase (MPO), azurocidine et sérine-protéase [390]. Les granules secondaires et tertiaires sont dépourvus de MPO mais sont fortement concentrés en lactoferrine et en gélatinase [389]. Les vésicules sécrétoires contiennent de l'albumine sérique et présentent un contenu protéique faible. Toutefois, elles fournissent un réservoir important en composants membranaires [391].

Les PNN expriment un large panel de PRR permettant une réponse rapide et adaptée [137]. Ces PRR sont importants pour l'activation des PNN et l'établissement rapide de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 27). Le signal médié par la détection d'un PAMP par ces PRR permet une régulation fine des mécanismes microbicides mis en jeu par le PNN. La présence de ces PRR n'est toutefois pas toujours clairement établie sur les PNN humains et murins (Tableau 8).

A la suite de la reconnaissance du corps étranger, les PNN l'internalisent et amorcent divers mécanismes pour le détruire. L'efficacité anti microbienne des PNN dépend de deux événements qui se produisent au niveau du phagolysosome: la génération de "Reactive Oxygen Species" (ROS) [391] suite à l'activation de la "Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate" (NADPH) oxydase et le relargage du contenu enzymatique et protéique des granules dans le phagolysosome [392].

**Tableau 8: Principaux PRR et fonctions chez les PNN.**

<sup>a</sup> Détection de mRNA mais pas l'expression de la protéine. <sup>b</sup> L'expression de la protéine n'est pas démontrée mais la sensibilité au ligand ou l'utilisation de souris déficientes pour ce récepteur suggère sa présence. <sup>c</sup> Des données contradictoires existent sur l'expression de la protéine [137].

	Expression	Réponses obtenues
TLR1	Homme	Dégranulation
	Souris <sup>a,b</sup>	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose
		Formation de NETs
		Migration
		Production de cytokines pro-inflammatoires
	Chez la souris, en synergie avec les lectines de type C: production d'IL-10	
TLR2	Homme	Dégranulation
	Souris <sup>b</sup>	Phagocytose
		Régulation de l'apoptose
		Formation de NETs
		Migration
		Production de cytokines pro-inflammatoires
	Chez la souris, en synergie avec les lectines de type C: production d'IL-10	
TLR4	Homme	Dégranulation
	Souris <sup>a,b</sup>	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose
		Formation de NETs
		Migration
		Production de cytokines pro-inflammatoires
	Chez la souris, en synergie avec les lectines de type C: production d'IL-10	
TLR5	Homme	Dégranulation
	Souris	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose (flagelline monomérique uniquement)
		Formation de NETs
		Production de cytokines pro-inflammatoires
TLR6	Homme <sup>a</sup>	Dégranulation
	Souris ?	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose
		Formation de NETs
		Chez l'Homme: production de cytokines pro-inflammatoires
TLR7	Souris <sup>a,b</sup>	Production de TNF- $\alpha$
TLR8	Homme	Dégranulation
	Souris ?	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose
		Formation de NETs
		Migration
	Production de cytokines pro-inflammatoires	
TLR9	Homme	Chez l'Homme: dégranulation
	Souris <sup>a</sup>	Phagocytose
		Inhibe l'apoptose
		Formation de NETs
		Migration
	Chez l'Homme: production de cytokines pro-inflammatoires	
TLR10	Homme <sup>a</sup>	Pas de fonctions actuellement décrites
	Souris ?	

	Expression	Réponses obtenues
Dectin-1	Homme	Phagocytose
	Souris	Dégranulation
Dectin-2	Homme ?	Pas de fonctions actuellement décrites
	Souris ? <sup>c</sup>	
Mincle	Homme	Phagocytose
	Souris	Dégranulation
NOD1	Homme ?	Phagocytose
	Souris <sup>b</sup>	Migration
NOD2	Homme	Phagocytose
	Souris <sup>b</sup>	Dégranulation

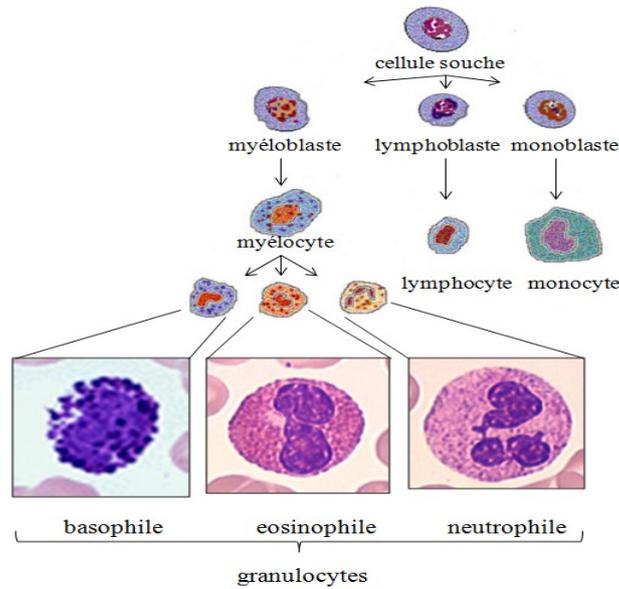
Puis, le PNN dégranule, c'est à dire libère le contenu des granules dans le phagolysosome ou dans le milieu extracellulaire [393]. La dégranulation est un événement clé de l'activité microbicide du PNN [394], mais des dégranulations trop importantes dans le milieu extérieur engendrent une destruction tissulaire. Les phagolysosomes ont un rôle clé dans le processus microbicide parce qu'ils constituent un espace fermé dans lequel le pathogène est exposé à des substances toxiques, ce qui limite les dégâts tissulaires. La séquestration intracellulaire des microorganismes induit la fusion des granules du PNN avec le phagolysosome et le relargage des peptides antimicrobiens, protéases et de ROS.

Chez l'Homme les PNN produisent des  $\alpha$ -défensines [395] localisées dans leur granules primaires [396]. Ces petits peptides antimicrobiens peuvent aider à la phagocytose, induire l'activation et la dégranulation et affecter la production de CXCL-8 [397, 398]. De plus, certaines études montrent que ces  $\alpha$ -défensines ont un rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire adaptative en participant au recrutement de CD immatures et de LcT [399, 400]. La production exacerbée d' $\alpha$ -défensines par le PNN est associée à la destruction pulmonaire [401]. Cette production d' $\alpha$ -défensines est présente entre autres chez le lapin [402] et le rat [403], mais pas chez la souris [404].

## 1.2. L'hématopoïèse

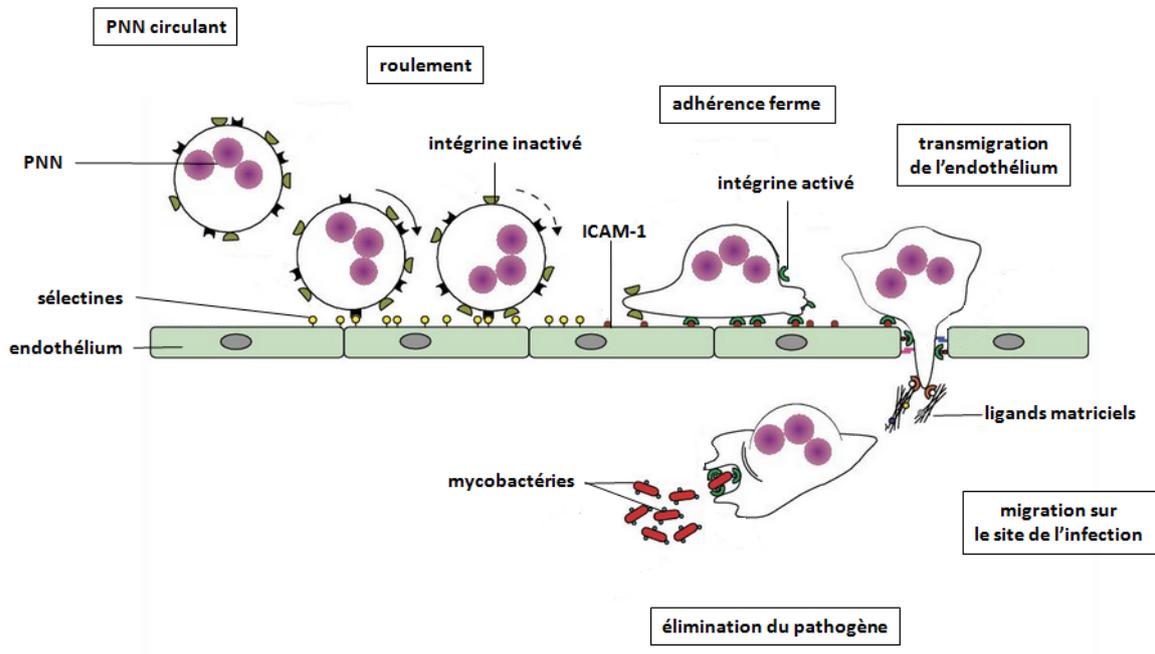
Les PNN sont issus de la différenciation et de la maturation de cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse. Le développement et la maturation des granulocytes dans la moelle osseuse se produit en deux phases: une phase mitotique et une phase non mitotique. Chacune d'elle dure approximativement une semaine. Au cours de la phase mitotique, le premier précurseur, le myéloblaste, se différencie en promyélocyte, puis en myélocyte. A ce stade de développement de la lignée myéloïde, la prolifération des cellules par mitose prend fin et les myélocytes se différencient en PNN dans lesquelles apparaît un noyau multilobé (Figure 28). Ce processus de différenciation est régulé par des facteurs de croissances hématopoïétiques. L'IL-17A induit la production de facteurs de croissance hématopoïétique, notamment G-CSF, par les cellules stromales de la moelle osseuse [248]. Ce G-CSF est un régulateur essentiel de la production et de la libération dans la circulation sanguine de PNN [405]. Il influence aussi la survie et les fonctions des PNN mature [406].

Les PNN passent ensuite dans la circulation sanguine avec une demi-vie courte, estimée à 8h chez l'Homme et 12h chez la souris [407].



**Figure 28: Schéma de l'hématopoïèse.**

Lors de la phase mitotique, les cellules souches sanguines se différencient en myéloblastes puis en myélocytes. A ce stade la phase de prolifération des cellules par mitose prend fin et les myélocytes se différencient en granulocytes: basophiles, éosinophiles et PNN [408].



**Figure 29: Schéma du recrutement des PNN sur le site inflammatoire.**

À l'approche du site inflammatoire, le PNN entretient contact avec l'endothélium activé. Les interactions réversibles entre les sélectines et leurs ligands ralentissent la course du PNN et le mettent en contact avec les stimuli inflammatoires exposés par l'endothélium, responsables de son adhésion ferme. Au niveau d'une jonction endothéliale et en collaboration avec le PNN, les cellules endothéliales desserrent leurs jonctions, lui permettant de progresser à travers l'endothélium vers la matrice. La migration dans la matrice met en jeu des récepteurs aux ligands matriciels et chimio-attractants des PNN [409].

### 1.3. Le recrutement du PNN

Les PNN sont les premières cellules immunitaires recrutées sur un site d'infection ou d'inflammation et contribuent activement à la première ligne de défense de l'organisme. Le recrutement de PMN se fait suivant le gradient des chimio-attractants, puis pour rejoindre le site inflammatoire ils traversent l'endothélium vasculaire. Cette migration trans-endothéliale est initiée par des changements de la surface de l'endothélium résultant de la stimulation par des médiateurs de l'inflammation [410, 411]. Les différentes étapes impliquées dans le recrutement des PNN sur le site infectieux sont : le roulement, l'adhésion à l'endothélium vasculaire et la migration trans-endothéliale [412] (Figure 29).

#### 1.3.1 Roulement ou "rolling"

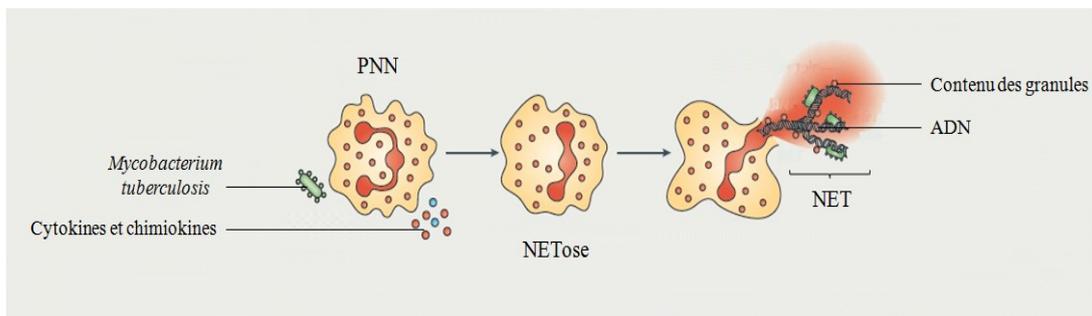
L'initiation de la migration des PNN commence par leur recrutement dans la circulation sanguine et leur roulement tout au long de la paroi des vaisseaux sanguins. Ce processus implique de multiples adhésions et ruptures de liaisons réversibles et de faible affinité entre les PNN et les cellules endothéliales [413]. Ces liaisons mettent en jeu des molécules d'adhésion transmembranaires, les sélectines [414, 415], qui localisées sur la plupart des cellules endothéliales [416]. Ces molécules sont responsables de l'adhérence de faible affinité et du roulement des PNN à la surface des cellules endothéliales.

#### 1.3.2. L'adhésion ferme

L'initiation de la seconde étape de la migration des PNN, met en place des interactions de forte affinité entre les intégrines activées à la surface des PNN et leurs ligands à la surface des cellules endothéliales [417]. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétéro-dimériques exprimées par les cellules de la lignée hématopoïétique [418]. L'activation des intégrines présentes sur les PNN augmente leur affinité pour leur ligand à la surface de l'endothélium, l'"Intercellular Adhesion Molecule 1" (ICAM-1) [419]. Cette interaction forte stabilise l'adhésion des PNN sur l'endothélium, ils adhèrent alors fermement et s'arrêtent totalement [420].

#### 1.3.3. Transmigration de l'endothélium

A la suite de leur arrêt sur l'endothélium, les PNN migrent à travers la paroi des vaisseaux vers le tissu. *In vitro*, et bien que non confirmé *in vivo*, il a été montré que ce



**Figure 30: Processus de NETose.**

Sous l'influence de stimulations par des PAMP ou de l'environnement en cytokines / chimiokines, les PNN peuvent produire des "Neutrophil Extracellular Traps" (NET). La "NETose" consiste en la décondensation de la chromatine et la désintégration de la membrane nucléaire. Le contenu du noyau et des granules va ensuite être expulsé vers le pathogène. La formation des NET est associée à la destruction des pathogènes [421].

passage au travers de l'endothélium est paracellulaire, entre deux cellules épithéliales, ou trans-cellulaire via une cellule épithéliale [422, 423]. Le passage paracellulaire semblerait être privilégié par les PNN [424].

Les PNN activés expriment en abondance des récepteurs aux chimiokines à leur surface et se déplacent en suivant le gradient chimio-tactique. Une fois sur le site de l'infection les PNN vont pouvoir éliminer les pathogènes.

#### 1.4. Mort des PNN

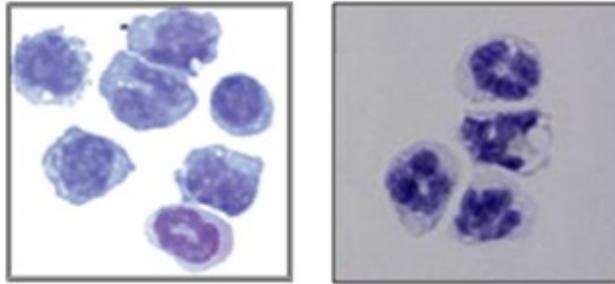
Durant l'inflammation, la plupart des PNN meurent dans le tissu et sont pris en charge par les MP. Il a été montré chez la souris que les PNN recrutés dans le tissu peuvent retourner dans la circulation sanguine [423]. La transmigration inversée des PNN est également observée chez l'Homme dans des cas de polyarthrite rhumatoïde, mais sans que l'on comprenne le rôle de ce mécanisme.

Dans des conditions physiologiques les PNN sont majoritairement éliminés de la circulation dans le foie, la rate et la moelle osseuse [425, 426]. Une augmentation de l'expression du CXCR-4 est observée sur les PNN âgés, les guidant vers la moelle osseuse pour l'élimination [427].

##### 1.4.1. "Neutrophil Extracellular Traps" (NET)

Récemment les "Neutrophil Extracellular Traps" (NET) ont été découvertes, les NET sont un réseau complexe de protéines, d'ADN, du contenu des granules et des enzymes que les PNN dégranulent contre les agents pathogènes [428]. Le processus amenant à la formation de NET est appelé "NETose" (Figure 30). Ce mécanisme est présent dans de nombreuses espèces de vertébrés [429-431], insectes [432] et plantes [433]. D'autres granulocytes (mastocytes et éosinophiles) peuvent également produire des NET [434, 435]. De plus, la production de NET par des MP humains issus du sang périphérique de donneurs sains en réponse à Mtb a été décrite [436].

Les PNN humains, issus du sang circulant sont capables de produire des NET contre Mtb, mais sans être capable de détruire le bacille [437]. Également, les NET produits par les PNN humains en réponse à Mtb induisent la production de cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  et anti-inflammatoire IL-10 par les MP [438]. La formation exacerbée de NET dans le cadre



**Figure 31: Les "Myeloid-Derived-Suppressor Cells" (MDSC).**

Photographie en microscopie optique de MDSC après une coloration May-Grünwald Giemsa. De phénotype hétérogène ces cellules immatures d'origine myéloïde sont monocytaires ou granulocytaires. Le noyau en forme de "beignet" est caractéristique des cellules myéloïdes immatures de la moelle osseuse [439, 440].

d'inflammations chroniques pourrait jouer un rôle dans l'instauration de pathologie auto-immune et engendrer des dégâts tissulaires [441].

## 1.5. Evolution des marqueurs utilisés

Les PNN expriment tous CD11b (aussi connu sous le nom de  $\alpha$ M-intégrine) mais sous certaines conditions, il est possible d'observer des différences phénotypiques, plus particulièrement dans les récepteurs aux chimiokines [442]. Les marqueurs de surface les plus communément utilisés pour définir les PNN chez la souris sont CD11b et Gr1. Gr1 est exprimé sur les granulocytes et monocytes dans la moelle osseuse et les tissus. Il correspond à deux protéines glycosylphosphatidylinositol ancrées dans la membrane: Ly-6C et Ly-6G. Bien que l'expression de Ly-6G soit restreinte aux PNN [443], Ly6C est largement exprimé sur les cellules immunitaires, incluant les CD, LcT et les monocytes. Chacune de ces deux molécules peut être détectée individuellement par des Ac spécifiques [444]. Une autre population cellulaire, récemment mise en lumière dans les cas d'infections, les "Myeloid-Derived-Suppressor Cells" (MDSC) portant également les marqueurs CD11b et Gr1. La plupart des études anciennes utilisant l'Ac RB6-8C5, fixant les PNN doivent donc être revisités. En effet, les cellules marquées Gr1<sup>+</sup> peuvent être soit des PNN, soit des monocytes inflammatoires, soit des MDSC [445].

## 2. Les "Myeloid-Derived-Suppressor Cells" (MDSC)

### 2.1. Une population hétérogène

Les MDSC représentent un groupe hétérogène de cellules myéloïdes immatures. Dans des conditions normales les MDSC représentent 20 à 30% des cellules de la moelle osseuse de souris, mais ne représentent plus que 2 à 4% des cellules du sang [446, 447]. La maturation de ces cellules dans des conditions non physiologiques peut être bloquée, il en résulte alors une expansion clonale anormale et une différenciation possibles en MDSC. Ces MDSC, sont décrites depuis plus de 25 ans chez des patients atteints de cancer [448-450], mais leur rôle dans la réponse immunitaire n'a été décrit que récemment [451].

### 2.2. Phénotype

L'aspect phénotypique des MDSC est variable (Figure 31). Les MDSC forment un groupe hétérogène de cellules ayant la morphologie de granulocytes ou de monocytes, mais elles



présentent un défaut d'expression des récepteurs caractérisant normalement les PNN, CD ou MP matures [452].

Récemment l'hétérogénéité des MDSC chez la souris a été définie par l'étude de l'expression du Gr1. Les MDSC de la lignée granulocytaire (G-MDSC) sont  $CD11b^+ Ly6C^{low} Ly6G^+$  et les MDSC de la lignée monocyttaire (M-MDSC) sont  $CD11b^+ Ly6C^{int} Ly6G^-$ . Les G-MDSC ont une granulosité supérieure aux M-MDSC [453]. Cette définition peut varier suivant les différents modèles d'étude et dans certaines conditions. Par exemple le récepteur CD80 (ou B7.1) [454], CD115 (ou M-CSF ou CSF1) [455] ou encore CD124 (ou IL-4R $\alpha$ ) [456] permettent l'identification des MDSC dans leurs modèles d'études respectifs.

La définition phénotypique n'est donc pas encore clairement standardisée et il faut démontrer les propriétés immunosuppressives des cellules myéloïdes immatures afin de pouvoir les définir comme des MDSC [457].

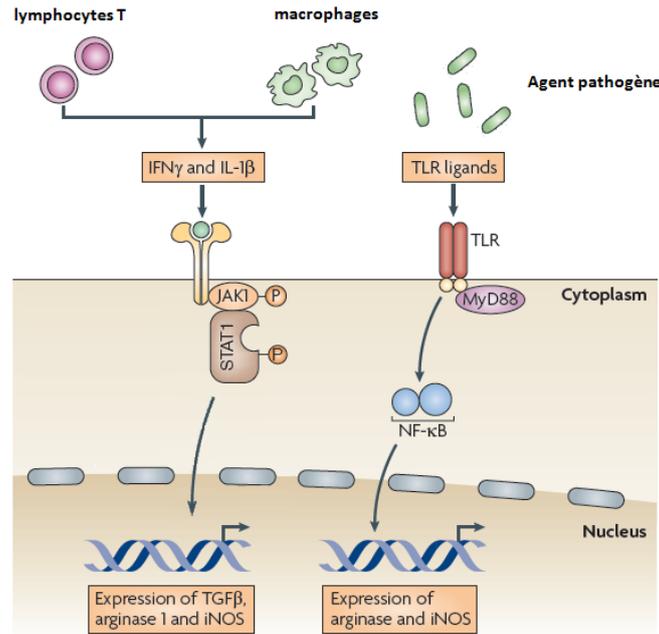
### 2.3. Fonctions

L'activation des cellules myéloïdes immatures dans des conditions pathologiques aboutit à la surexpression de molécules immunosuppressives comme, l'arginase 1 (codée par *arg-1*) et l'"inductible Nitric Oxide Synthase" (iNOS) (ou NOS2) [458, 459]. Il est établi que ces MDSC jouent un rôle clé dans la régulation négative des réponses immunitaires durant les cancers. Les MDSC ont la capacité d'inhiber la prolifération des LcT [460, 461] et en plus de cet effet suppressif de la réponse immunitaire adaptative, les MDSC régulent de la réponse immunitaire innée via la modulation de la production de cytokines par les MP [462]. Récemment la production de TGF- $\beta$  [463, 464] et d'IL-10 [465] par les MDSC a été décrite. Enfin, les MDSC peuvent induire les LcTreg [455, 466, 467].

L'inhibition de la prolifération des LcT par les G-MDSC implique iNOS ; par les M-MDSC implique ROS [452]. Ces cellules ont différents rôles dans le cancer, les infections et l'auto-immunité [453, 468, 469].

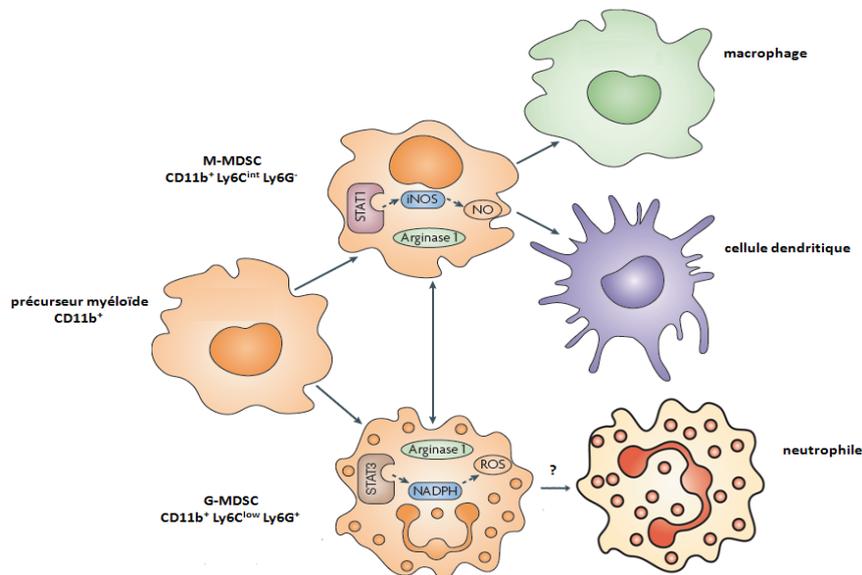
### 2.4. L'expansion des MDSC

Bien que les MDSC aient surtout été observées initialement dans les cas de cancers, il est démontré que les MDSC régulent également la réponse immunitaire dans les cas d'infections par divers agents pathogènes. Elles ont été décrites dans différents contextes infectieux, comme *Trypanosoma cruzi* [470], *Toxoplasma gondii* [471], *Leishmania major*



**Figure 32: Voies de signalisation impliquées dans l'expansion des MDSC.**

Une forte production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-1 $\beta$  par les LcT et les MP activés ou la reconnaissance directe des PAMP par les TLR peuvent induire l'expansion des cellules myéloïdes immatures et leur différenciation en MDSC. Différentes voies de signalisation sont impliquées, comme STAT1 et MyD88 activant NF $\kappa$ B. Ces voies de signalisation augmentent la durée de vie des cellules myéloïdes à l'état immature et activent la surexpression d'arginase et d'iNOS, leur conférant des propriétés immunosuppressives caractéristiques [472].



**Figure 33: Plasticité cellulaire des MDSC.**

Les cellules myéloïdes immatures, de lignée monocyttaire ou granulocytaire, bloquées dans leur développement peuvent développer des propriétés immunosuppressives devenant ainsi des M-MDSC et G-MDSC respectivement. Suivant l'environnement les MDSC peuvent changer de lignée et passer de M-MDSC et devenir des G-MDSC et inversement. Ces cellules immatures peuvent également maturer de M-MDSC en MP ou CD. La possibilité des G-MDSC à maturer en PNN n'est actuellement pas clairement démontrée [472].

[473], *Candida albicans* [474], *Porphyromonas gingivalis* [475] ou encore chez les helminthes [476].

Les mécanismes induisant l'expansion des MDSC varient en fonction du contexte inflammatoire, notamment via l'activation du TLR4 par le [465] et TLR5 par la flagelline [477]. L'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  participent également à l'expansion des MDSC (Figure 32) [470, 472].

Ces voies de signalisation bloquent la maturation des cellules myéloïdes immatures et donc augmentent leur durée de vie. Elles produisent des molécules immunosuppressives ce qui est caractéristique de leur activité biologique [472].

## 2.5. La plasticité cellulaire des MDSC

Les MDSC sont des cellules de la lignée myéloïde à un stade immature, elles conservent ainsi des capacités de cellules précurseur et peuvent donc évoluer en différents types cellulaires. Cette immaturité couplée avec la plasticité cellulaire rend leur observation complexe. Des études montrent que, *in vitro* et avec les stimuli adéquats, les MDSC peuvent se différencier en MP et CD matures [478-480] (Figure 33). Cette observation n'a pu être clairement démontrée que chez les M-MDSC. Les G-MDSC ont montré des propriétés de multiplication supérieures aux M-MDSC [452]. En fonction du contexte inflammatoire les G-MDSC peuvent se différencier en M-MDSC et réciproquement [457].



# Objectifs



## 1. Le changement de vision du PNN

Les PNN ont longtemps été considérés comme des cellules à courte durée de vie ayant pour seul rôle la destruction des agents pathogènes extracellulaires avant de mourir rapidement et d'être éliminés par d'autres cellules comme les MP lors de la résolution de l'inflammation. Mais cette vision réductrice des PNN a récemment changé [421, 481, 482]. Dès les années 1990, le dogme fut ébranlé par la découverte que, bien qu'avec une demi-vie courte (8 et 12h pour l'Homme et la souris respectivement [407]), lorsque les PNN infiltraient les lésions, leur demi-vie est beaucoup plus longue. En effet, 24h après l'induction de la réponse inflammatoire les PNN sont toujours présents en grand nombre sur les sites [483-485]. Le PNN ne prolifère pas mais sa persistance dans les tissus est augmentée [486].

Notre équipe a mis en lumière la capacité du PNN à migrer du site inflammatoire d'injection du BCG dans le derme auriculaire de la souris vers le ganglion drainant via la circulation lymphatique [487]. Cette capacité de migration des PNN par voie lymphatique a ensuite été confirmée par d'autres équipes [488-490].

Ces travaux ont apporté un changement majeur dans la vision du PNN qui, en transportant des Ag mycobactériens dans le ganglion drainant le site inflammatoire, rentrent en contact avec les cellules de l'immunité adaptative et deviennent alors un acteur à part entière de la réponse adaptative, à l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative.

Notre équipe a ensuite montré que les PNN infectés coopèrent avec les CD pour faciliter la présentation des Ag de BCG aux LcT naïfs [491].

## 2. Le PNN protecteur ou délétère dans le tissu pulmonaire?

Dans les infections pulmonaires à mycobactéries, le rôle protecteur des PNN a été rapporté dans plusieurs études. Chez l'Homme, le taux de PNN circulants est positivement corrélé à la résistance à l'infection par Mtb [492]. Chez la souris, les PNN jouent aussi un rôle protecteur en limitant la croissance mycobactérienne, même s'ils ne sont pas en mesure de détruire le bacille par la phagocytose [493]. La phagocytose de corps apoptotiques de PNN par les MP augmente leur capacité à éliminer les bacilles intracellulaires [494]. Dernièrement, il a été montré que les NET produits par les PNN en réponse à Mtb [437] participent à la maturation des MP [438].

Toutes ces études suggèrent un rôle protecteur du PNN, bénéfique pour la résolution de l'infection par le bacille tuberculeux.



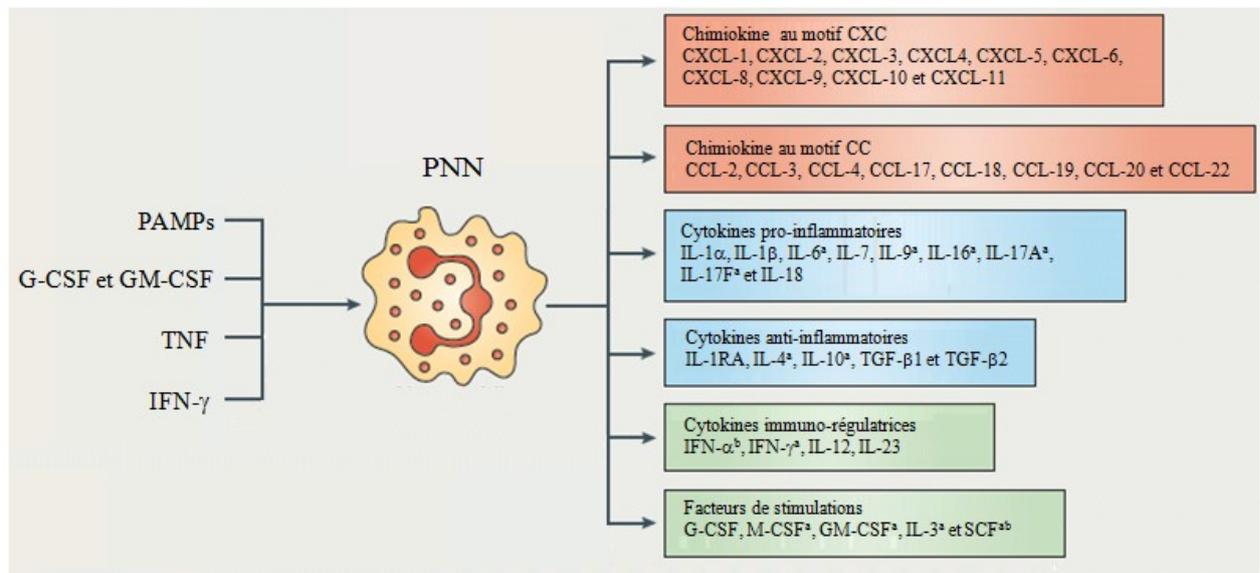
Néanmoins, les PNN sont les cellules les plus représentées dans les crachats de patients en TB active et sont infectés par Mtb [495]. Un nombre important de travaux associent l'excès de PNN à la TB active, indiquant un rôle délétère de ces cellules, du moins lorsqu'elles sont en excès. Une signature biologique de la TB active a été définie par étude du transcriptome: elle définit le PNN activé par la voie des IFN de type I comme majeur dans la pathologie [496]. Mtb induit la destruction par nécrose des PNN infectés [497]. Chez la souris, la déplétion en PNN n'a pas d'impact sur l'élimination des bacilles intracellulaires à faible vitesse de réplication [493], toutefois une reconstitution en PNN aide pour un meilleur contrôle [498]. Les PNN ne sont donc pas en mesure de détruire de façon efficace les bacilles et de contrôler à eux seuls l'infection [496].

Lors de l'infection par Mtb, la régulation du recrutement des PNN dans le poumon est important car leur accumulation est délétère pour l'hôte [499]. Dans un modèle de souris I/St où le recrutement et la survie des PNN sont exacerbés, la survie à l'infection par Mtb est diminuée. Ceci indique que le recrutement de PNN lors de l'infection par Mtb contribue au développement de la pathologie [500]. Chez la souris infectée par Mtb, puis injectée de façon répétée avec du BCG, la production d'IL-17A est exacerbée et la sévérité de l'infection à Mtb augmente. Le recrutement massif de PNN est corrélé à cette aggravation de la pathologie [501]. Un micro ARN non codant (miR-223) a été identifié dans le sang et le parenchyme pulmonaire de patients et de souris atteints de la TB. Ce micro ARN permet de contrôler l'expression des chimiokines recrutant les PNN et des souris génétiquement invalidées pour miR-223 ont un recrutement en PNN augmenté amenant à une inflammation létale [502].

### 3. Le rôle du PNN en tant que partenaire de la réponse immunitaire adaptative contre les mycobactéries

#### 3.1. Coopération avec les CD

Notre équipe a montré que dans le modèle de vaccination par le BCG chez la souris, le PNN migrait au ganglion drainant [487]. D'autres travaux ont également montré que le PNN infecté par Mtb dans le poumon délivrait des signaux de maturation et de migration aux CD vers le ganglion médiastinal pour une activation précoce des LcT naïfs [503]. Notre équipe a montré que lors d'un contact cellulaire les PNN infectés par le BCG induisent la maturation des CD favorisant la prolifération et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LcT [491]. Cette coopération



**Figure 34: Les molécules produites par les PNN.**

Liste des chimiokines, cytokines et facteurs de stimulations produites par les PNN humains et murins, spontanément ou à la suite de stimulations. L'expression et / ou production de ces molécules ont été validées par différentes techniques: expression des gènes, immuno-histologie, ELISA ou tests biologiques dans des études *in vitro* ou *in vivo*.

<sup>a</sup> données sont controversées pour les PNN humains. <sup>b</sup> données ne sont montrées que par des mesures d'ARNm [421].

entre PNN et CD a également été décrite pour d'autres agents infectieux: *Toxoplasma gondii* [490] et *Nippostrongylus brasiliensis* [504].

Ainsi comme nos travaux précurseurs sur la capacité migratoire des PNN l'avaient indiqué, l'ensemble de ces travaux soulignent un rôle important du PNN dans la mise en place de la réponse adaptative en coopération avec les CD.

### 3.2. Production de chimiokines / cytokines

Une fois infiltrés dans les tissus, les PNN produisent des chimiokines, cytokines et facteurs de croissance [421, 505] (Figure 34). Au même titre que les MP, plusieurs rapports suggèrent que les PNN pourraient être polarisés en différents sous-types en réponse à l'environnement inflammatoire [506-509].

Chez la souris infectée par Mtb, les PNN recrutés précocement ont un rôle clé dans le recrutement des LcT CD4<sup>+</sup> via la production de chimiokines reconnues par le CXCR3 exprimé spécifiquement par les Lc Th1 [228]. La déplétion des PNN recrutés dans les premiers jours de l'infection par Mtb chez la souris, est corrélée avec une formation du granulome altérée [493]. Cependant, les mécanismes par lesquels les PNN participent à la formation du granulome pulmonaire ne sont pas actuellement clairement établis.

### 4. Les PNN régulateurs

Dernièrement les PNN murins ont montré la capacité à produire une cytokine immunosuppressive en réponse à Mtb, l'IL-10 [138]. La production d'IL-10 par le PNN infecté est régulée par les voies "Spleen Tyrosine Kinase" (Syk), molécule adaptatrice des lectines et MyD88, molécule adaptatrice des voies TLR. La fonction principale de l'IL-10 est d'inhiber la réponse inflammatoire.

Des PNN régulateurs producteurs d'IL-10 ont été mis en évidence chez la souris infectée notamment par *Trypanosoma cruzi* [510] ou *Brucella abortus* [511], où ils retardent la mise en place de la réponse Th1 et diminuent la production d'IFN- $\gamma$

Les PNN ont émergé comme des cellules effectrices clés pouvant réguler les réponses immunitaires innées et adaptatives, ceci guidant le renouveau d'intérêt dans leurs études. Dans le cas des infections par Mtb, l'impact de la production d'IL-10 par les PNN régulateurs n'est actuellement pas étudié. L'IL-10 pourrait aider à la diminution de réponses inflammatoires



exacerbées, conduisant à la destruction tissulaire ou aider à la survie du bacille, participant à la chronicité de l'infection tuberculeuse [279, 289].

## 5. L'IL-17A et le recrutement des PNN

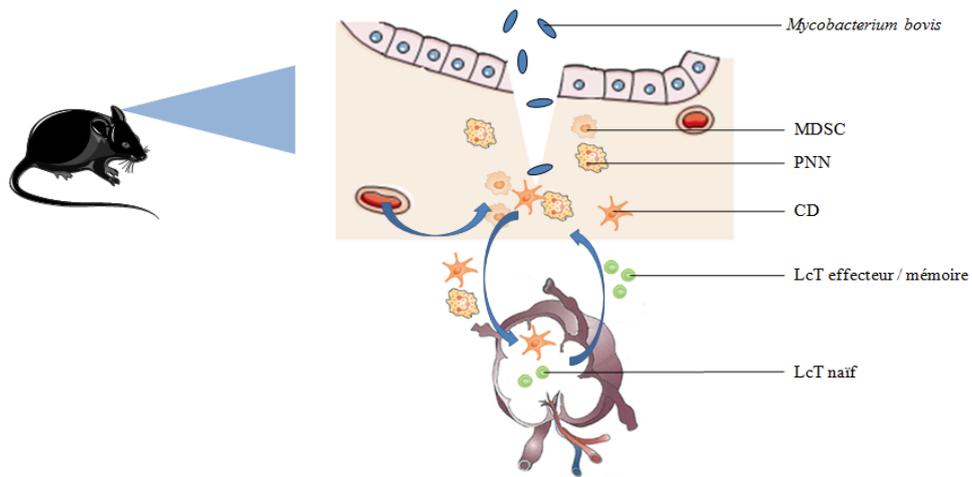
Le rôle protecteur des Th17 dans la mise en place de la réponse protectrice Th1 contre l'infection pulmonaire par Mtb a été démontré chez la souris [228]. L'IL-17A est également cruciale pour la formation d'un granulome efficace pour contenir Mtb et BCG dans le poumon. Des souris déficientes pour les LcT  $\gamma\delta$ , producteurs majeurs d'IL-montrent une diminution de la formation des granulomes.

Par contre une production excessive d'IL-17A est associée chez la souris à la destruction tissulaire [501]. Dans cet équilibre fragile entre l'avantage de la contention des bacilles et la destruction tissulaire délétère pour l'hôte, l'axe IL-23/IL-17A semble jouer un rôle important.

La voie Th17 induit la granulopoïèse, notamment via l'induction de G-CSF [259]. Dans le modèle de souris sur-exprimant l'IL-17A, le recrutement en granulocytes est augmenté [501]. De plus, chez la souris génétiquement invalidée pour l'IL-17A le recrutement en PNN est altéré [247, 257]. L'instillation intra-trachéale de Th17 conditionne un recrutement de PNN [512], recrutement bloqué par des Ac anti-IL-17A ou anti chimiokines.

