

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

**Rôle de Tirap/ Mal, un adaptateur des TLRs, dans le contrôle de
l'infection à *Mycobacterium tuberculosis***

Thèse de doctorat en biologie

Présentée et soutenue le 6 mai 2022 par

Imène Belhaouane

Devant le jury composé de :

Pr. Roland Brosch

Président

Dr. Jérôme Nigou

Rapporteur

Dr. Oana Dumitrescu

Rapporteure

Dr. Sabrina Marion

Examinatrice

Dr. Priscille Brodin

Directrice de thèse

Dr. Arnaud Machelart

Co-directeur de thèse

“We live on an island surrounded by a sea of ignorance. As our island of knowledge grows, so does the shore of our ignorance.”

John Archibald Wheeler

Résumé

La réponse immunitaire innée contre les agents infectieux fait appel à une multitude de gènes codant pour divers acteurs moléculaires indispensables à l'établissement d'une réponse protectrice. Parmi ces acteurs essentiels, les récepteurs reconnaissant les différents motifs associés aux pathogènes, constituent une étape clé dans la défense de l'hôte. Les récepteurs Toll-Like (TLRs) représentent la classe de récepteurs la plus conservée au cours de l'évolution. Les voies de signalisation des TLRs sont sensiblement régulées pour i) répondre de manière efficace aux différents pathogènes, ii) prévenir la perte de tolérance envers les organismes commensaux et iii) prévenir les dommages causés par une inflammation prolongée. Cette preuve est apportée par des polymorphismes génétiques humains conférant une résistance ou une susceptibilité à différents agents pathogènes. Dans le cas de signalisation en aval des TLRs, l'étude des variants génétiques de Tirap (*Toll/Interleukin-1 Receptor domain containing Adaptor Protein*), protéine adaptatrice essentielle à la signalisation de certains de ces récepteurs, a révélé différents effets sur la protection contre les agents infectieux. Par exemple, la mutation hétérozygote S180L de Tirap, mutation associée à une perte de fonction, confère une protection contre l'infection à pneumocoque, à la malaria et au VIH. Cependant, dans le cas de la tuberculose, plusieurs études ont associé cette mutation à des effets opposés quant à la protection contre l'infection.

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier comment une déficience génétique hétérozygote ou homozygote pour Tirap, pourrait affecter l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agent étiologique de la tuberculose.

L'aggravation de la pathologie associée à la tuberculose est étroitement liée au déséquilibre de la balance immunitaire, entraînant l'incapacité de l'hôte à contrôler l'infection. Une perte de fonction de Tirap pourrait avoir un impact important sur la réponse inflammatoire induite suite à l'infection par Mtb. De plus, grâce à plusieurs facteurs de virulence, Mtb peut interagir avec des facteurs de l'hôte pour interférer avec les réponses bactéricides mises en place par la cellule pour permettre l'élimination de l'agent infectieux. Au cours de cette thèse, nous avons montré qu'une déficience hétérozygote pour Tirap induisait une inflammation intermédiaire dans le macrophage infecté par Mtb corrélant avec une faible réplication de la bactérie. Ces macrophages hétérozygotes pour Tirap empêchent les bactéries d'établir une niche favorable à leur réplication en induisant une maturation efficace des compartiments intracellulaires qui les contiennent. Dans les cellules non déficientes, nous avons également montré que l'infection induit l'expression de Tirap qui induit au travers d'une signalisation médiée par STAT5 et l'expression de Cish, une protéine contrôlant l'acidification de la vacuole contenant la bactérie. Chez la souris, l'hétérozygotie pour Tirap est également associée avec

une résistance à l'infection par Mtb. Ce résultat peut être corrélé avec d'autres études humaines montrant que le polymorphisme associé à une perte de fonction Tirap confère une résistance à la tuberculose.

Grâce à ces résultats, nous apportons de nouvelles connaissances sur l'un des mécanismes que Mtb emploie pour manipuler la cellule hôte et assurer sa survie. À terme, une meilleure compréhension à l'échelle moléculaire et cellulaire de ces interactions hôte-agents pathogènes devrait permettre une meilleure lutte contre la tuberculose.

“Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.”