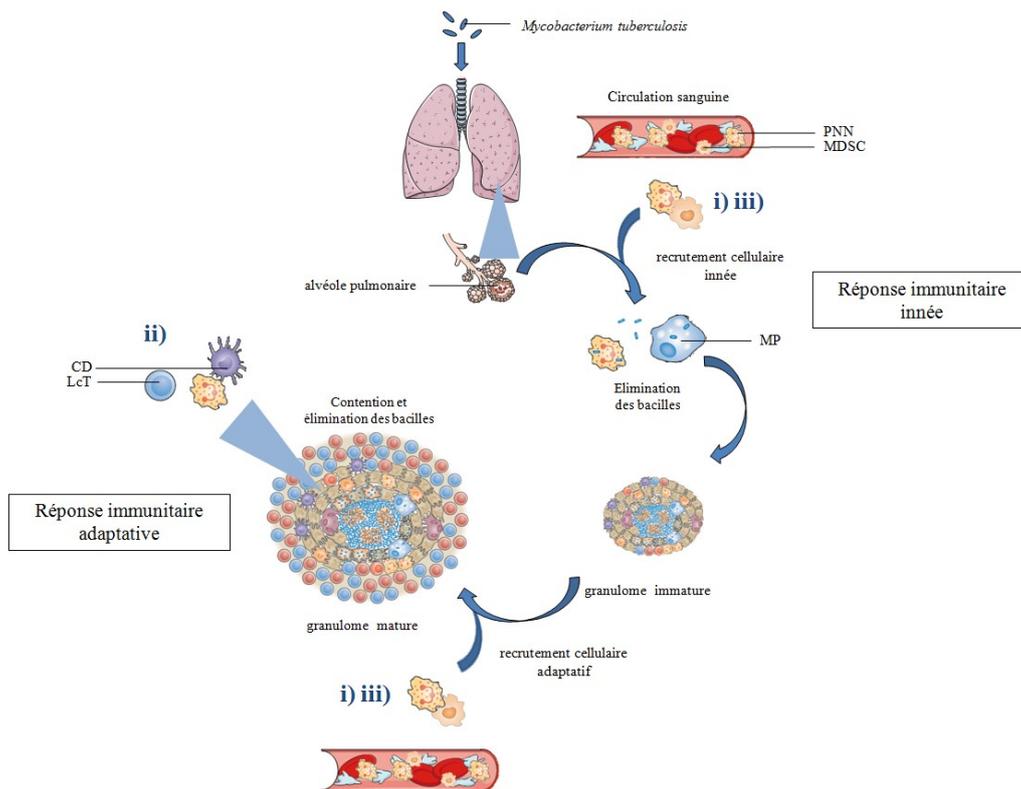
Les PNN humains n'expriment pas l'IL-17RA/RC, récepteur à l'IL17A [513]. La présence du récepteur à l'IL-17A sur les PNN de souris n'a pas été directement montrée, mais des PNN issus de souris déficientes pour l'IL-17RA ne montrent aucune perturbation de leur activité biologique [514].

Les mécanismes par lesquels la voie Th17 régule le recrutement des PNN et la formation du granulome restent à définir. L'IL-17RA est impliqué dans la plupart des récepteurs aux cytokines de la famille des IL-17, donc les souris déficientes pour ce récepteur ne répondent ni à l'IL-17A ni aux IL-17C, E et F.



**Figure 35: Recrutement de granulocytes dans le modèle de vaccination du derme auriculaire par BCG.**

Lors de l'injection de BCG dans le derme auriculaire, PNN et MDSC sont recrutés sur le site de l'infection. Ainsi grâce à ces observations, il est proposé que les PNN participent à la mise en place de la réponse Th1 protectrice en coopérant avec les CD pour l'activation des LcT naïfs et que les MDSC retardent la mise en place de la réponse Th1 en inhibant la prolifération des LcT CD4<sup>+</sup>.



**Figure 36: Les objectifs de la thèse.**

L'objectif de ce travail s'articule autour de trois axes i) définir le recrutement des PNN dans les phases précoces comme lors de la chronicité de l'infection, ii) étudier les communications cellulaires dans le granulome entre les PNN, les CD et les LcT et iii) caractériser le phénotype des granulocytes recrutés.

## 6. Les MDSC dans les infections mycobactériennes

Les MDSC sont un groupe hétérogène de cellules myéloïdes immatures [472] qui ont la capacité d'inhiber la prolifération des LcT [460, 461]. Elles sont proches des PNN et difficiles à caractériser phénotypiquement. Ces cellules sont depuis longtemps associées à la persistance des tumeurs [515] mais leurs implications dans des contextes infectieux sont de plus en plus souvent démontrées. Elles ont été mises en lumière dans des infections par *Trypanosoma cruzi* [470], *Toxoplasma gondii* [471], *Leishmania major* [473], *Candida albicans* [474], *Porphyromonas gingivalis* [475] ou encore par les helminthes [476].

Notre équipe a montré le recrutement de MDSC dans un modèle de vaccination par le BCG dans le derme auriculaire de la souris [439] (Figure 35).

Le rôle de ces cellules immunosuppressives dans les étapes de la physiopathologie de la TB n'est actuellement pas décrit. En supprimant les LcT, elles apparaissent pourtant comme un candidat idéal pour aider Mtb à échapper à la réponse de l'hôte et à persister. Il est donc important de les définir dans les modèles murins d'infection pulmonaire à Mtb afin, à terme, de pouvoir comprendre les rôles qu'elles pourraient jouer dans la physiopathologie de la TB.

## 7. Objectifs de la thèse

Les interactions entre CD, PNN et LcT dans le poumon infecté par les mycobactéries et leur impact potentiel sur l'environnement cytokinique ne sont pas clairement établis.

Notre objectif est de i) définir, chez la souris, la cinétique et les signaux moléculaires impliqués dans le recrutement des PNN dans le poumon lors d'infections intranasales par BCG et Mtb, ii) étudier les interactions que les CD infectées, présentes dans le granulome, peuvent établir avec les PNN et les LcT, et l'impact que cela peut avoir sur le microenvironnement inflammatoire du granulome et iii) caractériser la présence et la cinétique de recrutement de MDSC dans le poumon de souris infectées par BCG et Mtb (Figure 36).



i) Le recrutement des PNN au cours de l'infection pulmonaire par mycobactéries (Lombard et al., en préparation)

La littérature nous indique que la voie Th17 joue un rôle majeur dans le recrutement des PNN dans le poumon. Nous avons comparé ces recrutements chez des souris C57BL/6 de type sauvage (WT) et des souris génétiquement invalidées pour l'IL-17RA (IL-17RA<sup>-/-</sup>), incapables de répondre à la plupart des cytokines de la famille IL-17. Les deux lignées de souris ont été infectées par voie intranasale par BCG ou Mtb, les cellules du LBA et du parenchyme pulmonaire ont été analysées à différents jours post-infection (Jpi). Nous avons ensuite déterminé les chimiokines responsable du recrutement cellulaire et le rôle que ces PNN pouvaient jouer sur la balance inflammatoire IL-17A / IFN- $\gamma$ .

ii) Les communications cellulaires dans le granulome (Doz\*, Lombard\* et al., Journal of Immunology, 2013, \*equal contribution)

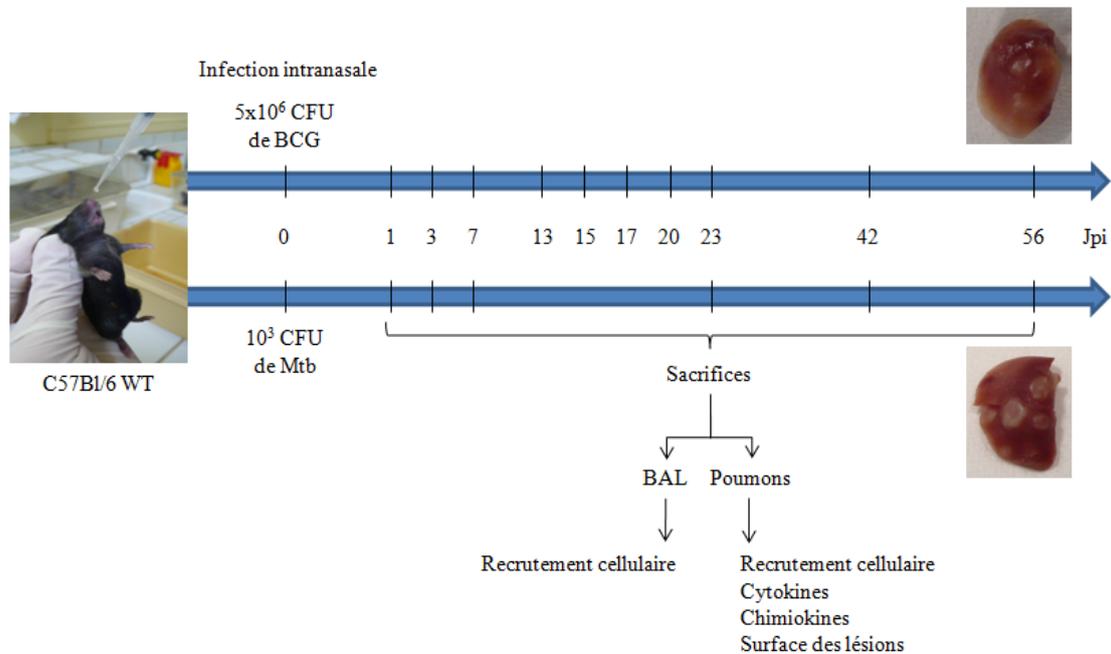
Nous avons mis en place un modèle *in vitro* qui reproduit les coopérations cellulaires entre CD, PNN et LcT qui peuvent survenir dans le granulome pulmonaire lors de la phase chronique de l'infection à mycobactéries. Nous avons ensuite étudié l'impact de ces communications cellulaires sur l'environnement cytokinique du granulome.

iii) Les MDSC dans le poumon de souris infectées par mycobactéries (travaux complémentaires)

Nous avons utilisé une combinaison d'Ac anti-CD11b, Ly-6C et Ly-6G afin de caractériser le recrutement des granulocytes, PNN et cellules apparentées, dans le poumon de nos souris C57BL/6 WT ou IL-17RA<sup>-/-</sup> infectées par BCG ou Mtb. Comme décrit précédemment dans l'équipe [439], nous avons cherché la présence de cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>) non PNN (Ly-6C<sup>int</sup> et Ly-6G<sup>-</sup>) et nous avons également cherché à définir la fonction de ces cellules.



# Résultats



**Figure 37: Protocole d'infection intranasale par BCG et Mtb.**

Dans le but d'analyser le recrutement des PNN, nous avons réalisé des infections intranasales de souris C57BL/6 WT, IL-17RA<sup>-/-</sup> ou IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> par  $5 \times 10^6$  CFU de BCG ou  $10^3$  CFU de Mtb. Les cinétiques de sacrifice sont pour le BCG J1, 3, 7, 13, 15, 17, 20, 23, 42 et 56pi et pour Mtb J1, 3, 7, 23, 42 et 56pi. Nous avons prélevé les lavages bronco-alvéolaires (LBA) afin d'analyser le recrutement cellulaire dans la lumière pulmonaire et digérer enzymatiquement le poumon afin d'analyser le recrutement cellulaire dans le parenchyme pulmonaire. Les cytokines et chimiokines produites ainsi que les lésions du parenchyme pulmonaire ont été analysées.

## **A. Définition du recrutement en PNN dans le parenchyme et la lumière pulmonaire suite à une infection par mycobactéries**

### **Article 1 (En preparation)**

#### **IL-17RA in non-hematopoietic cells controls recruitment to the lung of an adaptive wave of IL-10 producing neutrophils in mycobacteria-infected mice**

Robin Lombard, Florence Carreras, Emilie Doz, Yves Le Vern, Christelle Rossignol, Patricia Berthon, Dominique Buzoni-Gatel and Nathalie Winter

---

Les PNN sont les premières cellules recrutées lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries. Ce recrutement pourrait dépendre de la cytokine inflammatoire IL-17A dont le rôle majeur dans la granulopoïèse est établi. Plus tardivement, au moment de la mise en place de la réponse adaptative, le granulome se forme pour contenir les bacilles. L'IL-17A a un impact positif majeur dans l'orchestration du granulome. Le rôle des PNN est moins clair. Ils semblent jouer un rôle positif sur la mise en place de la réponse immunitaire, mais si leur recrutement est exacerbé, ils induisent la destruction du tissu pulmonaire.

Dans cette première partie de nos travaux, l'objectif était de définir, chez la souris, la cinétique et les signaux moléculaires impliqués dans le recrutement des PNN. Nous avons émis l'hypothèse que les cytokines de la famille de l'IL-17 joueraient un rôle majeur et nous avons donc comparé des souris C57BL/6 WT aux souris IL-17RA<sup>-/-</sup>, incapables de répondre à l'IL-17A, C, E et F. Les deux lignées de souris ont été infectées par voie intranasale par 5x10<sup>6</sup> CFU de BCG ou 10<sup>3</sup> CFU Mtb. A différents temps après infection, les souris ont été euthanasiées. Les cellules des lavages broncho-alvéolaires (LAB) et du parenchyme pulmonaire après digestion enzymatique, ont été isolées puis analysées par cytométrie en flux (Figure 37).

Dans un premier temps nous avons observé que le recrutement des PNN dans le poumon est bi-phasique. Après la première vague précoce observée à J1pi, une seconde



vague atteint le poumon entre les J17 et 23pi. Ce deuxième pic n'est pas observé après injection de BCG tué à la chaleur. Cependant, ces PNN tardifs ne sont pas corrélés à la charge bactérienne pulmonaire et leur déplétion par Ac n'a aucun impact sur le contrôle des bactéries.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux signaux de recrutement impliqués dans cette seconde vague. Ce deuxième pic de PNN a lieu en même temps que le recrutement dans le poumon des LcT  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ . Au pic de recrutement, de grandes quantités d'IL-17A et d'IFN- $\gamma$  sont également produites dans le poumon. Les LcT  $\gamma\delta$  participent majoritairement à la production d'IL-17A et les  $\alpha\beta$  à la production d'IFN- $\gamma$ .

Le rôle des IL-17 dans la granulopoïèse étant établi, nous avons analysé l'impact du récepteur IL-17RA dans notre modèle. Cette sous-unité est impliquée dans la formation de plusieurs récepteurs aux différentes IL-17: utiliser une souris l'IL-17RA<sup>-/-</sup> permet d'inhiber les signaux transmis par la majorité des membres de la famille des IL-17. Nous avons observé que le recrutement des PNN précoces (J1pi) ne dépend pas de l'expression de l'IL-17RA. Par contre, aussi bien chez la souris infectée par BCG que par Mtb, le recrutement des PNN tardifs est très fortement diminué chez la souris IL-17RA<sup>-/-</sup> par rapport à la souris WT. Chez la souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> un recrutement normal de PNN à J23pi est observé.

Le récepteur IL-17RA étant ubiquitaire, nous avons utilisé la technique des souris chimères et avons pu montrer que l'IL-17RA doit être exprimé par les cellules non hématopoïétiques pour un recrutement optimal des PNN tardifs. L'IL-17RA contrôle en phase tardive l'expression des chimiokines CXCL-1 et 5, deux ligands majeurs de CXCR2 exprimé par les PNN. De façon intéressante, CXCL-2, un autre ligand majeur de CXCR2, est produit chez les souris dont les cellules non hématopoïétiques sont déficientes pour l'IL-17RA et malgré cela les PNN tardifs ne sont pas recrutés.

Nous avons ensuite examiné le rôle de l'IL-17RA sur la physiopathologie de l'infection. En réponse à Mtb, un recrutement mal organisé de l'infiltrat inflammatoire est observé chez la souris IL-17RA<sup>-/-</sup> et les granulomes semblent moins bien formés en accord avec des travaux précédents chez la souris IL-17A<sup>-/-</sup> [247, 257]. De plus une production exacerbée d'IL-17A mais pas de l'IFN- $\gamma$  est observée chez la souris IL-17RA<sup>-/-</sup>. Elle est due à



une surproduction de l'IL-17A par les LcT  $\gamma\delta$  chez la souris IL-17RA<sup>-/-</sup> par rapport à la souris WT. De façon intéressante la production plus importante d'IL-17A est corrélée avec une production plus faible d'IL-10 chez la souris IL-17RA<sup>-/-</sup> incapable de recruter les PNN tardifs dans le poumon.

Nous avons ensuite analysé l'impact des PNN dans le contrôle de la balance cytokinique IL-17A / IL-10. Les PNN du poumon triés par cytométrie en flux à J1 ou 23pi produisent de grandes quantités d'IL-10 après restimulation par du BCG *ex vivo*. Après marquage intracellulaire des cytokines, nous avons observé que les PNN recrutés à J23pi dans le poumon participent, avec les LcT CD4<sup>+</sup> (probablement de type LcTreg) à la production de l'IL-10. Enfin, après administration d'un Ac déplétant spécifiquement les PNN à J23pi chez la souris WT, nous avons observé une tendance à la diminution de la production d'IL-10 dans le poumon. La production d'IL-17A est alors significativement augmentée indiquant bien le rôle régulateur des PNN tardifs dans l'inflammation dépendante de l'IL-17A dans le poumon.

Pour conclure cette première partie, nous avons mis en lumière, en réponse à BCG et Mtb, le recrutement dans le poumon d'une vague adaptative de PNN dépendante de l'expression du récepteur à l'IL-17RA par les cellules non-hématopoïétiques. Cette vague adaptative ne semble pas jouer de rôle majeur dans le contrôle direct des bacilles. Par contre ces PNN produisent de l'IL-10 et participent à la diminution de la réaction inflammatoire produite par l'IL-17A. Nous pensons donc qu'au même titre que les LcT, les PNN régulateurs, producteurs d'IL-10 permettent d'éviter l'exacerbation de l'inflammation dans le poumon.



**IL-17RA in non-hematopoietic cells controls the recruitment to the lung of  
an adaptive wave of IL-10-producing neutrophils  
in mycobacterium-infected mice**

**Short Title: IL-17RA and regulatory neutrophils**

**Robin LOMBARD, Florence CARRERAS, Emilie DOZ, Yves LEVERN, Christelle  
ROSSIGNOL, Patricia BERTHON, Dominique BUZONI-GATEL and Nathalie WINTER\***

**INRA, Université de Tours, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, 37380 Nouzilly  
France**

**\* E-mail to: [nathalie.winter@tours.inra.fr](mailto:nathalie.winter@tours.inra.fr)**

**Abstract**

Chronic infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) induces a delicate balance between pro- and anti-inflammatory immune responses in the lung. Mycobacterial multiplication is constrained within lung granulomas, but excessive inflammation eventually occurs and destroys the lung. In mice, excessive IL-17A production is associated with exacerbated inflammation. The role neutrophils play in this equilibrium remains unclear. These cells are recruited early and participate in granuloma formation, but excessive neutrophilia has been implicated in tuberculosis disease. We demonstrate here, in the mouse model, that neutrophils are recruited to the lung in two waves after intranasal infection with virulent Mtb or the live attenuated vaccine strain Bacillus Calmette Guérin (BCG). A first wave of neutrophils is swiftly recruited, followed by a subsequent adaptive wave that reaches the lung together with IFN- $\gamma$  and IL-17A-producing CD4 and  $\gamma\delta$  T cells. The adaptive wave is critically dependent on the expression of IL-17RA, the receptor for IL-17A, whereas the innate wave is not. Using wild-type and IL-17RA<sup>-/-</sup> bone marrow-chimeric mice, we demonstrated that IL-17RA in non-hematopoietic cells controlled the expression of two major chemokines involved in neutrophil recruitment, CXCL-1 and 5. Even though CXCL-2, the third major CXCR2 ligand, is produced, the adaptive wave of lung neutrophils is abolished in IL-17RA<sup>-/-</sup> mice. Neutrophils from the adaptive wave were colocalized with T cells and were not correlated with bacterial load in the lung. They were involved in IL-10 production *in situ* and their absence was associated with higher levels of IL-17A production and an exacerbation of lung inflammation. These results reveal that IL-10-producing neutrophils recruited to the lung during chronic mycobacterial infection actively participate in regulatory circuits attenuating the IL-17A-driven exacerbation of inflammation.

## Author Summary

Tuberculosis (TB) is a slowly progressing lung infection that kills 1.7 million people annually. *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) manipulates the immune system and persists in the host for decades. An equilibrium is established within granulomas, which limit mycobacterial multiplication but eventually form cavities that destroy the lungs. IFN- $\gamma$  and IL-17A are instrumental in granuloma formation but their production in excess may destroy the tissues. Neutrophils may also be involved in lung tissue destruction during TB. We investigated their role in regulating lung infection with Mtb or Bacillus Calmette Guérin (BCG), the live vaccine against TB, in the mouse model. We observed an early wave of neutrophil recruitment, followed by a second wave of neutrophils reaching the lung together with adaptive T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-17A. This second neutrophil wave was critically dependent on the expression of IL-17RA by lung-resident cells and the production of two chemokines: CXCL-1 and 5. The neutrophils produced IL-10, a highly immunosuppressive cytokine, which downregulated IL-17A. Thus, during lung infection with mycobacteria, IL-10-producing regulatory neutrophils help to maintain tissue integrity, by counteracting highly inflammatory IL-17A-producing T cells. These results shed new light on the regulatory role of neutrophils during Mtb infection.

## Introduction

Following infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), one of the three leading infectious cause of human mortality [1], some individuals mount a sterilizing innate immune response. In others, the bacilli are not eradicated and the adaptive immune response, characterized by a delayed hypersensitivity reaction to tuberculin, is initiated. However, this is generally not enough to eradicate all bacilli and most people remain latently infected with Mtb. The estimated latent tuberculosis (TB) reservoir currently corresponds to about one third of the world population [2]. Vaccination with *M. bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG), a live attenuated strain, induces a strong and long-lasting immune response. However, BCG provides high levels of protection only against the most severe forms of TB and, despite broad vaccination coverage, BCG is unable to control global pandemics of TB [3]. The WHO has declared the fight against TB to be a global priority.

Cell-mediated immunity is required to constrain Mtb. CD4 and CD8 T and B cells are recruited to the lung, together with innate cells, for the formation of a specific multicellular structure, the granuloma [4], which is required to constrain mycobacterial multiplication. However, excessive inflammation within the granuloma leads to caseification and lung tissue destruction. Granulomas are dynamic structures [5] consisting of various cells engaged in crosstalk, including innate and adaptive cells, such as alveolar macrophages (MP), dendritic cells (DC) and neutrophils. The roles of MP in mycobacterial killing and evasion, and of DC in linking innate and adaptive responses to mycobacteria are well established [6], but there is still some debate about the potential role of neutrophils [7]. Depending on the experimental setting, the animal model and time point, neutrophils may be considered important for protection against mycobacterial infections [8-12] or deleterious [13-16]. Neutrophils are among the first cells to respond to mycobacterial infection. They participate in the onset of

adaptive immunity [8,9] and granuloma formation [17]. However, chronic neutrophilia also seems to be involved in TB pathophysiology, although the mechanisms underlying neutrophil accumulation long after primary infection are not entirely clear [18-20].

IL-17 cytokines play an important role in inflammation. The best characterized member of this large family is IL-17A, which has shown to be responsible for recruiting neutrophils to sites of damage [21], including the lung [22]. IL-17F is closely related to IL-17A and these two molecules can form heterodimers with different effects on the fine-tuning of the inflammatory response depending on the pathological context [23]. IL-17 cytokines signal through receptors of the IL-17R family consisting of five subunits, which can assemble in different combinations to form diverse functional receptors. The IL-17RA subunit is common to several receptors used by at least four ligands containing IL-17A or F proteins [24]. IL-17 receptors mediate signaling through pathways generally associated with innate immunity and they connect the innate and adaptive arms of the immune response [24]. IL-17RA is expressed ubiquitously, and its levels are particularly high in hematopoietic tissues even though epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts are the principal cells responding to IL-17A [24]. In response to mycobacterial infection, IL-17A is produced principally by CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> αβ<sup>+</sup> T cells, which are also known as Th17 cells [25], and γδ<sup>+</sup> T cells [26,27]. IL-17A is beneficial to the host because vaccine-induced Th17 cells favor the recruitment of protective Th1 cells in response to Mtb infection [25] and because IL-17A contributes to the formation of a mature granuloma [27,28]. However, IL-17A is also detrimental because its unrestricted production leads to lung tissue destruction [18].

Chronic infection with mycobacteria generally results in a delicate balance between pro- and anti-inflammatory immune responses. IL-10 plays an important role in downregulating the IFN-γ<sup>-</sup> and TNF-producing Th1 environment. Cells within protective pulmonary granulomas produce more IL-10 than cells located outside these structures [29].

Local IL-10 production may be beneficial to both the host, by controlling what would otherwise be massive inflammation, and to the pathogen, by disarming cells, thereby allowing pathogen survival [30]. IL-10<sup>-/-</sup> mice have an enhanced Th1 protective response against Mtb [31], and IL-10 blockade during BCG vaccination in wild-type (WT) mice enhances protection against Mtb [32], indicating that IL-10 has a deleterious effect. Many cells may produce IL-10, and its source may depend on the stage of Mtb infection. During chronic infection, T cells, including regulatory T cells (Treg), are the major source of IL-10 [33]. During the initial phase of infection in mice, innate cells, such as alveolar macrophages, DCs and neutrophils, produce IL-10 following TLR and C-type lectin co-activation by mycobacterial PAMPs [34].

TB pathogenesis is characterized by the regulation of inflammation, but the role of neutrophils in mycobacteria-driven inflammation remains a matter of debate [7,35]. We recently showed that infected DCs, which are present during the chronic phase of mycobacterial infection [36,37], attract neutrophils and instruct them to produce IL-10. *In vitro*, these neutrophils specifically constrain IL-17A production by Th17 CD4 cells expressing the IL-10 receptor, but not by Th1 cells [38]. Thus, neutrophils may be involved in attenuating the strong IL-17A-driven inflammation *in vivo*. We investigated how and why these cells were recruited to the lung upon mycobacterial infection. We used mice intranasally (i.n.) inoculated with BCG or virulent Mtb and observed that, in addition to neutrophils recruited early in infection, a second adaptive wave of neutrophils was recruited to the lung, together with T cells. IL-17RA produced by non-hematopoietic cells, was critically involved in the adaptive wave of neutrophil recruitment. We also obtained evidence to suggest that, during the adaptive response, the IL-10 produced by neutrophils *in vivo* contributed to an attenuation of the effects of IL-17A, thereby helping to decrease inflammation in the lung.

## Results

### Neutrophils reach the lung in two waves following intranasal infection with BCG or Mtb

We investigated the kinetics of neutrophil recruitment to the lung, by administration of  $5 \times 10^6$  CFUs of BCG intranasally (i.n.) to C57BL/6 mice, which were then killed at several time points. We analyzed cells from bronchoalveolar lavage (BAL) and digested lung tissue. Combined labeling with anti-Ly-6C and anti-Ly-6G antibodies was used to distinguish inflammatory monocytes and myeloid-derived suppressor cells from *bona fide* neutrophils among CD11b-positive myeloid cells [39]. The day after BCG instillation, CD11b<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup> neutrophils, which had a characteristic polylobed nucleus, were abundant among CD11b-positive myeloid cells in both lung tissue and BAL (Fig. 1A). We then analyzed the kinetics of neutrophil recruitment to the lung tissue and air space over the 56 days following BCG instillation (Fig. 1B). On day 1, neutrophils accounted for a high proportion of CD11b cells, but this proportion rapidly decreased after day 3. However, a second, larger peak of neutrophils was observed on day 23 (Fig. 1B). In the BAL, neutrophils were the most abundant CD11b cells on day 1 but were barely detectable on day 3. The second wave of neutrophils was also detected in BAL cells on day 23, albeit to a lesser extent than in lung tissue, indicating that the extravasation of these late arrivals to the air space was less efficient. In a more detailed kinetic study, we found that the second wave of neutrophil recruitment began between days 15 and 17 (Supplemental Fig. S1). By day 56 after BCG instillation, the number of neutrophils in this second wave declined. Following the i.n. administration of  $10^3$  CFUs of Mtb, we detected neutrophils in the lung tissue on day one, albeit in smaller numbers than in mice receiving BCG instillations (Fig. 1C). After a slight decrease on day 7, neutrophil numbers had again increased by day 23. By contrast to what was observed following BCG instillation in mice, neutrophils continued to accumulate in Mtb-infected lung

tissue on day 56 (Fig. 1C). The early peak of neutrophils in BAL decreased by day 3. The late peak of neutrophils was detected on day 23 and accumulation was still ongoing on day 56 (Fig. 1C). We then compared several parameters between day 1 and day 23 neutrophils (Supplemental Fig. S2). After infection with the green fluorescent BCG strain Myc409 [8], neutrophils carrying BCG were detected in the lung tissue on days 1 and 23, demonstrating their ability to carry out phagocytosis *in vivo*, although BCG-infected neutrophils were more numerous on day 1 than on day 23 (Supplemental Fig. S2). No difference in morphology, killing capacity, myeloperoxidase activity or reactive oxygen species production was detected between day 1 and day 23 neutrophils.

#### **Day 23 neutrophil numbers are not correlated with bacterial load and these cells reach the lung along with adaptive IFN- $\gamma$ - and IL-17A-producing T cells**

We then investigated the correlation between bacterial counts and the day 23 influx of neutrophils into the lung. Mice were inoculated *i.n.* with  $5 \times 10^6$  CFUs of live BCG or an equivalent load of heat-killed (HK) bacilli. One day later, similar numbers of neutrophils were recruited to the lung tissue in response to live or HK BCG. By contrast, on day 23 the neutrophil peak was detected only in mice inoculated with live BCG (Fig. 2A). We assessed the multiplication of BCG and *Mtb* *in vivo* in the lung. The inoculum of  $5 \times 10^6$  CFUs of live attenuated BCG administered had decreased by a factor of 100 by day 23 (Fig. 2B), because the immune response controlled bacterial multiplication. By contrast, by day 23, the initial inoculum of virulent *Mtb* ( $10^3$  CFUs) had increased by a factor of 100 (Fig. 2B). Thus, in BCG-inoculated mice, despite the decrease in the number of CFUs, there were more neutrophils on day 23 than on day 1. By contrast, in *Mtb*-infected mice, despite vigorous bacterial multiplication in the lung, the neutrophil rebound on day 23 was less marked than that in BCG-inoculated animals. We then selectively depleted neutrophils on days 1 and 23 by

injecting anti-Ly-6G NIMPR14 Ab [39] either before BCG infection or on days 17, 19 and 21 after BCG infection. Neither neutrophil depletion had a measurable impact on BCG load in the lung (Fig. 2C), indicating that the recruited neutrophils were unable to control mycobacteria *in situ* despite being able to kill bacilli *ex vivo* (Supplemental Fig. S2). We investigated whether the wave of neutrophils observed on day 23 was in direct contact with bacilli in the lung, by instilling green fluorescent BCG strain Mye409 in mice and analyzing lung cryosections after neutrophil staining with anti-Ly6G antibodies (Fig. 2D). The bacilli were not colocalized with the neutrophils reaching the lung on day 23.

The neutrophils on day 23 therefore appeared to be part of the adaptive immune response occurring in the lung. We then carried out flow cytometry analysis of the recruitment of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> αβ and CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> γδ T cells to the infected lung (Fig. 3A). Both these subsets peaked on day 23 in the BCG- and Mtb-infected mice (Fig. 3B), coinciding with the second peak of neutrophils (Fig. 1). In a more detailed kinetic study, we observed that this second wave of neutrophils reached the lung by day 15 or 17, together with T cells (Supplemental Fig. S1). In response to Mtb or BCG, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> αβ T cells accumulated in the lung in larger numbers than CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> γδ T cells (Fig. 3B). CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> αβ T cells were more numerous in BCG-infected mice than in Mtb-infected mice. We analyzed the distribution of T cells and neutrophils in the BCG-infected lung on day 23, by the immunohistochemical staining of frozen sections. On day 23, neutrophils were found to be located in the close vicinity of T cells (Fig. 3C) rather than in contact with bacteria (Fig. 2D)

As IFN-γ [20] and IL-17A [18] could be involved in the influx of neutrophils in response to mycobacterial infection, we analyzed the production of these two cytokines in the lung. The production of both IL-17A and IFN-γ by total lung cells peaked on day 23 in both BCG- and Mtb-infected mice (Fig. 3D), coinciding with the recruitment of T cells to the lung. Consistent with previous reports [26-28], intracellular cytokine staining (ICS) showed that

CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> αβ T cells were the chief producers of IFN-γ, whereas CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> γδ T cells produced most of the IL-17A, although both these T-cell subsets were able to produce both cytokines (Fig. 3E). We detected no IL-17A production by neutrophils in response to BCG infection (data not shown). In response to infection with BCG or Mtb, strong upregulation of *il-17a* gene expression was observed in the lung on day 23, but not on day 1. Expression of the other genes from the *il-17* family [24] was barely detectable (Supplemental Fig S3). Thus, during the adaptive phase of the immune response, the arrival of IFN-γ<sup>+</sup> and IL-17A-producing T cells in the lung coincided with an adaptive wave of neutrophil recruitment to the lung, these cells being colocalized with T cells but not with bacilli.

#### **The IL-17RA produced by non-hematopoietic cells regulates CXCR2 ligand production and controls the adaptive wave of neutrophils**

IL-17A has been identified as a key regulator of granuloma formation [40]. We therefore studied its role in the innate and adaptive waves of neutrophil recruitment in the response to mycobacteria. We used IL-17RA<sup>-/-</sup> mice [41] (hereafter referred to as IL mice), in which signaling by most members of the IL-17 family is blocked [42]. The day after BCG or Mtb infection, early neutrophils reached the lung tissue and air space similarly in WT and IL mice (Fig. 4A). By contrast, the adaptive influx of neutrophils on day 23 was severely impaired in IL mice after infection with Mtb or BCG (Fig. 4A). We observed no significant difference in the adaptive neutrophil peak between WT and IFN-γR<sup>-/-</sup> BCG-infected mice (Fig. 4B), indicating that this receptor played a much less important role than IL-17RA in our model.

We then investigated whether IL-17RA regulated the production of the main CXCR2 ligands involved in neutrophil recruitment — CXCL-1 (KC), CXCL-2 (MIP2) and CXCL-5 (LIX) [43] — in the lung after BCG infection. The day following treatment, comparisons with PBS used as a control, showed that BCG moderately upregulated the expression of these three

genes, in both WT and IL mice (Fig. 4C). On day 23, *cxcl-2* gene expression was slightly higher than on day 1 but did not differ between WT and IL mice. By contrast, *cxcl-1* and *5* expression was much stronger on day 23 than on day 1 in BCG-infected WT mice but was dramatically reduced in IL mice.

We investigated the role of IL-17RA expression by non-hematopoietic and hematopoietic cells, by constructing bone marrow (BM)-chimeric mice. Lethally irradiated recipient WT or IL mice were reconstituted with donor WT or IL BM cells. All cells from control WT to WT mice expressed IL-17RA whereas IL to IL mice were totally IL-17RA-deficient. Reconstitution was complete after six weeks (Supplemental Fig. S4) and the mice were inoculated i.n. with  $5 \times 10^6$  CFUs of BCG. Twenty-three days later, we analyzed adaptive neutrophil recruitment in lung tissue and BAL by flow cytometry (Fig. 4D). WT mice reconstituted with IL BM cells had similar numbers of neutrophils to control WT to WT mice. By contrast, adaptive lung neutrophil recruitment was severely impaired in IL mice reconstituted with WT BM cells, as in IL to IL mice.

We found that *cxcl-2* expression was similar in all groups of chimeric mice (Fig. 4E). By contrast, expression of the *cxcl-1* and *5* genes was severely impaired in BCG-infected IL mice reconstituted with WT or IL BM cells (Fig. 4E). Together, these data demonstrate that IL-17RA produced by non-hematopoietic cells plays a critical role in the adaptive wave of neutrophils. By contrast, the innate wave of neutrophils reached the lung independently of IL-17RA. Adaptive recruitment was correlated with the upregulation of *cxcl-1* and *5* expression by non-hematopoietic cells in response to IL-17A. Interestingly, the third main ligand of CXCR2, CXCL-2, did not seem to be involved because, despite the production of this ligand in IL mice on day 23, the adaptive wave of neutrophils was unable to reach the lung.

**Despite defective neutrophil recruitment, the adaptive inflammatory response is exacerbated in IL-17RA<sup>-/-</sup> mycobacterium-infected mice**

As the adaptive wave of neutrophil recruitment was impaired in BCG- and Mtb-infected IL mice, we investigated the possibility that the overall inflammatory response was curtailed in these mice. On day 23 after Mtb infection, a more severe, diffuse cellular infiltration was observed in the lungs of IL mice than in those of WT mice (Fig. 5A), although there was no difference in the number of CFUs detected in these two types of mice at this time point (data not shown). In two separate Mtb infection experiments, we measured the total lung area on day 23, together with the areas covered by lesions in 20 representative lung sections from two WT and two IL mice. The percentage of lung tissue occupied by lesions was higher in IL than in WT mice (Table 1). We then investigated whether the inflammatory cytokine environment differed between IL and WT mice. On day 1 after infection with BCG or Mtb, almost no IL-10, IL-17A or IFN- $\gamma$  production by total lung cells stimulated *in vitro* could be detected in either genetic background (data not shown). On day 23, all three cytokines were detected (Fig. 5B). Interestingly, significantly more IL-10 was produced in WT mice, in which neutrophils were among the cells recruited during the adaptive phase, than in IL mice, in which neutrophils were rare. IL-17A production followed the opposite pattern, being stronger in IL than in WT mice (Fig. 5B). IFN- $\gamma$  production was similar in the two genetic backgrounds. We then investigated the role of IL-17RA in T-cell recruitment (Fig. 5C and D). CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells reached the lung in similar numbers in BCG-infected WT and IL mice, whereas CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells tended to be present in larger numbers in IL than in WT animals (Fig. 5C). This trend was confirmed in BM-chimeric mice, in which CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells were more numerous in IL mice reconstituted with WT BM than in WT mice receiving IL BM (Fig. 5D). Thus, IL-17RA expression by non-hematopoietic cells had no effect on classical T-cell recruitment, but restricted  $\gamma\delta$  T-cell recruitment to the lung. We then

used ICS to analyze the contribution of these two T-cell subsets to the inflammatory cytokine balance in WT or IL infected lung (Fig. 5E). IFN- $\gamma$  production by CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  and CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells was similar in the two genetic backgrounds. By contrast, the percentage of IL-17A-producing CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-cells was higher in IL than in WT mice (Fig. 5E), indicating that IL-17RA expression restricted both recruitment and the production of IL-17A by  $\gamma\delta$  T cells. IL-17A upregulation was inversely correlated with IL-10 levels, because lower levels of production by total lung cells (Fig. 5B) and a lower percentage of IL-10<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells (Fig. 5E) were observed in IL than in WT mice.

These data show that the IL-17RA receptor is required both to control the adaptive wave of neutrophils in the lung and to shift the cytokine balance towards the production of less IL-17A and more IL-10.

### **Neutrophils contribute to IL-10 production in the mycobacterium-infected lung, restricting IL-17A production**

Mouse neutrophils can produce anti-inflammatory IL-10 [34,38,44]. We assessed the contribution of neutrophils to IL-10 secretion in the lung, by isolating neutrophils on days 1 and 23 post-BCG infection, by cell sorting. These neutrophils produced similarly large amounts of IL-10 after *in vitro* stimulation with HK BCG (Fig. 6A). On day 23 after BCG infection, we performed ICS for IL-10 on *ex vivo* lung cells, resulting in the detection of IL-10<sup>+</sup> neutrophils (Fig. 6B). We compared IL-10<sup>+</sup> cell percentages between subsets of total lung cells (gating strategy: Supplemental Fig. S5). We found that neutrophils made less of a contribution to IL-10 production than CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells, but that they were nevertheless more efficient than CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells (Fig. 6C). We then analyzed the impact of the IL-10 produced by neutrophils *in vivo*, in BCG-infected WT mice, by depleting neutrophils by the administration of an anti-Ly6G NIMPR14 Ab [38] on days 17, 19 and 21. IL-10 levels tended

to be lower in neutrophil-depleted mice (Fig. 6D). Neutrophil depletion led to much higher levels of IL-17A production but had no effect on IFN- $\gamma$  production. In BM-chimeric mice, IL-10 levels were lower in IL recipient mice, in which adaptive neutrophil recruitment was impaired, than in WT recipient mice (Fig. 6E), in which the influx of adaptive neutrophils was normal. CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells, the other cell subset involved in IL-10 secretion, were normally recruited in IL recipient mice (Fig. 5C), suggesting that the low levels of IL-10 in these mice was associated with the impairment of neutrophil recruitment. As shown above, low levels of IL-10 were correlated with high levels of IL-17A production. On the basis of all these data, we conclude that the neutrophils recruited during the adaptive immune response, in response to IL-17RA signaling in non-hematopoietic cells, contribute to the shift in cytokine balance towards lower levels of IL-17A and attenuate inflammation via their capacity to produce IL-10 *in vivo*, in the infected lung.

## Discussion

In recent years, new functions of neutrophils have been identified, revealing a widespread role of these innate cells in immunity [45,46]. In response to mycobacterial infection, neutrophils may exert protective or deleterious functions [7,35], depending on the kinetics and magnitude of their recruitment. Pioneering work carried out by Appelberg and coworkers showed that, in addition to early neutrophils recruited in response to mycobacterial products, T cell-dependent chronic neutrophilia also occurred in mice systemically infected with various mycobacterial species [47-49]. We show here that neutrophil recruitment to the lung in response to airway infection with fully virulent Mtb or the live attenuated BCG was biphasic. In addition to the swift recruitment of neutrophils during the first 24 hours after bacterial entry into the lung, a second wave of neutrophils reached the lung at the same time as primed T cells. The instillation of HK BCG resulted in a barely detectable second wave of neutrophil recruitment, indicating that the persistence of mycobacteria was required for this second wave. This was probably due to the more sustained and protective immune response induced by live BCG than by HK BCG [50,51]. Despite their ability to kill mycobacteria *in vitro*, these neutrophils arriving in the lung in the second wave had no measurable impact on BCG CFUs *in vivo*. Furthermore, they were not colocalized with bacteria in the lung, instead being found in close contact with T cells. Therefore, these neutrophils belonged to the adaptive immune response to persistent mycobacteria orchestrated in the lung about 17 to 21 days after infection. We also established that the IL-17A/F-IL-17RA pathway was a key regulator of the adaptive wave of neutrophil recruitment to lungs infected with Mtb or BCG. This pathway was dispensable for the influx of early neutrophils. The signals involved in early neutrophil recruitment to the lung remain to be established, but it is possible that several compounds from the mycobacterial cell wall, recognized by neutrophil-expressed pathogen recognition receptors, are directly involved [52]. Contrary to previous reports [19,20], we

observed no major role for the IFN- $\gamma$  receptor in neutrophil recruitment to the lung. We think that this may reflect differences in the time course used in the various studies. We focused here on the initiation of adaptive neutrophil recruitment to the lung, whereas other studies have described a prominent role of the IFN- $\gamma$  receptor in chronic lung neutrophilia occurring 5 to 6 weeks after Mtb infection.

IL-17RA is ubiquitously expressed [24] and most cells are therefore potentially able to respond to IL-17A. However, we established, in studies on BM-chimeric mice, that IL-17RA expression by non-hematopoietic cells controlled the adaptive wave of neutrophil recruitment. In response to IL-17A or F, the lung epithelium produces CXCR2 ligands, such as CXCL-1 (KC), CXCL-2 (MIP2) and CXCL-5 (LIX), which act as powerful attractants of neutrophils [53]. In the lung, CXCL5 is the principal ligand responsible for sustained neutrophil attraction after the instillation of LPS [54] or pneumococcal pneumonia [55]. We observed that, at the time of adaptive neutrophil recruitment to the lung, expression of the *cxcl-1* and *5* genes was strongly upregulated in WT mice. The expression of these genes was severely impaired in IL and WT $\rightarrow$ IL BM-chimeric mice, demonstrating that IL-17RA expression by non-hematopoietic lung cells played a key role in the production of these two neutrophil chemoattractants. By contrast, moderate *cxcl-2* expression was observed during both the early and late phases of neutrophil recruitment, independently of IL-17RA expression. Therefore CXCL-1 and/or 5 are probably involved in adaptive neutrophil recruitment to the BCG-infected lung. Despite the expression of *cxcl-2* in IL mice, the adaptive recruitment of neutrophils was impaired in these mice. We have no definitive explanation for this observation at the moment, but it is possible that the three ligands have different affinities for CXCR2 expressed by neutrophils from the innate and adaptive waves and that CXCL-2 is not well recognized. Alternatively, CXCL-1 or 5, but not 2, may signal via another neutrophil chemokine receptor specifically expressed by neutrophils from the adaptive wave and

required instead of CXCR2. Indeed, other chemokines, such as CXCL-3, 6, 7 and 8, signal via CXCR1 or 2 [43], both of which are expressed by human neutrophils. CXCL15/hungkine is also involved in neutrophil recruitment to the lung [56]. It would be interesting to determine whether IL-17RA also controls the expression of these genes upon mycobacterial infection.

Several reports have highlighted the importance of IL-17A production in the control of mycobacterial infection. Memory Th17 cells induced by vaccination mediate an optimal Th1 protective response against Mtb in the mouse lung [25] and IL-17A is critically involved in mature granuloma formation, which helps to constrain mycobacterial multiplication [27,28]. We observed no difference in the control of BCG multiplication between WT and IL mice, from day 1 to 56 (our unpublished observations). However, on day 23, the lung leukocyte infiltrate was more abundant and less organized in Mtb-infected IL mice, in which adaptive neutrophils were rare, than in WT mice, consistent with the data published by Umemura *et al.* [28] for IL-17A<sup>-/-</sup> mice. IL mice control Mtb multiplication in the short term after low-dose infection [57], but they control larger amounts of Mtb in the lung less efficiently than WT [58]. Thus, the IL-17A/IL-17RA pathway seems to be necessary for the control of Mtb infection. Nevertheless, the IL-17A-driven exacerbation of inflammation observed in several circumstances may lead to tissue destruction. IL-17A is overproduced in response to high mycobacterial loads in the mouse [18] or in humans infected with multidrug-resistant Mtb strains resulting in high antigen loads [59], leading to an unfavorable clinical outcome. The exacerbation of inflammation and the high levels of neutrophilia occurring in IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice after four to five weeks of infection with Mtb also seem to be related to IL-17A overproduction. The IL-17A/IL-17RA pathway thus appears to be something of a double-edged sword in the control of Mtb-induced disease, because IL-17A and IL-17RA are required to restrict bacilli multiplication, but the presence of too much IL-17A leads to damaging inflammation.

Negative feedback regulatory mechanisms are of the utmost importance for regulating the IL-17A inflammatory axis. One such mechanism may involve the IL-17RA expressed by Th17 cells, creating a negative feedback loop to restrict the expansion of this cell population [60]. We observed an upregulation of IL-17A production by both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in IL mice. We did not investigate IL-17RA expression by  $\gamma\delta$  T cells in our setting, but IL-17A expression by  $\gamma\delta$  T cells has been shown to be increased in IL-17RA<sup>-/-</sup> mice in a BALB/c background, and this seems to be correlated with lower levels of neutrophil recruitment [61]. However, we observed no downregulation of IL-17A in chimeric IL mice reconstituted with WT cells, in which IL-17A-producing CD4 and  $\gamma\delta$  T cells expressed IL-17RA. Thus, although we cannot exclude a role for this negative feedback mechanism in IL-17A damping, we believe that it is not the only mechanism involved. Another mechanism for the downregulation of IL-17A involves IL-10 signaling in Th17 cells. The IL-10R $\alpha$  receptor expressed on intestinal Th17 cells makes these cells sensitive to IL-10 produced by CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and restricts inflammation [62]. The IL-10-mediated attenuation of the IL-17A-driven exacerbation of disease also occurs in mice with cutaneous *Leishmania major* infections [63]. IL-10 is one of the principal suppressive cytokines produced by Treg cells. However, several recent studies have provided evidence for a role of “regulatory neutrophils” in chronic infections. In *Trypanosoma cruzi*-infected mice, suppressive neutrophils recruited via the IL-17RA pathway produce IL-10, attenuating IFN- $\gamma$ -driven excessive inflammation [44]. Furthermore, neutrophils also suppress the Th1 response to *Brucella abortus*, although the mechanisms involved remain unclear [64]. Mycobacterium-infected neutrophils produce IL-10, facilitating the establishment of Mtb [34]. We have shown *in vitro* that IL-10-producing neutrophils specifically shut down Th17 CD4 T cells through their IL-10 receptor [38]. The *in vivo* data presented here provide additional support for this concept, by demonstrating the contribution of IL-10-producing neutrophils to

constrain IL-17A in the lung, through specific downregulation of Th17 CD4 and  $\gamma\delta$  T cells during mycobacterial infection. Therefore, together with Treg cells, IL-10-producing regulatory neutrophils may contribute to the delicate equilibrium between pro- and anti-inflammatory mechanisms characteristic of mycobacterial infections of the lungs. In the longer term, following prolonged exposure to mycobacteria [18] or other inflammatory signals, such as deregulation of the expression of important microRNAs [14], the cytokine balance may tend towards an exacerbation of IL-17A and chemokine production, leading to the recruitment of pathological levels of neutrophils or other inflammatory cells. We will need to improve our understanding of how best to fine-tune these neutrophil waves so as to favor their beneficial effects, if we are to develop future interventions for the successful global control of TB.

## **Materials and Methods**

### **Ethics statement**

All experimental protocols complied with French law (Décret: 2001-464 29/05/01) and EEC regulations (86/609/CEE) for the care and use of laboratory animals and were carried out under Authorization for Experimentation on Laboratory Animals Number B-37-201. Our animal protocol (number 2012-06-14) was approved by the “Val de Loire” Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA VdL) and was registered with the French National Committee for Animal Experimentation.

### **Bacterial strains and CFU determination**

Wild-type BCG strain 1173P2 Pasteur [65] and recombinant Myc 409 strains expressing EGFP [8] were grown in Beck-Proskauer medium, supplemented with hygromycin (50 µg/ml) for Myc 409. The Mtb strain laboratory strain H37Rv was cultured in 7H9 medium supplemented with ADC (5% BSA fraction V, 2% dextrose, 0.003% beef catalase and 0.85% NaCl; BD Microbiology Systems, San Jose, CA, USA). Bacteria were harvested at mid-exponential growth phase and frozen at -70°C. CFUs were counted after plating dilutions on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC (ADC supplemented with 0.005% oleic acid, BD Microbiology Systems). For the preparation of heat-killed (HK) BCG, bacilli suspended in PBS were heated for 30 min at 80°C. For lung CFU determination, tissues were disrupted with ceramic beads (Lysing Matrix D, MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) in PBS, in a Ribolyser apparatus (Fastprep-24, MP Biomedicals), in accordance with the manufacturer’s instructions. Appropriate dilutions were plated on 7H11 plates supplemented with OADC and CFUs were counted after 21 days.

### **Mouse infection and mAb treatment, bone marrow chimera construction**

## **Materials and Methods**

### **Ethics statement**

All experimental protocols complied with French law (Décret: 2001-464 29/05/01) and EEC regulations (86/609/CEE) for the care and use of laboratory animals and were carried out under Authorization for Experimentation on Laboratory Animals Number B-37-201. Our animal protocol (number 2012-06-14) was approved by the “Val de Loire” Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA VdL) and was registered with the French National Committee for Animal Experimentation.

### **Bacterial strains and CFU determination**

Wild-type BCG strain 1173P2 Pasteur [65] and recombinant Myc 409 strains expressing EGFP [8] were grown in Beck-Proskauer medium, supplemented with hygromycin (50 µg/ml) for Myc 409. The Mtb strain laboratory strain H37Rv was cultured in 7H9 medium supplemented with ADC (5% BSA fraction V, 2% dextrose, 0.003% beef catalase and 0.85% NaCl; BD Microbiology Systems, San Jose, CA, USA). Bacteria were harvested at mid-exponential growth phase and frozen at -70°C. CFUs were counted after plating dilutions on Middlebrook 7H11 agar supplemented with OADC (ADC supplemented with 0.005% oleic acid, BD Microbiology Systems). For the preparation of heat-killed (HK) BCG, bacilli suspended in PBS were heated for 30 min at 80°C. For lung CFU determination, tissues were disrupted with ceramic beads (Lysing Matrix D, MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) in PBS, in a Ribolyser apparatus (Fastprep-24, MP Biomedicals), in accordance with the manufacturer’s instructions. Appropriate dilutions were plated on 7H11 plates supplemented with OADC and CFUs were counted after 21 days.

### **Mouse infection and mAb treatment, bone marrow chimera construction**

USA). Before intracellular staining for IL-10, IFN- $\gamma$  or IL-17A, T cells were incubated with 1  $\mu$ g/ml ionomycin and 25 ng/ml M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and HK BCG and treated for 4 h at 37°C with 5  $\mu$ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich). The intracellular concentration of IL-10 in neutrophils was determined on HK-BCG-stimulated cells without the addition of PMA or ionomycin. Intracellular staining was performed with the Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was analyzed with a FACSCalibur apparatus (BD Biosciences) and FlowJo software 8.7.1 (TreeStar, Ashland, OR). For the purification of lung neutrophils on days 1 and 23, CD11b<sup>+</sup> Ly-6C<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> cells were sorted on a MoFlo<sup>®</sup> high-speed cell sorter (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) with Summit Software (Beckman Coulter). Neutrophils were recovered in complete medium and immediately stimulated with HK-BCG.

### Detection of cytokines by ELISA and assessment of cytokine gene expression by RT-qPCR

For the measurement of antigen-specific cytokine production by lung cells, we dispensed 10<sup>5</sup> lung tissue cells in individual wells of 96-well plates. The cells were incubated at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and were stimulated with the equivalent of 10<sup>6</sup> CFU of HK BCG. Supernatants were harvested 72 h later and assayed for IL-17A, IFN- $\gamma$  and IL-10 ELISA with commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For measurement of the expression of chemokine and *il-17* family genes, lung tissues were perfused with PBS and 1 ml Trizol reagent was added (Sigma-Aldrich). The lung tissues were disrupted with ceramic beads (Lysing Matrix D, MP Biomedicals) in a Ribolyser apparatus (Fastprep-24, MP Biomedicals). We extracted mRNA with the NucleoSpin RNAII kit (Macherey Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's recommendations. RNA

concentration was determined spectrophotometrically ( $A_{260}$  determination) with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and the integrity and quality of the RNA were assessed with an Agilent RNA 6000 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). We reverse-transcribed 2  $\mu\text{g}$  of total RNA with the M-MLV reverse transcriptase (Superscript III kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in the presence of RNasin® and random primers (Promega, Fitchburg, WI, USA), by incubating for 5 min at 25°C, 1 h at 50°C and 15 min at 70°C. Real-time PCR was performed on the resulting cDNA, in a volume of 12.5  $\mu\text{l}$  per well, with MESA Green (MasterMix Plus for SYBR® Assay, Eurogentec, Seraing, Belgium) as the reporter dye and a Chromo 4 light cycler apparatus (Biorad, Hercules, CA, USA) for data acquisition. The amplification conditions were as follows: 95°C for 5 min and 37 cycles of 95°C for 15 s and 60 or 64°C for 45 s. DEPC-treated water (DEPC from Invitrogen) was used as a negative control. Primer sequences (Table 2, in supporting information) were designed with Clone Manager® 9 software (Scientific and Educational Software, NC, USA) and purchased from Eurogentec. Gene expression is expressed relative to the mean level of expression for three housekeeping genes — hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt-1*), ribosomal protein L4 (*Rpl-4*) and peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*) — analyzed with GenEx software (Multid Analysis, Gothenburg, Sweden).

## Histopathology and immunohistochemistry studies on Mtb- and BCG-infected lungs

Following bronchoalveolar lavage (BAL), lungs from day 23 Mtb-infected C57BL/6 WT and IL mice were perfused with neutral buffer and then fixed by incubation in 4% neutral buffered formalin (Carlo Erba, Milan Italy) for 14 days at room temperature. Lungs underwent routine processing and were embedded in paraffin wax. We cut 5  $\mu\text{m}$  sections, which were then

stained with hematoxylin and eosin (HE). Lesion scores were obtained for each animal by studying 20 serial sections of lung tissue cut at 50  $\mu\text{m}$  intervals under an Eclipse 80i microscope equipped with a DXM 1200C digital camera (Nikon Instruments, Europe, Amsterdam, The Netherlands) and NIS-Elements D Microscope Imaging Software (Nikon). The mean percentage of empty surfaces occupied by vascular and bronchial areas was determined from five representative slides, to determine a correction percentage deduced from the total area of the solid tissue section. The area occupied by lesions was then expressed as a percentage of the corrected solid lung area. For each sample, the arithmetic mean lesion area was then calculated for the 20 serial tissue sections. The results from two independent experiments are reported.

For the localization of T cells, neutrophils and bacteria, lungs obtained 23 days after infection with  $5 \times 10^6$  CFUs of BCG strain Myc409 were frozen and embedded in OCT compound (Fischer Scientific). We collected 8  $\mu\text{m}$ -thick lung sections on Superfrost Plus slides (Thermo Scientific). These sections were air-dried and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . For staining, the sections were thawed, air-dried, hydrated by incubation in 0.1% Triton X100 in PBS and blocked by incubation with 10 % fetal bovine serum in PBS for 30 min. The sections were then incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with primary antibodies: FITC-conjugated anti-CD3 and purified anti-Ly-6G antibodies (both from BD Pharmingen). Sections were washed three times in PBS and incubated for 30 min at room temperature with Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). The sections were washed in PBS and mounted in anti-fade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Fluoromount G, Southern Biotech, USA). Tissues were observed under an Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope equipped with a 40 $\times$  PlanNeofluar oil/DIC objective or a 63 $\times$  PlanApochromat oil/DIC objective, both with the ApoTome system (Zeiss). Images were captured with an AxioCam MRm CCD camera (Zeiss) and Axiovision software (Zeiss).

***Statistical analysis***

Prism 5.0 software (GraphPad, CA, USA) was used for statistical analyses. We used the nonparametric unpaired two-tailed Mann-Whitney U test for all comparisons. \* indicates  $p$  values  $< 0.05$ , \*\* indicates  $p < 0.01$  and \*\*\* indicates  $p < 0.001$ .

### **Acknowledgments**

**We thank Dr Bernhard Ryffel (CNRS, Orléans, France) for the gift of IL-17RA<sup>+</sup> breeding pairs and Dr Fabrice Laurent, from our laboratory, for IFN $\gamma$ R<sup>+</sup> mice. We warmly thank all members of the *Plate Forme d'Infectiologie Experimentale* mouse facility from the INRA Val de Loire Center for their expertise and kindness. We would also like to express our gratitude to Sylvie Darche and Dr James Di Santo from the Pasteur Institute in Paris for their help with the generation of chimeric mice, and to Mario Delgado and François Meurens from our laboratory for help with RT-qPCR experiments and data interpretation.**

## References

1. Lawn SD, Zumla AI (2011) Tuberculosis. *The Lancet* 378: 57-72.
2. Dye C, Williams BG (2010) The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328: 856-861.
3. Fine PEM (2001) BCG: the challenge continues. *Scand J Infect Dis* 33: 243 - 245.
4. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943-948.
5. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Winter N, Sher A, et al. (2008) Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 28: 271-284.
6. Cooper AM (2009) Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 27: 393-422.
7. Martino A, Badell E, Winter N (2011) Neutrophils in mycobacterial infections. In: Tacchini-Cottier F, van Zandbergen G, editors. *Neutrophils In Infectious Diseases: Bentham Science publishers Ltd.* pp. 42-48.
8. Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, et al. (2005) Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106: 1843-1850.
9. Blomgran R, Ernst JD (2011) Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 186: 7110-7119.
10. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM, et al. (2007) Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest* 117: 1988-1994.
11. Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, et al. (2000) Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 68: 577-583.
12. Yang C-T, Cambier CJ, Davis JM, Hall C, J, Crosier P, S, et al. (2012) Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 12: 301-312.
13. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, et al. (2010) An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-977.
14. Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Fa, xE, et al. (2013) MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest* 123: 0-0.
15. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, et al. (2005) Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* 73: 1744-1753.
16. Bum S, Kong J, Hong M, Lee Y, Kim J, et al. (2009) Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB *Chest* 137: 122-128.
17. Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hause A, Lu B, et al. (2003) Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol* 33: 2676-2686.
18. Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Torrado E, et al. (2010) Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 207: 1609-1616.

19. Desvignes L, Ernst JD (2009) Interferon- $\gamma$ -responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 31: 974-985.
20. Nandi B, Behar SM (2011) Regulation of neutrophils by interferon- $\gamma$  limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J Exp Med* 208: 2251-2262.
21. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485-517.
22. Laan M, Cui Z-H, Hoshino H, Lötvalld J, Sjöstrand M, et al. (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162: 2347-2352.
23. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S (2011) Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162.
24. Gaffen SL (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9: 556-567.
25. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, et al. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8: 369-377.
26. Lockhart E, Green AM, Flynn JL (2006) IL-17 production is dominated by  $\gamma\delta$  T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 177: 4662-4669.
27. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, et al. (2010) Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 184: 4414-4422.
28. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, et al. (2007) IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune responses against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178: 3786-3796.
29. Shaler CR, Kugathasan K, McCormick S, Damjanovic D, Horvath C, et al. (2011) Pulmonary mycobacterial granuloma: increased IL-10 production contributes to establishing a symbiotic host-microbe microenvironment. *Am J Pathol* 178: 1622-1634.
30. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NRJ (2001) Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9: 86-92.
31. Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, et al. (2010) Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol* 40: 2200-2210.
32. Pitt JM, Stavropoulos E, Redford PS, Beebe AM, Bancroft GJ, et al. (2012) Blockade of IL-10 signaling during Bacillus Calmette-Guérin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 189: 4079-4087.
33. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A (2011) The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol* 4: 261-270.
34. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31: 761-771.
35. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, Martineau AR (2012) Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends in Immunology* 33: 14-25.
36. Jiao X, Lo-Man R, Guermonprez P, Fiette L, Dériaud E, et al. (2002) Dendritic cells are host cells for mycobacteria *in vivo* that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 168: 1294-1301.

37. Schreiber HA, Hulseberg PD, Lee J, Prechl J, Barta P, et al. (2010) Dendritic cells in chronic mycobacterial granulomas restrict local anti-bacterial T cell response in a murine model. *PLoS ONE* 5: e11453.
38. Doz E, Lombard R\*, Carreras F, Buzoni-Gatel D, Winter N (2013) Mycobacteria-infected dendritic cells attract neutrophils that produce IL-10 and specifically shut down Th17 CD4 T cells through their IL-10 receptor. \* *Equal contribution*. *J Immunol* 191: 3818-3826.
39. Martino A, Badell E, Abadie V, Balloy V, Chignard M, et al. (2010) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining *in vivo* T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production. *J Immunol* 184: 2038-2047.
40. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, et al. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22: 285-294.
41. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, et al. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194: 519-527.
42. Gaffen SL (2011) Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 23: 613-619.
43. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S (2012) Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 566-572.
44. Tosello Boari J, Amezcua Vesely MC, Bennejo DA, Ramello MC, Montes CL, et al. (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog* 8: e1002658.
45. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-531.
46. Mócsai A (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 210: 1283-1299.
47. Appelberg R (1992) CD4+ T cells are required for antigen-specific recruitment of neutrophils by BCG-immune spleen cells. *Immunology* 75: 414-419.
48. Appelberg R, Silva MT (1989) T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 78: 478-484.
49. Appleberg R, Pedrosa J, Silva M (1991) Host and bacterial factors control the *Mycobacterium avium*-induced chronic peritoneal granulocytosis in mice. *Clin Exp Immunol* 83: 231-236.
50. Bloch H, Segal W (1955) Viability and multiplication of vaccines in immunization against tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 71: 228-248.
51. Orme IM (1988) Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect Immun* 56: 3310-3312.
52. Lee W-B, Kang J-S, Yan J-J, Lee MS, Jeon B-Y, et al. (2012) Neutrophils promote mycobacterial trehalose dimycolate-induced lung inflammation via the mincle pathway. *PLoS Pathog* 8: e1002614.
53. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls J (2007) Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res* 33: 507-518.
54. Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, et al. (2011) IL-17A and TNF- $\alpha$  exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells *in vivo* and *in vitro*. *J Immunol* 186: 3197-3205.

55. Yamamoto K, Ahyi A-NN, Pepper-Cunningham ZA, Ferrari JD, Wilson AA, et al. (2013) Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
56. Chen S-C, Mehrad B, Deng JC, Vassileva G, Manfra DJ, et al. (2001) Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine. *J Immunol* 166: 3362-3368.
57. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, et al. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14: 275-281.
58. Freches D, Korf H, Denis O, Havaux X, Huygen K, et al. (2013) Mice genetically inactivated in interleukin-17A receptor are defective in long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 140: 220-231.
59. Basile JJ, Geffner LJ, Romero MM, Balboa L, Sabio y Garcia C, et al. (2011) Outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis* MDR strains induce high IL-17 T-cell response in patients with MDR tuberculosis that is closely associated with high antigen load. *J Infect Dis* 204: 1054-1064.
60. Smith E, Stark MA, Zarbock A, Burcin TL, Bruce AC, et al. (2008) IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through a short-loop inhibition via IL-17 receptor. *J Immunol* 181: 1357-1364.
61. Wozniak K, Kolls J, Wormley F (2012) Depletion of neutrophils in a protective model of pulmonary cryptococcosis results in increased IL-17A production by gamma/delta T cells. *BMC Immunol* 13: 65.
62. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor Jr W, Huber FJ, et al. (2011) Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3- and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34: 554-565.
63. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, et al. (2013) IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog* 9: e1003243.
64. Barquero-Calvo E, Martirosyan A, Ordoñez-Rueda D, Arce-Gorvel V, Alfaro-Alarcón A, et al. (2013) Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathog* 9: e1003167.
65. Gheorghiu M, Lagrange PH, Fillastre C (1988) The stability and immunogenicity of a dispersed grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. *J Biol Stand* 16: 168-174.

### Figure Legends

#### **Figure 1. Neutrophils reach the lung in two waves following mycobacterial infection.**

Wild-type C57/BL6 mice were intranasally (i.n.) infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG or  $10^3$  CFU of *Mtb* and killed at the time points indicated. Cells from the bronchoalveolar lavage (BAL) performed on four to five animals per group were pooled and cells were isolated from enzyme-digested lung tissue from the individual animals. (A) Combined labeling with anti-CD11b, anti-Ly-6C and anti-Ly-6G antibodies was used to identify neutrophils among the cells present in the BAL or lung tissue. The characteristic polylobed nucleus of neutrophils was observed in CD11b Ly-6C Ly-6G triple-positive cells from the R2 gate after flow cytometry sorting and May Grünwald Giemsa labeling. (B, C) We determined the numbers of neutrophils present in the lung tissue by flow cytometry for five independent C57/BL6 mice and in the BAL fluid pooled from the five mice killed on days 1, 3, 7, 23 and 56 post infection. Lung neutrophil numbers were determined after infection with BCG (B) or *Mtb* (C). \* $p < 0.05$  (Student's *t*-test). The numbers of neutrophils per mouse are shown. The most representative of two to three experiments with four to five mice per group is depicted.

#### **Figure 2. Late neutrophils are not colocalized with and do not kill mycobacteria *in vivo*.**

(A) Lung tissue neutrophil numbers for four to five individual C57/BL6 mice were determined by flow cytometry on days 1 and 23 after the i.n. inoculation of mice with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG or an equivalent load of heat-killed (HK) BCG \* $p < 0.05$  (Student's *t*-test). (B) C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG or  $10^3$  CFU of *Mtb*. From day 1 to 42, the numbers of CFU for BCG or *Mtb* present in the lung were determined after bacterial growth on agar plates. (C) The impact of neutrophil depletion was measured by injecting 200  $\mu$ g of the neutrophil-depleting mAb NIMPR14 or similar amounts of IgG2b control mAb into

**C57/BL6 mice 5, 3 and 1 day before infection with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG for the early wave, or on days 17, 19 and 22 post infection for the late neutrophil wave. The number of BCG or Mtb CFUs present in the lung was determined on days 1 and 23 post infection. (B, C) The data shown are the mean  $\pm$  SD of ( $\log_{10}$ ) CFU counts from four to five individual animals. The most representative experiment of three carried out for BCG infection and of two carried out for Mtb infection is depicted. (D) Day 23 lung cryosections from mice into which green fluorescent BCG Myc409 was instilled were immunostained with anti-Ly-6G antibody for the observation of neutrophils and with DAPI (blue) for the observation of nuclei under a fluorescence microscope. Colocalization of BCG (green, plain arrows) and neutrophils (red, dotted arrows) was not observed (magnification  $\times 200$ ).**

**Figure 3. IL-17A- and IFN- $\gamma$ -producing T cells reach the lung at the same time as the second neutrophil wave. Wild-type C57/BL6 mice were infected i.n. with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG or  $10^3$  CFU of Mtb and killed at the time points indicated. (A) Cells from enzyme-digested lung tissue from four to five individual animals were labeled with anti-CD3, anti-CD4 and anti- $\gamma\delta$  mAbs and analyzed by flow cytometry. After gating on CD3<sup>+</sup> T cells (R1), we observed CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  classical T cells (R3) and CD4<sup>-</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells (R2). (B) On days 1, 3, 7 and 23 after infection with BCG or Mtb, the numbers of lung CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells were evaluated. In two independent experiments, the number of CD4<sup>+</sup> T cells was higher in BCG-infected than in Mtb -infected mice  $*p < 0.05$  (Student's *t*-test), whereas the numbers of  $\gamma\delta$  T cells were similar for the two infections. Cell numbers per mouse are depicted. (C) Day 23 lung cryosections from mice receiving a BCG instillation were immunostained with anti-Ly-6G antibody (red) for neutrophils, anti-CD3 antibody (green) for T cells and DAPI (blue) for nuclei, and observed under a fluorescence microscope. Neutrophils (red, dotted arrows) were observed in the close vicinity of T cells (green, plain arrows) (magnification  $\times 200$ ). (D)**

On days 1 and 23 after infection with BCG or Mtb, we cultured  $10^5$  cells from the total lung digestions of four to five individual C57BL/6 mice for three days in the presence of a number of HK-BCG cells equivalent to  $10^6$  CFUs. The IL-17A and IFN- $\gamma$  present in the supernatant were then determined by ELISA. The data shown are from one representative experiment of two carried out \* $p < 0.05$  (Student's *t*-test). (E) Lung cells from day 23 BCG-infected mice were stimulated by incubation overnight with HK BCG and PMA ionomycin and then stained for intracellular IL-17A and IFN- $\gamma$  (See Supplementary Fig. S5 for the gating strategy used). Among the CD3<sup>+</sup> T cells gated as in panel A, IFN- $\gamma$  was produced principally by CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells, whereas IL-17A was produced principally by CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells. The data shown are the mean  $\pm$  SD percentages of positive cells from duplicate wells.

**Figure 4. IL-17RA in non hematopoietic cells regulates lung CXCR2 ligands production and controls the adaptive wave of neutrophils.** C57BL/6 wild-type (WT) mice and mice with an invalidated IL-17RA gene (IL) were infected i.n. with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG or  $10^3$  CFU of Mtb. (A) Mice were killed at the indicated time points; cells were prepared from lung tissue (dot plots) or BAL (histograms) and neutrophils were analyzed by flow cytometry, as in Figure 1. Numbers of neutrophils per mouse were determined in lung tissues from four to five independent WT (black symbols) or IL (white symbols) BCG- or Mtb-infected and mock-treated mice. We also counted neutrophils in BAL from WT (black bars) and IL (white bars) BCG- or Mtb-infected and mock-treated mice. (B) C57BL/6 WT (black symbols) and IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> (white symbols) mice were infected i.n. with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG and neutrophil recruitment to the lungs was assessed 23 days later, by determining the numbers of neutrophils in lung tissue (dot plot) and BAL fluid (histograms). (C) Quantitative RT-PCR for the three main CXCR2 ligands, CXCL-1, 2 and 5, in lung tissue homogenates from WT (black symbols) and IL (white symbols) mice on days 1 and 23 after BCG infection.

Expression was normalized to the mean value for three housekeeping genes: *hprt-1*, *rel-4* and *ppia*. The data shown are the means  $\pm$  SD of four to five individual mice  $*p < 0.05$  (Student's *t*-test). (D) Recipient WT (black symbols) and IL (white symbols) mice were lethally irradiated and reconstituted with  $7 \times 10^6$  bone marrow cells from WT or IL donor mice. On day 23 after infection with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG, the mean  $\pm$  SD number of neutrophils per mouse was calculated from the lung tissue cells of five individual mice (dot plots) and from BAL cells (histograms).  $*p < 0.05$   $**p < 0.01$  (Student's *t*-test) (E) Quantitative RT-PCR for CXCL-1, 2 and 5 was performed on chimeric mouse lung tissue on day 23 post BCG infection. Expression was normalized with respect to that of the housekeeping genes *hprt-1*, *rel-4* and *ppia*. The data shown are means  $\pm$  SD for four to five individual mice  $**p < 0.01$  (Student's *t*-test).

**Figure 5. Higher levels of IL-17A and lower levels of IL-10 are produced in infected IL-17RA<sup>+</sup> than in WT mice.** (A) Lungs from WT and IL mice were embedded in paraffin on day 23 after the instillation of  $10^5$  CFU of Mtb. Sections were cut, stained with hematoxylin and eosin and observed under a light microscope. Sections with typical inflammatory cell infiltrates are shown. (B) Total lung cells from four to five independent WT (black symbols) or IL (white symbols) BCG- or Mtb-infected and mock-treated mice were stimulated with HK BCG. The IL-17A, IFN- $\gamma$  and IL-10 present in the supernatant after 72 h were determined by ELISA  $**p < 0.01$  (Student's *t*-test). (C, D) Numbers of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells infiltrating the lungs on days 1 and 23 after BCG infection were analyzed by flow cytometry in WT (black) and IL (white) mice (C) and in WT/IL chimeric mice (D). (E) Intracellular IL-10, IL-17A and IFN- $\gamma$  in lung CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells on day 23 post BCG infection, for WT (black) and IL (white) mice.

**Figure 6. Neutrophils produce IL-10 in the lung, attenuating the effect of IL-17A.**

C57 BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG and cells were processed the following day or 23 days later. (A)  $10^5$  neutrophils were purified from lungs by flow cytometry cell sorting and stimulated *in vitro* with a number of HK BCG cells equivalent to a dose of  $10^6$  CFU of BCG. We quantified the IL-10 present in the supernatant 72 h later, by ELISA. (B, C) Intracellular IL-10 in total lung cells was stained on day 23 post-BCG infection, after *in vitro* stimulation with HK BCG or PMA ionomycin (for T-cell analysis) or mock treatment. The percentage of IL-10<sup>+</sup> neutrophils among CD11b<sup>+</sup> Ly-6C<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> cells (B) and the percentages of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells and neutrophils among IL-10<sup>+</sup> cells (C) are shown (See Supplementary Fig. S5 for the gating strategy). (D) WT chimeric mice were infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG. On days 17, 20 and 22 they received injections of 200  $\mu$ g of Ab NIMPR14 to deplete adaptive neutrophils or of IgG2b as a control. We stimulated  $10^5$  total lung cells from five individual mice killed on day 23 with a number of HK BCG cells equivalent to a dose of  $10^6$  CFUs and the quantified the IL-10, IL-17A and IFN- $\gamma$  present in the supernatant 72 h later by ELISA. (E) WT/IL chimeric mice were infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG and then killed 23 days later; we stimulated  $10^5$  total lung cells from five individual mice with a number of HK BCG cells equivalent to a dose of  $10^6$  CFU. The IL-10 and IL-17A present in the supernatant 72 h later were quantified by ELISA \*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test).

Lungs	First experiment		Second experiment	
	WT	IL-17RA <sup>-/-</sup>	WT	IL-17RA <sup>-/-</sup>
Total area (mm <sup>2</sup> )	2.53	4.64	4.71	4.43
Lesion area (mm <sup>2</sup> )	0.24	0.69	0.04	0.27
Lesion (%)	9.49	14.87	0.75	6.09

**Table 1: Total and lesion areas, and percentage of the total area covered by lesions (lesion %) in the lungs of WT and IL mice. C57BL/6 WT and IL mice were infected with 10<sup>3</sup> CFU of Mtb and killed on day 23. Lungs were processed for histochemistry and stained with hematoxylin and eosin. The mean empty surface area occupied by vascular and bronchial areas was determined on 5 representative slides. This correction factor was deduced from the total area of the solid tissue section, to obtain the total lung area. The areas occupied by lesions were then measured and averaged for 20 representative lung sections from two mice in each group. The proportion of the total solid lung surface area covered by lesions was then determined. Results from two independent experiments are shown.**