Marie Curie

Remerciements

Cette thèse doctorat et cette soutenance sont l'occasion d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à atteindre mes objectifs et à surmonter certains obstacles sur ce chemin semé d'embûches. Mais avant de citer vos noms 😊, j'aimerais prendre le temps d'être reconnaissante pour toutes ces petites choses qui, sur le moment, me semblaient insignifiantes, mais qu'avec le recul aujourd'hui, je considère tellement importantes. Tous ces petits événements du quotidien, ces petites victoires et ces échecs m'ont mené à ce jour, saine et sauve 🙏

Durant ces presque 4 ans qui m'ont semblé interminables (jusqu'à il y a quelques mois où j'avais l'impression qu'une journée durait 10h et non 24h) j'ai beaucoup appris, tant sur le plan professionnel que personnel. Le monde de la recherche, du peu que j'ai pu apercevoir, peut être parfois impitoyable et injuste. Cela nous enseigne à tous (ou presque) la modestie et l'humilité, et nous donne l'occasion de nous remettre en question. Cela m'a appris également à apprécier chaque petite victoire, même si je suis souvent trop fière pour le montrer. Le nombre d'heures passées sous un PSM ou devant son tableau Excel en sachant que le résultat sera « shitty » avant même d'avoir fait le graphique... Quelle frustration ! J'ai appris très vite à prendre du recul grâce au flegme de certains et à l'enthousiasme naïf des autres. Derrière une barre d'histogramme, un milliard de questions philosophiques sur ce qui est un fold change et un control négatif ! Certes, souvent nous n'avons que peu de reconnaissance par rapport aux efforts fournis, mais la satisfaction de voir cette étoile au-dessus de cette barre et si on a de la chance, un tout petit écart-type, moi personnellement ça a égayé certaines de mes journées. Croiser quelqu'un dans les couloirs de l'IBL, le sourire aux lèvres parce que sa manipe n'était pas un floppe total, je trouvais ça ironiquement satisfaisant. Ce n'est pas chose facile de mettre des mots sur tout cela et sur cette expérience éprouvante mais enrichissante à la fois. Je suis juste contente et je me surprends à penser que si c'était à refaire, je n'hésiterais pas une seconde. Au-delà des petits pas de fourmis que j'ai pu faire en essayant de décortiquer ce « phénotype Tirap », au-delà des compétences techniques et du sens critique que j'ai pu acquérir, cela m'a apporté tellement sur le plan personnel et m'a permis d'aborder les petits tracas de la vie différemment, parfois en mode « drama » quand j'avais contaminé une culture, et parfois avec tellement de recul, de pragmatisme et de détachement. En résumé, j'aime croire que l'expérience d'une thèse peut nous faire évoluer, à nous d'être ouverts d'esprit et « chill » quand il le faut !

Les personnes que je remercie en premier sont mes directeurs de thèse. Priscille et Arnaud, merci de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse. Vous m'avez permis de faire mes premiers pas dans

le monde de la recherche et dans le monde de la TB. Merci pour vos conseils et votre disponibilité. Je suis heureuse d'avoir été encadrée par vous deux, deux personnes très différentes mais qui partagent la même passion pour la recherche. Priscille, vous m'avez permis de m'intégrer et de m'affirmer. Très vite, vous avez exigé que je sois autonome, critique et que je comprenne tous les rouages du labo. Cela m'a permis de comprendre concrètement la complexité de la vie d'un labo de recherche. Nous n'étions pas toujours d'accord et nous n'avions pas la même manière d'avancer pour ce projet, mais cela m'a permis d'acquérir un sens critique. Cela m'a appris qu'il ne suffit pas d'être têtue pour s'affirmer et qu'un argumentaire logique et solide permet plus facilement de s'imposer. Vous m'avez également permis de comprendre l'importance d'avoir un réseau, d'interagir avec les gens et d'oser aller vers eux. Dès le début, vous m'avez encouragée à participer aux congrès, à défendre mes idées. Je me suis découvert une passion pour « la scène » que ce soit devant mon poster ou une présentation, mais aussi sur la scène de la gare Saint Sauveur ! Oui je tiens à ce que les gens sachent que Priscille a chanté du Dalida avec moi et toute l'équipe au karaoké du St So !