Figure 1

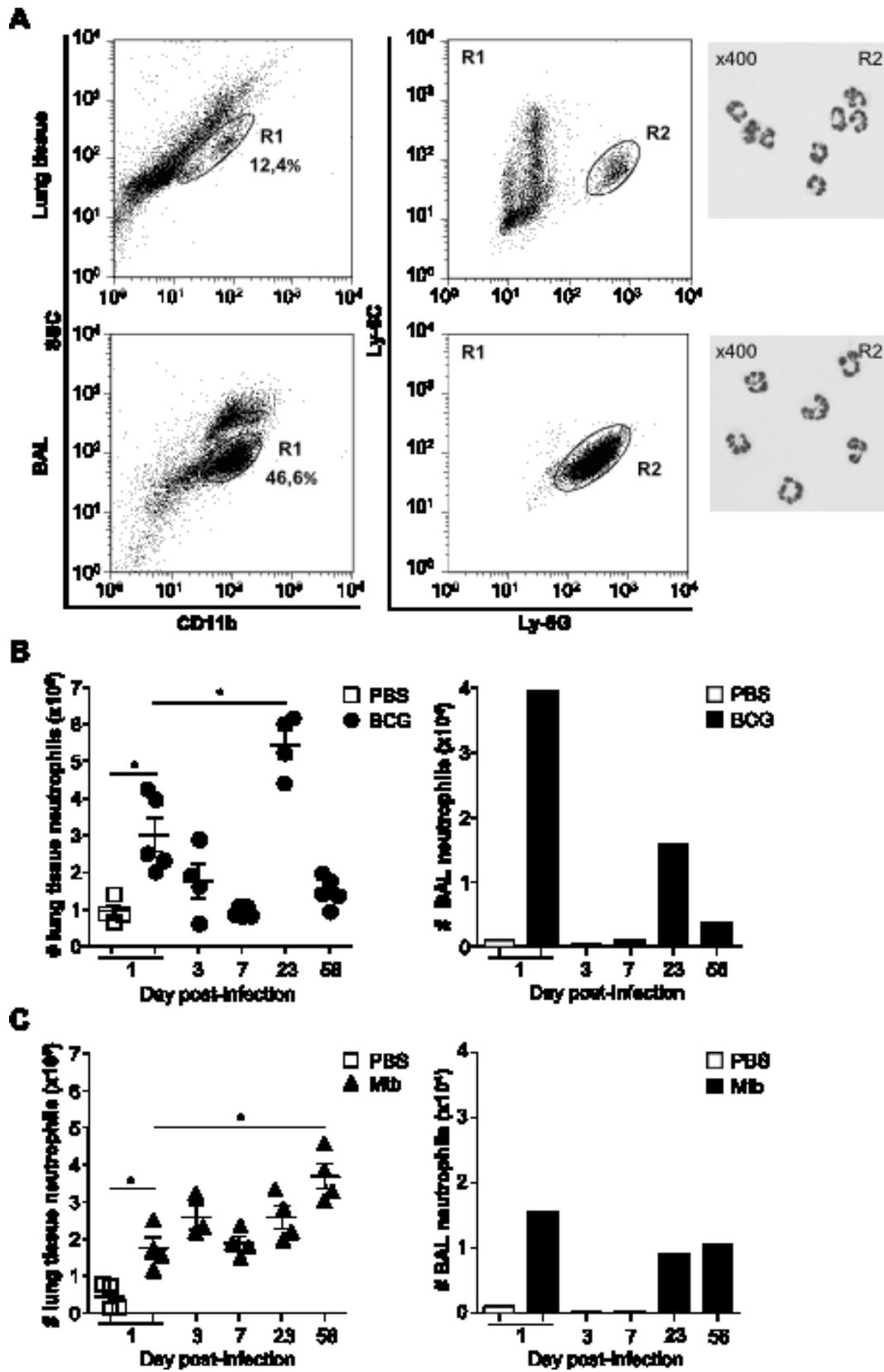


Figure 2

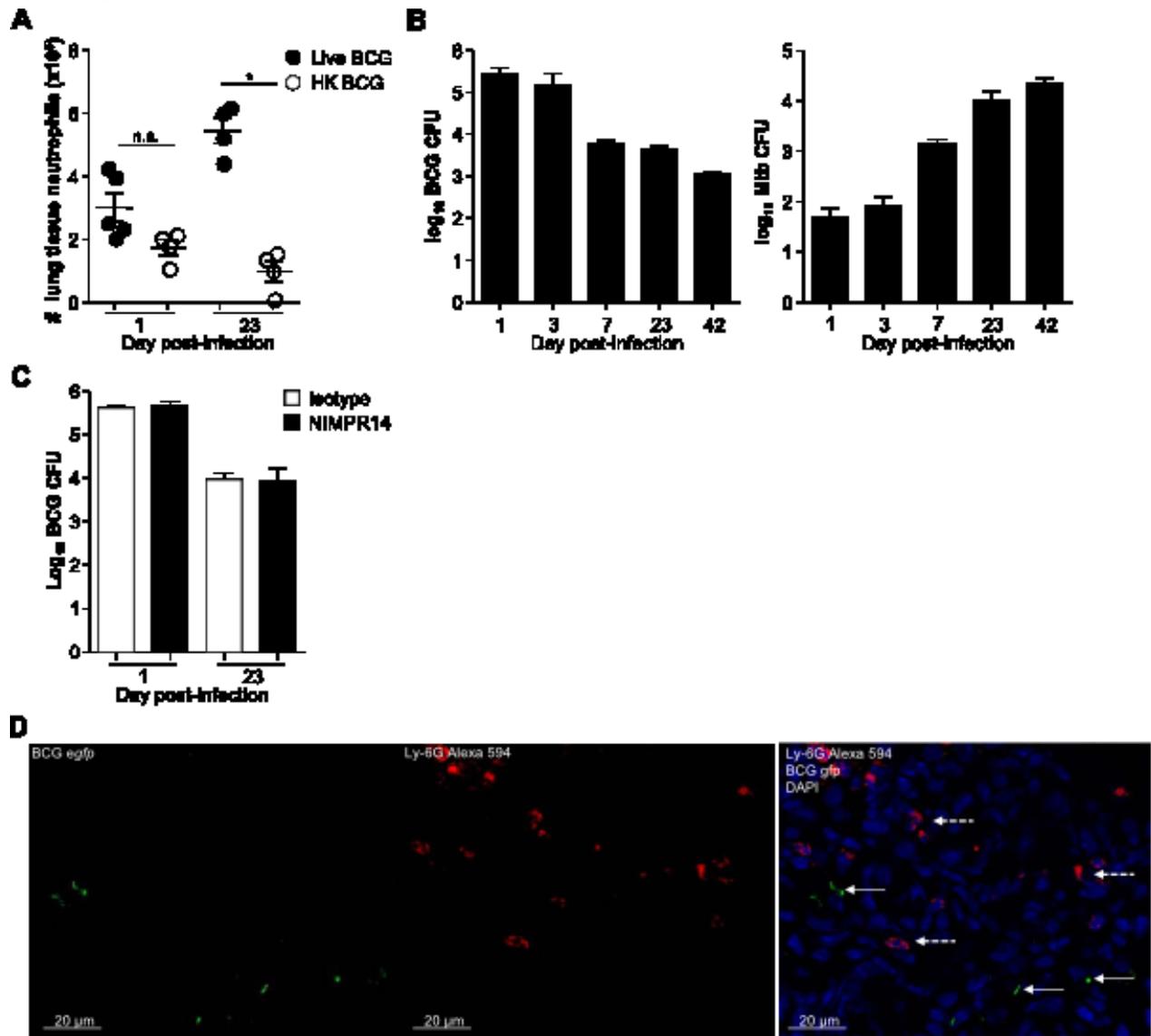


Figure 3

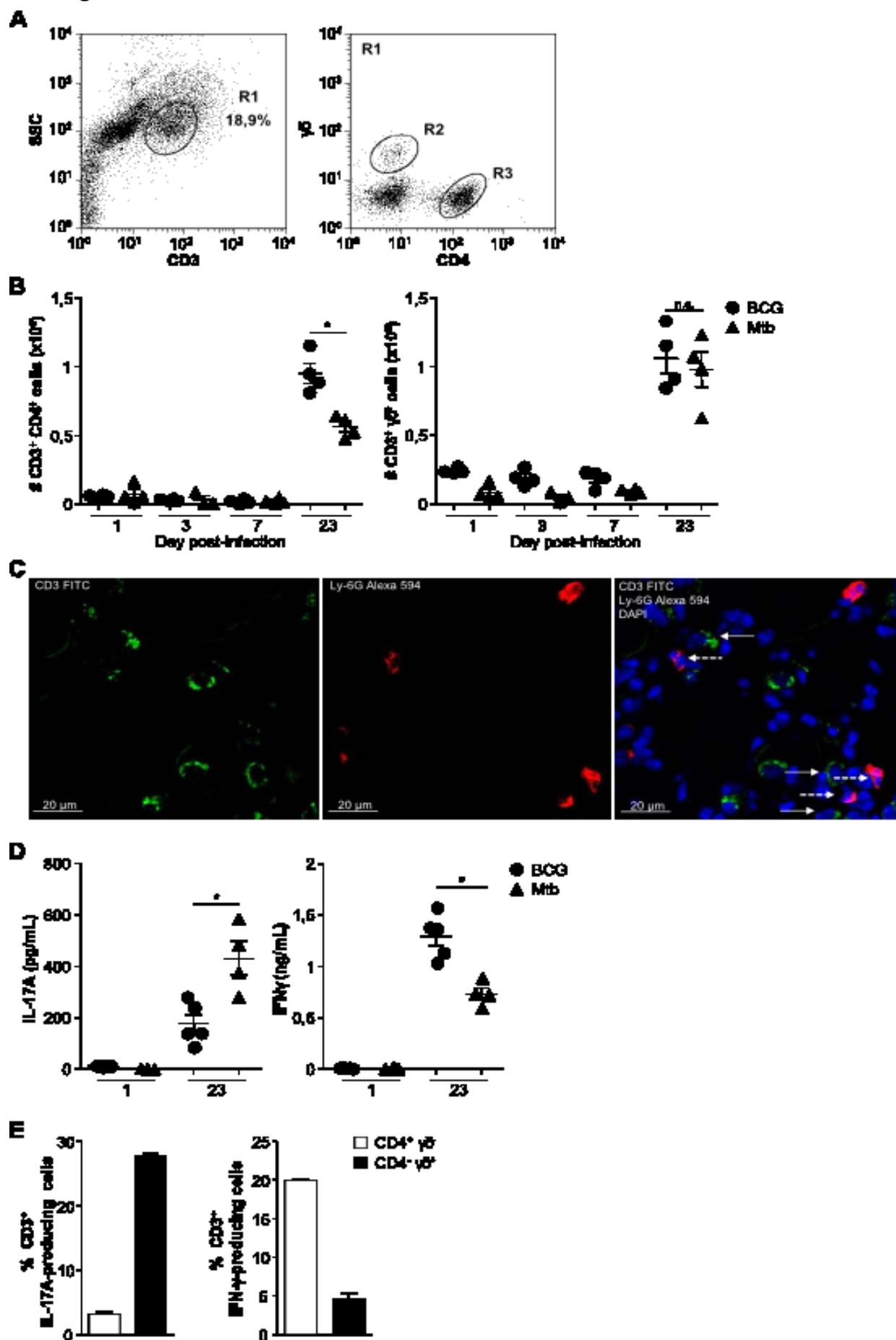


Figure 4

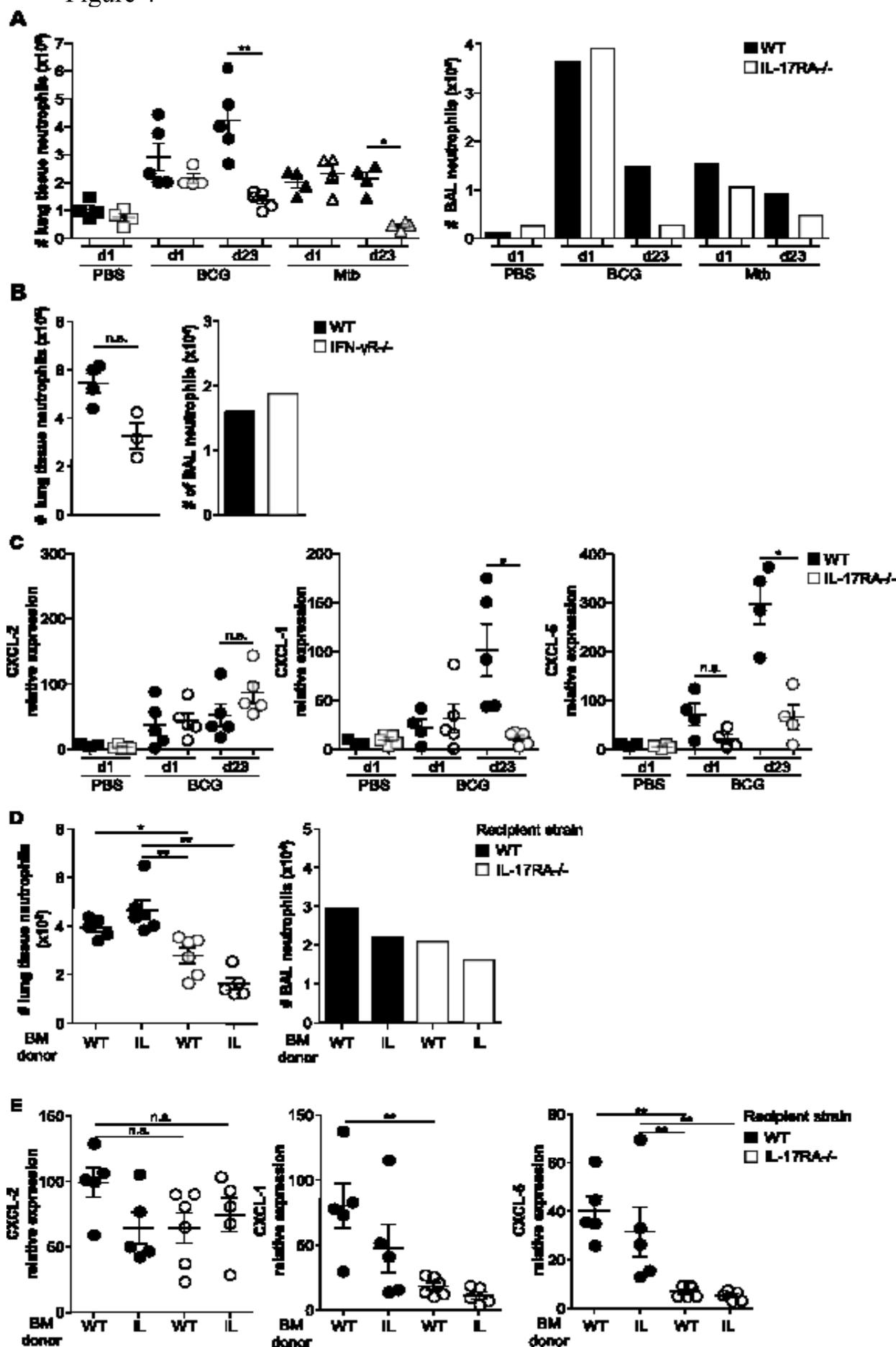


Figure 5

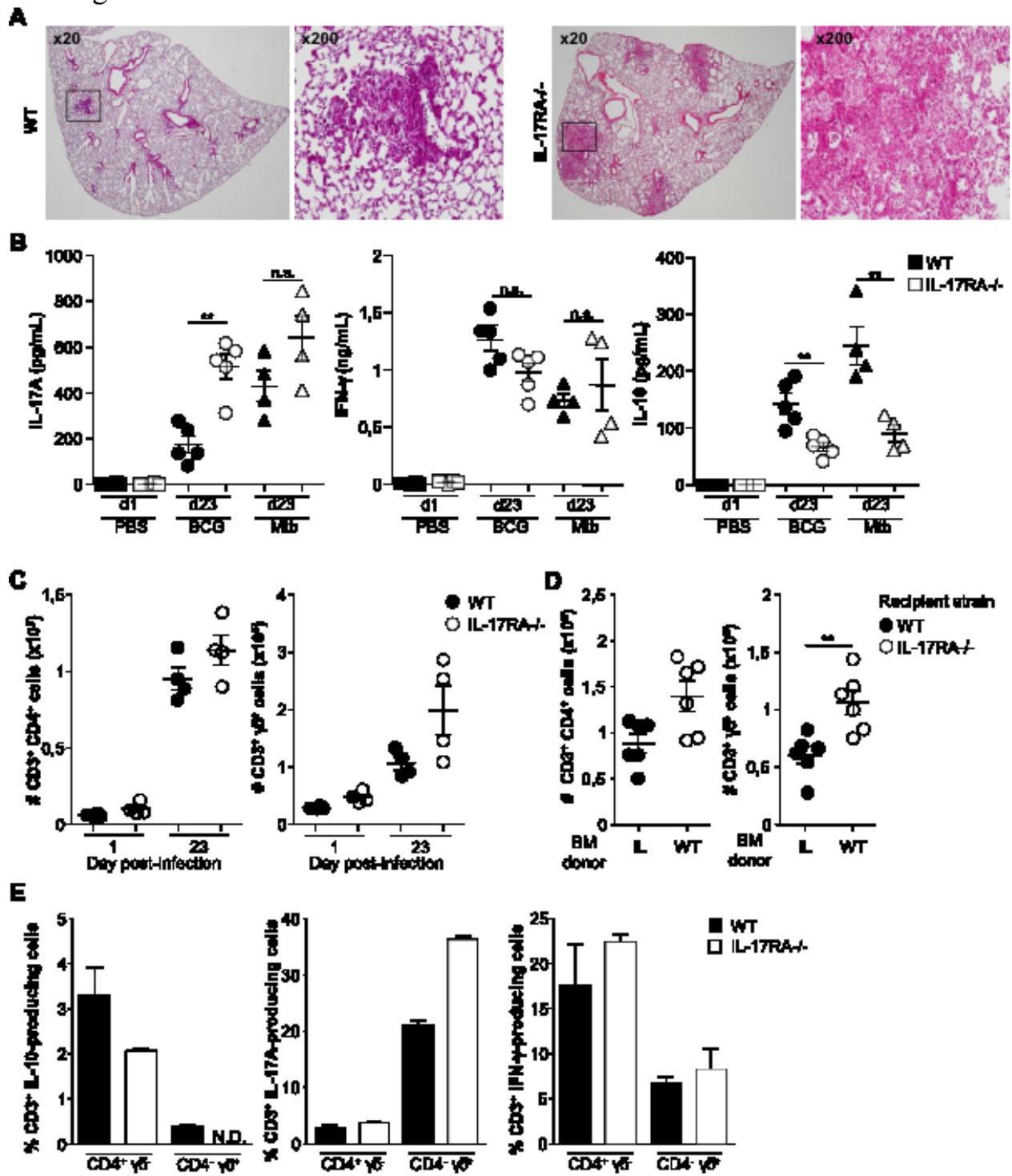
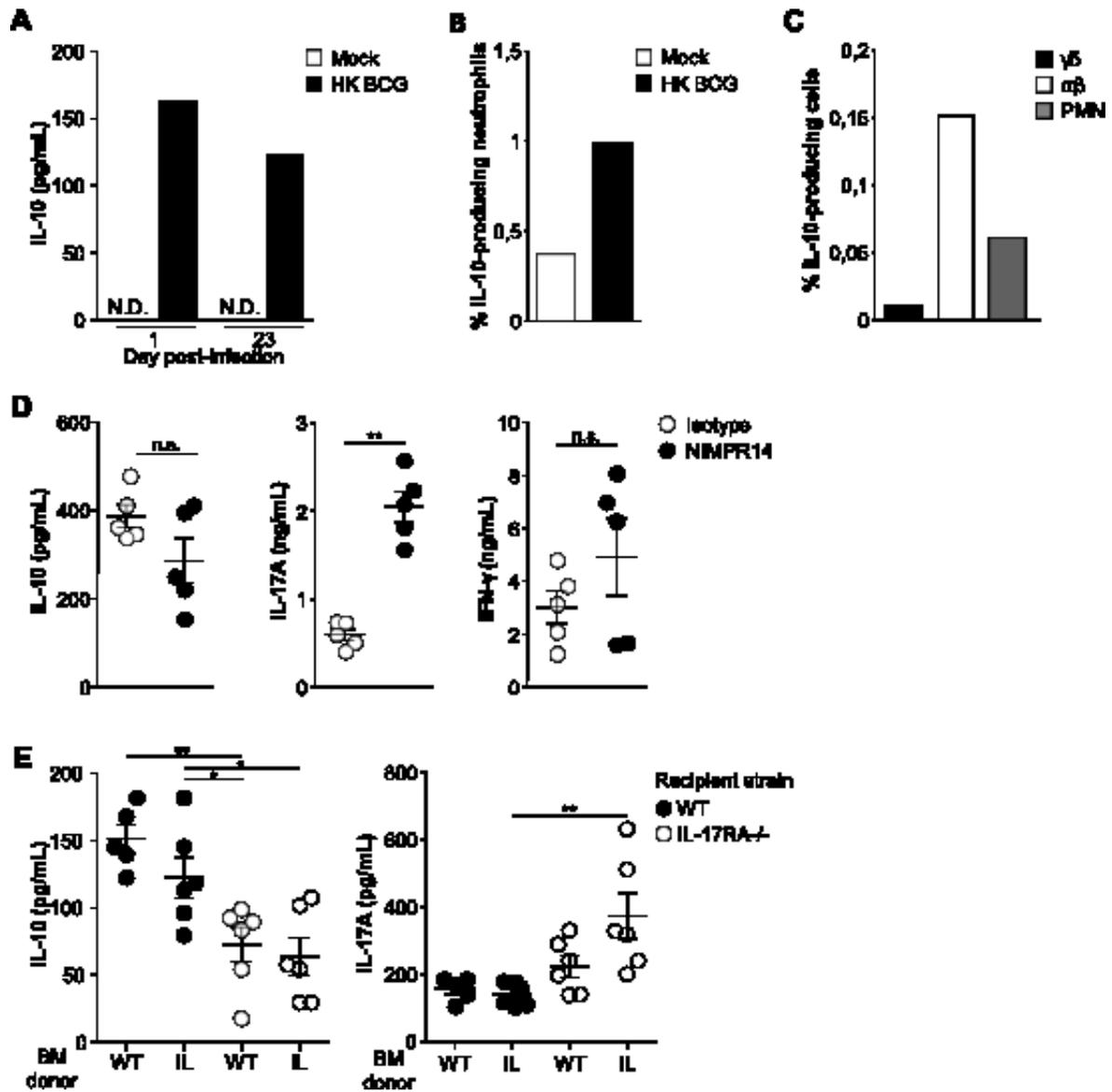


Figure 6



## **B. Communications cellulaires entre les PNN et les autres cellules de l'immunité: les CD et les LcT**

### **Article 2**

#### **Mycobacteria-Infected Dendritic Cells Attract Neutrophils That Produce IL-10 and Specifically Shut Down Th17 CD4 T Cells through Their IL-10 Receptor**

\*Emilie Doz, \*Robin Lombard, Florence Carreras, Dominique Buzoni-Gatel and Nathalie Winter

\* contributed equally to this work

---

Lors de l'infection par les mycobactéries, les PNN peuvent participer à la mise en place de la réponse immunitaire, soit en contrôlant les bacilles soit en établissant des communications avec les MP et les CD. Notre équipe a montré aussi bien avec des cellules humaines que murines, que des PNN infectés par BCG pouvaient transmettre des signaux de maturation et faciliter la capacité de présentation des antigènes par les CD [491]. Lors de la phase chronique de l'infection, notre équipe [516] et d'autres auteurs [517] ont montré que les CD étaient réservoir de mycobactéries.

Les interactions entre CD, PNN et LcT dans le granulome pulmonaire à mycobactéries et leur impact potentiel sur l'environnement cytokinique ne sont pas clairement établis. L'objectif de cette deuxième partie est d'étudier les interactions que les CD infectées, présentes dans le granulome pulmonaire, peuvent établir avec les PNN et les LcT également présents dans le granulome. Le rôle de ces dialogues sur le microenvironnement inflammatoire est également étudié.

*In vitro*, des CD sont dérivées de la moelle osseuse de souris C57/BL6 en 10 jours de culture en milieu enrichi en GM-CSF. Ces CD sont ensuite infectées par du BCG fluorescent (souche rBCG-*egfp*) puis mises au contact de PNN purifiés de moelle osseuse par tri magnétique après marquage par un anticorps anti-Ly-6G. Le troisième partenaire est le LcT activé-mémoire CD4<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup> et CD44<sup>+</sup> purifié par cytométrie en flux à partir de rates de



souris transgéniques OT-II (dont les cellules CD4<sup>+</sup> portent le récepteur spécifique de l'ovalbumine (OVA)) qui ont été vaccinées par une souche de rBCG-OVA. Notre modèle reproduit *in vitro* les coopérations cellulaires entre ces trois acteurs de la réponse immunitaire qui peuvent survenir dans le granulome, lors de la phase adaptative de la réponse.

Nous avons observé que les CD infectées par le BCG produisent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12p70) et également de chimiokines CXCL-1 et 2 impliquées dans le recrutement des PNN. Lorsque les PNN sont séparés des CD infectées par le BCG par une membrane poreuse, ils la traversent rapidement pour aller au contact des CD. Le PNN participe au contrôle des bactéries qui ne sont toutefois pas complètement éliminées.

Le contact PNN-CD/BCG favorise surtout la sécrétion par le PNN (et non par la CD) de grandes quantités de cytokine immunosuppressive IL-10. Lorsque le PNN est séparé de la CD infectée BCG par une membrane ne laissant diffuser que les molécules de faible poids moléculaire la production d'IL-10 est abolie. Zhang et collaborateurs [138] ont établi que le PNN infecté par le BCG ou stimulé par du BCG tué à la chaleur produisait de l'IL-10. Dans notre modèle, la stimulation de la CD par le BCG tué ne permet pas au PNN attiré au contact, de produire de l'IL-10. Nous avons aussi observé que la production d'IL-10 par le PNN après contact avec la CD infectée est contrôlée par les voies de signalisation médiées par Syk et la molécule adaptatrice MyD88.

Le bacille doit donc être vivant dans la CD pour que le PNN soit en mesure de produire de l'IL-10. Nous avons alors observé que les PNN au contact de CD infectées par rBCG-*egfp* acquièrent la fluorescence indiquant un mécanisme de transfert des bacilles vivants de la CD vers le PNN. Bien que nous n'ayons pas élucidé les mécanismes cellulaires responsables de ce transfert; il semble que le CR3 soit impliqué.

Nous avons ensuite cherché à comprendre comment l'IL-10 produite par le PNN pouvait influencer la réponse immunitaire adaptative qui se met en place au moment de l'arrivée dans le poumon des LcT activés. Lorsque les LcT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD62<sup>-</sup> isolées de souris OT-II immunisées par le rBCG-OVA sont mises au contact de CD infectées par le BCG et de peptide spécifique du TCR-OVA, les LcT produisent de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$ .



L'addition de PNN dans cette co-culture inhibe la production d'IL-17A mais pas de l'IFN- $\gamma$ . Cette inhibition de l'IL-17A est dépendante du contact entre le PNN et le couple CD-LcT. De plus si le PNN est isolé de la moelle osseuse d'une souris déficientes pour l'IL-10, il n'a aucun effet sur la production d'IL-17A. Nous avons corrélé ces observations *in vitro* avec la réponse établie *in vivo*. Chez la souris OT-II immunisée par rBCG-OVA, la déplétion de PNN par injection d'un Ac spécifique diminue la production d'IL-10 et augmente la production d'IL-17A dans le poumon par rapport aux souris injectées avec un Ac contrôle. L'IFN- $\gamma$  n'est pas modulé par la déplétion des PNN. Enfin, nous avons observé que seuls les Th17 expriment le récepteur à l'IL-10. Ceci explique pourquoi les PNN producteurs d'IL-10 modulent négativement la réponse Th17 mais pas la réponse Th1.

Pour conclure cette deuxième partie, nous avons démontré que les CD infectées par les mycobactéries, telles que celles trouvées dans les granulomes, attirent les PNN. Un contact établi entre ces deux types cellulaires permet un transfert de bacilles vivants et surtout donne aux PNN la capacité de produire de l'IL-10 immunosuppressive. Nous avons ensuite mis en lumière *in vitro* et *in vivo*, le rôle régulateur des PNN sur la réponse inflammatoire Th17, mais pas Th1, via leur capacité à produire de l'IL-10. L'ensemble des travaux de ces deux parties suggère bien un rôle nouveau du PNN régulateur dans le contrôle de la réponse inflammatoire IL-17A.



# Mycobacteria-Infected Dendritic Cells Attract Neutrophils That Produce IL-10 and Specifically Shut Down Th17 CD4 T Cells through Their IL-10 Receptor

Emilie Doz,<sup>1</sup> Robin Lombard,<sup>1</sup> Florence Carreras, Dominique Buzoni-Gatel, and Nathalie Winter

Neutrophils participate in the control of mycobacterial infection both by directly eliminating bacilli and by interacting with macrophages and dendritic cells (DCs). Despite host defenses, slow-growing mycobacteria can persist in the host for decades, mostly inside macrophages and DCs, and eventually destroy tissues after exacerbated inflammation. IL-17A-driven neutrophil recruitment may participate in this process. We report that mouse bone marrow-derived DCs infected with live *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) produced large amounts of CXCL1 and CXCL2, and attracted neutrophils. After physical contact with DCs infected with live BCG, the neutrophils produced large quantities of the immunosuppressive cytokine IL-10 via the MyD88 and spleen tyrosine kinase pathways. The CD11b Integrin was involved in this neutrophil-DC interaction and allowed IL-10 production. TCR OVA transgenic mice immunized with a BCG strain producing OVA mounted an OVA-specific Th17 and Th1 CD4 response. Interestingly, IL-10-producing neutrophils specifically shut down IL-17A production by Th17 CD4 cells, but not IFN- $\gamma$  production by Th1 cells. This was due to Th17 CD4 cell-restricted expression of the receptor for IL-10. After neutrophil depletion, total mouse lung cells produced less IL-10 but more IL-17A; IFN- $\gamma$  production was not affected. Therefore, we suggest that during mycobacterial infection, regulatory neutrophils are instructed by infected reservoir DCs to produce IL-10 that specifically targets IL-10R $\alpha$ -expressing Th17 CD4 T cells. This could be important to control the otherwise exuberant Th17 response. *The Journal of Immunology*, 2013, 191: 3618–3626.

Inflammation is a rapid process whereby tissues respond to infection and eliminate the invader. Inflammation is central to immune surveillance, but it may contribute to tissue damage if left unregulated. Successful pathogens have evolved strategies to counteract inflammation and the ensuing immune responses. Slow-growing mycobacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*, a leading infectious cause of human mortality (1) and the live vaccine strain *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) used to protect against tuberculosis (TB) (2), successfully evade the inflammatory response and, therefore, can persist in the host for long periods (3). Infection with *M. tuberculosis* typically induces acute inflammatory processes in the host and leads to the recruitment of innate phagocytic cells, such as neutrophils (or polymorphonuclear neutrophils [PMNs]), monocytes, and dendritic cells (DCs). In most cases, the resident innate and early

recruited cells efficiently eliminate the bacilli with no subsequent signs of infection. However, in 10–20% of cases, the innate cells require help from Th1 CD4 and CD8 T cells to limit mycobacterial growth (4) in mature granulomas (5) even though the bacilli are not fully eliminated. Vaccination with BCG induces long-lasting immunity (6) because this live attenuated strain survives for long periods after inoculation (7). The host cells allowing mycobacterial persistence are mostly macrophages. We (8) and others (9, 10) have established that DCs are also reservoirs for persistent mycobacteria. Infected DCs can migrate out of the chronic mycobacterial granulomas and disseminate the infection among the lymphoid organs (11).

Neutrophils are highly efficient phagocytic cells (12) and also play an important role during mycobacterial infection. In an intradermal BCG vaccination model in the mouse, we demonstrated that neutrophils recruited to the injection site could transfer live bacilli to the draining lymph node (13). Infected neutrophils promote DC maturation and Ag presentation to T cells resulting in polarization toward the Th1 phenotype (12). This interaction involves the CD11b ( $\alpha$ M) Integrin that, together with CD18 (b2), forms CR3 (Mac-1) and is strongly expressed in neutrophils (14, 15). IFN- $\gamma$  and TNF play major roles in lung defense in response to mycobacteria. Humans or mice genetically deficient for the IFN- $\gamma$ R or its signaling cascade are unable to control mycobacterial infection (16), and anti-TNF therapy leads to TB reactivation (17) after granuloma breakdown (4). This inflammatory cytokine response must be restricted to avoid tissue damage. IL-17A controls granulopoiesis and neutrophil recruitment to sites of inflammation, and is another important player in the context of mycobacterial infections. It is required for granuloma formation after either BCG or *M. tuberculosis* infection in the mouse (16, 18). Th17 memory cells are involved in vaccine-induced protection against *M. tuberculosis* infection via the rapid recruitment of

Institut National de la Recherche Agronomique, Université de Tours, Unité Mixte de Recherches 1262, Infectiologie et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France

\*E.D. and R.L. contributed equally to this work.

Received for publication February 22, 2013. Accepted for publication July 31, 2013.

This work was supported by French Agence Nationale pour la Recherche Grant ANR-08-MIEN-001 17MyoimPilot and a fellowship from Institut National de la Recherche Agronomique and the Region Centre (to R.L.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Nathalie Winter, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherches 1262, Infectiologie et Santé Publique, Bâtiment 311, 37380 Nouzilly, France. E-mail: emilie.doz@joum.inra.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BCG, Bacillus Calmette-Guérin; BM, bone marrow; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; DC, dendritic cell; EGFP, enhanced GFP; HK, heat-killed; In, intranasal; MOI, multiplicity of infection; PMN, polymorphonuclear neutrophil; rBCG, recombinant BCG; Syk, spleen tyrosine kinase; TB, tuberculosis.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/1913618-09

www.jimmunol.org | doi:10.1093/immunol/133.0827

activated Th1 cells to the lung (20). Neutrophils recruited via IL-17A secrete high levels of CXCR3 chemokines that attract Th1 cells to the granuloma; these neutrophils may thus contribute to protection against the infection (21). However, Th17 cells are also highly inflammatory and must be tightly regulated to avoid tissue damage. In *M. tuberculosis*-infected mice, repeated exposure to BCG induces sublethal IL-17A production that inhibits neutrophil recruitment and destroys the lung (22). Exacerbated neutrophil infiltration is clearly a pathological trait of active TB, not only in the mouse model, but also in humans (23, 24).

The cellular interactions that regulate the host cytokine balance to restrict mycobacterial growth while maintaining tissue function have not been fully elucidated. We investigated whether such interactions control the inflammatory and anti-inflammatory cytokine balance during the chronic phase of mycobacterial infection when persistently infected DCs are present (8). We used BCG-infected DCs as a model of chronic infection with slow-growing mycobacteria. We observed that BCG-infected DCs produced large amounts of the chemokines CXCL1 and CXCL2, and attracted neutrophils. Upon physical contact with live BCG-infected DCs, neutrophils secreted large quantities of IL-10, an immunosuppressor, and this secretion required the CD11b receptor. The neutrophil-derived IL-10 specifically shut down IL-17A production by CD4 T cells but had little or no effect on IFN- $\gamma$  production. IL-17A-producing CD4 Th17 cells expressed the IL-10R $\alpha$ , whereas IFN- $\gamma$ -producing CD4 Th1 cells did not. Furthermore, neutrophil depletion decreased IL-10 production in the lung and increased IL-17A production by CD4 T cells, whereas IFN- $\gamma$  production was unaffected.

## Materials and Methods

### Bacterial strains

The full-length chicken gene encoding OVA was inserted into the integrative vector pAV660 derived from mycobacteriophage M68 as described previously (25). The plasmid was then integrated into the chromosome of the BCG strain 1173P2 Pasteur (26) to give strain Myc 3301. Expression of the full-length OVA-encoding gene in strain Myc 3301 was confirmed by Western blot. Wild-type BCG, strain Myc 408 expressing enhanced GFP (EGFP) (13) and Myc 3301 expressing OVA, were grown in Beck-Prokultur medium (26) supplemented as appropriate with kanamycin (20 mg/ml, Myc 3301) or hygromycin (50 mg/ml, Myc 408). Bacteria were harvested at midexponential growth phase and frozen at 270°C. CFUs were counted after plating dilutions on Middlebrook 7H11 agar supplemented with 0.05% oleic acid, 5% BSA fraction V, 2% dextrose, 0.004% beef catalase, and 0.88% NaCl (BD Microbiology Systems). For assays using heat-killed (HK) bacilli, 10<sup>8</sup> CFUs BCG resuspended in PBS was heated for 30 min at 80°C.

### Abc and FACS analysis

CD11c-FITC clone HL3, Ly6G-PE clone 1A8, CD4-FITC clone L3T4, CD210 (IL-10R $\alpha$ )-PE clone 1B1.3a, IL-10-allophycocyanin clone JES5-16E3, IL-17-PE or FITC clone TC11-16H10, and IFN- $\gamma$ -allophycocyanin clone XMGI2, and all Ab isotype controls were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Cells were incubated for 20 min with 2% total mouse serum; then surface staining was performed in PBS supplemented with 5% FCS and 0.1% total mouse serum. Before intracellular IL-10, IL-17, or IFN- $\gamma$  staining, cells were treated for 4 h at 37°C with 5 ng/ml brefeldin A. After cell-surface staining, the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) was used according to the manufacturer's instructions to detect intracellular cytokines. Fluorescence was analyzed using a FACSDallur apparatus and the FlowJo software 8.7.1 (Tree Star, Ashland, OR).

### Mice breeding, immunization schedule, and neutrophil depletion

Six- to eight-week-old C57BL/6 mice from SAS Janvier (Le Genest Saint Isle, France); IL-10<sup>2/2</sup> mice (Charles River, France) were kindly donated by Laurent Genotier (INSERM, U851, Lyon, France). MyD88<sup>2/2</sup> mice originally from Shizuo Akira (27) and backcrossed for 10 generations on a C57BL/6 background (28) were kindly donated by Michel Chignard (Institut Pasteur, Paris, France); OT-II transgenic mice for the OVA MHC class II complex-specific TCR (29) on a C57BL/6 genetic background

were bred at the resident INRA animal facility before use. For CD4 T cell preparation, 8- to 10-week-old female OT-II mice were immunized s.c. with 10<sup>7</sup> CFUs Myc 3301 and used 4 wk later. To study the effects of neutrophils on the T cell response *in vivo*, we gave OT-II mice 5.3  $\times$  10<sup>6</sup> CFUs Myc 3301 by the intranasal (i.n.) route. Twenty and 22 d after immunization, the mice were i.p. injected with 200 mg NIMFR14 Ab, which specifically depletes Ly-6G<sup>+</sup> neutrophils (30), or with the same quantity of IgG2b Ab (control "isotype-treated" mice). On d 23, total lung cells were harvested and aliquots of 10<sup>6</sup> cells were distributed into 96-well plates. These samples were stimulated with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and either 2 mg/ml OVA peptides 323–339 or HK-BCG with a dose equivalent to 10<sup>6</sup> CFUs. The culture supernatants were assayed for cytokines 72 h later by ELISA.

All experimental protocols complied with French law (Décret 2001-464 29/06/01) and European Economic Community regulations (86/609/CEE) for the care and use of laboratory animals under Authorization for Experimentation on Laboratory Animals number B-37-201. Our animal protocol number 2012-06-14 was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation "Val de Loire" (CEEA Val) registered with the French National Committee for Animal Experimentation.

### Bone marrow-derived DC, neutrophil, and CD4 T cell preparation and treatment

DCs were derived from bone marrow (BM) progenitors cultured in 2% conditioned medium from the GM-CSF-producing J558 hybridoma, as previously described (31) and used on d 10. Neutrophils were purified from BM by positive magnetic selection with anti-Ly-6G PE-conjugated Ab (1A8; BD Biosciences) and anti-PE beads (Miltenyi Biotec, Bergsch Gladbach, Germany) as described previously (13). CD4 T cells were purified from total spleen cells by positive magnetic selection using CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. The CD4<sup>+</sup> T cells were stained with PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD44 clone IM7 and FITC-conjugated anti-CD82L FITC clone MEL-14 (BD Biosciences). The CD44<sup>+</sup>/CD82L<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells were sorted on a MoFlo apparatus (Beckman Coulter, Fullerton, CA) with Summit Software (Beckman Coulter, Fullerton, CA). To test BCG infection cytotoxicity on bone marrow-derived DCs (BMDCs), we performed propidium iodide and Annexin V (BD Biosciences) staining after overnight culture with live BCG at a multiplicity of infection (MOI) of 5. *In vivo* test, total cells were purified from lung tissue after 1 h treatment at 37°C with 1.5 mg/ml collagenase D (Roche) and 40 U/ml DNase A (Roche). Cells were filtered with a 100- $\mu$ m nylon cell strainer (BD Falcon) and suspended in complete medium before stimulation with BCG or OVA peptide (aa 323–339, sequence ISQAVHAAHAEINEAGR; Polypeptide, Strasbourg, France).

To test the involvement of the spleen tyrosine kinase (Syk) pathway in IL-10 production, we treated cells with 1 nM piobatanol (Sigma Aldrich) and 1 nM of the inhibitor ER27319 (Sigma Aldrich) for 1 h. Control wells received the DMSO diluent alone. Cells were also treated with 15 ng/ml anti-CD11b Ab (clone M170; BD Biosciences) or rat IgG2b isotype control for 1 h. The cell culture supernatants were harvested 16–20 h later and assayed for IL-10 by ELISA (kits from R&D Systems).

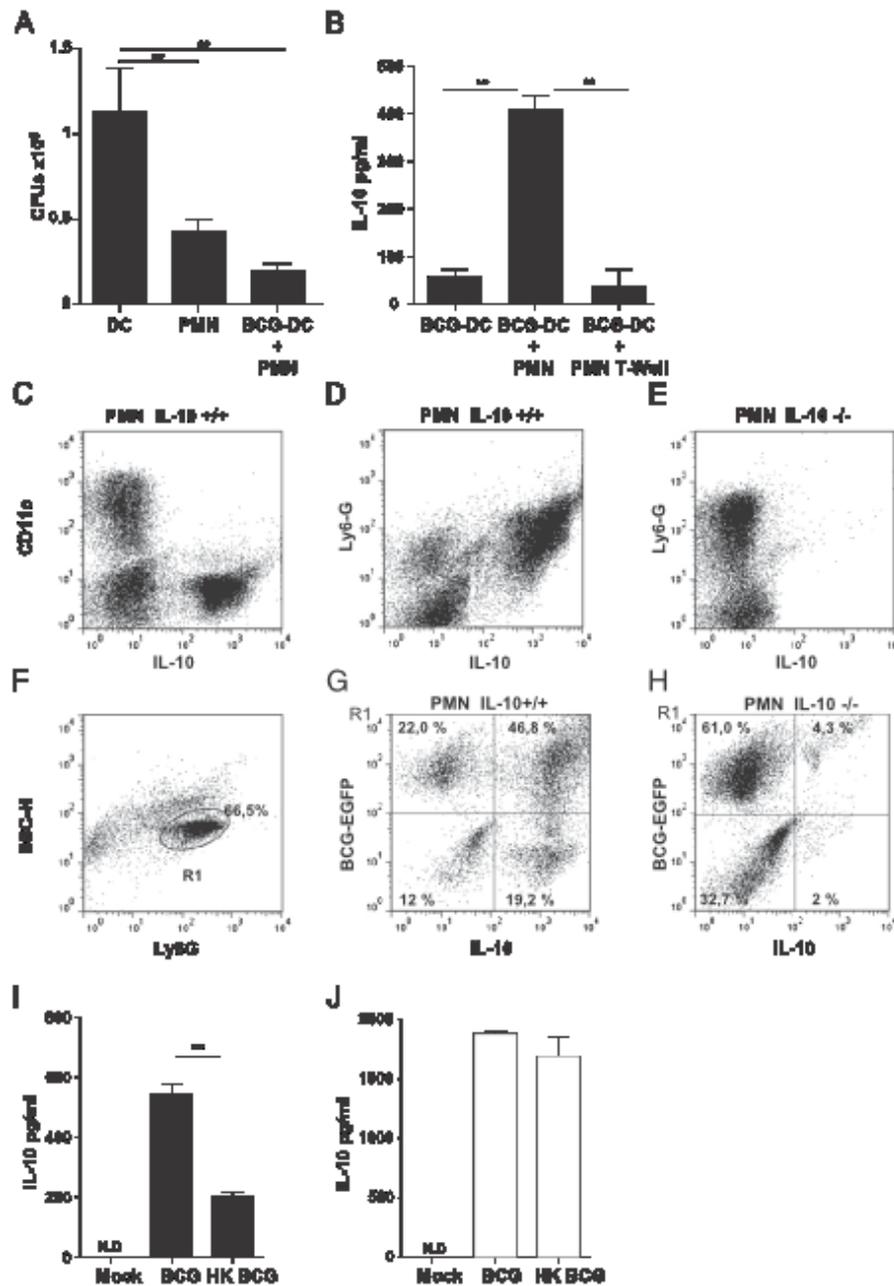
### Detection of cytokines in cocultures

C57BL/6 BMDCs were infected with BCG at an MOI of 5 for 2 h. Amikacin (200 mg/ml) was added and the samples incubated for 2 h to kill extracellular BCG as described previously (32). This treatment was applied to live-BCG-infected BMDCs throughout the study, before the incubation with neutrophils. Alternatively, cells were treated with 100 ng/ml LPS (*Escherichia coli*, serotype O11:B4; Sigma Aldrich). Sixteen hours later, the BMDCs were washed three times with PBS and placed in contact with neutrophils at a ratio of two neutrophils for one BMDC for 16 h. For some experiments as indicated, CD44<sup>+</sup>/CD82L<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells isolated from OT-II-immunized mice were added at a ratio of 10 T cells for 1 DC and the samples incubated for a further 16 h. In the presence of 2 ng/ml OVA peptides. Cytokines in the cell-culture supernatants were detected by ELISA (kits from R&D Systems).

### Transwell cultures for neutrophil migration assay

Aliquots of 10<sup>6</sup> BMDCs, previously infected with BCG at an MOI of 5 and treated with LPS (100 ng/ml) or mock treated, were seeded in 48-well Transwell system plates (3- $\mu$ m pores; BD Falcon). Control wells contained medium supplemented with 1 ng/ml recombinant CXCL1/KC (R&D Systems), and 2.3  $\times$  10<sup>6</sup> neutrophils were placed in the insert. Thirty minutes later, all cells were harvested from the wells and counted, then labeled with Gemas and examined under the light microscope to count





**FIGURE 2.** DCs infected with live BCG induce neutrophils to produce IL-10. (A) DCs were infected by incubation for 2 h with BCG at MOI of 5, treated with amikacin, and then cocultured overnight with PMNs. Control DCs and PMNs alone were infected and cultured in the same conditions. The cells were then lysed and BCG CFUs counted. Results reported are representative of duplicate measures in three independent experiments. \*\**p* = 0.002. (B) A total of  $2.53 \times 10^5$  DCs infected as in (A) was cultured with  $5.3 \times 10^6$  PMNs. In some wells, PMNs were placed in the insert of a 0.4- $\mu$ m pore-size Transwell device to separate them from DCs. Culture supernatants were harvested 16 h later and assayed for IL-10 by ELISA. \*\**p* = 0.005. (C and D) DCs infected as in (A) were placed in contact with PMNs. The samples were labeled with DC-specific anti-CD11c and PMN-specific anti-Ly6G Ab, and intracellular IL-10 was stained. After gating to eliminate cellular debris, intracellular IL-10 production was examined in CD11c<sup>+</sup> DCs (C) and Ly6G<sup>+</sup> PMNs (D). (E) Similar experiment and gating strategy to that described in (C) and (D) with BCG-infected DCs in contact with PMNs obtained from IL-10<sup>-/-</sup> mice. (F–H) DCs were infected as in (A) with BCG strain Myc 409-producing EGFP and placed in contact with wild-type (G) or IL-10<sup>-/-</sup> (H) PMNs. (F) After cell-surface labeling and staining of intracellular IL-10, Ly6G<sup>+</sup> PMNs were gated (R1) to analyze their BCG infection and IL-10 production status. (I) A total of  $2.69 \times 10^5$  DCs was infected with live BCG, treated with HK BCG at a dose equivalent to an MOI of 5, or mock-treated and cultured with  $5.3 \times 10^6$  PMNs. (J) Direct BCG infection, HK BCG stimulation, or mock treatment of  $5.3 \times 10^6$  PMNs. (I and J) IL-10 concentration in the culture supernatants determined by ELISA 16 h later. Measures were performed in triplicate with cells from two different animals. Results reported in the figure are from one experiment, representative of three independent experiments. \*\**p* = 0.002.

neutrophils directly infected with live BCG produced large amounts of IL-10 (Fig. 2J). Although contact with HK BCG-

stimulated DCs did not cause neutrophils to produce IL-10 (Fig. 2I), direct exposure to HK BCG led to substantial IL-10 secretion

by neutrophils (Fig. 2). These various observations suggest that, upon physical contact with DCs, neutrophils can be infected with live BCG, and this caused them to produce large amounts of IL-10.

**CD11b orchestrates neutrophil-driven MyD88- and Syk-dependent IL-10 production after contact with BCG-infected DCs**

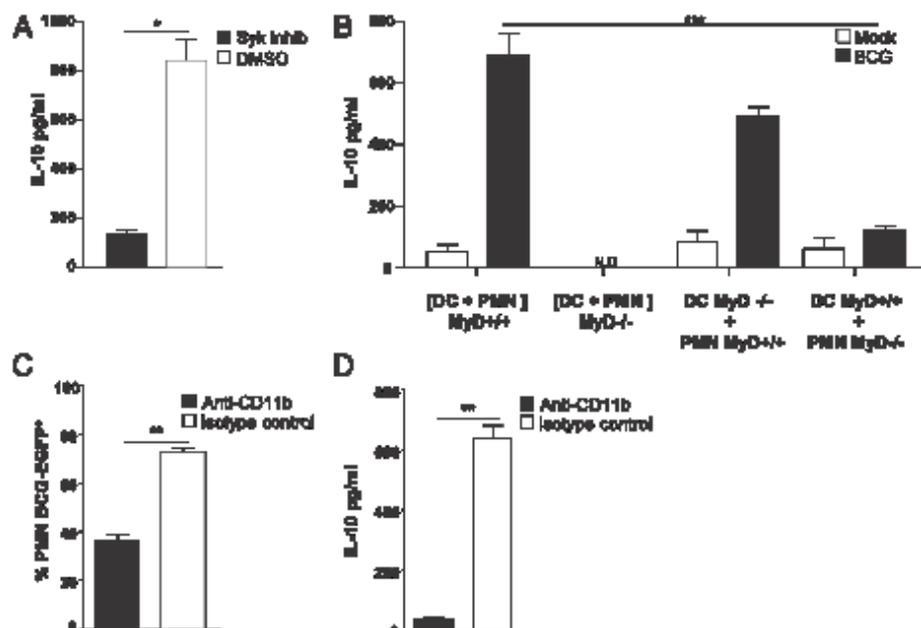
Syk and MyD88 are major regulators of IL-10 production in neutrophils directly infected with mycobacteria (38). We investigated whether these pathways were also involved in IL-10 production after contact between BCG-infected DCs and neutrophils. Treatment of BCG-DC-neutrophil cocultures with the two Syk inhibitors, piceatannol and ER27319 (39, 40), substantially reduced IL-10 secretion (Fig. 3A). Syk inhibitors did not impair neutrophil viability (Supplemental Fig. 2A) or TNF production (Supplemental Fig. 2B). MyD88<sup>2/2</sup> and wild-type mice-derived DCs were infected with BCG and cocultured with neutrophils from each background. Wild-type neutrophils cocultured with BCG-infected DCs from the two genetic backgrounds produced similar quantities of IL-10. In contrast, IL-10 secretion by MyD88<sup>2/2</sup> neutrophils cocultured with BCG-infected wild-type DCs was substantially lower. This indicates that neutrophils require MyD88 for IL-10 production in response to BCG-infected DCs. However, BCG-infected DCs do not require MyD88 to instruct neutrophils to produce IL-10.

CD11b/CD18 (CR3, Mac-1) is an integrin strongly expressed on neutrophils and that acts as a receptor for mycobacteria (41). CD11b is also able to activate Syk to trigger anti-inflammatory properties in innate cells (42). We studied the role of CD11b in IL-10 production by neutrophils. Treatment with anti-CD11b Ab before direct infection with BCG reduced neutrophil capacity to produce IL-10 by 64% (Supplemental Fig. 2C). We then infected

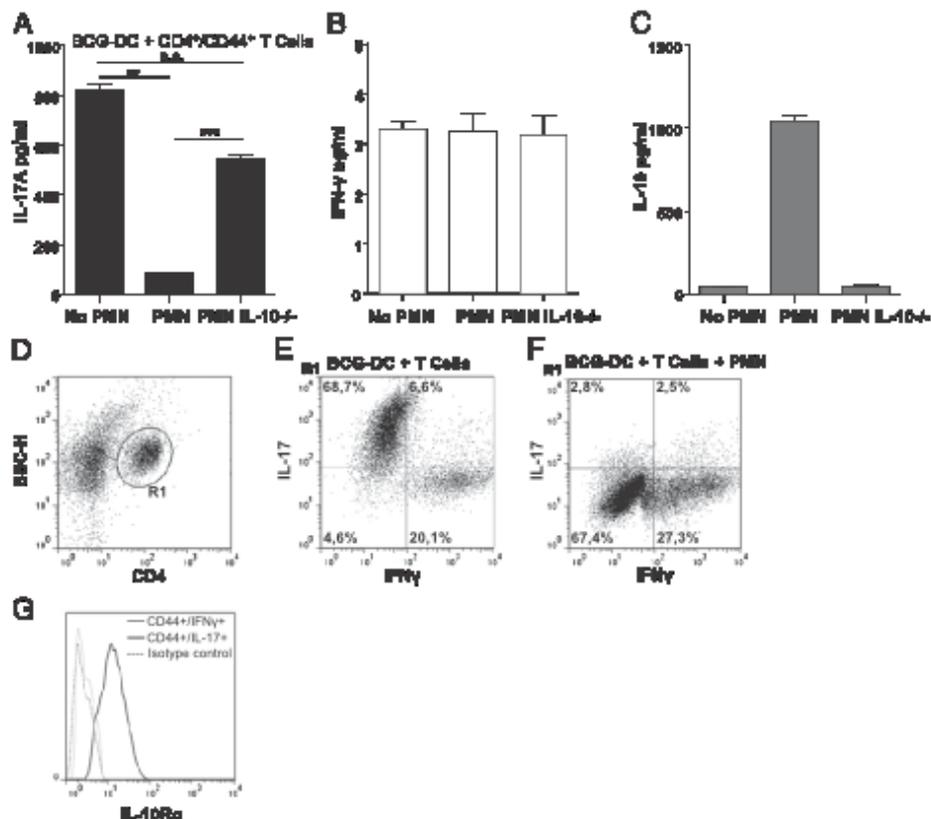
DCs with green fluorescent Myc 408 and placed them in contact with neutrophils in the presence and absence of anti-CD11b Ab. The numbers of neutrophils acquiring green fluorescence in the presence of anti-CD11b Ab was half that in its absence (Fig. 3C). IL-10 production in BCG-infected DC and neutrophil cocultures was almost completely abolished by the presence of anti-CD11b (Fig. 3D). Therefore, CD11b appears to be required for the up-regulation of IL-10 production by the interaction between BCG-infected DCs and neutrophils.

Anti-BCG Th17, but not Th1 CD4 T cells express the IL-10R and are sensitive to IL-17A shut down by IL-10-producing neutrophils

Because neutrophils in contact with BCG-infected DCs produce IL-10, an anti-inflammatory cytokine, we investigated whether this cooperation modulates the T cell response. CD4 T cells carrying a b TCR are important for the control of mycobacteria, mainly through IFN- $\gamma$  production (43). CD4-ab T cells producing IL-17A also play a role in protection (20) even though exacerbated IL-17A production destroys the lung (22). To address the regulation of IL-17A production by a b TCR-CD4 T cells, we immunized TCR OVA transgenic OT-II mice (28) with rBCG strain Myc 3301 producing OVA. To generate high numbers of activated/memory CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>hi</sup> T cells, we used the s.c. inoculation route, close to BCG intradermal vaccination used in humans. CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>hi</sup> T cells sorted from OT-II mice 4 wk after immunization produced large amounts of IL-17A and IFN- $\gamma$  in response to BCG-infected DCs and the OVA peptide (Fig. 4A, 4B). When neutrophils were added, IL-17A production was greatly reduced. However, when neutrophils from IL-10<sup>2/2</sup> mice were used, IL-17A production was similar to that in the absence of neutrophils. This indicates that IL-17A production by Th17



**FIGURE 3.** CD11b is involved in BCG acquisition by neutrophils and regulates Syk- and MyD88-dependent IL-10 production. (A) DCs infected with BCG as in Fig. 2 and PMN cocultures were treated with the Syk inhibitors, piceatannol and ER27319, at 1 mM each. Control wells were treated with equal volume of DMSO solvent. The IL-10 concentration in culture supernatant was measured by ELISA 16 h later. \**p* = 0.03. (B) DCs and PMNs were obtained from MyD88<sup>2/2</sup> or wild-type mouse BM. A total of 2.5 × 10<sup>5</sup> DCs infected as in Fig. 2 or mock-treated were placed in contact with 5 × 10<sup>5</sup> PMNs for 16 h. The IL-10 concentration in the culture supernatant was determined by ELISA. \*\*\**p* = 0.0002. (C and D) A total of 5 × 10<sup>5</sup> DCs infected as in Fig. 2 with rBCG strain Myc 408 was incubated with anti-CD11b or isotype control (15 mg/ml) or not treated, then placed in contact with 10<sup>6</sup> PMNs. (C) Percentage of fluorescent PMNs was determined by FACS after gating on Ly-8G<sup>+</sup> cells as in Fig. 2F. \*\*\**p* = 0.006. (D) IL-10 concentrations in culture supernatants were measured by ELISA 16 h later. \*\**p* = 0.004. (A, B, and D) Measures were performed in triplicate with cells from two different animals. Results reported in the figure are from one experiment, representative of three independent experiments.



**FIGURE 4.** IL-10-producing neutrophils specifically downregulate Th17 CD4 cells expressing IL-10Ra. A total of  $2.5 \times 10^5$  DCs infected with BCG as in Fig. 2 was cultured overnight with  $5.3 \times 10^6$  PMNs from wild-type or IL-10<sup>-/-</sup> mice. A total of  $2.5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells from OT-II mice immunized 4 wk earlier with rBCG-OVA was FACS sorted and added to the wells in the presence of 2 ng/ml OVA peptide. IL-17A (A), IFN-g (B), and IL-10 (C) were assayed in culture supernatants 72 h later. Results are means  $\pm$  SD from triplicates performed with cells from two different animals. Three independent experiments were performed and the results reported in the figure are from one representative experiment. \*\**p* = 0.002, \*\*\**p* = 0.0006. (D–F) Flow cytometry analysis was performed on gated CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> cells (D) after stimulation with BCG-infected DCs and OVA peptide, in the absence (E) or presence (F) of PMNs and intracellular anti-IFN-g or anti-IL-17A staining. Two independent experiments were performed and results for one are shown. (G) After cell-surface anti-IL-10Ra and intracellular anti-IFN-g and anti-IL-17A staining, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> IFN-g<sup>+</sup> (thin line) and CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (thick line) were gated to analyze IL-10Ra expression. CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells were stained with control Ab of same isotype as anti-IL-10Ra (dashed line).

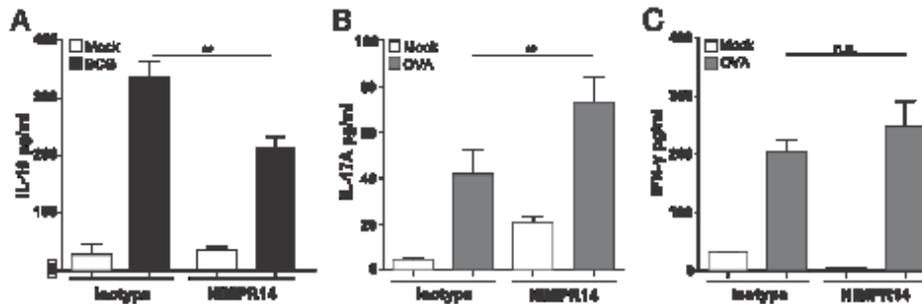
CD4 T cells was downregulated by neutrophil-derived IL-10 (Fig. 4A). By contrast, IFN-g production remained unchanged when neutrophils were added (Fig. 4B), indicating that the Th1 CD4 T cells generated by mycobacterial infection were not affected by neutrophils. The extent of IL-17A downregulation was inversely correlated with IL-10 concentrations in cultures containing neutrophils from wild-type mice (Fig. 4C). No IL-10 production was detected when neutrophils from IL-10<sup>-/-</sup> mice were added. This showed that even in the presence of Ag-specific T cells, IL-10 was produced by neutrophils. Moreover, neutrophil-derived IL-10 specifically downregulated Th17 and not Th1 CD4 T cells. As with BCG-infected DC–neutrophil cocultures, IL-10 production was substantially reduced when neutrophils were physically separated from the BCG-infected DCs and CD4<sup>+</sup> T cells. OVA-specific IL-17A production was restored, whereas IFN-g production was unaffected (Supplemental Fig. 3).

To determine how neutrophils regulated IL-17A and IFN-g production, we performed intracellular cytokine staining. Two subsets of CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> T cells, producing either IL-17A or IFN-g, were observed after activation with BCG-infected DCs and the OVA peptide (Fig. 4E). In the presence of neutrophils, IL-17A synthesis by CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> Th17 cells was completely abolished, whereas the IFN-g production by CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> Th1 cells was unaffected (Fig. 4F). We then investigated whether both T cell

subjects could receive IL-10 signals. Only the CD4<sup>+</sup> T cells producing IL-17A stained positive for IL-10Ra (Fig. 4G), explaining why only Th17 CD4 T cells were sensitive to downregulation by IL-10. Therefore, neutrophil-driven IL-10 is responsible for strong downregulation of IL-17A secretion by Th17 CD4 T cells because of their specific expression of IL-10Ra.

**Neutrophils producing IL-10 downregulate Th17 CD4 T cells in vivo**

To assess the effects of IL-10-producing neutrophils on the Th1/Th17 balance in the context of natural infection with mycobacteria in vivo, we immunized OT-II mice by i.n. administration of the rBCG-OVA strain Myc 3301 to target the lung. Three weeks later, the mice were injected with NIMPR14 Ab that specifically depletes CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> neutrophils (Supplemental Fig. 4) or with control Ab of the IgG2b isotype. Lung cells were harvested the day after Ab injection and were stimulated with BCG or with the OVA peptide. Ex vivo BCG stimulation induced IL-10 secretion by the total cell preparations, and neutrophil depletion significantly decreased IL-10 production (Fig. 5A), demonstrating the contribution of neutrophils to IL-10 production in vivo. After addition of the OVA peptide to the culture, CD4<sup>+</sup> transgenic OT-II cells produced IL-17A and IFN-g. Neutrophil depletion significantly increased IL-17A production by OVA-specific Th17 OT-II



**FIGURE 5.** Neutrophil depletion in rBCG-OVA immunized OT-II mice reduces IL-10 production in the lung and increases IL-17A production by OVA-specific CD4 T cells. OT-II mice were immunized i.v. with  $6.9 \times 10^6$  CFUs of the OVA-producing rBCG strain Myc 3301. On days 20 and 22, the mice were administered 200 mg NIMPR14 Ab to specifically deplete PMNs. Control mice received an irrelevant Ab of same isotype. On day 23, total lung cells were harvested and stimulated with HK BCG at a dose equivalent to  $10^6$  CFUs (A) or with 2 mg/ml OVA peptide (B and C). IL-10 (A), IL-17A (B), and IFN-g (C) were assayed 3 d later by ELISA. Results are means  $\pm$  SD from duplicate wells;  $n = 8$  mice. \*\* $p = 0.001$  (A), \*\* $p = 0.005$  (B).

cells (Fig. 5B), whereas IFN-g production by Th1 OT-II cells remained unaffected (Fig. 5C). These observations confirm that neutrophil-derived IL-10 acts to dampen the response of Th17 inflammatory lung T cells in vivo as proposed in the model described in Fig. 6.

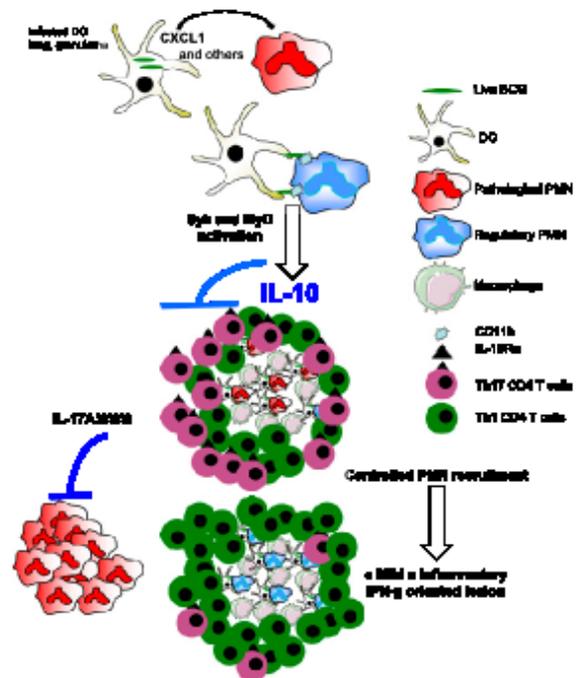
**Discussion**

*M. tuberculosis* infects one third of the world's population and kills 1.7 million people every year (1). Even though many people carry the bacilli persistently, they do not present clinical symptoms; this is the consequence of a tightly regulated immune response, which controls the multiplication of the bacilli but fails to eliminate the infection completely. Indeed, mycobacterial infection induces a delicate equilibrium between proinflammatory and anti-inflammatory immune responses, and this is well illustrated in pulmonary granulomas where mycobacteria can reside for decades. Although macrophages are the cells mostly involved in the control of mycobacteria, DCs are also an additional reservoir for BCG (8) or *M. tuberculosis* (10) and, when infected, display an impaired ability to present Ag to T cells (6, 9). Infected DCs and macrophages need to cooperate with other cells not only to control the infection, but also to regulate the host immune response. In this article, we demonstrate that BCG-infected DCs efficiently attract neutrophils by secreting high levels of chemokines, including CXCL1 and CXCL2. Neutrophils are acute inflammatory cells that respond to mycobacterial infection. They engulf bacilli efficiently, both in vitro and in vivo (12, 13). They also play a key role in granuloma formation through the secretion of CXCR3 ligands that recruit CD4 T cells (21). Neutrophils also reach the infected lungs during chronic infection, once the adaptive immune response is established (44) in response to persisting bacilli. We show that BCG-infected DCs actively participate in neutrophil recruitment. Consistent with our observations, Ahrens and colleagues (45) have also shown that BCG-infected DCs administered to mice always induced strong neutrophil recruitment. Therefore, DCs chronically infected with mycobacteria present in the mature granuloma (9) actively participate in the prolonged recruitment of neutrophils.

We observed that DCs infected with green fluorescent BCG established contacts with neutrophils, and this enabled them to acquire bacilli. Bacilli retained their fluorescence after the transfer, suggesting that most of them were still alive. Indeed, although neutrophils may contribute to BCG killing upon contact with infected DCs, the bacilli were not fully eliminated. The integrin CD11b expressed by neutrophils and the dectin DC-SIGN expressed by DCs are involved in the interaction between these

two innate cell types (15) and both are receptors for mycobacteria (46, 47). We observed that blocking CD11b decreased by 50% the entry of BCG into neutrophils after contact with infected DCs. Thus, the transfer of live BCG from DCs to neutrophils appears to be dependent on contact via CD11b, although the mechanism involved remains to be clarified.

The interactions between the BCG-infected DCs and neutrophils led to a sustained production of IL-10, mostly by the neutrophils. HK BCG applied directly to the neutrophils efficiently



**FIGURE 6.** Model of infected DCs in granulomas instructing neutrophils to produce IL-10 to downregulate IL-10R $\alpha$ -bearing Th17 CD4 T cells. In this model, bacilli that reside in DCs in the granulomas during the chronic phase of mycobacterial infection recruit neutrophils via CXCL1 and other chemokines. Contacts that are established between cells enable CD11b-mediated transfer of live bacilli from DCs to neutrophils that produce IL-10 via Syk- and MyD88-dependent pathways. These regulatory IL-10-producing neutrophils specifically shut down Th17 CD4 cells that express the IL-10R. This mechanism may help control pathological IL-17A production, and thereby avoid exacerbated neutrophil recruitment and moderate inflammation.

triggered TLR receptors and other pathways involved in IL-10 secretion (38). However, when the DCs were treated with HK BCG and then placed in contact with neutrophils, IL-10 production was minimal. This indicates that live bacilli actively participate in their transfer into neutrophils and the upregulation of IL-10 production. As reported by Zheng et al. (38) in directly mycobacteria-infected neutrophils, we confirmed that MyD88 and Syk pathways are major regulators of the IL-10 production by neutrophils instructed by BCG-infected DCs. CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting MyD88 degradation upon LPS triggering (42). CR3, the heterodimer of CD11b and CD18, is used by mycobacteria to enter macrophages and induce a weak inflammatory response (48). We observed that CD11b blocking not only reduced BCG entry into neutrophils, but also reduced IL-10 secretion substantially. Therefore, CD11b (CR3) appears to be an important, albeit silent, portal of entry for mycobacteria. It would be informative to explore whether invasion via CD11b and triggering IL-10 production help mycobacteria to persist in the host.

In mycobacteria-infected mice, cells within a pulmonary granuloma produce more IL-10 than cells outside, illustrating the immunosuppressive microenvironment in these structures (37). The local IL-10 production may provide benefits to both the host, by controlling what would otherwise be massive inflammation, and to the pathogen, by clearing cells to allow its survival (49). Furthermore, IL-10 has an important role in the equilibrium of the IFN- $\gamma$  and TNF Th1 environment within the protective granuloma. Inhibition of IL-10 signaling during BCG vaccination enhances host-generated Ag-specific IFN- $\gamma$  and IL-17A responses (50). IL-17A participates in the protection against *M. tuberculosis* after vaccination (20) and in the formation of the mycobacterial granuloma (18, 19). However, IL-17A is a highly inflammatory cytokine implicated in a number of chronic inflammatory diseases, including TB, and it may be responsible for substantial tissue damage in the host (22). We observed in this study that IL-10 produced because of the interaction between BCG-infected DCs and neutrophils strongly and specifically blunted IL-17A production by Th17 CD4 T cells, whereas IFN- $\gamma$  produced by Th1 CD4 T cells was not affected. In vivo neutrophil depletion in BCG-infected OT-II mice decreased IL-10 production by total lung cells and enhanced IL-17A production but did not affect IFN- $\gamma$  production by Ag-specific lung CD4 T cells. Th17 cells, but not Th1 CD4 T cells, induced by mycobacterial infection expressed the IL-10Ra receptor, allowing them to respond to IL-10. Two studies have described the importance of IL-10Ra in restraining IL-17A-driven inflammation. Chaudhry and colleagues (51) demonstrated that the IL-10Ra receptor is required to endow regulatory T cells with the capacity to limit Th17 CD4 T cell proliferation specifically. Huber and colleagues (52) reported that Th17 CD4 T cells only do secrete IL-10Ra, making them sensitive to IL-10 produced by CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. Both of these mechanisms are required to stop the proliferation of pathological Th17 CD4 T cells and protect mice against intestinal inflammation (51, 52).

It is intriguing that we found that neutrophils, usually considered to be innate cells recruited to kill pathogens, were able to restrict IL-10Ra<sup>+</sup> inflammatory Th17 CD4 T cells by secreting IL-10. This is in line with a new concept of the "regulatory neutrophil" that has recently emerged (36, 53). We demonstrate in this article that IL-10-producing "regulatory neutrophils" were induced after contact with BCG-infected DCs.

We believe that BCG is an acceptable model for interactions taking place between DCs, neutrophils, and CD4 T cells in the lung with fully virulent *M. tuberculosis* for the following reasons: 1) the

important role of IL-17 in granuloma formation has been first shown in BCG-infected mice (19) and later confirmed with *M. tuberculosis* (18); 2) production of IL-10 by infected neutrophils in vitro and in vivo has been demonstrated both after BCG and *M. tuberculosis* infection (38); 3) in vivo DC infection has been shown both with BCG (8, 9, 54) and *M. tuberculosis* (55, 56); and 4) recruitment of neutrophils to the site of infection has been shown both with BCG (13, 57) and *M. tuberculosis* (58, 59). We propose a model (Fig. 6) where, during chronic infection with mycobacteria, IL-10 regulatory neutrophils are recruited by mycobacteria-infected reservoir DCs present in the granuloma (8–10, 80). Thus, they specifically restrict IL-17A production by targeting IL-10Ra<sup>+</sup> antimycobacterial Th17 CD4 T cells. This regulatory loop may prevent exacerbated recruitment of neutrophils in response to IL-17A, whereas protective Th1 CD4 T cells producing IFN- $\gamma$  remain unaffected. However, long-term exposure to mycobacteria or *M. tuberculosis* reactivation might eventually recruit "pathological neutrophils" as observed in patients with active TB (23, 24). Therefore, elucidating the mechanisms governing balanced recruitment of regulatory versus pathological neutrophils may lead to the development of novel therapeutic or preventive strategies to combat TB.

### Acknowledgments

We thank Yves Le Van and Dominique Karbasov from the Cell Sorting facility at the Tours INRA Center, as well as all members of the Plate Forme d'Infectiologie Experimentale facility at the Tours INRA Center for help and advice. We thank Laurent Garnier for IL-10<sup>+/+</sup> mice, Michel Chignard and Viviane Bellay for MyD88<sup>-/-</sup> mice, Christine Delprat, Bécher Isselli, and Caroline Demergel for helpful discussions, and Caroline Chyrellet for manuscript corrections.

### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

### References

- Dye, C., and B. G. Williams. 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328: 856–861.
- Fine, P. E. M. 2001. BCG: the challenge continues. *Scand. J. Infect. Dis.* 33: 243–245.
- Feleba, J. 2008. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 3: 359–407.
- Egan, J. G., A. G. Rothbarth, C. G. Feng, N. Winter, A. Sher, and R. N. Genshin. 2008. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 28: 271–284.
- Rusati, D. G., P.-J. Candona, M.-J. Kim, S. Alshari, and F. Altare. 2008. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculous granuloma. *Nat. Immunol.* 9: 943–948.
- Weir, R. E., P. Gont-Stolniks, S. Floyd, M. K. Lator, S. Senoon, K. Senoon, R. Blitt, A. Ben-Smith, P. E. Fine, and H. M. Dockrill. 2008. Persistence of the immune response induced by BCG vaccination. *BMC Infect. Dis.* 8: 9.
- Aronson, M. E., M. Srinivasan, G. W. Condit, R. S. Howard, L. H. Moulton, E. R. Rhoades, and L. H. Harrison. 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA* 291: 2095–2099.
- Jao, X., R. Lo-Man, P. Guemagnac, L. Fleiss, E. Déjeud, S. Burgaud, B. Gloagol, N. Winter, and G. Leduc. 2002. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J. Immunol.* 168: 1284–1301.
- Schneller, H. A., P. D. Hulseberg, J. Lee, J. Proehl, P. Beria, N. Selaevik, J. S. Harding, Z. Fabry, and M. Sander. 2010. Dendritic cells in chronic mycobacterial granulomas restrict local anti-bacterial T cell responses in a murine model. *PLoS ONE* 5: e11455.
- Wolf, A. J., B. Linares, G. J. Treviño-Núñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Taketau, and J. D. Ernst. 2007. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J. Immunol.* 178: 2508–2518.
- Schneller, H. A., J. S. Harding, C. Hunt, C. J. Altamirano, P. D. Hulseberg, D. Szarek, Z. Fabry, and M. Sander. 2011. Inflammatory dendritic cells migrate in and out of intraperitoneal chronic mycobacterial granulomas in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 3822–3833.
- Moral, C., E. Bedal, V. Abadie, M. Robledo, N. Sibirilid, J. C. Gluckman, S. Gloagol, S. Boudify, and N. Winter. 2008. Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* 38: 437–447.

13. Abadie, V., E. Badell, P. Couillard, D. Emergaux, F. J. Leenen, M. Tanguy, L. Fleita, S. Besand, B. Gloagul, and N. Winter. 2008. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 108: 1849-1853.

14. Magliorini, A. M., F. Sanchez, M. Redrado-Samuelis, C. Mora, J. C. Gluckman, and S. Boudry. 2008. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 78: 977-985.

15. van Gilsbergen, K. P. J. M., M. Sanchez-Hernandez, T. B. H. Geffenbeek, and Y. van Kooyk. 2006. Neutrophil-mediated immune modulation of dendritic cells through glycoprotein-dependent interactions between Hsa-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201: 1281-1292.

16. Fortin, A., L. Abel, J. L. Casanova, and P. Gros. 2007. Host genetics of mycobacterial diseases. In *in vivo* and near forward genetic studies of BCG-oids and tuberculosis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8: 163-192.

17. Wells, R. S. 2008. Tumour necrosis factor antagonist structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect. Dis.* 8: 601-611.

18. Okazaki Yoshida, Y., M. Umemura, A. Yahagi, R. L. O'Brien, K. Ikuta, K. Kishihara, H. Hara, S. Nakaz, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2010. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.* 184: 4414-4422.

19. Umemura, M., A. Yahagi, S. Horiuchi, M. D. Bagum, H. Watanabe, K. Kamekura, T. Suda, K. Suda, S. Nakaz, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection. *J. Immunol.* 178: 3786-3795.

20. Khack, S. A., G. K. Ball, J. E. Piseri, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Gillis, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Seshi, et al. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell response after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8: 369-377.

21. Sailer, P., P. Aichler, S. Bendermann, A. E. Hauser, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, S. Ehlers, H. J. Muller-Klaus, and S. H. Kaufmann. 2003. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur. J. Immunol.* 33: 2879-2888.

22. Cruz, A., A. G. Fraga, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, E. Torado, M. Sanabe, D. R. Fawcett, T. D. Randall, J. Pedrosa, A. M. Cooper, and A. G. Castro. 2010. Pathological role of Interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 207: 1609-1619.

23. Berry, M. F. R., C. M. Graham, F. W. Mohlab, Z. Xu, S. A. A. Booth, T. Ori, K. A. Wilkinson, R. Banerjee, J. Srinivas, R. J. Wilkinson, et al. 2010. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 467: 673-677.

24. Eun, B. Y., J. H. Kong, M. S. Hong, Y. J. Lee, J. H. Kim, S. H. Heung, S. N. Cho, L. E. Via, and C. E. Barry, III. 2010. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the alveoli of patients with active pulmonary TB. *Chest* 137: 122-129.

25. Vukina, T. D., I. Mederák, V. Abadie, M. Fierment, J. Monte-Peñina, B. Gloagul, J.-M. Reynat, and N. Winter. 2008. Modification of the mycobacteriophage  $\lambda$ 685P capsid allows the integration of multiple vaccines into different BSA:Ala-T loops in slow- and fast-growing mycobacteria. *BMC Mol. Biol.* 7: 47.

26. Ghoshgiri, M., R. H. Lagrange, and C. Filice. 1986. The stability and immunogenicity of a dispersed-grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. *J. Biol. Stand.* 16: 15-26.

27. Adachi, O., T. Kawai, K. Takada, M. Matsumoto, H. Tanaka, M. Saitoh, K. Nakazaki, and S. Akira. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 8: 143-150.

28. Recrut, E., V. Belloy, I. Garcia-Veiga, L. Touqui, R. Rimplat, and M. Chignard. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS ONE* 3: e2789.

29. Bendin, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76: 34-40.

30. Marino, A., E. Badell, V. Abadie, V. Belloy, M. Chignard, M.-Y. Mielou, B. Combadiere, C. Combadiere, and N. Winter. 2010. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining *in vivo* T cell priming via IL-1R $\alpha$ -dependent nitric oxide production. *J. Immunol.* 184: 2038-2047.

31. Mederák, I., I. Bourguin, D. Emergaux, E. Badell, J. Monte-Peñina, B. Gloagul, and N. Winter. 2002. Plasmidic versus integrational cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on *in vivo* antigen persistence and immune response. *Infect. Immun.* 70: 303-314.

32. Reynat, J. M., G. Lopez-Panlatier, C. Ofrado, B. Gloagul, and N. Winter. 1998. Uracil activity does not contribute dramatically to persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Infect. Immun.* 66: 3634-3636.

33. Hirschfeld, M., Y. Ma, J. H. Wiles, S. N. Vogel, and J. J. Wiles. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 165: 615-622.

34. Anderson, M. R., N. Luby, D. Holligan, G. Wiedergren-Thorsen, M. Swanson, and G. Gladys. 2012. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin regulates leukocyte recruitment by modulating alveolar inflammatory responses. *Innate Immun.* 18: 531-542.

35. Jones, M. R., L. J. Quinton, B. T. Simms, M. M. Lupa, M. S. Kagan, and J. R. Mitzgerl. 2008. Role of Interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 197: 380-388.

36. Kobayashi, Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front. Biosci.* 13: 9403-9407.

37. Sailer, C. R., K. Kugathasan, S. McCormick, D. Danjerova, C. Horvath, C.-L. Shieh, M. Jayanthan, X. Chen, R.-C. Yang, and Z. Xing. 2011. Pulmonary mycobacterial granulomas increased IL-10 production contributes to establishing a symbiotic host-microbe microenvironment. *Am. J. Pathol.* 178: 1823-1834.

38. Zhang, X., L. Mejjam, E. Denaut, C. Ledere, and R. Lo-Man. 2008. Co-inhibition of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 28: 761-771.

39. Moriya, K., J. Rivera, S. Odum, Y. Saitama, K. Muramoto, T. Yoshiuchi, M. Miyazaki, and K. Yamada. 1997. EP-27519, an adenosine-related compound, inhibits release of antigen-induced allergic mediators from mast cells by selective inhibition of fopsonin receptor I-mediated activation of Syk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12636-12644.

40. Olier, J. M., D. L. Burg, B. S. Wilson, J. L. McLaughlin, and R. L. Geshien. 1994. Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 269: 26987-26993.

41. Velasco-Velázquez, M. A., D. Barrera, A. González-Arenas, C. Rosales, and J. Aguirre-Hernández. 2003. Macrophage-*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb. Pathog.* 36: 126-131.

42. Han, C., J. Ji, B. Xu, H. Liu, M. Li, and X. Cao. 2010. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cal-1. *Nat. Immunol.* 11: 734-742.

43. Winkles, G. M., A. Cooper, W. Kelley, M. Chatterjee, and D. L. Woodland. 2008. Early T-cell responses in tuberculosis immunity. *Immunol.* 125: 294-298.

44. Appelberg, R., J. M. Poshova, and M. T. Blum. 1991. Host and bacterial factors control the *Mycobacterium avium*-induced chronic peritoneal granulocytosis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 85: 231-236.

45. Arena, B., C. Gröber, R. D. Fina, T. Freund, D. Quarcio, A. Awagyan, A. Hübner, A. M. DiBorio, U. Wehn, and E. Hamedani. 2005. BCG priming of dendritic cells enhances T regulatory and TH1 function and suppresses allergen-induced TH2 function *in vitro* and *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150: 210-220.

46. Oywee, C., H. C. Hoppe, M. Daffa, and M. R. Ehlers. 1997. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by copular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun.* 65: 4285-4295.

47. Tallhouk, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pflert, M. Jackson, A. Amara, L. Legras, D. Dreher, L. P. Hood, J. C. Gluckman, et al. 2008. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197: 121-127.

48. Tabouret, G., C. Astier-Dequeker, C. Demange, W. Metzger, P. Combaret, A. Rey, N. Hironaka, N. F. Ballo, E. Fariat, M. Daffa, and C. Guillot. 2010. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog.* 6: e1001169.

49. Redpath, B., P. Ghosh, and M. R. J. Goodridge. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 8: 86-92.

50. Pitt, J. M., E. Stavrakouli, P. S. Redford, A. M. Baxby, G. J. Bancroft, D. B. Young, and A. O'Garra. 2012. Blockade of IL-10 signaling during bacillus Calmette-Guérin vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 189: 4078-4087.

51. Chaudhry, A., R. M. Bernstein, P. Treuting, Y. Liang, M. C. Pitt, J.-M. Heinrich, R. B. Jack, F. T. Wunderlich, J. C. Brining, W. Müller, and A. V. Rudenski. 2011. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34: 568-576.

52. Hübner, S., N. Gagliardi, E. Epigonus, W. O'Connor, J. F. J. Hübner, A. Chaudhry, M. Kaminski, Y. Kobayashi, C. J. Booth, A. V. Rudenski, et al. 2011. Th17 cells express Interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>hi</sup> and Foxp3<sup>lo</sup> regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34: 884-895.

53. Tonello Basti, J., M. C. Amozoa Vesely, D. A. Bernabe, M. C. Ranaivosoa, C. L. Montan, H. Ojeda, A. Guppi, and E. V. Acosta Rodriguez. 2012. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* 8: e1002889.

54. Rothkugel, A. G., J. G. Egan, C. G. Feng, L. R. V. Antonelli, A. Bellas, N. Winter, R. H. Laskov, and A. Sher. 2008. *In situ* IL-12p70 production during mycobacterial infection is sustained by CD11b<sup>high</sup> dendritic cells localized in tissue sites distinct from those harboring bacilli. *J. Immunol.* 182: 6915-6925.

55. Blomgran, R., and J. D. Ernst. 2011. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 186: 7110-7118.

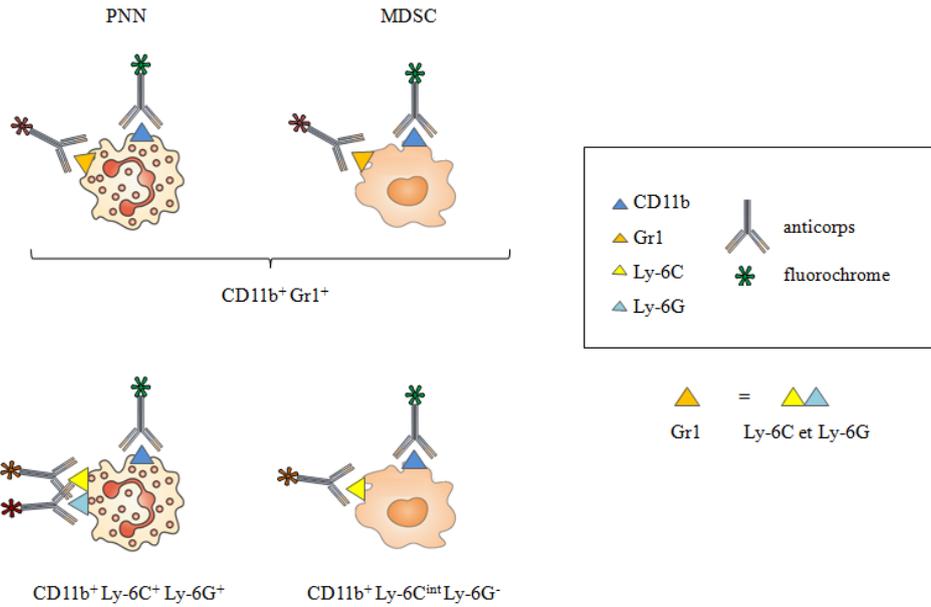
56. Wolf, A. J., L. Desjardins, B. Linas, M. Banerjee, T. Tamura, K. Takaki, and J. D. Ernst. 2005. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.* 205: 105-116.

57. D'Aquila, H., M. R. Rojas, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. H. Melo, and P. T. Bozza. 2008. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and progranulin E2 production by macrophages. *Cell. Microbiol.* 10: 2590-2604.

58. Kang, D. D., Y. Liu, J. R. Moreno, T. D. Randall, and S. A. Khack. 2011. Proliferating early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *PLoS ONE* 6: e26161.

59. Tsai, M. C., S. Chakraverty, G. Zhu, J. Xu, K. Thirala, C. Kachi, J. Tubertli, J. Flynn, and J. Chen. 2008. Characterization of the tuberculosis granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* 8: 218-229.

60. Tallhouk, L., O. Njezalla, S. Hironaka-Schubert, E. Pflert, F. Sanchez, J.-P. Abadie, P. H. Lagrange, J. C. Gluckman, M. Rosenzweig, and J.-L. Herrmann. 2003. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J. Immunol.* 170: 1939-1948.



**Figure 38: Protocole d'immunomarquage.**

L'utilisation d'Ac marquant spécifiquement les deux différents épitopes Ly-6C et Ly-6G permet la discrimination entre différentes populations de cellules myéloïdes, les PNN ( $CD11b^+$ ,  $Ly6C^+$ ,  $Ly-6G^+$ ) et les MDSC ( $CD11b^+$ ,  $Ly-6C^{int}$ ,  $Ly-6G^-$ ).

## C. Identification d'une autre population cellulaire phénotypiquement proche des PNN.

---

### 1. Introduction

De plus en plus de publications mettent en lumière la présence de MDSC dans le cas d'infections [470, 471, 473-476]. Ces cellules à fort potentiel immunosuppresseur ont d'abord été décrites dans le cas de cancer [448-450] ou l'inflammation systémique aigüe comme le sepsis [518, 519]. Les MDSC inhibent la prolifération des LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [460, 461] et aident ainsi les tumeurs à s'établir [515]. Mais leurs récentes implications dans les infections indiquent un rôle clé dans la modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte dans le contexte d'agressions par les agents pathogènes.