Arnaud, je ne saurais pas comment te remercier et exprimer toute la reconnaissance et l'estime que j'ai pour toi. Je ne pouvais pas souhaiter mieux comme encadrant. Merci pour ta disponibilité, ton écoute et ton indulgence. Tu as été bienveillant et tu as toujours eu le mot juste pour m'encourager. Tu as essayé de me transmettre tout ton savoir, ton savoir-faire et ta passion. Merci pour ces longues discussions où tu m'as permis et appris à pousser toujours un peu plus loin ma réflexion. Les gens s'imaginent sûrement qu'on ne fait que papoter quand ils nous voient parler et rigoler à travers la vitre du bureau. Mais ils s'imaginent mal que même au bar, autour d'une bière (ou 2 ou 3...), on a pu avoir des discussions scientifiques très riches. Les discussions avec toi étaient très fluides et constructives. Ton exigence, ta rigueur et ton sens critique m'inspirent beaucoup. Tu es un scientifique admirable. Je tiens aussi à ce que tu saches que j'ai énormément apprécié notre cohésion. Une limite entre le pro et le perso s'est naturellement et facilement établie entre nous. Je te respecte beaucoup et te souhaite de partager la même relation (si ce n'est mieux) avec tes futurs thésards. Arnaud (pas encadrant), merci pour ton soutien, tes blagues douteuses et tes casseroles ! Merci de garder certains potins pour toi parce que j'ai des dossiers aussi 😊. J'aime croire qu'une fois mon diplôme en poche, tu seras non seulement mon ancien directeur de thèse mais également mon ami. Tu es une personne humble, généreuse, gentille et qui se soucie de son prochain. Garde cette positivité et cet optimisme qui te caractérisent et ne te laisses pas rattraper par ce monde de scientifiques fous furieux.

Je remercie ensuite, « l'équipe 7 du C2IL » ! Expression devenue mythique grâce à Priscille ! (If you know, you know 😊). Une équipe formidable, la meilleure équipe du CIIL sans conteste ! Mais je pense bien que mon avis est biaisé parce que vous m'avez tellement gâtée. Je pense à Alex qui est

sans doute la cause de l'échec de tous les régimes que j'ai voulu suivre ! Alex merci pour les gaufres, les palets de dames, les chips et la bière. Tu n'as toujours pas compris que les bonbons je n'aimais pas ça par contre ! Tu es une personne généreuse. Merci pour tes blagues ****stes, cela a égayé certaines de mes journées. Merci pour ton humour et ton sens de la répartie. Tu as su aussi dire les mots justes quand je pétais des câbles ! Tu m'as appris à prendre du recul et à relativiser. Tu m'as aussi appris que les machines plantaient rarement sans raison et que c'est nous qui ne sommes pas très fute-fute. Tu as été très gentil avec moi malgré tes moqueries (innocentes) et disponible quand j'en avais besoin. Je me sentais comme une VIP. Alex, je te souhaite sincèrement de gagner à l'EuroMillions et de te barrer sur ton yacht !

Eik, thanks for your chair! It was very generous and kind. You have been a great support throughout this journey and I hope we will stay in touch. Thank you for your time, for the "Kasteel Rouge" experience and for the clandestine barbecue! You have always offered me your unconditional help and I will not forget it. Nat, merci pour ta gentillesse, ton aide et ta disponibilité. Toujours d'accord pour me filer un coup de main, pour me retrouver et m'expliquer un protocole. Toujours souriante, merci pour ta positivité et ta bienveillance. Je te souhaite d'être toujours épanouie dans ce que tu fais et dans ce que tu voudras faire plus tard. Céline, merci pour ton aide, pour ton dynamisme et ta bienveillance. Toujours partante, pour un kebab ou pour aller courir. Tu as été compréhensive et tu m'as toujours proposé ton aide spontanément dans les moments un peu compliqués. Ta forte personnalité et ta détermination sont inspirantes. Aurélie, merci pour ton écoute et tes encouragements. Jo, tu as toujours été gentil avec moi, à proposer ton aide ou à dire un mot gentil et d'encouragement avant de partir les soirs où je restais seule au labo. Avant d'être dans l'équipe, tu étais aussi un ami, merci pour tes histoires sans fin, ça me faisait rire intérieurement !