Chez la souris, notre équipe a montré un recrutement de MDSC lors d'infection par le BCG dans le derme auriculaire de la souris [439]. Le rôle de ces cellules dans la physiopathologie de la TB n'est pour le moment pas documenté mais elles pourraient être favorables à l'instauration de la chronicité de l'infection [520, 521].

Comme Martino et collaborateurs l'avaient précédemment démontré [439], nous avons utilisé une combinaison d'Ac CD11b, Ly-6C et Ly-6G. Ce point est important car durant de nombreuses années l'identification des PNN était basée sur un double marquage CD11b et Gr1 ne pouvant pas discriminer les différences d'expression des marqueurs Ly-6C et Ly-6G (Figure 38).

Dans cette troisième partie, notre objectif est de savoir si nous pouvons identifier le recrutement d'une population cellulaire de type MDSC et, le cas échéant, de définir leur cinétique de recrutement lors des phases innées et chroniques de l'infection. Si ces cellules sont présentes nous souhaiterions ensuite comprendre leur impact sur la physiopathologie de la TB.



## 2. Matériels et méthodes

La plupart des résultats de cette partie de ma thèse ont été obtenus lors des protocoles expérimentaux visant à définir le recrutement des PNN ou à caractériser les coopérations cellulaires entre les CD, les PNN et les LcT. Donc de nombreuses techniques sont similaires à ce qui a été présenté dans la première et la deuxième partie de ce travail. Je m'efforcerai ici de décrire les techniques différentes ou apportant des informations importantes pour la compréhension de cette troisième partie.

### 2.1. Marquages cellulaires

Trois marqueurs: CD11b-FITC clone M1/70, Ly-6C-PerCPCy5.5 clone AL21 et Ly-6G-Pe clone 1A8 (BD Biosciences, Californie, USA) sont utilisés afin de définir nos différentes populations cellulaires de la lignée myéloïde. Les PNN sont CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> et Ly6G<sup>+</sup> et les MDSC révélés par Martino et col. sont CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>int</sup> et Ly6G<sup>-</sup>. Les acquisitions sont faites par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences) et les analyses sur le logiciel FloJo (Tree Star, Oregon, USA).

### 2.2. Test de prolifération cellulaire

Les LcT sont issus de broyage de rate de souris C57BL/6 WT préalablement immunisées par BCG et sacrifiées à J23pi. Le tri des cellules CD4<sup>+</sup> est réalisé sur colonne magnétique (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) (cf Article n°2).

Les CD sont dérivées de la moelle osseuse de souris C57BL/6 WT, puis infectées par BCG (cf Article n°2).

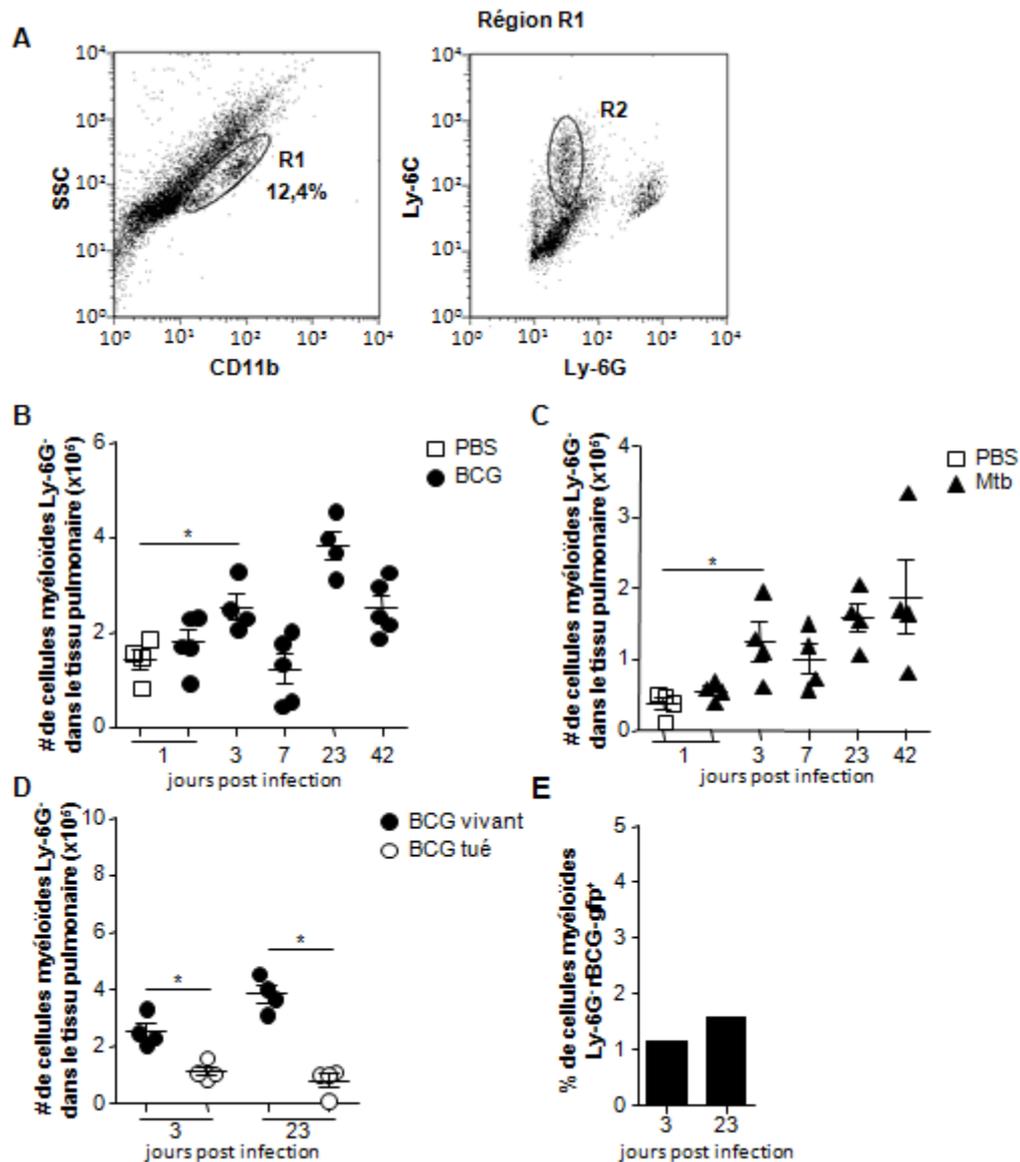
Les cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> sont isolés du poumon après la digestion enzymatique à J3pi par voie intranasale avec 5x10<sup>6</sup> CFU de BCG. Après marquage avec notre combinaison d'Ac, les cellules sont triées par cytométrie en flux (Moflo XDP, Beckman Coulter, Californie, USA) (cf Article n°1).

Le test de prolifération est réalisé par addition de 5x10<sup>5</sup> LcT à 5x10<sup>4</sup> CD infectées par le BCG en P96 (BD Falcon) 72h à 37°C en milieu RPMI (Gibco BRL, life technologies, Paisley, Royaume-Uni) complétement avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (Gibco), 2mM de L-glutamine (Gibco) et 100U/mL de pénicilline / streptomycine (Gibco).



Suivant les conditions,  $5 \times 10^4$  PNN ou cellules myéloïdes Ly-6G<sup>+</sup> sont additionné dans les puits. Puis 20 $\mu$ g/mL de "L-NG-Monomethylarginine, Acetate Salt" (L-NNMA) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) sont ajoutés quand cela est indiqué.

La mesure de la prolifération des LcT est faite par deux techniques différentes, soit par l'ajout d'1 $\mu$ Curie par puits de [<sup>3</sup>H]thymidine (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) incubée 16h à 37°C; soit la détection de l'FN- $\gamma$  produit dans le surnageant après 72h de culture via ELISA (R&D Systems, Minnesota, USA).



**Figure 39: Recrutement bi-phasique de cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup>.**

**A.** Caractérisation phénotypique en cytométrie en flux de cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>, Région R1) distinctes des PNN (Ly-6C<sup>int</sup> et Ly-6G<sup>-</sup>, Région R2). Ces cellules sont donc CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>int</sup>, Ly6G<sup>-</sup>.

**B. C.** Souris C57BL/6 WT instillées par la voie intranasale avec du PBS (□) ou 5x10<sup>6</sup> CFU de BCG (●) ou 10<sup>3</sup> CFU de Mtb (▲). Le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> est analysé dans le parenchyme pulmonaire à différents Jpi.

**D.** Souris C57BL/6 WT instillées par la voie intranasale avec du BCG vivant (●) ou tué par la chaleur (○). Le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> est analysé dans le parenchyme pulmonaire à J3 et 23pi.

**E.** Souris C57BL/6 WT infectées par la voie intranasale avec rBCG-egfp. La capacité d'infection de cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> est analysée dans le parenchyme pulmonaire à J3 et 23pi.

Les différences statistiques sont représentées dans la figure par \* (0,01 < p < 0,05) et évaluées via le test de Mann-Whitney.

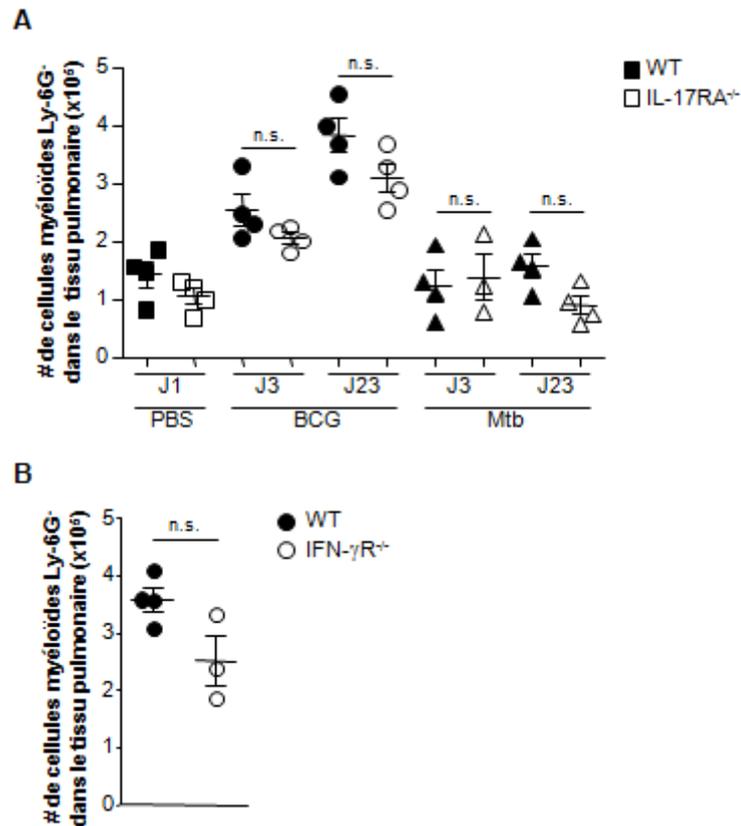
### 3. Résultats

#### 3.1. Caractérisation phénotypique et recrutement de cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> différentes des PNN

Lors des analyses de la cinétique de recrutement des PNN chez la souris C57BL/6 infectées par voie intranasale par BCG ou Mtb, nous avons utilisé le triple marquage CD11b, Ly-6C et Ly-6G pour caractériser l'afflux des cellules myéloïdes dans le poumon. Le recrutement de cellules CD11b<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>int</sup> et Ly-6G<sup>-</sup> (Région R2) est observé (Figure 39A). Ces cellules myéloïdes distinctes des PNN ont une taille (FSC) et une granulosité (SSC) très proches des PNN (résultats non montrés). Leur cinétique de recrutement est, comme pour les PNN, bi-phasique. Dans le modèle BCG sont observées une première vague de recrutement de ces cellules à J3pi, puis une seconde vague à J23pi (Figure 39B). Ce recrutement est cependant moins important que celui des PNN et il n'est observable que dans le parenchyme et non dans la lumière pulmonaire. Dans le modèle Mtb, contrairement au modèle BCG, ces cellules persistent dans les phases tardives (J42pi) (Figure 39C). Enfin aucune différence phénotypique des cellules des phases précoce et tardive n'est observée (résultat non montré). Le recrutement de ces cellules myéloïdes est donc similaire aux PNN. Une première vague durant la réponse immunitaire innée et une seconde vague en même temps les LcT  $\alpha\beta$  et LcT  $\gamma\delta$  de la réponse immunitaire adaptative.

Nous avons observé que l'instillation de BCG tué par la chaleur réduit significativement le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> par rapport à l'infection avec du BCG vivant (Figure 39D). De plus avec l'utilisation de rBCG-egfp fluorescent on observe que la capacité d'infection de ces cellules est faible en comparaison des PNN et cela même à un temps précoce (J3pi) où la disponibilité du bacille est toujours importante (Figure 39E). En effet, dans ces temps précoces la présence de BCG, révélée par la gfp, dans le parenchyme pulmonaire est importante (résultat non montré).

Le recrutement tardif de ces cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> dépend donc de l'instillation de BCG vivant. Contrairement aux PNN, ces cellules ont une capacité réduite pour la phagocytose des bacilles.



**Figure 40: Recrutement inné et adaptatif indépendants de l'IL-17RA et l'IFN- $\gamma$ R.**

**A.** Souris C57BL/6 WT (noir) ou IL-17RA<sup>-/-</sup> (blanc) instillées par voie intranasale avec du PBS (□), BCG (○) ou Mtb (△). Le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> est analysé dans le parenchyme pulmonaire à J3 et 23pi.

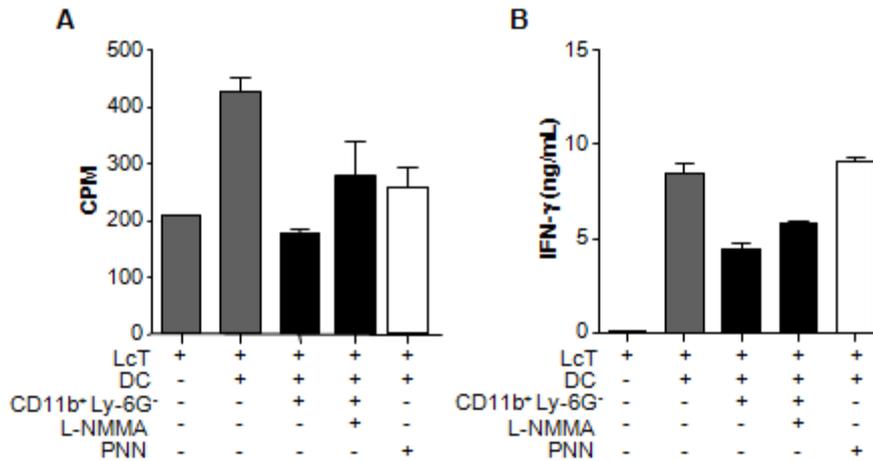
**B.** Souris C57BL/6 WT (noir) ou IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> (blanc) infectées par voie intranasale par BCG. Le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> est analysé dans le parenchyme pulmonaire à J23pi.

Les différences statistiques sont représentées dans la figure par ns ( $p > 0,05$ ) et évaluées via le test de Mann-Whitney.

### 3.2. Impact des récepteurs IL-17RA et IFN- $\gamma$ R sur le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup>

Nous observons que contrairement aux PNN le recrutement des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> n'est pas impacté par l'expression des récepteurs IL-17RA (Figure 40A) ou IFN- $\gamma$ R (Figure 40B).

Ainsi des mécanismes différents régulent le recrutement des PNN et ces cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> phénotypiquement proches.



**Figure 41: Impact des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> sur la prolifération des LcT.**

**A. B.** Réaction de prolifération lymphocytaire Ag spécifique. Suivant les conditions  $5 \times 10^4$  cellules myéloïdes non Ly-6G<sup>-</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (■) ou  $5 \times 10^4$  PNN (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) (□) sont ajoutées à  $5 \times 10^5$  LcT CD4<sup>+</sup> et  $5 \times 10^4$  CD infectées par BCG durant 72h avec ou sans 20μg/mL de drogue inhibitrice de iNOS (L-NMMA).

La prolifération cellulaire a été réalisée par mesure de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine (**A.**) et le rôle effecteur par la détection de l'IFN-γ produit dans le surnageant de culture (**B.**).

### 3.3. Caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup>

La caractérisation fonctionnelle est nécessaire à la définition de ces cellules pour démontrer leurs propriétés immunosuppressives via l'inhibition, dépendante de l'iNOS ou de ROS, de la prolifération des LcT. Nous avons mis en place un protocole de mesure de prolifération lymphocytaire Ag dépendante,  $5 \cdot 10^5$  LcT sont issus de souris immunisées au BCG sont cultivés avec  $5 \cdot 10^4$  CD infectées par BCG. L'ajout des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> indique une tendance à la diminution de la prolifération des LcT (Figure 41A et B). Lorsque la drogue L-NMMA est ajoutée, la prolifération est restaurée. Bien que l'addition de PNN à la co-culture CD infectées et LcT inhibe partiellement la prolifération cellulaire elle ne joue aucun rôle sur la production d'IFN-g. Ceci indique que seuls les cellules CD11b<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>+</sup> et Ly-6G<sup>-</sup> mais pas les PNN, sont capables d'inhiber la prolifération des LcT ainsi que leur rôle effecteur.

Donc, avec ces données préliminaires, nous concluons que des MDSC sont recrutées dans le poumon de souris infectées par mycobactéries. Elles seraient capables via un mécanisme dépendant de l'iNOS, d'inhiber les LcT effecteurs, ce qui serait favorable à l'infection par Mtb. Ces données sont à consolider.

**Tableau 9: Les différences observées entre PNN et les cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup>.**

	PNN	MDSC	
Phénotype	CD11b <sup>+</sup> Gr1 <sup>+</sup> (Ly-6C <sup>+</sup> Ly-6G <sup>+</sup> )	CD11b <sup>+</sup> Gr1 <sup>+</sup> (Ly-6C <sup>int</sup> Ly-6G <sup>+</sup> )	
Capacité d'infection	Importante en phase innée (20%)	Faible même en phase innée (1%)	
Recrutement	Compartiment	Parenchyme et lumière pulmonaire	Parenchyme pulmonaire
	Cinétique	Bi-phasique en phase innée (I1pi) et adaptative (I23pi)	Bi-phasique en phase innée (I3pi) et adaptative (I23pi)
	Bacille	BCG vivant dépendant en phase adaptative	BCG vivant dépendant en phase adaptative
	IL-17RA	IL-17RA indépendant en phase innée et IL-17RA dépendant en phase adaptatif	IL-17RA indépendant en phase innée et adaptative
	IFN- $\gamma$ R	IFN- $\gamma$ R indépendant	IFN- $\gamma$ R indépendant
	Capacité immunosuppressive	Via l'IL-10	Via l'iNOS ?

#### 4. Discussion et perspectives

Lors de nos travaux sur le recrutement des PNN dans le poumon infecté par les mycobactéries, nous avons observé le recrutement d'une population de cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>int</sup>, Ly-6G<sup>-</sup> proches des PNN mais néanmoins différentes. Nous avons étudié leur cinétique de recrutement lors d'infection pulmonaire par BCG que Mtb. La comparaison de ces deux types cellulaires montre leurs différences (Tableau 9).

Bien que, comme les PNN, ces cellules soient recrutées en deux vagues correspondant à la phase innée et adaptative de la réponse immunitaire, les cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> restent localisées dans le parenchyme pulmonaire. De plus, le recrutement de ces cellules est indépendant des récepteurs IL-17RA et IFN- $\gamma$ R, aussi bien en phase innée qu'adaptative. Comme pour les PNN l'infection par le BCG vivant est nécessaire au recrutement de la vague adaptative, mais ces cellules ont une capacité réduite à phagocyter le bacille. Donc ces cellules ne semblent pas avoir pour rôle la destruction du bacille.

Le recrutement de cellules de même phénotype a été observé par notre équipe dans le cadre de protocole de vaccination par injection intradermique de BCG dans le derme auriculaire de souris C57BL/6 WT [439]. Dans ce contexte, les PNN sont recrutés de façon précoce sur le site de l'infection (J1pi) et les cellules CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>int</sup>, Ly6G<sup>-</sup> plus tardivement (J3pi). La déplétion en PNN augmente le recrutement des MDSC, suggérant un contrôle des PNN dans le recrutement de ces cellules.

Dans notre contexte d'infection pulmonaire par le BCG, nous observons également un recrutement précoce de PNN (J1pi) et le recrutement de cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> à J3pi. Nous pensons que ces cellules Ly-6G<sup>-</sup> du poumon sont identiques à celles du derme.

Martino et collaborateurs ont caractérisé la fonction immunosuppressive de ces cellules par un test de prolifération lymphocytaire. Ils ont établi qu'elles inhibent la prolifération des LcT via un mécanisme dépendant de l'iNOS. Ils ont ainsi démontré que ces cellules sont des MDSC.

Nous avons également réalisé la caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> retrouvées dans le poumon. Nos résultats préliminaires indiquent une fonction suppressive de ces cellules sur la prolifération des LcT. Ce mécanisme est partiellement bloqué par l'addition de L-NMMA, indiquant le rôle de l'iNOS dans ce mécanisme de suppression. Ces résultats suggèrent que des MDSC sont recrutées dans le poumons de souris suite à l'infection par mycobactéries.



Au laboratoire, nous avons mis au point la technique de suivi de la prolifération lymphocytaire par marquage de la membrane au "carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester" (CFSE). Nous consoliderons nos données préliminaires sur la caractérisation fonctionnelle des cellules myéloïdes Ly-6G<sup>-</sup> par cette technique, avec un essai dose réponse. Nous ferons également une observation direct de ces cellules myéloïdes immatures pouvant inclure plusieurs phénotypes associé à la lignée granulocytaire ou monocytaire.

Les MDSC sont des cellules myéloïdes immatures très plastiques et ont des fonctions immunosuppressives. Bien qu'à l'origine décrite dans les cas de cancers, les MDSC sont de plus en plus impliquées dans les cas d'infections [470, 471, 473-476]. Elles pourraient jouer un rôle prédominant dans la modulation des réactions inflammatoires, capitale dans l'évolution de la physiopathologie des infections par les agents pathogènes.

Nous pensons que les MDSC pourraient jouer sur l'équilibre immunologique indispensable afin d'éviter l'exacerbation de la réponse inflammatoire dans le granulome pulmonaire à mycobactéries qui amène à la destruction tissulaire délétère pour l'hôte. Mais un micro environnement trop anti-inflammatoire nuirait au maintien de l'intégrité du granulome, structure cellulaire clé pour la contention et la destruction du bacille. Une meilleure connaissance des mécanismes de recrutement de ces cellules pourrait permettre d'agir sur la modulation de cet équilibre immunitaire fragile indispensable à l'évolution de la physiopathologie vers la résorption de l'infection par le bacille tuberculeux.



# Discussion



## Discussion

### 1. Le PNN ami ou ennemi dans la TB : une question de nombre et de cinétique ?

Le rôle des PNN dans le contrôle de l'infection par Mtb reste à ce jour controversé. Bien que le PNN semble clairement associé à l'exacerbation de la maladie chez l'homme [495, 496] comme chez la souris [500-502], cette fonction délétère apparaît dans les phases chroniques, tardivement après l'infection. Il est possible que ces fonctions destructrices proviennent d'une exposition répétée aux mycobactéries comme cela a été démontré chez la souris [501] ou d'une modification de la balance inflammatoire due à d'autres facteurs. Dans les phases précoces de l'infection, le rôle bénéfique des PNN est illustré dans de nombreuses études. Chez la souris, notre équipe [487, 491] et d'autres [399, 503] ont montré que les PNN établissent des coopérations avec les CD pour initier la réponse immunitaire adaptative. Ils permettent le recrutement efficace des LcT protecteurs dans le poumon [522]. Chez l'homme la susceptibilité à l'infection par Mtb est moindre chez les individus dont le taux de PNN circulants est élevé [492]. Ainsi en progressant, l'infection par Mtb pourrait favoriser l'accumulation d'un nombre pathologique de PNN, même si dans la phase précoce, un nombre plus restreint de ces cellules pourrait avoir un rôle bénéfique.

### 2) Deux vagues de recrutement des PNN, innée et adaptative.

Nos travaux démontrent que les PNN sont recrutés en deux vagues, innée et adaptative, répondant à des signaux différents, probablement pour exercer des fonctions distinctes. En effet les PNN de la phase précoce sont fortement infectés par le BCG dans le poumon alors que ceux de la phase tardive le sont très peu, malgré la présence de bacilles dans le poumon. Nous avons également observé que les PNN tardifs sont co-localisés dans le poumon, avec les LcT et non pas avec les bacilles. Ces observations indiquent bien un rôle de ces PNN dans le contrôle de la réponse adaptative. Dès 1992, Appelberg et collaborateurs ont décrit le recrutement de PNN lors de la réponse immunitaire adaptative, chez la souris, dans le cadre d'infection péritonéale par des mycobactéries non tuberculeuses [523, 524]. Dans leur modèle, le recrutement de PNN tardifs dépendait de LcT producteurs d'IFN- $\gamma$ . Dans notre modèle l'IFN- $\gamma$  ne contrôle pas le recrutement des PNN tardifs. En effet les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées par BCG ne montrent pas de défaut majeur de recrutement des PNN tardifs. Par contre, ce recrutement est dépendant de l'expression de l'IL-17RA et corrèle avec l'arrivée



dans le poumon de LcT produisant de l'IL-17A. Comme d'autres équipes l'ont montré [238, 247] la production d'IL-17A est majoritairement due aux LcT  $\gamma\delta$ . Cependant, les LcT  $\alpha\beta$  participent également à cette production. Par contre, nous n'avons pas détecté de production d'IL-17A par les PNN après stimulation par du BCG *in vitro* contrairement à ce qui a été rapporté dans d'autres études [525, 526]. *In situ*, dans le poumon lors du recrutement des PNN précoces nous n'observons pas de production d'IL-17A. Chez les souris IL-17RA<sup>-/-</sup> infectées par BCG ou Mtb, le défaut de recrutement en PNN tardifs est associé à une augmentation de la production d'IL-17A. De plus, la déplétion des PNN tardifs chez la souris WT est associée à une augmentation de la production en IL-17A. Donc dans notre modèle d'étude, les PNN recrutés ne sont pas impliqués dans la production d'IL-17A.

### 3. Des mécanismes de recrutement différents pour les deux vagues impliquent-ils l'arrivée de sous-types différents?

Nous avons clairement démontré le rôle clé de l'IL-17RA dans le contrôle du recrutement des PNN de la vague adaptative uniquement. La présence de l'IL-17RA sur les PNN de la souris n'a pas été directement montrée, mais des PNN issus de souris génétiquement invalidées pour l'IL-17RA ne montrent aucune perturbation de leur activité biologique [514]. Ceci suppose l'absence de ce récepteur sur les PNN. L'instillation intratrachéale de Th17 conditionne un recrutement de PNN dépendant de chimiokines [512] et ce recrutement est bloqué par des Ac anti-chimiokines. Le recrutement de PNN tardifs semble donc être indirect via la production de chimiokines en réponse à l'IL-17A produit par les LcT  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$ . Grâce à la technique des souris chimères, nous avons établi que l'IL-17RA devait être exprimé par les cellules non hématopoïétiques. Bien que nous ne l'ayons pas clairement établi, nous pensons que les cellules épithéliales pulmonaires sont impliquées dans ce recrutement et expriment IL-17RA. Dans le futur, des immuno-marquages permettraient de vérifier la présence du récepteur à leur surface.

Le recrutement des PNN précoces est indépendant de IL-17RA. Il est probable qu'en présence de grandes quantités de PAMP mycobactériens, comme c'est le cas lors de l'inoculation initiale, les cellules épithéliales produisent des chimiokines via la ligation de leurs PRR de surface.

Les chimiokines majoritairement décrites dans le recrutement des PNN sont trois ligands du récepteur CXCR-2 fortement exprimé par les PNN. Ces trois ligands sont CXCL-1 (KC), CXCL-2 (MIP-2) et CXCL-5 (LIX). Nous avons pu corrélérer l'expression de CXCL-1 et 5 à la



présence de IL-17RA, indiquant que ces deux chimiokines sont majoritairement impliquées dans le recrutement des PNN de la phase adaptative. Chez la souris WT, *cxcl-1* et *5* ne sont d'ailleurs exprimés que lors de la phase adaptative. Cependant, nous avons observé l'expression de CXCL-2 lors de la phase adaptative de la réponse immunitaire chez les souris IL-17RA<sup>-/-</sup> qui sont pourtant incapables de recruter les PNN tardifs. Les chimiokines ont des affinités et diffusions dans l'organisme différentes. Chez le rat CXCL-2 a une forte affinité pour CXCR-2 mais n'est détectée que dans le tissu pulmonaire. L'équivalent du CXCL-1 (CINC) a une faible affinité pour le récepteur CXCR-2 mais est libéré dans la circulation sanguine, pouvant ainsi initier le recrutement des PNN [527]. Le recrutement jusque dans le tissu pulmonaire pourrait donc impliquer deux signaux séquentiels, le premier pour la transmigration des PNN à travers l'endothélium des vaisseaux sanguins, puis CXCL-2 pour l'arrivée des PNN sur le site inflammatoire. CXCL-15 (ou lungkine) est impliquée dans les infections pulmonaires par différents agents pathogènes, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumonia* ou le LPS [528, 529], dans le recrutement des PNN dans le poumon [528]. Cette chimiokine pourrait être également un signal additionnel pour CXCL-2. La cinétique d'expression de CXCL-15 dans le poumon suite à l'infection par mycobactéries et le contrôle de son expression par IL-17RA pourront être étudiées au laboratoire.

Bien que des signaux différents soient impliqués dans le recrutement des deux vagues de PNN, nous n'avons pas pu observer à ce jour, de différences dans leur phénotype, leur pouvoir bactéricide et leur capacité à produire l'IL-10. Cependant, l'existence de sous-types différents de PNN est reportée dans la littérature [530]. Tout comme les MP activés classiquement en M1 ou alternativement en M2, les PNN pourraient également être polarisés et exercer des fonctions distinctes. Dans le cancer, les PNN au contact de produits dérivés de tumeurs comme la protéine SAA1, produisent de l'IL-10 et acquièrent un phénotype suppresseur. Ils sont cependant réorientés vers un phénotype pro-inflammatoire après interaction avec les cellules NKTi, via un contact membranaire impliquant la molécule CD1d [531]. Un PNN recruté dans le poumon pourrait donc être polarisé différemment en fonction de l'environnement cytokinique ou des interactions qu'il pourrait établir avec d'autres cellules. La différence d'expression de certains marqueurs pourrait permettre la distinction de sous-types de PNN, notamment CD54, CD177 ou les récepteurs aux chimiokines CXCR-1, 2



et 4 [532]. L'observation d'une plus large gamme de marqueurs pourra peut-être nous permettre de définir si les PNN précoces et tardifs sont deux sous-types distincts.

#### 4. Le rôle régulateur des PNN: une nouvelle vision

Lors de la mise en place de la réponse adaptative nous avons observé la production de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires, IFN- $\gamma$  et l'IL-17A, ainsi qu'anti-inflammatoire, IL-10. Nous avons montré que les PNN tardifs participent à cette production d'IL-10 avec les LcT  $\alpha\beta$ . La cytokine anti-inflammatoire IL-10 est présente dans le granulome [533]. Dans les phases chroniques de l'infection par Mtb, les MP et les CD sont des réservoirs de bacilles [516, 517, 534]. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons montré que les CD infectées par le BCG attirent très fortement les PNN. Après contact, les PNN acquièrent alors un phénotype régulateur puisqu'ils se mettent à produire de grandes quantités d'IL-10. Ce mécanisme nécessite le contact avec la CD et des bacilles vivants. De plus au contact des CD infectées par du BCG fluorescent, les PNN acquièrent efficacement des bacilles vivants. Bien que nous n'ayons pas pu élucider le mécanisme de transfert des bacilles, il est dépendant de CD11b, suggérant un passage du bacille vivant de la CD au PNN via le CR3.

L'IL-10 diminue la production de TNF- $\alpha$  qui induit la formation et la maturation du granulome [535]. Dans un modèle murin sur-exprimant l'IL-10, l'augmentation de la charge mycobactérienne est corrélée à la réactivation accrue de la TB [286, 287]. Dans un modèle murin génétiquement invalidée pour l'IL-10, la mise en place de la réponse Th1 protectrice est plus efficace, avec un meilleur contrôle de la dispersion des bacilles. Même si dans des cinétiques courtes l'absence d'IL-10 est favorable à l'élimination des bacilles [288], à partir de 60Jpi des souris déficientes en IL-10 montrent une exacerbation de la production de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 et, au delà de 185Jpi, une augmentation de la destruction du poumon corrélée à l'augmentation de la charge en bacilles est observée [536].

Nos travaux indiquent un rôle plus nuancé de l'IL-10 produite par le PNN. Nous pensons en effet que la production d'IL-10 peut être bénéfique en contrôlant l'exacerbation de l'inflammation induite par l'IL-17A. En effet dans un modèle murin où la production d'IL-17A est exacerbée, la destruction du parenchyme pulmonaire est augmentée et la survie diminuée [501] démontrant l'importance de contrôler l'IL-17A. *In vitro* comme *in vivo* nous montrons que l'IL-10 produit par les PNN régulateurs est en mesure de diminuer la production d'IL-17A par les Th17, mais sans impact sur les Th1 producteur d'IFN- $\gamma$ . Dans d'autres études



l'IL-10 produite dans les infections pulmonaires à mycobactéries régule la voie Th1 et la production d'IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  [536, 537].

Dans notre modèle, nous avons observé que seuls les Th17 portent le récepteur IL-10R $\alpha$  les rendant sensibles à la régulation par l'IL-10. Les différences observées dans ces études pourraient venir de cinétiques d'infection différentes. En effet, dans nos travaux, nous nous intéressons aux mécanismes de mise en place de la réponse adaptative dans le granulome immature mais nous n'avons pas exploré l'impact de l'IL-10 sur les voies Th1 / Th17 dans les temps très tardifs de l'infection.

Les PNN régulateurs producteurs d'IL-10 ont été mis en évidence récemment dans plusieurs autres infections. Chez la souris infectée par *Trypanosoma cruzi* [510], la déplétion des PNN est corrélée à une augmentation de la parasitémie mais surtout à une exacerbation de la production d'IFN- $\gamma$  et à la destruction du foie. Pour cet autre pathogène intracellulaire, les PNN régulateurs exercent donc également un rôle protecteur contre une inflammation détruisant le tissu cible de l'infection. De même, chez la souris infectée par *Brucella abortus*, des PNN suppresseurs diminuent la réponse Th1 même si dans ce cas le rôle bénéfique ou délétère de ces PNN n'est pas clairement établi [511]. Pour les mycobactéries ce double rôle est également décrit. En effet, Zhang et collaborateurs [138] qui ont été les premiers à démontrer la production d'IL-10 par le PNN infecté par Mtb ou BCG, proposent que ce mécanisme favorise l'installation de Mtb et soit donc défavorable au contrôle de l'infection. L'IL-10 produit par les LcTreg et les PNN régulateurs pourrait participer dans le granulome pulmonaire, à établir un environnement "symbiotique" entre l'hôte et le pathogène [533]. Si 1/3 de la population mondiale est atteint de TB latente asymptomatique cela pourrait être en partie dû à cet équilibre immunologique. Nous pensons cependant que les PNN producteurs d'IL-10 ont aussi un rôle bénéfique en permettant de contrôler l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire induite par l'IL-17A. Là encore, il s'agit peut-être de quantités de PNN et de cinétique d'arrivée dans le poumon.

## 5. Pertinence et limites des modèles

Pour des raisons évidentes de coût et de disponibilité d'outils, la souris est le modèle le plus couramment utilisé pour l'étude de la réponse de l'hôte à l'infection par Mtb. Néanmoins, la souris C57BL/6 ou la souris BALB/c, qui sont les plus utilisées car les collections de souris génétiquement invalidées sont souvent disponibles sur ces fonds génétiques, montrent des limites notamment dans la maturation du granulome qui ne présentent pas de caséification et



n'évoluent pas vers le stade de caverne. Il a récemment été décrit que la lignée C3HeB/FeJ quant à elle, développe des granulomes matures et hypoxiques associés à la destruction tissulaire [538]. Dans le futur, il sera intéressant de comparer le recrutement et la polarisation des PNN et des MDSC chez la souris C57BL/6 de référence et cette lignée.

Lors de ce travail, certaines expérimentations ont été réalisées sur le modèle d'infection par le BCG. En effet la manipulation d'un agent pathogène de classe 3 comme Mtb, est plus contraignante que celle d'un agent de classe 2 comme le BCG, vaccin administré à plus de trois milliards de personnes. Cependant notre travail ayant principalement porté sur la phase de mise en place initiale de la réponse adaptative et non pas l'évolution de la physiopathologie, nous pensons que nos observations avec le BCG s'appliquent à Mtb pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'importance de l'IL-17A dans la formation du granulome a d'abord été montrée avec le BCG [247] puis reproduite avec Mtb [257]. Ensuite, nous avons montré dans notre premier article, que la cinétique de recrutement des PNN et autres cellules clé pour le granulome est très similaire pour Mtb et BCG. Enfin, dans les deux modèles, l'impact du récepteur IL-17RA sur le recrutement des PNN est comparable avec un recrutement indépendant de l'IL-17RA en phase innée et dépendant en phase adaptative. Concernant le rôle régulateur des PNN leur capacité à produire de l'IL-10 a été montrée aussi bien en réponse au BCG qu'à Mtb [138]. La présence de CD infectées par le bacille se retrouve aussi bien dans les modèles d'infections par le BCG [516, 517, 539] que Mtb [503, 540]. Ainsi, nous pensons que nos autres données, notamment concernant le rôle du PNN dans la production d'IL-10 et la régulation de la voie Th17 sont valables aussi pour l'infection par Mtb.

Bien que la capacité des PNN murins à produire de l'IL-10 soit clairement démontrée, l'existence de PNN régulateurs chez l'Homme ne fait pas consensus. Bien qu'une étude ait montré que le LPS pouvait induire la production d'IL-10 par les PNN humains [531], ces résultats n'ont pas pu être répétés dans d'autres laboratoires [541], peut-être à cause d'une contamination des préparations de PNN par des monocytes [542]. Cependant des PNN régulateurs chez l'Homme pourraient également fonctionner via la production d'autres cytokines suppressives comme par exemple le TGF- $\beta$ . En 1989, la production de TGF- $\beta$  par des PNN humains stimulés au LPS a été observée [543].



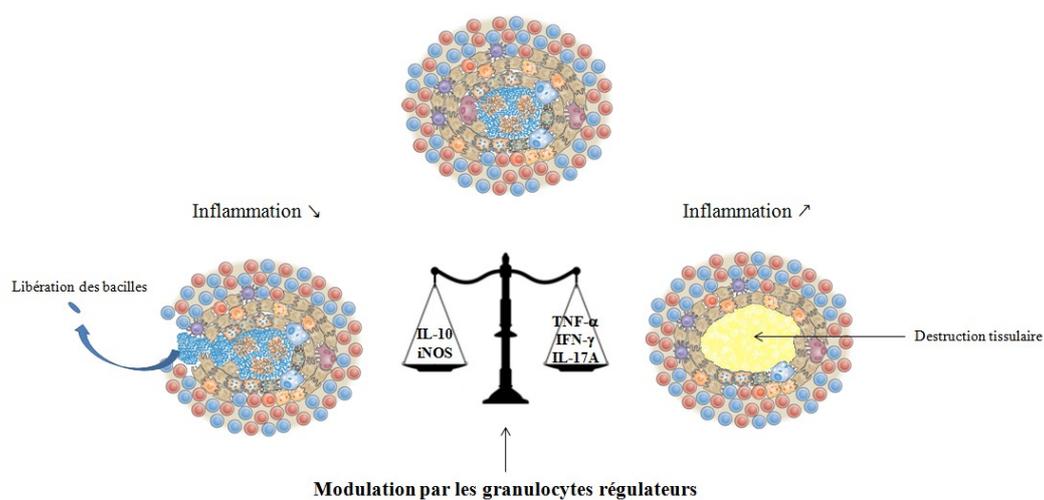
## 6. D'autres granulocytes régulateurs: les MDSC

L'implication des MDSC dans les infections par les agents pathogènes n'a été révélée que récemment [470, 474, 476]. Des cellules myéloïdes immatures, CD11b<sup>+</sup> et exprimant Gr1 plus faiblement que les PNN, ont été observées dans les formes sévères de TB chez la souris [544]. Cependant la caractérisation fonctionnelle de ces cellules n'ayant pas été réalisée, nous ne pouvons pas affirmer à ce jour qu'il s'agisse de MDSC. Dans nos modèles d'infection intranasale, nous avons observé de potentielles MDSC dans le poumon. Dans ce même temps, du Plessis et collaborateurs ont montré le recrutement de MDSC inhibant l'activation et la prolifération de LcT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, dans le poumon de patients en TB active ainsi que chez des sujets contacts [545]. Les mécanismes de recrutement ainsi que le rôle joué par ces cellules dans l'évolution de la physiopathologie de la TB ne sont pas documentés. Nos résultats apportent des informations nouvelles sur l'impact de l'IL-17RA et la cinétique de recrutement des MDSC dans le poumon suite à l'infection par mycobactéries.