A mes collègues mais surtout amis aujourd'hui, vous êtes formidables ! Servane, Karine, Valentin, Gauthier, Alix, Kamel et j'en oublie c'est sûr, vous êtes au top les gars. Tout ça n'aurait pas été possible sans vous. Enfin si quand même, mais ça aurait été beaucoup plus dur. Nos soirées et nos délires vont beaucoup me manquer. Je garde précieusement tous nos souvenirs en tête en espérant en recréer de nouveaux avec vous un jour. L'Alchi, St So, Karafun, Musi'Quiz, mon ancien appart... se rappelleront de nos bêtises ! Sachez que chacun d'entre vous m'a aidée à avancer à sa manière. J'ai partagé des moments sincères avec chacun d'entre vous. Merci...

Aux personnes qui ont été de passage dans ma vie mais qui m'ont apporté un petit moment de réconfort, je vous remercie.

Mes amies de toujours et pour toujours, Sirine et Amina. Que dire de plus si ce n'est que je vous adore. Vous êtes mes sœurs de cœur. La vie nous a séparées il y a quelques années, mais savoir que

je peux compter sur vous à tout moment, peu importe la raison me reconforte beaucoup. Vous avez enduré mon caractère de merde pendant cette thèse, vous méritez le prix Nobel de la Paix ! Flo, grâce à Amina, tu fais partie de ma petite famille maintenant. Merci pour ta générosité et ta gentillesse.

Je remercie aussi ma famille dont le soutien indéfectible et inconditionnel m'a portée et reconfortée tout au long de cette expérience. Papa, maman, Leïla et Lilia, tout est éphémère dans la vie mais l'amour que l'on se porte est inébranlable. Papa, maman, je vous remercie d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Vous étiez exigeants et compréhensifs à la fois. Vous nous avez inculqué malgré vous cette force de caractère et cette détermination qui vous exaspèrent quelques fois. Je vous aime et je fais tout ça pour vous. Leïla et Lilia, vous êtes mes meilleures amies et mes complices dans la vie.

Enfin, je remercie tous les collaborateurs et toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce projet. Merci à l'équipe du LHS et à mon comité de suivi individuel, les Docteurs Laleh Majlessi et Laurent Masollier pour leurs conseils. Membres du jury, Professeur Roland Brosch, Docteurs Jérôme Nigou, Oana Dumitrescu et Sabrina Marion, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour le temps consacré à la relecture de mon manuscrit. Merci pour vos conseils et suggestions qui rendent ce travail plus complet et valorisant.

“La connaissance, c'est l'expérience. Tout le reste n'est qu'information.”

Albert Einstein

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	20
1. Les infections pulmonaires et l'importance des senseurs de l'immunité innée	21
2. Rôle de Tirap/Mal, adaptateur des TLRs, dans l'inflammation et l'immunité innée	24
Publication 1.....	25
Paradoxical roles of the MAL/Tirap adaptor in pathologies	25
Résumé.....	26
3. Pathogénèse de la tuberculose	36
3.1. La tuberculose, pertinence pour la santé mondiale.....	36
3.2. L'évolution de l'infection à <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
3.3. Le granulome tuberculeux.....	49
3.4. Interaction hôte-agent pathogène pendant l'infection	52
Objectifs de la thèse	72
Résultats	75
Publication 2.....	76
Tirap heterozygosity represses Cish-mediated control of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> phagosomal acidification	76
Résumé.....	77
Discussion et perspectives	115
Rappel de la problématique et des objectifs.....	116
Une déficience pour Tirap inhibe la réplication de Mtb dans le macrophage.....	117
1. Effet de Tirap sur le contrôle de la réplication de Mtb	117
2. Tirap et la signalisation des TLRs pendant l'infection à Mtb.....	118
3. Interaction Mtb-Tirap.....	119
4. Effet de Tirap sur la production de cytokines inflammatoires pendant l'infection	120
5. Effet de Tirap sur la maturation de la vacuole	120
L'hétérozygotie pour Tirap protège de l'infection par Mtb chez la souris.....	122
1. Effet de Tirap sur la charge bactérienne dans le poumon	122
2. Effet de Tirap sur la production des cytokines inflammatoires	122
3. Effet d'une déficience pour Tirap sur le recrutement des cellules immunitaires.....	123
Conclusion et perspectives.....	124
Méthodes	130
Références bibliographiques	138
Annexe.....	154
Publication 3.....	155