Dans notre contexte, deux voies majeures pourraient réguler l'accumulation des MDSC [472]. D'une part, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  produits par les LcT et MP activés lors de l'infection. La transduction du signal via STAT1 permet alors la translocation du facteur de transcription dépendant de la voie JAK / STAT dans le noyau des cellules myéloïdes immatures et l'expression d'arginase et iNOS. D'autre part, la reconnaissance directe des PAMP par les TLR des cellules myéloïdes immatures. La transduction du signal via MYD88 permet la translocation du facteur de transcription NF $\kappa$ B dans le noyau et l'expression d'arginase et iNOS (Voir Introduction, Figure 32).

Dans les infections pulmonaires par *Pseudomonas aeruginosa*, l'induction de MDSC par la flagelline est un mécanisme utilisé par le bacille pour diminuer la mise en place de la réponse LcT protectrice [477]. Lors de l'infection pulmonaire par Mtb, le recrutement de MDSC, incapables de détruire le bacille mais retardant la mise en place de la réponse T, pourrait être un mécanisme bénéfique à Mtb pour persister durablement dans son hôte [439].

Dans le cas d'infections virales, les MDSC sont impliquées dans l'établissement de la chronicité de l'infection et sont une cible thérapeutique [546]. Les inhibiteurs de Phosphodiesterase-5 (PDE5) diminuent l'expression d'*arg-1* et *inos* bloquant ainsi les effets immunosuppresseurs des MDSC [547]. Une molécule inhibitrice des tyrosines kinases, le sunitinib, permet de bloquer STAT3 et relève l'immunosuppression induite par les MDSC [548]. Enfin l'isomère  $\beta$  de la 2'désoxy-2',2'difluorocytidine (ou gencitabine) et le 5-fluorouracile (5FU) permettrait de dépléter spécifiquement les MDSC [549]. Dans le futur,



**Figure 42: L'équilibre inflammatoire dans le granulome.**

L'équilibre cytokinique se mettant en place dans le granulome est capital pour éviter la destruction tissulaire. Nous pensons que les granulocytes régulateurs jouent un rôle majeur dans cet équilibre : les PNN régulateurs inhibant la production d'IL-17A via la production d'IL-10 et les MDSC inhibant la prolifération des LcT via la production d'iNOS. A l'avenir, une meilleure connaissance de ces granulocytes pourra permettre de développer un nouvel arsenal thérapeutique.

ces différentes molécules pourront être utilisées dans nos modèles afin cibler les MDSC et étudier l'impact sur l'évolution de la charge mycobactérienne ou du granulome.

## Conclusion

Les déséquilibres dans la balance cytokinique se mettant en place dans le granulome peuvent engendrer la destruction tissulaire (Figure 42). De nouvelles interventions thérapeutiques pourraient permettre dans le futur de contrôler cette évolution. Ce domaine de recherche devient d'autant plus important que la circulation de formes résistantes aux antibiotiques augmente, ce qui limite l'arsenal thérapeutique disponible.

Nous pensons que l'ensemble de nos travaux sur la caractérisation des granulocytes régulateurs recrutés dans le poumon lors des infections à mycobactéries apporte un éclairage nouveau dans ce domaine. A l'avenir, une meilleure connaissance accrue de la biologie de ces granulocytes pourra permettre le développement de nouvelles stratégies drogues pour contrôler la pandémie de TB l'un des fléaux majeurs pour l'Homme aujourd'hui.



# Bibliographie



1. Gutierrez, M.C., et al., *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e5.
2. Wirth, T., et al., *Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex*. PLoS Pathog, 2008. **4**(9): p. e1000160.
3. Kappelman, J., et al., *First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia*. Am J Phys Anthropol, 2008. **135**(1): p. 110-6.
4. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola, *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. Rev Sci Tech, 2001. **20**(1): p. 21-54.
5. Shinnick, T.M. and R.C. Good, *Mycobacterial taxonomy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1994. **13**(11): p. 884-901.
6. Tortoli, E., *The new mycobacteria: an update*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **48**(2): p. 159-78.
7. Kaur, D., et al., *Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis*. Adv Appl Microbiol, 2009. **69**: p. 23-78.
8. Bishop, P.J. and G. Neumann, *The history of the Ziehl-Neelsen stain*. Tubercle, 1970. **51**(2): p. 196-206.
9. Minnikin, D.E., et al., *The mycolic acids of Mycobacterium chelonae*. J Gen Microbiol, 1982. **128**(4): p. 817-22.
10. Brennan, P.J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 91-7.
11. Brennan, P.J. and H. Nikaido, *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 29-63.
12. Luquin, M., et al., *Distribution of a novel mycolic acid in species of the genus Mycobacterium*. Int J Syst Bacteriol, 1991. **41**(3): p. 390-4.
13. Hoffmann, C., et al., *Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3963-7.
14. Daffe, M. and P. Draper, *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*. Adv Microb Physiol, 1998. **39**: p. 131-203.
15. Daffe, M. and J.M. Reyrat, *The global architecture of the mycobacterial cell envelope*. Washington, DC, ASM Press, 2008: p. p395.
16. Neyrolles, O. and C. Guilhot, *Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis*. Tuberculosis (Edinb), 2011. **91**(3): p. 187-95.
17. Behling, C.A., et al., *Induction of pulmonary granulomas, macrophage procoagulant activity, and tumor necrosis factor-alpha by trehalose glycolipids*. Ann Clin Lab Sci, 1993. **23**(4): p. 256-66.
18. Hunter, R.L., et al., *Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1249-61.
19. Pabst, M.J., et al., *Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1988. **140**(2): p. 634-40.
20. Ng, V., et al., *Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae*. Cell, 2000. **103**(3): p. 511-24.
21. Onwueme, K.C., et al., *The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria*. Prog Lipid Res, 2005. **44**(5): p. 259-302.
22. <http://www.who.int>.
23. Cattoir, V., *[Molecular identification of mycobacteria and detection of antibiotic resistance]*. Ann Biol Clin (Paris), 2004. **62**(4): p. 405-13.
24. Rodrigues, L.C. and D. Lockwood, *Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(6): p. 464-70.

25. Demangel, C., T.P. Stinear, and S.T. Cole, *Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of Mycobacterium ulcerans*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(1): p. 50-60.
26. Silva, M.T., F. Portaels, and J. Pedrosa, *Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite Mycobacterium ulcerans leading to Buruli ulcer*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(11): p. 699-710.
27. Brosch, R., et al., *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3684-9.
28. Huard, R.C., et al., *Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis complex*. J Bacteriol, 2006. **188**(12): p. 4271-87.
29. Aranaz, A., et al., *Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 6): p. 1785-9.
30. Boddington, B., et al., *Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(8): p. 1751-9.
31. Driscoll, J.R., *Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Methods Mol Biol, 2009. **551**: p. 117-28.
32. Smith, N.H., et al., *Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(7): p. 537-44.
33. <http://www.tbfacts.org>.
34. <http://www.oie.int>.
35. <http://agriculture.gouv.fr>.
36. Eisenstadt, J. and G.S. Hall, *Microbiology and classification of mycobacteria*. Clin Dermatol, 1995. **13**(3): p. 197-206.
37. Cosivi, O., et al., *Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries*. Emerg Infect Dis, 1998. **4**(1): p. 59-70.
38. Thoen, C., P. Lobue, and I. de Kantor, *The importance of Mycobacterium bovis as a zoonosis*. Vet Microbiol, 2006. **112**(2-4): p. 339-45.
39. Clifton-Hadley RS, S.-L.C., Lugton IW, *Infectious diseases of wild animals*. London : Manson Publishing,, 2001. **3rd ed**: p. 558 p.
40. Simpson, V.R., *Wild animals as reservoirs of infectious diseases in the UK*. Vet J, 2002. **163**(2): p. 128-46.
41. Delahay, R.J., C.L. Cheeseman, and R.S. Clifton-Hadley, *Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of Mycobacterium bovis infection in the European badger (Meles meles) and other British mammals*. Tuberculosis (Edinb), 2001. **81**(1-2): p. 43-9.
42. Murphy, D., et al., *Tuberculosis in cattle herds are sentinels for Mycobacterium bovis infection in European badgers (Meles meles): the Irish Greenfield Study*. Vet Microbiol, 2011. **151**(1-2): p. 120-5.
43. Gallagher, J. and R.S. Clifton-Hadley, *Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals*. Res Vet Sci, 2000. **69**(3): p. 203-17.
44. Wedlock, D.N., et al., *Control of Mycobacterium bovis infections and the risk to human populations*. Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 471-80.
45. O'Reilly, L.M. and C.J. Daborn, *The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review*. Tuber Lung Dis, 1995. **76 Suppl 1**: p. 1-46.
46. Robert, J., et al., *A national survey of human Mycobacterium bovis infection in France. Network of Microbiology Laboratories in France*. Int J Tuberc Lung Dis, 1999. **3**(8): p. 711-4.
47. InVs, *Rapport de l'Institut national de Veille Sanitaire*. 2010: p. 18/03/2010.
48. WHO, *Global tuberculosis report*. 2012.
49. Dye, C., *Global epidemiology of tuberculosis*. Lancet, 2006. **367**(9514): p. 938-40.

50. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts*. PLoS Med, 2007. **4**(5): p. e115.
51. Lonnroth, K., et al., *Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants*. Soc Sci Med, 2009. **68**(12): p. 2240-6.
52. <http://www.stoptb.org>.
53. Raviglione, M.C., *The TB epidemic from 1992 to 2002*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 4-14.
54. Kwan, C.K. and J.D. Ernst, *HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(2): p. 351-76.
55. Shafer, R.W., et al., *Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection*. Medicine (Baltimore), 1991. **70**(6): p. 384-97.
56. Corbett, E.L., et al., *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic*. Arch Intern Med, 2003. **163**(9): p. 1009-21.
57. Kaufmann, S.H. and A.J. McMichael, *Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis*. Nat Med, 2005. **11**(4 Suppl): p. S33-44.
58. Sonnenberg, P., et al., *How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners*. J Infect Dis, 2005. **191**(2): p. 150-8.
59. Grange, J.M., et al., *What is BCG?* Tubercle, 1983. **64**(2): p. 129-39.
60. Corbel, M.J., et al., *Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15-16 December 2003*. Vaccine, 2004. **22**(21-22): p. 2675-80.
61. Calmette, A., *Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG*. Proc R Soc Med, 1931. **24**(11): p. 1481-90.
62. Calmette, A. and C. Guerin, *Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la tuberculose*. Ann. Inst.Pasteur, 1920. **34**: p. 553-560.
63. Lagrange, *Vaccination antituberculeuse par le BCG: historique d'une découverte et de ses controverses*. Med.Sci., 1998. **14**: p. 314-319.
64. Calmette, *Vaccination préventive des enfants nouveaux-nés contre la tuberculose par le BCG*. Annales de l'Institut Pasteur, 1927. **3**.
65. Behr, M.A. and P.M. Small, *A historical and molecular phylogeny of BCG strains*. Vaccine, 1999. **17**(7-8): p. 915-22.
66. Oettinger, T., et al., *Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree*. Tuber Lung Dis, 1999. **79**(4): p. 243-50.
67. Behr, M.A. and D.R. Sherman, *Mycobacterial virulence and specialized secretion: same story, different ending*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 286-7.
68. <http://www.inpes.sante.fr>.
69. Behr, M.A., *BCG--different strains, different vaccines?* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(2): p. 86-92.
70. Stanford, J.L., *Immunotherapy with Mycobacterium vaccae in the treatment of mycobacterial disease*. J Infect, 1999. **39**(3): p. 179-82.
71. Parida, S.K. and S.H. Kaufmann, *Novel tuberculosis vaccines on the horizon*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 374-84.
72. Behr, M.A., et al., *Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray*. Science, 1999. **284**(5419): p. 1520-3.
73. Lewis, K.N., et al., *Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guerin attenuation*. J Infect Dis, 2003. **187**(1): p. 117-23.

74. Mahairas, G.G., et al., *Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis*. J Bacteriol, 1996. **178**(5): p. 1274-82.
75. Renshaw, P.S., et al., *Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6*. EMBO J, 2005. **24**(14): p. 2491-8.
76. Fine, P.E., *The BCG story: lessons from the past and implications for the future*. Rev Infect Dis, 1989. **11 Suppl 2**: p. S353-9.
77. Andersen, P. and T.M. Doherty, *The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 656-62.
78. Colditz, G.A., et al., *Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature*. JAMA, 1994. **271**(9): p. 698-702.
79. Brewer, T.F., *Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature*. Clin Infect Dis, 2000. **31 Suppl 3**: p. S64-7.
80. Brewer, T.F. and G.A. Colditz, *Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(1): p. 126-35.
81. Sterne, J.A., L.C. Rodrigues, and I.N. Guedes, *Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination?* Int J Tuberc Lung Dis, 1998. **2**(3): p. 200-7.
82. Aronson, N.E., et al., *Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study*. JAMA, 2004. **291**(17): p. 2086-91.
83. Smith, D., E. Wiegeshaus, and V. Balasubramanian, *An analysis of some hypotheses related to the Chingelput bacille Calmette-Guerin trial*. Clin Infect Dis, 2000. **31 Suppl 3**: p. S77-80.
84. Fine, P.E., *Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity*. Lancet, 1995. **346**(8986): p. 1339-45.
85. Palmer, C.E. and M.W. Long, *Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis*. Am Rev Respir Dis, 1966. **94**(4): p. 553-68.
86. Brandt, L., et al., *Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 672-8.
87. Hesseling, A.C., et al., *The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children*. Vaccine, 2007. **25**(1): p. 14-8.
88. WHO, *Weekly epidemiological record*. 2007. **3**(82): p. 17-24.
89. Maher, D., et al., *Le traitement de la tuberculose: principes à l'intention des programmes nationaux*. WHO, 1997. **97.220**.
90. WHO, *The TB Vaccines Pipeline*. Pipeline report, 2012.
91. Kaufmann, S.H., *Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?* Nat Med, 2000. **6**(9): p. 955-60.
92. Collins, H.L. and S.H. Kaufmann, *Prospects for better tuberculosis vaccines*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(1): p. 21-8.
93. Agger, E.M. and P. Andersen, *A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure*. Vaccine, 2002. **21**(1-2): p. 7-14.
94. McMurray, D.N., *Recent progress in the development and testing of vaccines against human tuberculosis*. Int J Parasitol, 2003. **33**(5-6): p. 547-54.
95. Bernstein, J., et al., *Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds*. Am Rev Tuberc, 1952. **65**(4): p. 357-64.
96. Malone, L., et al., *The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice*. Am Rev Tuberc, 1952. **65**(5): p. 511-8.
97. Maggi, N., et al., *Rifampicin: a new orally active rifamycin*. Chemotherapy, 1966. **11**(5): p. 285-92.

98. Schatz, A.W., *Effect of Streptomycin and other antibiotic substances upon Mycobacterium tuberculosis and related organisms*. Proc Soc Exp Biol Med, 1944. **57**: p. 244-248.
99. Thomas, J.P., et al., *A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-l-butanol)*. Am Rev Respir Dis, 1961. **83**: p. 891-3.
100. Goldberg, D.E., R.F. Siliciano, and W.R. Jacobs, Jr., *Outwitting evolution: fighting drug-resistant TB, malaria, and HIV*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1271-83.
101. Bifani, P.J., et al., *Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clone family*. JAMA, 1996. **275**(6): p. 452-7.
102. Glynn, J.R., et al., *Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(8): p. 843-9.
103. Guerrero, A., et al., *Nosocomial transmission of Mycobacterium bovis resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection*. Lancet, 1997. **350**(9093): p. 1738-42.
104. Espinal, M.A., et al., *Anti tuberculosis drug resistance in the world*. World Health Organization, 2000. **Geneva**: p. 253p.
105. Aziz, M.A., et al., *Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis*. Lancet, 2006. **368**(9553): p. 2142-54.
106. WHO, *Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes*. 1996. **WHO/TB/96.199**.
107. Ramaswamy, S. and J.M. Musser, *Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update*. Tuber Lung Dis, 1998. **79**(1): p. 3-29.
108. Udhwadia, Z.F., et al., *Totally drug-resistant tuberculosis in India*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(4): p. 579-81.
109. <http://www.fda.gov>.
110. Arms Karen, P.S.C., *Biologie, edition etudes vivantes*, 1988. **tome 2**.
111. <http://www.embryology.ch>.
112. Chronos, Z.C., et al., *Pulmonary surfactant and tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89 Suppl 1**: p. S10-4.
113. Downing, J.F., et al., *Surfactant protein a promotes attachment of Mycobacterium tuberculosis to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4848-52.
114. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of beta defensin 2 in experimental pulmonary tuberculosis: tentative approach for vaccine development*. Arch Med Res, 2012. **43**(4): p. 324-8.
115. Botos, I., D.M. Segal, and D.R. Davies, *The structural biology of Toll-like receptors*. Structure, 2011. **19**: p. p447-449.
116. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
117. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
118. Nishiya, T. and A.L. DeFranco, *Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19008-17.
119. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.

120. Jin, M.S. and J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 182-91.
121. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
122. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
123. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
124. Harding, C.V. and W.H. Boom, *Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors*. Nature, 2010. **8**: p. 296-307.
125. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
126. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
127. Ferwerda, G., et al., *NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. 279-85.
128. Mayer, A.K., et al., *Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3134-42.
129. Hasegawa, M., et al., *A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 373-83.
130. Taylor, M.E. and K. Drickamer, *Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 399-404.
131. Torrelles, J.B., A.K. Azad, and L.S. Schlesinger, *Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from Mycobacterium tuberculosis by C-type lectin pattern recognition receptors*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1805-16.
132. Shin, D.M., et al., *Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1*. Cell Microbiol, 2008. **10**(8): p. 1608-21.
133. Ishikawa, E., et al., *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2879-88.
134. Velasco-Velazquez, M.A., et al., *Macrophage--Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3*. Microb Pathog, 2003. **35**(3): p. 125-31.
135. Cywes, C., et al., *Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4258-66.
136. Tabouret, G., et al., *Mycobacterium leprae phenolglycolipid-1 expressed by engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes*. PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001159.
137. Thomas, C.J. and K. Schroder, *Pattern recognition receptor function in neutrophils*. Trends Immunol, 2013. **34**(7): p. 317-28.
138. Zhang, X., et al., *Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 761-71.
139. Jo, E.K., *Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(3): p. 279-86.
140. Huynh, K.K., S.A. Joshi, and E.J. Brown, *A delicate dance: host response to mycobacteria*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(4): p. 464-72.

141. Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira, *Pathogen recognition by innate receptors*. J Infect Chemother, 2008. **14**(2): p. 86-92.
142. van Crevel, R., T.H. Ottenhoff, and J.W. van der Meer, *Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 294-309.
143. Gomez, M.I. and A. Prince, *Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens*. Pediatr Pulmonol, 2008. **43**(1): p. 11-9.
144. Shepard, C.C., *Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cells*. J Exp Med, 1957. **105**(1): p. 39-48.
145. Bermudez, L.E. and J. Goodman, *Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells*. Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1400-6.
146. Hernandez-Pando, R., et al., *Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection*. Lancet, 2000. **356**(9248): p. 2133-8.
147. Menozzi, F.D., et al., *Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions*. Microbes Infect, 2006. **8**(1): p. 1-9.
148. Pethe, K., et al., *The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination*. Nature, 2001. **412**(6843): p. 190-4.
149. Landsman, L. and S. Jung, *Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3488-94.
150. Bowden, D.H., *The alveolar macrophage*. Environ Health Perspect, 1984. **55**: p. 327-341.
151. Ernst, J.D., *Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1277-81.
152. Russell, D.G., *Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 569-77.
153. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
154. Gomes, M.S., et al., *Survival of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis in acidified vacuoles of murine macrophages*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3199-206.
155. Nathan, C. and M.U. Shiloh, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
156. Ferrari, G., et al., *A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria*. Cell, 1999. **97**(4): p. 435-47.
157. Nguyen, L. and J. Pieters, *The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(5): p. 269-76.
158. Li, W. and J. Xie, *Role of mycobacteria effectors in phagosome maturation blockage and new drug targets discovery*. J Cell Biochem, 2011. **112**(10): p. 2688-93.
159. Fratti, R.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5437-42.
160. Vergne, I., et al., *Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 751-60.
161. Rhoades, E.R. and I.M. Orme, *Susceptibility of a panel of virulent strains of Mycobacterium tuberculosis to reactive nitrogen intermediates*. Infect Immun, 1997. **65**(4): p. 1189-95.

162. Miller, B.H., et al., *Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection*. *Infect Immun*, 2004. **72**(5): p. 2872-8.
163. Raynaud, C., et al., *The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2002. **46**(1): p. 191-201.
164. Molle, V., et al., *pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from Mycobacterium tuberculosis and characterization of the channel by peptidic dissection*. *Mol Microbiol*, 2006. **61**(3): p. 826-37.
165. Egen, J.G., et al., *Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas*. *Immunity*, 2008. **28**(2): p. 271-84.
166. Dautry-Varsat, A., M.E. Balana, and B. Wyplosz, *Chlamydia--host cell interactions: recent advances on bacterial entry and intracellular development*. *Traffic*, 2004. **5**(8): p. 561-70.
167. <http://www.cours-pharmacie.com>.
168. Holt, P.G., et al., *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(2): p. 142-52.
169. Steinman, R.M., *Dendritic cells: from the fabric of immunology*. *Clin Invest Med*, 2004. **27**(5): p. 231-6.
170. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
171. Ulrichs, T., et al., *T-cell responses to CDI-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection*. *Infect Immun*, 2003. **71**(6): p. 3076-87.
172. Inaba, K., et al., *Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo*. *J Exp Med*, 1993. **178**(2): p. 479-88.
173. Gonzalez-Juarrero, M. and I.M. Orme, *Characterization of murine lung dendritic cells infected with Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2001. **69**(2): p. 1127-33.
174. Beckman, E.M., et al., *Recognition of a lipid antigen by CDI-restricted alpha beta+ T cells*. *Nature*, 1994. **372**(6507): p. 691-4.
175. Kaufmann, S.H., *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(1): p. 20-30.
176. Schreiber, H.A. and M. Sandor, *The role of dendritic cells in mycobacterium-induced granulomas*. *Immunol Lett*, 2010. **130**(1-2): p. 26-31.
177. Trombetta, E.S., et al., *Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation*. *Science*, 2003. **299**(5611): p. 1400-3.
178. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. *Nature*, 2004. **427**(6970): p. 154-9.
179. Orme, I.M., P. Andersen, and W.H. Boom, *T cell response to Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1993. **167**(6): p. 1481-97.
180. Feng, C.G., et al., *Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1999. **67**(7): p. 3242-7.
181. Randhawa, P.S., *Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies*. *Pathology*, 1990. **22**(3): p. 153-5.
182. Muller, I., et al., *Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells*. *Infect Immun*, 1987. **55**(9): p. 2037-41.
183. Orme, I.M. and F.M. Collins, *Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity*

- and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin.* Cell Immunol, 1984. **84**(1): p. 113-20.
184. Caruso, A.M., et al., *Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis.* J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5407-16.
185. Selwyn, P.A., et al., *A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection.* N Engl J Med, 1989. **320**(9): p. 545-50.
186. Cambier, et al., *Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes.* Ann. Méd. Vét., 2010. **154**: p. 104-112.
187. Cooper, A.M., *Cell-mediated immune responses in tuberculosis.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 393-422.
188. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
189. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
190. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
191. Okamura, H., et al., *Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 259-64.
192. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice.* J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.
193. Jouanguy, E., et al., *Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection.* N Engl J Med, 1996. **335**(26): p. 1956-61.
194. Jouanguy, E., et al., *Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis.* J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2658-64.
195. Kong, X.F., et al., *A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons.* Blood, 2010. **116**(26): p. 5895-906.
196. Feinberg, J., et al., *Bacillus Calmette Guerin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes.* Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 3276-84.
197. Scanga, C.A., et al., *Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2.* J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 347-58.
198. Lin, Y., et al., *Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis.* Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1351-6.
199. Zhang, M., et al., *T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun, 1995. **63**(8): p. 3231-4.
200. Flynn, J.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice.* Immunity, 1995. **2**(6): p. 561-72.
201. Mohan, V.P., et al., *Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1847-55.
202. Gardam, M.A., et al., *Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management.* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(3): p. 148-55.
203. Mayordomo, L., et al., *Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment.* Scand J Rheumatol, 2002. **31**(1): p. 44-5.

204. Harris, J., J.C. Hope, and J. Keane, *Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 2008. **198**(12): p. 1842-50.
205. Garcia, I., et al., *High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3182-90.
206. Prabha, C., et al., *Role of TNF- $\alpha$  in host immune response in tuberculous pleuritis*. Curr Sci, 2003. **85**: p. 639-642.
207. Moreira, A.L., et al., *Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis*. Tuber Lung Dis, 1997. **78**(1): p. 47-55.
208. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 556-67.
209. Potian, J.A., et al., *Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway*. J Exp Med, 2011. **208**(9): p. 1863-74.
210. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
211. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
212. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
213. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
214. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
215. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
216. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
217. Infante-Duarte, C., et al., *Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6107-15.
218. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
219. Krakowski, M. and T. Owens, *Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1641-6.
220. Tran, E.H., E.N. Prince, and T. Owens, *IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2759-68.
221. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 454-67.
222. Curtis, M.M. and S.S. Way, *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 177-85.
223. Hu, Y., et al., *The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1217**: p. 60-76.

224. Pappu, R., V. Ramirez-Carrozzi, and A. Sambandam, *The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases*. Immunology, 2011. **134**(1): p. 8-16.
225. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
226. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
227. Romagnani, S., et al., *Properties and origin of human Th17 cells*. Mol Immunol, 2009. **47**(1): p. 3-7.
228. Khader, S.A., et al., *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 369-77.
229. Cua, D.J. and C.M. Tato, *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 479-89.
230. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
231. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
232. Kawaguchi, M., et al., *IL-17 cytokine family*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1265-73; quiz 1274.
233. Iwakura, Y., et al., *Functional specialization of interleukin-17 family members*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 149-62.
234. Chang, S.H. and C. Dong, *A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses*. Cell Res, 2007. **17**(5): p. 435-40.
235. Wright, J.F., et al., *Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13447-55.
236. Yang, X.O., et al., *Regulation of inflammatory responses by IL-17F*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1063-75.
237. Starnes, T., et al., *Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4137-40.
238. Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn, *IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4662-9.
239. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
240. Sutton, C.E., et al., *Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 331-41.
241. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
242. Yu, J.J. and S.L. Gaffen, *Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 170-7.
243. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 761-9.
244. Zelante, T., et al., *IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2695-706.

245. Shibata, K., et al., *Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4466-72.
246. Liu, J., et al., *Early production of IL-17 protects against acute pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. **61**(2): p. 179-88.
247. Umemura, M., et al., *IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3786-96.
248. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
249. Gonzalez-Juarrero, M., et al., *Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control Mycobacterium tuberculosis infection*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 914-22.
250. Szeliga, J., et al., *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-mediated innate responses in tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2008. **88**(1): p. 7-20.
251. Fort, M.M., et al., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 985-95.
252. Dong, C., *Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 80-6.
253. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
254. Kuestner, R.E., et al., *Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5462-73.
255. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
256. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 617-21.
257. Okamoto Yoshida, Y., et al., *Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4414-22.
258. Forlow, S.B., et al., *Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3309-14.
259. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-94.
260. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
261. Ishigame, H., et al., *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 108-19.
262. Toy, D., et al., *Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 36-9.
263. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
264. Haudenschild, D., et al., *Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4309-16.

265. Rickel, E.A., et al., *Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4299-310.
266. Lee, J., et al., *IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1660-4.
267. Chang, S.H., et al., *Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 611-21.
268. Rong, Z., et al., *IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 208-15.
269. Pancer, Z., et al., *Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13273-8.
270. Tsang, M., et al., *Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 165-9.
271. Abbas, A.K., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nature Immunology, 2013. **14**(4): p. 307.
272. Cottrez, F. and H. Groux, *Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12-5.
273. Barnes, M.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 401-11.
274. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 353-60.
275. Kursar, M., et al., *Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2661-5.
276. Wergeland, I., J. Assmus, and A.M. Dyrhol-Riise, *T regulatory cells and immune activation in Mycobacterium tuberculosis infection and the effect of preventive therapy*. Scand J Immunol, 2011. **73**(3): p. 234-42.
277. Howard, M. and A. O'Garra, *Biological properties of interleukin 10*. Immunol Today, 1992. **13**(6): p. 198-200.
278. Yssel, H., et al., *IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells*. J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2378-84.
279. Redford, P.S., P.J. Murray, and A. O'Garra, *The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 261-70.
280. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
281. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
282. Yang, X., et al., *IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following Chlamydia trachomatis lung infection*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 1010-7.
283. Gomes-Santos, A.C., et al., *New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 560817.
284. Tournoy, K.G., J.C. Kips, and R.A. Pauwels, *Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(6): p. 775-83.
285. Grunig, G., et al., *Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1089-99.

286. Murray, P.J., et al., *T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 315-21.
287. Turner, J., et al., *In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6343-51.
288. Redford, P.S., et al., *Enhanced protection to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2200-10.
289. O'Leary, S., M.P. O'Sullivan, and J. Keane, *IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(1): p. 172-80.
290. Macatonia, S.E., et al., *Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3755-65.
291. Mocellin, S., et al., *The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 61-76.
292. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
293. Wang, P., et al., *Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms*. J Biol Chem, 1995. **270**(16): p. 9558-63.
294. Shames, B.D., et al., *Interleukin-10 stabilizes inhibitory kappaB-alpha in human monocytes*. Shock, 1998. **10**(6): p. 389-94.
295. Kopydlowski, K.M., et al., *Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1537-44.
296. Hart, P.H., et al., *Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3672-80.
297. Linderholm, M., et al., *Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome*. J Infect Dis, 1996. **173**(1): p. 38-43.
298. Shaw, T.C., L.H. Thomas, and J.S. Friedland, *Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by human monocytic cells*. Cytokine, 2000. **12**(5): p. 483-6.
299. Toossi, Z., et al., *Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 465-73.
300. Sendide, K., et al., *Mycobacterium bovis BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5324-32.
301. Zuniga, J., et al., *Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 193923.
302. Orme, I.M., *The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1987. **138**(1): p. 293-8.
303. Feng, C.G. and W.J. Britton, *CD4+ and CD8+ T cells mediate adoptive immunity to aerosol infection of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1846-9.
304. van Pinxteren, L.A., et al., *Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3689-98.

305. Sousa, A.O., et al., *Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4204-8.
306. Cho, S., et al., *Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12210-5.
307. Serbina, N.V., et al., *CD8+ CTL from lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 353-63.
308. Stenger, S., et al., *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science, 1998. **282**(5386): p. 121-5.
309. Lanier, L.L., et al., *Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood*. Eur J Immunol, 1988. **18**(12): p. 1985-92.
310. Groh, V., et al., *Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system*. J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1277-94.
311. Griffin, J.P., et al., *Kinetics of accumulation of gamma delta receptor-bearing T lymphocytes in mice infected with live mycobacteria*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4263-5.
312. Tanaka, Y., et al., *Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8175-9.
313. Fournie, J.J. and M. Bonneville, *Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens*. Res Immunol, 1996. **147**(5): p. 338-47.
314. Haregewoin, A., et al., *Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein*. Nature, 1989. **340**(6231): p. 309-12.
315. Born, W., et al., *Recognition of a peptide antigen by heat shock--reactive gamma delta T lymphocytes*. Science, 1990. **249**(4964): p. 67-9.
316. Tanaka, Y., et al., *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
317. Bukowski, J.F., C.T. Morita, and M.B. Brenner, *Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 57-65.
318. Fournier J. -J., B.M., *Les lymphocytes T gamma-delta: des chasseurs polyvalents*. Pour la science, 2008. **368**: p. 50-55.
319. Gertner, J., et al., *Lymphocytes: Gamma Delta*. Encyclopedia of life sciences, 2007.
320. Boom, W.H., *Gammadelta T cells and Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, 1999. **1**(3): p. 187-95.
321. Holoshitz, J., et al., *Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid*. Nature, 1989. **339**(6221): p. 226-9.
322. Peng, M.Y., et al., *Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(3): p. 203-8.
323. Dieli, F., et al., *Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(5): p. 1512-9.
324. Dieli, F., et al., *Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes*. J Infect Dis, 2001. **184**(8): p. 1082-5.
325. D'Souza, C.D., et al., *An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1217-21.

326. Ladel, C.H., et al., *Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis*. Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2877-81.
327. Williams, A., et al., *Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs*. Immunology, 2004. **111**(3): p. 328-33.
328. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
329. Tanaka, T., et al., *Chemokines in tumor progression and metastasis*. Cancer Sci, 2005. **96**(6): p. 317-22.
330. Janeway, C., et al., *Immunology*. de Boeck, 2009. **3em édition**.
331. Sanchez-Rodriguez, C., et al., *An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2002. **6**(8): p. 706-12.
332. Reljic, R. and J. Ivanyi, *A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(12): p. 813-8.
333. Hamel, K., et al., *Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4994-5003.
334. Matsushita, T., et al., *Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3420-30.
335. Maglione, P.J., et al., *Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3329-38.
336. Kozakiewicz, L., et al., *B cells regulate neutrophilia during Mycobacterium tuberculosis infection and BCG vaccination by modulating the interleukin-17 response*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003472.
337. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
338. Kurashima, K., et al., *Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(4): p. 1474-7.
339. Mastroianni, C.M., et al., *Chemokine profiles in the cerebrospinal fluid (CSF) during the course of pyogenic and tuberculous meningitis*. Clin Exp Immunol, 1998. **114**(2): p. 210-4.
340. Qiu, B., et al., *Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation*. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1503-15.
341. Lin, Y., M. Zhang, and P.F. Barnes, *Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1121-6.
342. Wickremasinghe, M.I., L.H. Thomas, and J.S. Friedland, *Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to Mycobacterium tuberculosis: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3936-47.
343. Furie, M.B. and G.J. Randolph, *Chemokines and tissue injury*. Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1287-301.
344. Ajuebor, M.N., et al., *Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1685-91.
345. Vieira, S.M., et al., *A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(3): p. 779-89.

346. Pruenster, M., et al., *The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 101-8.
347. Williams, M.R., et al., *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 461-9.
348. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 452-60.
349. Sanz, M.J. and P. Kubes, *Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 278-83.
350. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
351. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
352. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
353. Pugin, J., R.J. Ulevitch, and P.S. Tobias, *A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2193-200.
354. North, R.J. and Y.J. Jung, *Immunity to tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 599-623.
355. Golden, M.P. and H.R. Vikram, *Extrapulmonary tuberculosis: an overview*. Am Fam Physician, 2005. **72**(9): p. 1761-8.
356. Russell, D.G., *Who puts the tubercle in tuberculosis?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 39-47.
357. Ulrichs, T. and S.H. Kaufmann, *New insights into the function of granulomas in human tuberculosis*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 261-9.
358. Lin, P.L. and J.L. Flynn, *Understanding latent tuberculosis: a moving target*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 15-22.
359. Gideon, H.P. and J.L. Flynn, *Latent tuberculosis: what the host "sees"?* Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 202-12.
360. Gengenbacher, M. and S.H. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 514-32.
361. Philips, J.A. and J.D. Ernst, *Tuberculosis pathogenesis and immunity*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 353-84.
362. Barry, C.E., 3rd, et al., *The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(12): p. 845-55.
363. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent*. N Engl J Med, 2001. **345**(15): p. 1098-104.
364. Lawn, S.D. and A.I. Zumla, *Tuberculosis*. Lancet, 2011. **378**(9785): p. 57-72.
365. Pai, M., et al., *Lethal interaction: the colliding epidemics of tobacco and tuberculosis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2007. **5**(3): p. 385-91.
366. Zaridze, D., et al., *Alcohol and cause-specific mortality in Russia: a retrospective case-control study of 48,557 adult deaths*. Lancet, 2009. **373**(9682): p. 2201-14.
367. Diedrich, C.R. and J.L. Flynn, *HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis?* Infect Immun, 2011. **79**(4): p. 1407-17.
368. Ramakrishnan, L., *Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 352-66.
369. Tsai, M.C., et al., *Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension*. Cell Microbiol, 2006. **8**(2): p. 218-32.

370. Adams, D.O., *The granulomatous inflammatory response. A review.* Am J Pathol, 1976. **84**(1): p. 164-92.
371. Monack, D.M., A. Mueller, and S. Falkow, *Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 747-65.
372. Russell, D.G., C.E. Barry, 3rd, and J.L. Flynn, *Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us.* Science, 2010. **328**(5980): p. 852-6.
373. Helming, L. and S. Gordon, *Molecular mediators of macrophage fusion.* Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 514-22.
374. van Maarseveen, T.C., W. Vos, and P.J. van Diest, *Giant cell formation in sarcoidosis: cell fusion or proliferation with non-division?* Clin Exp Immunol, 2009. **155**(3): p. 476-86.
375. Russell, D.G., et al., *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma.* Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 943-8.
376. Co, D.O., et al., *T cell contributions to the different phases of granuloma formation.* Immunol Lett, 2004. **92**(1-2): p. 135-42.
377. Epstein, W.L., et al., *T-cell independent transfer of organized granuloma formation.* Immunol Lett, 1986. **14**(1): p. 59-63.
378. Suya, H., et al., *Skin granuloma formation in mice immunosuppressed by cyclosporine.* J Invest Dermatol, 1988. **90**(4): p. 430-3.
379. Saunders, B.M., et al., *CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis.* Cell Immunol, 2002. **216**(1-2): p. 65-72.
380. Cooper, A.M., et al., *Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis.* J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 39-45.
381. Cooper, A.M., A. Solache, and S.A. Khader, *Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 441-7.
382. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection.* J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
383. <http://pneumocourlancy.fr>.
384. McMurray, D.N., *Disease model: pulmonary tuberculosis.* Trends Mol Med, 2001. **7**(3): p. 135-7.
385. Sandor, M., J.V. Weinstock, and T.A. Wynn, *Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses.* Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 44-52.
386. Lee, C.G., et al., *Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1).* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 809-21.
387. Hernandez-Pando, R., et al., *Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis.* Eur J Immunol, 2004. **34**(1): p. 174-83.
388. <http://www.cnrs.fr>.
389. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
390. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
391. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
392. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects.* Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.

393. Chapman, A.L., et al., *Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9757-62.
394. Mocsai, A., et al., *Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 1120-6.
395. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
396. Ganz, T., M.E. Selsted, and R.I. Lehrer, *Defensins*. Eur J Haematol, 1990. **44**(1): p. 1-8.
397. Lillard, J.W., Jr., et al., *Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 651-6.
398. Yang, D., et al., *Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 291-6.
399. Yang, D., et al., *Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 9-14.
400. Raj, P.A. and A.R. Dentino, *Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **206**(1): p. 9-18.
401. Bdeir, K., et al., *Neutrophil alpha-defensins cause lung injury by disrupting the capillary-epithelial barrier*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(9): p. 935-46.
402. Selsted, M.E., D. Szklarek, and R.I. Lehrer, *Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes*. Infect Immun, 1984. **45**(1): p. 150-4.
403. Eisenhauer, P., et al., *Polymorphic expression of defensins in neutrophils from outbred rats*. Infect Immun, 1990. **58**(12): p. 3899-902.
404. Eisenhauer, P.B. and R.I. Lehrer, *Mouse neutrophils lack defensins*. Infect Immun, 1992. **60**(8): p. 3446-7.
405. Semerad, C.L., et al., *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 413-23.
406. Roberts, A.W., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* Growth Factors, 2005. **23**(1): p. 33-41.
407. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
408. <http://www.ac-versailles.fr>.
409. Bouaouina, H.-M., *Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes*. Hématologie, 2006. **12**(1): p. 21-33.
410. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
411. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
412. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 349-74.
413. Ramachandran, V., et al., *Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13519-24.
414. Albelda, S.M., C.W. Smith, and P.A. Ward, *Adhesion molecules and inflammatory injury*. FASEB J, 1994. **8**(8): p. 504-12.
415. Lusinskas, F.W., et al., *Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins*. J Cell Biol, 1994. **125**(6): p. 1417-27.
416. Scholz, D., et al., *Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture*. Cell Tissue Res, 1996. **284**(3): p. 415-23.

417. Williams, M.A. and J.S. Solomkin, *Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(6): p. 725-36.
418. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
419. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
420. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
421. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
422. Burns, A.R., et al., *Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 1): p. 45-57.
423. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 761-9.
424. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
425. Shi, J., et al., *Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1226-30.
426. Hong, C., et al., *Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 337-47.
427. Eash, K.J., et al., *CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions*. Blood, 2009. **113**(19): p. 4711-9.
428. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
429. Palic, D., et al., *Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils*. Dev Comp Immunol, 2007. **31**(8): p. 805-16.
430. Chuammitri, P., et al., *Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **129**(1-2): p. 126-31.
431. Wardini, A.B., et al., *Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 1): p. 259-64.
432. Altincicek, B., et al., *Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2705-12.
433. Wen, F., et al., *Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection*. Plant Physiol, 2009. **151**(2): p. 820-9.
434. Yousefi, S., et al., *Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 949-53.
435. Lin, A.M., et al., *Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 490-500.
436. Wong, K.W. and W.R. Jacobs, Jr., *Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon gamma to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis*. J Infect Dis, 2013. **208**(1): p. 109-19.
437. Ramos-Kichik, V., et al., *Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(1): p. 29-37.
438. Braian, C., V. Hoge, and O. Stendahl, *Mycobacterium tuberculosis- Induced Neutrophil Extracellular Traps Activate Human Macrophages*. J Innate Immun, 2013.