High-content analysis monitoring intracellular trafficking and replication of Mycobacterium tuberculosis inside host cells..... 155

Liste des abréviations

AIM2	Absent in melanoma 2	HBHA	Heparin-binding hemagglutinin adhesin
ALRs	AIM2-like receptors	HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
AMP	Adenosine monophosphate	VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ARG	Arginase	HLA	Human leucocyte antigen
BCG	Bacille de Calmette et Guérin	iBALT	Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
CFP-10	Culture filtrate Protein 10 kDa	IDO	Indoléamine 2,3-Dioxygénase
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase	IFN	Interferon
Cish	Cytokine Inducible SH2 Containing Protein	IgG	Immunoglobulin G
CLECSF8	C-Type Lectin Superfamily Member 8	IL	Interleukine
CLRs	C-type lectin receptors	INH	Isoniazid
DC	Dendritic cell	IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	Irg1	Immune Response Gene 1
DT2	Type 2 diabetes	KatG	Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase
EEA1	Early Endosom Antigen 1	LAM	Lipoarabinomannan
Eis	Enhanced Intracellular Survival	LRR	Leucin-rich repeat
EMB	Ethambutol	LTBI	Latent tuberculosis infection
ESAT-6	Early secretory antigenic target protein 6	ManLAM	Mannose-capped Lipoarabinomannan
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport	MDR	Multidrug resistant
Esp	ESX-1-secreted substrate protein	MHC	Major histocompatibility complex
FCGR	Fc gamma Receptor	Mincle	Macrophage inducible Ca ²⁺ -dependent lectin receptor

GMP	Guanosine monophosphate	MIP	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ROS	Reactive Oxygen Species
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88	ROS	Reactive Oxygen species
NFkB	Nuclear Factor kappa B	rpoB	β subunit of bacterial RNA polymerase
NLRs	NOD-like receptors	RR	Rifampicin Resistance
NO	Nitric oxide	STING	Stimulator of Interferon Genes
NOD	Nucleotid-binding and oligomerization domain	T7SS	Type 7 secretion system
NOS	Nitric Oxide Synthase	TB	Tuberculose
OMS	Organisation mondiale de la santé	TBK1	TANK Binding Kinase 1
OXPHOS	Phosphorylation Oxydative	TDM	Trehalose Dimycolate
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns	TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
PDIM	Phthiocerol Dimycocerosates	Tirap	TIR domain containing Adaptor Protein
PGL	Phenolic Glycolipid	TLRs	Toll-like receptors
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase	TNF	Tumor necrosis factor
PI3P	Phosphatidylinositol 3-Phosphate	TNT	Tuberculosis Necrotizing Toxin
PIM	Phosphatidylinositol Mannoside	TST	Tuberculin Skin Test
PRRs	Pattern recognition receptors	v-ATPase	Vacuolar ATPase
PZA	Pyrazinamide	VDR	Vitamine D Receptor
RIF	Rifampicin	VPS34	Vacuolar Protein Sorting 34
RIG	Retinoic acid-inducible gene I	XDR	Extensively Drug Resistance
RILP	Rab-interacting lysosomal protein		
RLRs	RIG-I-like receptors		

Liste des figures

Figure 1 : Vue d'ensemble de l'immunité innée dans les voies respiratoires conductrices et les alvéoles pulmonaires	22
Figure 2: Cibles moléculaires des antibiotiques antituberculeux de première intention et mécanismes de résistance associés.....	44
Figure 3: Principaux mécanismes cibles des HDT.....	46
Figure 4: Trafic intracellulaire de Mtb et exemples de médicaments suggérés comme HDT.....	48
Figure 5 : Structure et composition cellulaire du granulome tuberculeux	51
Figure 6: La paroi cellulaire des mycobactéries	53
Figure 7: Les facteurs de virulence des Mycobactéries et structure de la mycomembrane.....	55
Figure 8: Reconnaissance des PAMPs mycobactériens par les récepteurs de l'immunité innée.....	60
Figure 9: Localisation de Mtb dans les cellules humaines.	63
Figure 10: Voies de détection de l'ADN et de l'ARN cytosoliques Mtb.....	67
Figure 11: Les facteurs de virulence de Mtb modulent la mort cellulaire de l'hôte pour permettre la survie du bacille	70
Figure 12: Hypothèses sur le rôle de Tirap dans la régulation des défenses du macrophage infecté par Mtb	126
Figure 13: Test d'efficacité de l'isoniazide et la rifampicine sur la réplication bactérienne au sein de macrophages wild type et de macrophages déficients pour Tirap	128

Publication 1

Figure 1: MAL structure, pathway and dependent immune responses during infections.....	28
--	----

Publication 2

Figure 1: Comparative study of bacterial load, recruited immune cells and cytokines expression in lungs of Tirap +/+, +/- and -/- infected mice.....	83
Figure 2: Tirap expression and localization in Mtb-infected BMDMs: Impact on bacterial growth and cytokines expression.....	86
Figure 3: Identification of differentially regulated genes between +/+, +/- and -/- BMDMs during Mtb infection.....	90
Figure 4: Tirap implication in phagosomal maturation and lipid droplet formation.....	93
Supplementary figure 1.....	112
Supplementary figure 2.....	113
Supplementary figure 3: Gating strategies in flow cytometry to analyze the different populations in lungs of mice.....	114

Publication 3

Figure 1: Summary of the main subcellular events that can be monitored using the proposed pipeline following <i>M. tuberculosis</i> infection in macrophage.....	161
Figure 2: Overall scheme for the different assays described in this chapter.....	187
Figure 3 Overall scheme for (a) infection of cells in suspension and (b) infection of plated cells....	189
Figure 4: Example of a 384-well assay plate layout.....	190
Figure 5: (a) Workflow of the staining process for all dyes listed in this chapter. (b) Workflow of the image analysis process.....	204
Figure 6: Examples of dose-response curves, obtained using two-folds dilutions of various chemical modulators.....	206

Liste des tableaux

Tableau 1: Différentes formes vaccinales en développement.....	38
Tableau 2: Effets de différentes mutations de Tirap sur la résistance à la TB	117
Tableau 3: Détermination phénotypique des cellules immunitaires pulmonaires.	133
Tableau 4: Séquences des amerces sens et anti-sens	136

Publication 1

Tableau 1: Effect of MAL deficiency during infectious and non-infectious diseases.....	30
--	----

Publication 2

Tableau 1: Phenotypic determination of pulmonary immune cells.....	101
Tableau 2: Forward and reverse primers sequences.....	104

Publication 3

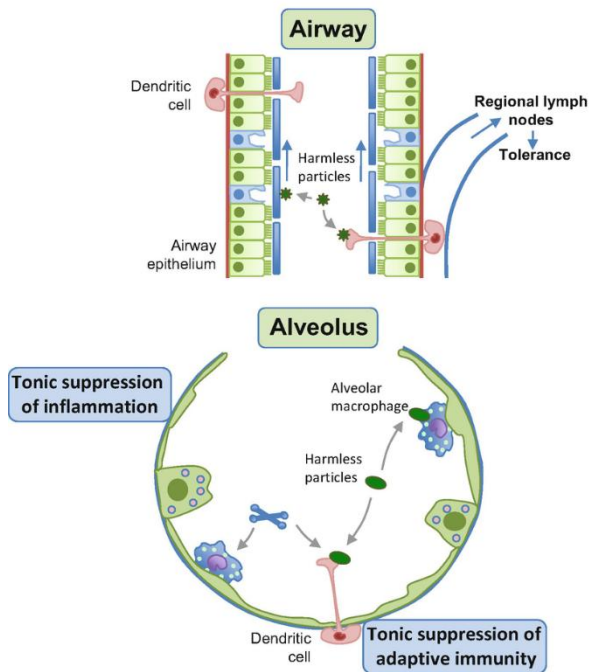
Tableau 1: Recommended conditions for siRNA transfection in 384-well microplate.....	217
Tableau 2: Excitation and emission wavelength for common fluorophores.....	218