439. Martino, A., et al., *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2038-47.
440. Sawanobori, Y., et al., *Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5457-66.
441. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
442. Johnston, B., et al., *Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1269-76.
443. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
444. Hestdal, K., et al., *Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 22-8.
445. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 989-99.
446. Ilkovitch, D. and D.M. Lopez, *The liver is a site for tumor-induced myeloid-derived suppressor cell accumulation and immunosuppression*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5514-21.
447. Zhao, F., et al., *Increase in frequency of myeloid-derived suppressor cells in mice with spontaneous pancreatic carcinoma*. Immunology, 2009. **128**(1): p. 141-9.
448. Young, M.R., M. Newby, and H.T. Wepsic, *Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors*. Cancer Res, 1987. **47**(1): p. 100-5.
449. Buessow, S.C., R.D. Paul, and D.M. Lopez, *Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice*. J Natl Cancer Inst, 1984. **73**(1): p. 249-55.
450. Seung, L.P., et al., *Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6254-8.
451. Maeda, H. and T. Akaike, *Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer*. Biochemistry (Mosc), 1998. **63**(7): p. 854-65.
452. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
453. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
454. Yang, R., et al., *CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6807-15.
455. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
456. Gallina, G., et al., *Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2777-90.
457. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.

458. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
459. Rodriguez, P.C. and A.C. Ochoa, *Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 180-91.
460. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1553-60.
461. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1155-66.
462. Sinha, P., et al., *Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 977-83.
463. Yang, L., et al., *Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 23-35.
464. Filipazzi, P., V. Huber, and L. Rivoltini, *Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(2): p. 255-63.
465. Arora, M., et al., *TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1 int F4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(6): p. 578-93.
466. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
467. Nagaraj, S., J.I. Youn, and D.I. Gabrilovich, *Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells*. J Immunol, 2013. **191**(1): p. 17-23.
468. Dietlin, T.A., et al., *Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1205-12.
469. Zhu, B., et al., *CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5228-37.
470. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.
471. Voisin, M.B., et al., *Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5487-92.
472. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
473. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
474. Mencacci, A., et al., *CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3180-90.
475. Ezernitchi, A.V., et al., *TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4763-72.
476. Terrazas, L.I., et al., *The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5294-303.

477. Rieber, N., et al., *Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease*. J Immunol, 2013. **190**(3): p. 1276-84.
478. Bronte, V., et al., *Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3838-46.
479. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 186-96.
480. Li, Q., et al., *Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1130-9.
481. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
482. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.
483. Colotta, F., et al., *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. Blood, 1992. **80**(8): p. 2012-20.
484. Brach, M.A., et al., *Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death*. Blood, 1992. **80**(11): p. 2920-4.
485. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 318-24.
486. Witko-Sarsat, V., et al., *Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival*. J Exp Med, 2010. **207**(12): p. 2631-45.
487. Abadie, V., et al., *Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1843-50.
488. Beauvillain, C., et al., *CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1196-204.
489. Maletto, B.A., et al., *Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3094-102.
490. Chtanova, T., et al., *Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 487-96.
491. Morel, C., et al., *Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice*. Eur J Immunol, 2008. **38**(2): p. 437-47.
492. Martineau, A.R., et al., *Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1988-94.
493. Seiler, P., et al., *Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 671-80.
494. Tan, B.H., et al., *Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1864-71.
495. Eum, S.Y., et al., *Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB*. Chest, 2010. **137**(1): p. 122-8.
496. Berry, M.P., et al., *An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis*. Nature, 2010. **466**(7309): p. 973-7.
497. Corleis, B., et al., *Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils*. Cell Microbiol, 2012. **14**(7): p. 1109-21.
498. Pedrosa, J., et al., *Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 577-83.

499. Nandi, B. and S.M. Behar, *Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2251-62.
500. Eruslanov, E.B., et al., *Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1744-53.
501. Cruz, A., et al., *Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1609-16.
502. Dorhoi, A., et al., *MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment*. J Clin Invest, 2013.
503. Blomgran, R. and J.D. Ernst, *Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7110-9.
504. Pesce, J.T., et al., *Neutrophils clear bacteria associated with parasitic nematodes augmenting the development of an effective Th2-type response*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 464-74.
505. Cassatella, M.A., *Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound*. Adv Immunol, 1999. **73**: p. 369-509.
506. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 183-94.
507. Pillay, J., et al., *Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 211-20.
508. Kamp, V.M., et al., *Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 1011-20.
509. Puga, I., et al., *B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen*. Nat Immunol, 2012. **13**(2): p. 170-80.
510. Tosello Boari, J., et al., *IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002658.
511. Barquero-Calvo, E., et al., *Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen Brucella abortus*. PLoS Pathog, 2013. **9**(2): p. e1003167.
512. Laan, M., et al., *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2347-52.
513. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. Blood, 2010. **115**(2): p. 335-43.
514. Yu, J.J., et al., *An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3794-802.
515. Khaled, Y.S., B.J. Ammori, and E. Elkord, *Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects*. Immunol Cell Biol, 2013. **91**(8): p. 493-502.
516. Jiao, X., et al., *Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1294-301.
517. Schreiber, H.A., et al., *Dendritic cells in chronic mycobacterial granulomas restrict local anti-bacterial T cell response in a murine model*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11453.
518. Brudecki, L., et al., *Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response*. Infect Immun, 2012. **80**(6): p. 2026-34.

519. Cuenca, A.G., et al., *A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 281-92.
520. Panjabi, R., G.W. Comstock, and J.E. Golub, *Recurrent tuberculosis and its risk factors: adequately treated patients are still at high risk*. Int J Tuberc Lung Dis, 2007. **11**(8): p. 828-37.
521. Lee, J.M., et al., *The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment*. Int J Cancer, 2012. **131**(3): p. 741-51.
522. Seiler, P., et al., *Early granuloma formation after aerosol Mycobacterium tuberculosis infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2676-86.
523. Appelberg, R., *Macrophage inflammatory proteins MIP-1 and MIP-2 are involved in T cell-mediated neutrophil recruitment*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(3): p. 303-6.
524. Appelberg, R., *Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils*. J Leukoc Biol, 1992. **51**(5): p. 472-7.
525. Ferretti, S., et al., *IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2106-12.
526. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 331-42.
527. Quinton, L.J., et al., *Selective transport of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung to the blood facilitates pulmonary neutrophil recruitment*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(3): p. L465-72.
528. Rossi, D.L., et al., *Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5490-7.
529. Chen, S.C., et al., *Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CXC chemokine lungkine*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3362-8.
530. Tsuda, Y., et al., *Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 215-26.
531. De Santo, C., et al., *Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1039-46.
532. Beyrau, M., J.V. Bodkin, and S. Nourshargh, *Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity*. Open Biol, 2012. **2**(11): p. 120134.
533. Shaler, C.R., et al., *Pulmonary mycobacterial granuloma increased IL-10 production contributes to establishing a symbiotic host-microbe microenvironment*. Am J Pathol, 2011. **178**(4): p. 1622-34.
534. Tailleux, L., et al., *Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1939-48.
535. Jacobs, M., et al., *Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10*. Immunology, 2000. **100**(4): p. 494-501.
536. Higgins, D.M., et al., *Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(2): p. 149-57.
537. Geffner, L., et al., *CD4 CD25 Foxp3 regulatory T lymphocytes suppress IFN-gamma and CD107 expression in CD4 and CD8 T cells from tuberculous pleural effusions*. Clin Exp Immunol, 2013.

538. Harper, J., et al., *Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions*. J Infect Dis, 2012. **205**(4): p. 595-602.
539. Rothfuchs, A.G., et al., *In situ IL-12/23p40 production during mycobacterial infection is sustained by CD11bhigh dendritic cells localized in tissue sites distinct from those harboring bacilli*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6915-25.
540. Wolf, A.J., 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**(1): p. 105-15.
541. Reglier, H., et al., *Lack of IL-10 and IL-13 production by human polymorphonuclear neutrophils*. Cytokine, 1998. **10**(3): p. 192-8.
542. Davey, M.S., et al., *Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils*. Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1017-8; author reply 1018-20.
543. Grotendorst, G.R., G. Smale, and D. Pancev, *Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 396-402.
544. Lyadova, I.V., et al., *In mice, tuberculosis progression is associated with intensive inflammatory response and the accumulation of Gr-1 cells in the lungs*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10469.
545. du Plessis, N., et al., *Increased Frequency of Myeloid-derived Suppressor Cells during Active Tuberculosis and after Recent Mycobacterium tuberculosis Infection Suppresses T-Cell Function*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(6): p. 724-32.
546. Goh, C., S. Narayanan, and Y.S. Hahn, *Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections?* Immunol Rev, 2013. **255**(1): p. 210-21.
547. Serafini, P., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2691-702.
548. Xin, H., et al., *Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2506-13.
549. Vincent, J., et al., *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3052-61.

# Annexe



**Annexe 1: Amorces utilisés pour les analyses en qRT-PCR.**

Amorces	Séquence
<i>hprt-1</i> sens	5'-GAGCGTTGGGCTTACCTCAC-3'
<i>hprt-1</i> anti-sens	5'-GATGGCCTCCCATCTCCTTC-3'
<i>ppia</i> sens	5'-CCACCGTGTTCTTCGACATC-3'
<i>ppia</i> anti-sens	5'-CCAGGACCTGTATGCTTTAG-3'
<i>rpl-4</i> sens	5'-TCACTTTGCCAGCTGTGTTC-3'
<i>rpl-4</i> anti-sens	5'-GAACAGCCTCCTTGGTCTTC-3'
<i>il-10</i> sens	5'-GCCTTCAGCCAGGTGAAGAC-3'
<i>il-10</i> anti-sens	5'-CCTTGATTTCTGGGCCATGC-3'
<i>il-17A</i> sens	5'-CAAACACTGAGGCCAAGGAC-3'
<i>il-17A</i> anti-sens	5'-CACTGAGCTTCCCAGATCAC-3'
<i>il-17C</i> sens	5'-AGGACCTCTAGCTGGAACAC-3'
<i>il-17C</i> anti-sens	5'-TGGGTAGCGGTTCTCATCTG-3'
<i>il-17E</i> sens	5'-CCCAGCAAAGAGCAAGAACC-3'
<i>il-17E</i> anti-sens	5'-ACCCGATTCAAGTCCCTGTC-3'
<i>il-17F</i> sens	5'-AAACCAGGGCATTCTGTCC-3'
<i>il-17F</i> anti-sens	5'-ATTGATGCAGCCTGAGTGTC-3'
<i>ifn-γ</i> sens	5'-CACGGCACAGTCATTGAAAG-3'
<i>ifn-γ</i> anti-sens	5'-TTGCTGATGGCCTGATTGTC-3'
<i>kc</i> sens	5'-CCAACACAGCACCATGATCC-3'
<i>kc</i> anti-sens	5'-TGAGGGCAACACCTTCAAGC-3'
<i>mip-2</i> sens	5'-CACCAACCACCAGGCTACAG-3'
<i>mip-2</i> anti-sens	5'-CGCCCTTGAGAGTGGCTATG-3'
<i>lix</i> sens	5'-TTCCATCTCGCCATTCATGC-3'
<i>lix</i> anti-sens	5'-GGGATCACCTCCAAATTAGC-3'

*hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *ppia*, peptidylprolyl isomerase A; *rpl-4*, ribosomal protein L4; *il-10*, interleukin-10; *il-17E*, *il-25*; *ifn-γ*, interferon gamma; *kc*, *cxcl-1*; *mip-2*, *cxcl-2*; *lix*, *cxcl-5*.



**Annexe 2: Amorces utilisés pour les géotypages des souris.**

Amorces	Séquence
Amorce commune sens	5'-AGCTGCTGTTAGCACTTTGC-3'
Amorce sauvage anti-sens	5'-CGTACGCACACACTCTCGA-3'
Amorce mutant anti-sens	5'-CTTGTGTAGCGCCAAGTG-3'



Annexe 3: Figures supplémentaires de l'article n°1.  
**Supporting Information**

**Figure S1. Neutrophil and T-cell recruitment to the lung between days 13 and 42 after BCG infection.** C57BL/6 mice were inoculated by the intranasal route with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG. Mice were killed on days 13, 15, 17, 20 and 42. Total cells were prepared from enzyme-digested lungs and stained with antibodies for flow cytometry analysis, as indicated in materials and methods. (A)  $CD11b^+ Ly-6C^+ Ly-6G^+$  neutrophils and (B)  $CD3^+ CD4^+ \gamma\delta^-$  and  $CD3^+ CD4^- \gamma\delta^+$  T cells from four independent mice were counted \* $p < 0.05$  (Student's *t* test).

**Figure S2. Day 1 and day 23 lung neutrophils have similar phagocytic and killing abilities.** C57BL/6 mice were infected i.n. with  $5 \times 10^6$  CFU of the green fluorescent recombinant BCG strain Myc 409. (A) Neutrophils from lung tissue were analyzed 1 and 23 days later, by flow cytometry. After gating on  $CD11b^+$  cells, we sorted  $Ly-6C^+ Ly-6G^+$  neutrophils, centrifuged them on glass slides and stained them with May Grünwald Giemsa. Neutrophils from the two time points had similar morphologies. (B) The percentages of neutrophils on days 1 and 23 carrying green fluorescent bacteria were analyzed by flow cytometry. The percentage of infected neutrophils was higher on day 1, but infected neutrophils were also present on day 23, indicating that both neutrophil populations were able to take up BCG by phagocytosis *in vivo*. (C) Lung neutrophils were sorted by flow cytometry on days 1 and 23 after BCG infection. Bone marrow neutrophils were purified with magnetic beads for comparison. Neutrophil killing capacity was assayed by infecting  $5 \times 10^5$  neutrophils with the rapid growing species *M. smegmatis* or BCG at a MOI of 10. After 20 h of incubation, cells were lysed in 0.001% Triton X100. Appropriate dilutions of the initial inoculum and cell-associated bacilli were plated on 7H11 plates supplemented with OADC.

After 2 (for *M. smegmatis*) or 21 (for BCG) days, CFUs were counted and percentage killing was determined as the ratio of the initial inoculum to cell-associated CFUs, with 100% killing corresponding to a total absence of bacilli associated with cells. Day 1 and 23 neutrophils had similar mycobacterium-killing abilities and both were more efficient than naïve BM neutrophils. (D) The amounts of myeloperoxidase (MPO) and reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophils from the two waves were compared with the amounts of these bactericidal compounds produced by naïve BM neutrophils immediately after sorting (MPO) or after overnight stimulation with HK BCG at a MOI of 10 (ROS). We lysed  $3 \times 10^5$  neutrophils resuspended in 450  $\mu$ l of PBS by adding 450  $\mu$ l of 0.05% Triton X100. The lysate was sonicated and cleared by centrifugation for 10 min at 4°C and 12,000  $\times$  g. MPO was determined by mixing 30  $\mu$ l of lysate with 70  $\mu$ l of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma Aldrich). The reaction was stopped by adding hydrochloric acid (Interchim, Montluçon, France) and MPO activity was determined spectrophotometrically, by measuring absorbance at 450 nm. ROS activity was measured in neutrophils after the addition of 10  $\mu$ M ROS fluorescent detection reagent (Invitrogen) and incubation for 60 min at 37°C. Fluorescence was read in a flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences) at 500 to 525 nm. Lung neutrophils purified on days 1 and 23 produced similar amounts of both MPO and ROS. Naïve BM neutrophils were less effective, particularly for ROS production. (C and D). The results are shown as means  $\pm$  SD for triplicate wells.

**Figure S3. Expression of four members of the IL-17 gene family in the lungs of mice infected with BCG or Mtb.** C57BL/6 mice were infected i.n. with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG (circles) or  $10^3$  CFU of Mtb (triangles) or were mock-treated (squares). Lungs were harvested on day 1 or day 23 and processed for mRNA isolation and cDNA preparation. Quantitative real-time PCR was performed on the cDNA as described in the materials and methods. The

expression of the *il-17 a, c, e* and *f* genes was normalized with respect to the mean expression levels of three housekeeping genes: *hrprt-1*, *rel-4* and *ppia*. The data shown are means  $\pm$  SD of four to five individual mice. The only gene displaying significant upregulation was *il-17a*, which was more strongly expressed on day 23 than on day 1, with similar levels of expression in BCG- and Mtb-infected mice.

**Figure S4. Bone marrow reconstitution in chimeric mice.** C57BL/6 WT and IL mice were lethally irradiated and reconstituted with  $7 \times 10^6$  BM cells from WT or IL mice. At various time points, blood drawn from two mice was pooled and two different pools were prepared for each group. DNA was extracted from the pooled cells and PCR was performed with primers designed on the basis of the WT or disrupted *il-17ra* gene sequence (listed in table 2). This made it possible to distinguish between the wild-type *il-17ra* gene (500 bp) and the disrupted *il-17ra* gene (375 bp). Full reconstitution was observed at week 6, and mice were infected with BCG.

**Figure S5. Gating strategy for intracellular cytokine staining in lung neutrophils and T cells 23 days after BCG infection.** C57 BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^6$  CFU of BCG. Total lung cells were harvested 23 days later and  $10^5$  cells were incubated overnight with a number of heat-killed BCG cells equivalent to a dose of  $10^6$  CFU. For T-cell stimulation, we also added 25 ng/ml PMA and 1  $\mu$ g/ml ionomycin. Cells were incubated with 5  $\mu$ g/ml brefeldin A for the last 4 h. After surface labeling with anti-CD11b, anti-Ly-6C and anti-Ly6G (neutrophils) antibodies or with anti-CD3, anti-CD4 and anti- $\gamma$ 5 (T cells) antibodies, cells were processed with the Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences), as indicated by the manufacturer, to stain intracellular IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-17A. Cells were also incubated with Ab from similar isotypes as negative controls. (A) Flow cytometry was carried out with

gating on CD11b<sup>+</sup> cells (R1) and IL-10<sup>+</sup> cells were observed among the Ly-6C<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> neutrophils (gate R2). (B) For T cells, a first gate (R1) was applied to CD3<sup>+</sup> cells. The CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  cells were then gated in R3 and CD4<sup>-</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells were gated in R2. Intracellular IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-17A were analyzed in these two gated cell populations, and staining was compared with that for the control antibody. The background fluorescence obtained with the control Ab was subtracted from the cytokine-specific fluorescence shown in Figures 3E and 5E.

Figure S1

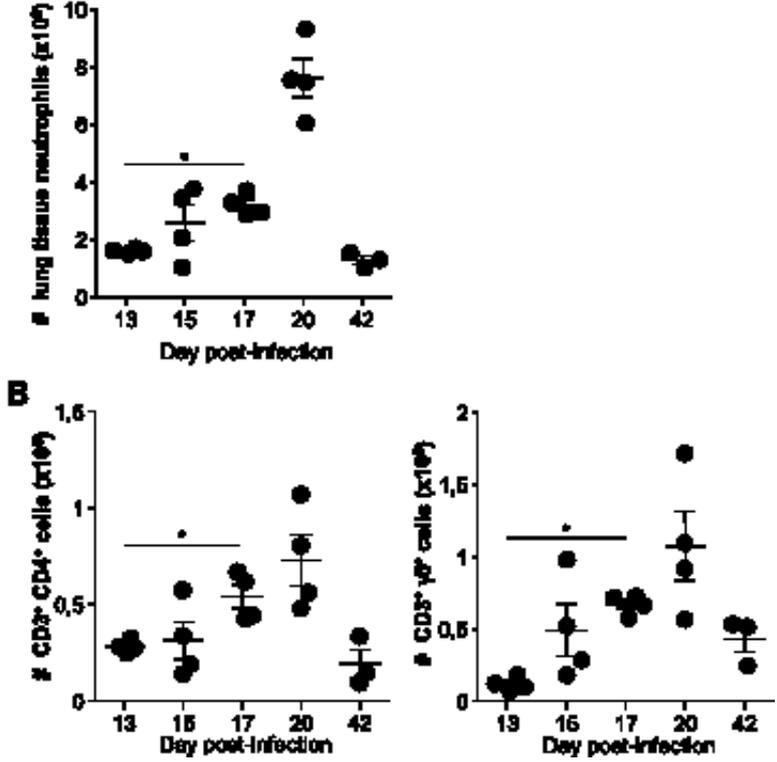


Figure S2

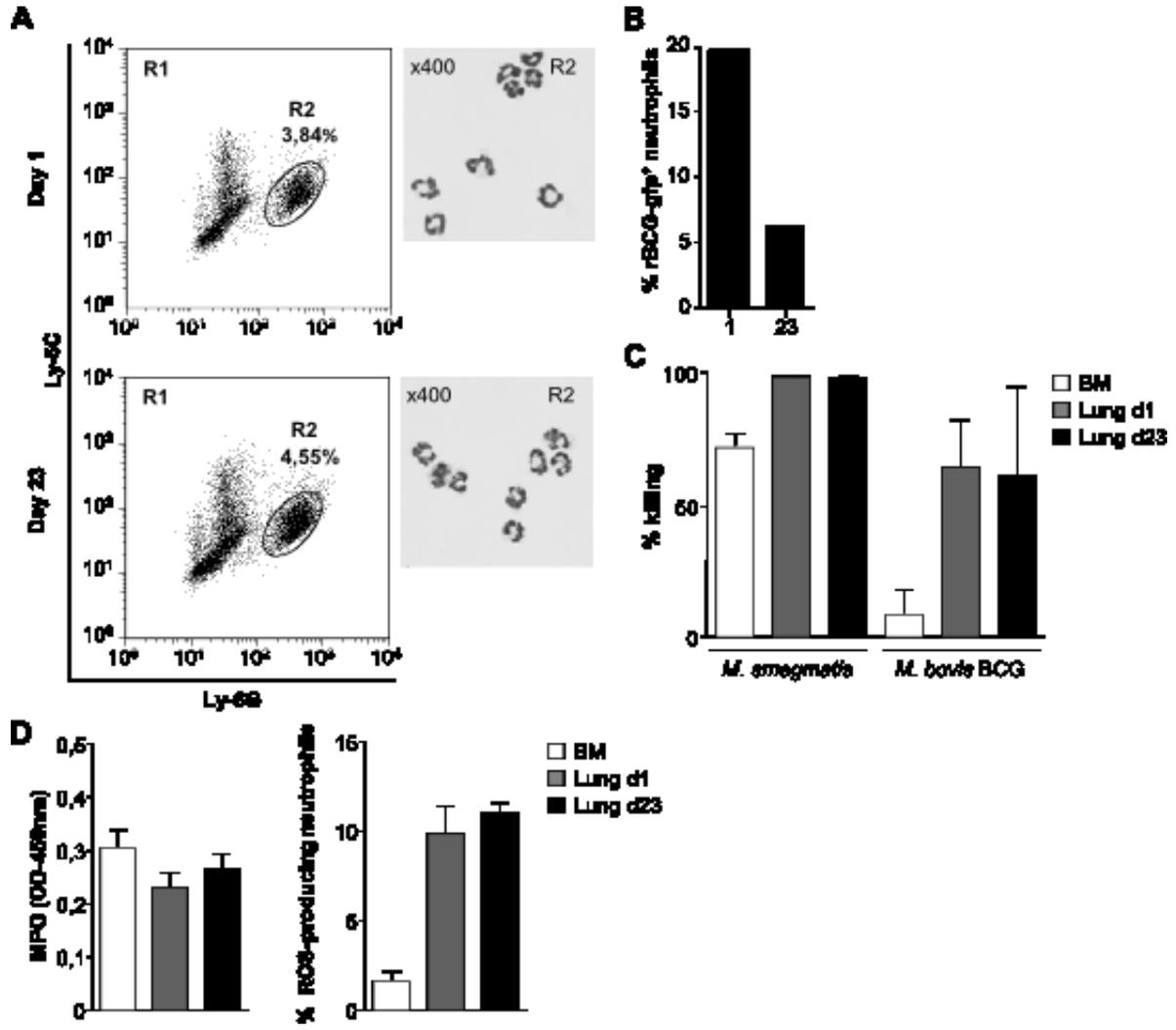


Figure S3

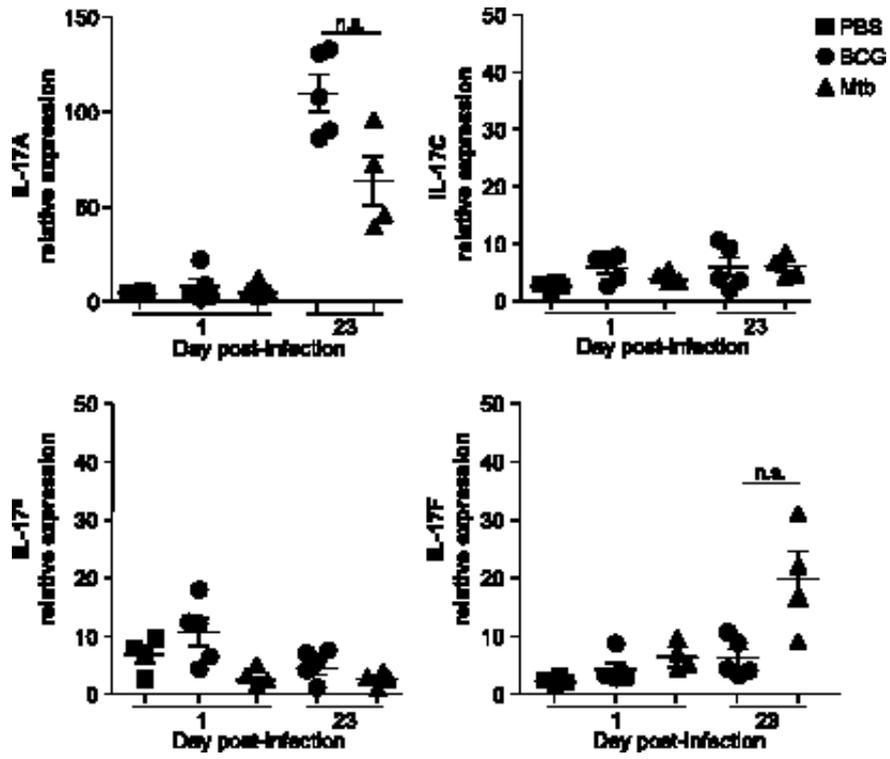


Figure S4

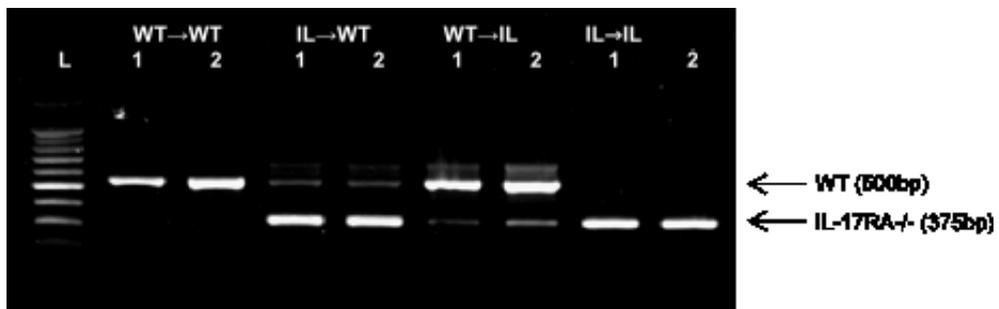
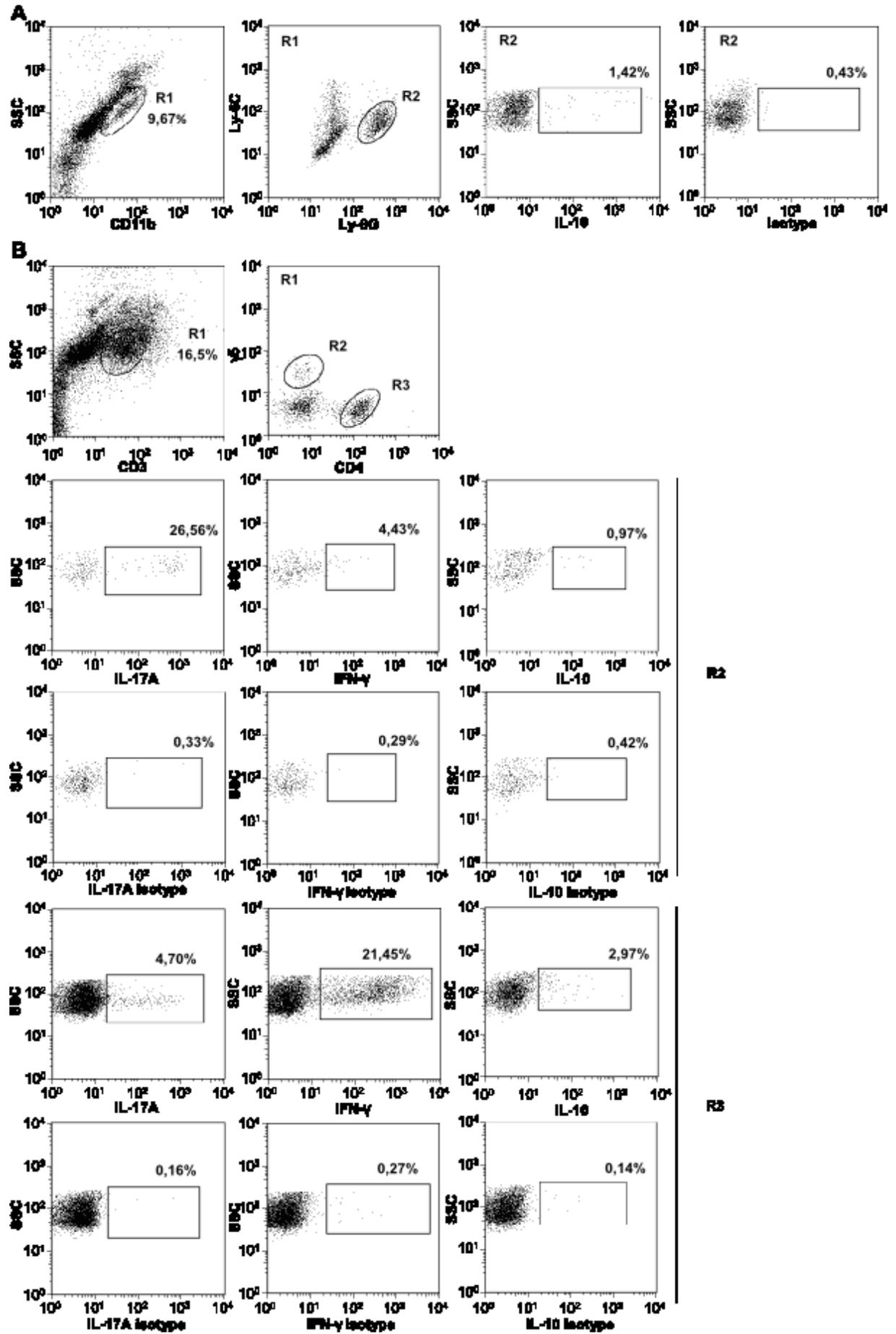


Figure S5



**SUPPLEMENTAL LEGENDS****Supplemental FIGURE 1.****BCG-infected DCs in contact with neutrophils produce large amounts of inflammatory cytokines and chemokines**

$2.5 \times 10^5$  C57Bl/6 mouse BMDCs were infected 2 hr with live BCG (MOI 5), extracellular bacilli were killed with amikacin for 2 hr and placed in contact with  $5 \times 10^3$  PMNs overnight. DCs were also stimulated with LPS (100 ng/ml) before overnight contact with PMNs. Inflammatory cytokines (A) and chemokines involved in PMN recruitment (B) were measured in supernatants by ELISA (ANOVA test with Bonferroni's post-hoc  $**p < 0.01$ ). (C-D) After 2 hr incubation with live BCG (MOI of 5) followed by 2 hr treatment with 200  $\mu$ g/ml amikacin, BMDCs were washed and incubated overnight in complete medium. Cells were stained with Propidium Iodide and annexin V to detect apoptotic and dead cells (D). Mock-treated cells were also stained for comparison (C).

**Supplemental FIGURE 2****Syk inhibitors do not affect neutrophil viability after BCG infection and CD11b is a major regulator of IL-10 production**

$5 \times 10^5$  PMNs extracted from mouse bone marrow were infected with BCG at a MOI of 5 and treated with the anti-Syk inhibitors piceatannol and ER27319 (1  $\mu$ M each) or an equivalent volume of solvent. Control PMNs were cultivated in RPMI with no treatment. (A) After 16 hr incubation, PMN viability was assayed with the MTT Cell Growth Assay kit (Merck, Millipore) by adding 10  $\mu$ l of 2.5 mg/ml MTT solution. After overnight incubation at 37°C, MTT reduction to dark blue formazan by live cells was quantified by reading the absorbance at 610 nm. (B) TNF concentration in the culture supernatant was determined by ELISA. (C)

$5 \times 10^5$  PMNs were treated with 15  $\mu\text{g/ml}$  of anti-CD11b Ab or isotype control for 1 hr. They were then infected with BCG at a MOI of 5 for 16 hr and IL-10 produced in supernatants was measured by ELISA 72 hr later.

### **Supplemental FIGURE 3**

**IL-10 production by neutrophils inversely correlates with IL-17A production by Th17 CD4 T cells and is contact dependent**

$2.5 \times 10^5$  C57Bl/6 mouse BMDCs were infected 2 hr with live BCG (MOI 5), extracellular bacilli were killed with amikacin for 2 hr. After overnight incubation,  $2.5 \times 10^6$  CD4+CD44+CD62L- T cells obtained by FACS sorting from OT-II mice immunized with rBCG-OVA were added. Where indicated,  $5 \times 10^5$  PMNs were added in contact with DCs and T cells or separated by a 0.4  $\mu\text{m}$  pore size Transwell device. IL-17A (A), IFN- $\gamma$  (B) and IL-10 (C) concentrations in the culture supernatant were measured by ELISA 72 hr later. Results are means  $\pm$  SD from triplicates performed with cells from two independent animals. Three experiments were performed and the results from one representative experiment are reported. (\*\*  $p < 0.01$ , unpaired two tailed Mann Whitney's test).

### **Supplemental FIGURE 4**

**Injection of the NIMPR14 Ab, like that of the 1A8 Ab, specifically depletes Ly-6G+ neutrophils in the lung of mice immunized intranasally with BCG**

Five C57Bl/6 female mice were immunized with  $5 \times 10^6$  CFUs of the OVA-producing rBCG strain Myc 3301. On days 20 and 22, the mice were given an i.p. injection of 200  $\mu\text{g}$  of PMN-specific depleting Ab 1A8 or NIMPR14 or their respective IgG2a and IgG2b isotype controls. On day 23, lung cells were harvested, stained with anti-CD11b, anti-Ly-6C and anti-Ly6G Ab and analyzed by FACS. CD11b+ myeloid cells were gated (A and D) and analyzed for Ly-6C

and Ly-6G expression. The numbers of Ly6C<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> neutrophils were substantially and similarly lower in total lung cell preparations from 1A8 (C) or NIMPR14 (F) injected mice than from mice injected with control isotype IgG2a (B) or IgG2b (E).

Figure S1

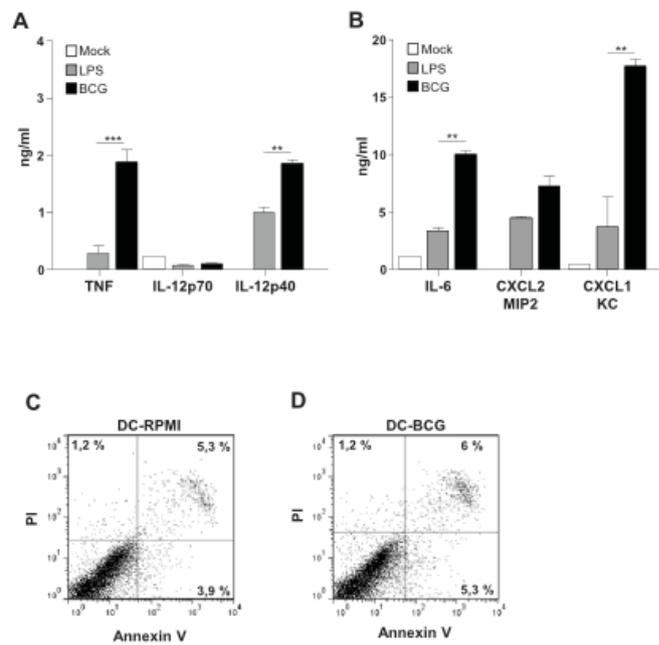


Figure S2

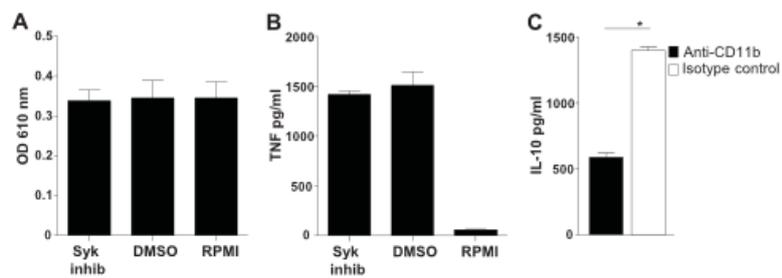


Figure S3

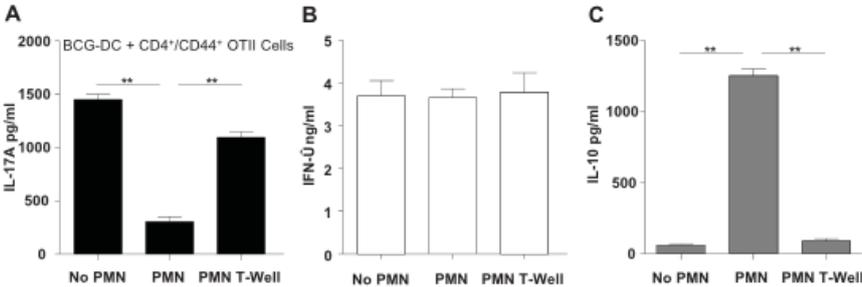
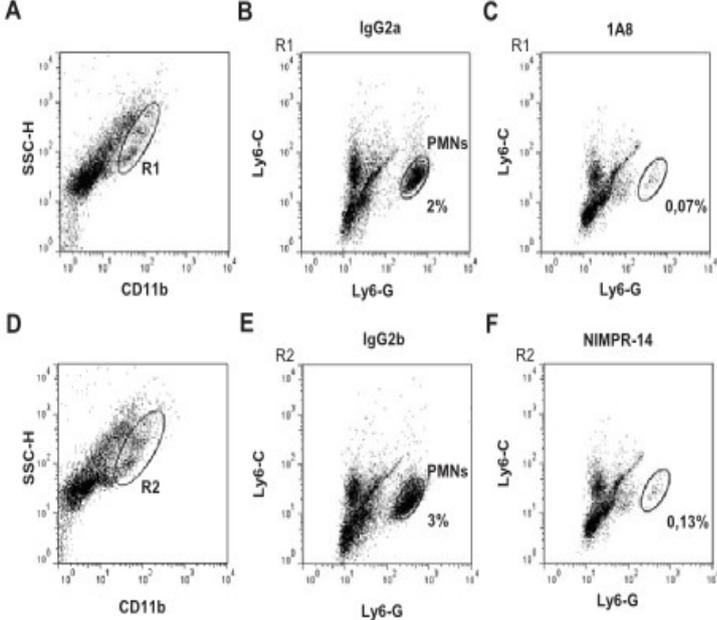


Figure S4









*Ce n'est pas le but de la promenade qui est important,  
mais les petits pas qui y mènent.*

(Proverbe chinois)











## Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la régulation de la réponse inflammatoire IL-17A lors de l'infection pulmonaire par les mycobactéries

### Résumé

La pandémie de tuberculose (TB) causée par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) n'est pas contrôlée par le vaccin vivant BCG. Mtb induit la formation de granulomes qui évoluent vers une réaction inflammatoire exacerbée détruisant le poumon lors de la TB active. Les rôles des polynucléaires neutrophiles (PNN) et de la cytokine inflammatoire IL-17A dans cette évolution sont à clarifier. Nous montrons, chez la souris, que les PNN sont recrutés dans le poumon en deux vagues après infection par Mtb ou BCG. La deuxième vague dépend du récepteur IL-17RA exprimé par les cellules non-hématopoïétiques. Les chimiokines CXCL-1 et 5 attirant les PNN semblent impliquées. Dans le poumon, ces PNN produisent la cytokine immunosuppressive IL-10 qui diminue la production d'IL-17A. Les cellules dendritiques infectées, présentes dans le granulome, sécrètent aussi CXCL-1. Elles attirent les PNN qui produisent de l'IL-10 bloquant la production d'IL-17A mais pas d'IFN- $\gamma$ . En effet, seuls les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th17 expriment le récepteur à l'IL-10. Nos travaux apportent un éclairage nouveau sur les PNN régulateurs dans le contrôle de l'inflammation due à l'IL-17A lors de la TB.

Mots clés : tuberculose, polynucléaire neutrophile, IL-17A, IL-10, immunosuppression, inflammation

### Abstract

Tuberculosis (TB) pandemic, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), is not controlled by the live vaccine BCG. Mtb induces granuloma formation developing to exacerbated inflammation that destroys the lung during active TB. Roles played by polymorphonuclear neutrophils (PMN) and inflammatory cytokine IL-17A remain ill defined. We show, in the mouse model, that PMN reach the lung in two waves following lung infection with BCG or Mtb. Only the second wave depends on receptor IL-17A expression by non hematopoietic cells. PMN chemoattractants CXCL-1 and 5 seem involved in this late recruitment. In the lung PMN produce immunosuppressive IL-10 that dampens IL-17A production. Mycobacteria infected dendritic cells, present inside granuloma, also secrete CXCL-1. Neutrophils attracted towards infected dendritic cells secrete IL-10 that inhibits IL-17A but not IFN- $\gamma$  production. Indeed, CD4<sup>+</sup> Th17 and not Th1 express the IL-10 receptor. Our data shed new light on regulatory PMN in IL-17A-driven lung inflammation during TB.

Key words : tuberculosis, polymorphonuclear neutrophil, IL-17A, IL-10, immunosuppression, inflammation