INTRODUCTION

1. Les infections pulmonaires et l'importance des senseurs de l'immunité innée

Chez les mammifères, les poumons représentent la plus grande surface épithéliale en contact direct avec le milieu extérieur. Il s'agit donc d'un organe très exposé aux agents pathogènes, aux allergènes et à d'autres substances toxiques en suspension dans l'air (V. Kumar, 2020). Ces agressions peuvent être aiguës ou chroniques selon l'intensité et la durée de l'exposition et selon la réponse immunitaire mise en place par l'organisme (Bienenstock, 1984; V. Kumar, 2020). Cependant, les substances inhalées ne sont pas toujours une menace pour l'intégrité pulmonaire. C'est ainsi que le système respiratoire et le système immunitaire se coordonnent pour surveiller et répondre de manière appropriée aux particules inhalées (**Figure 1**) (Riches & Martin, 2018). Ces mécanismes de surveillance, ou plus communément appelés, mécanismes de reconnaissances, sont propres à l'immunité innée. Au niveau cellulaire, l'immunité innée est principalement médiée par les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages résidents, les neutrophiles recrutés et les monocytes circulants. Cette réponse innée est immédiate et rapide dans le temps. D'autres cellules du système immunitaire, comme les lymphocytes T et les lymphocytes B, répondent plus lentement mais avec une spécificité aux agents pathogènes considérablement plus grande. Ces cellules font partie du système immunitaire adaptatif et participent au développement de la mémoire immunologique. A l'interface entre ces deux types de réponses immunitaires, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages exercent une fonction de présentation d'antigènes pour activer l'immunité adaptative à partir de l'immunité innée. Ces acteurs clés de l'immunité amorcent la destruction des agents infectieux par un phénomène d'endocytose particulier, appelé phagocytose. Il s'agit d'un processus remarquablement complexe et polyvalent qui, en plus d'éliminer les agents pathogènes, assure le remodelage des tissus en éliminant les cellules mortes. La capacité des cellules phagocytaires à remplir des fonctions aussi diverses repose, en grande partie, sur leur vaste répertoire de récepteurs (Freeman & Grinstein, 2014). Ces récepteurs de l'immunité innée, appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) reconnaissent divers types de motifs moléculaires : les motifs moléculaires associés au danger (DAMPs, *Danger-Associated Molecular Patterns*) générés lors des conditions pro-inflammatoires perturbant l'homéostasie immunitaire, et des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes, appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) qui incluent, entre autres, des lipides complexes, des glucides dérivés de parois cellulaires bactériennes et de levure, des séquences d'ADN CpG non méthylées et des ARN double brin.

A. Steady state



B. PAMPs

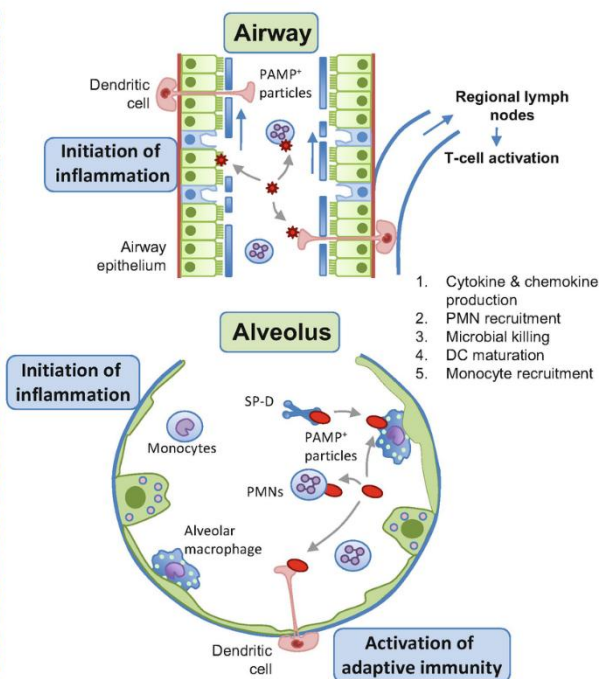


Figure 1 : Vue d'ensemble de l'immunité innée dans les voies respiratoires conductrices et les alvéoles pulmonaires

(Riches & Martin, 2018).

(A) En l'absence de PAMPs, les voies respiratoires sont protégées par du mucus qui capture les particules inoffensives et les transporte le long du flux mucociliaire. Les cellules dendritiques capturent également les particules, les transportent vers les ganglions lymphatiques régionaux et favorisent la tolérance aux antigènes couramment inhalés. Également en l'absence de PAMPs, les alvéoles sont maintenues dans un état anti-inflammatoire et immunodéprimé pour prévenir l'inflammation indésirable et l'activation immunitaire contre les particules et les antigènes inoffensifs. (B) L'immunité innée est activée en présence de PAMPs. Les PAMPs stimulent les cellules épithéliales des voies respiratoires pour exprimer des chimiokines, des cytokines et des médiateurs lipidiques qui attirent les neutrophiles qui à leur tour éliminent les microbes exprimant les PAMPs. Les cellules dendritiques des voies respiratoires répondent aux PAMPs en migrant vers les ganglions lymphatiques régionaux et en stimulant la prolifération des lymphocytes T. Une réponse similaire est activée dans les alvéoles lors de la détection des PAMPs par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales entraînant l'initiation de l'inflammation et l'activation de l'immunité adaptative.

Ces PRRs incluent les récepteurs Toll-Like (TLRs), les récepteurs NOD-Like (NLRs), les récepteurs RIG-I-Like (RLRs), les récepteurs de lectine de type C (CLRs) et plusieurs capteurs d'ADN intracellulaire (voie de signalisation cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP Synthase - Stimulator of IFN Genes*), récepteurs de type Aim 2 (ALRs)) (V. Kumar, 2020). Les TLRs sont considérés comme les récepteurs les plus importants dans la reconnaissance des PAMPs et l'amorçage de la phagocytose. À ce jour, 10 TLRs fonctionnels sont décrits chez l'homme, dont 6 sont exprimés à la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) et 4 au niveau des compartiments intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Les TLRs détectent une variété de PAMPs, comme le lipopolysaccharide (TLR4), les lipopeptides (TLR2 associés à TLR1 ou TLR6), la flagelline bactérienne (TLR5), l'ARN double brin viral (TLR3), l'ARN simple brin viral ou bactérien (TLR 7 et 8) et l'ADN non méthylé riche en CpG (TLR9) (Botos, Segal, & Davies, 2011). Ces récepteurs sont essentiellement caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR) qui assure la reconnaissance des PAMPs, un domaine transmembranaire se prolongeant par une fraction cytosolique de type TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*), requise pour l'activation des voies de signalisation en aval (Vijay, 2018). Ces voies de signalisation, conduisent à l'activation de facteurs de transcription, comme NFκB¹ (*Nuclear Factor kappa B*), permettant aux cellules de produire les cytokines pro-inflammatoires adéquates aux PAMPs reconnus afin de combattre l'infection (O'Neill, Bryant, & Doyle, 2009). Cependant, cette transduction du signal du domaine TIR des TLRs jusqu'au noyau n'est possible qu'après recrutement d'une machinerie complexe constituée de protéines adaptatrices. La protéine MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*), a été le premier adaptateur caractérisé jouant un rôle crucial dans ces voies de signalisation induisant l'assemblage d'un complexe protéique, appelé myddosome, responsable de l'activation de la voie NFκB (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001; Takeda & Akira, 2004b). Par la suite, d'autres études ont montré qu'un autre adaptateur des TLRs, Tirap (*TIR adaptor protein*) ou Mal (*Myd88 adaptor-Like*), jouait un rôle clé dans l'assemblage du myddosome et l'activation de l'inflammation. Ce dernier a longtemps été décrit seulement pour son implication dans la régulation des cascades de signalisation en aval des TLR2 et TLR4 en favorisant le recrutement de MyD88 (Horng, Barton, Flavell, & Medzhitov, 2002; Mansell, Brint, Gould, O'Neill, & Hertzog, 2004; O'Neill et al., 2003). Cependant, des études plus récentes ont démontré que Tirap était impliqué dans la signalisation du TLR9 (Bonham et al., 2014) mais aussi dans la signalisation d'autres récepteurs non-TLRs, comme en aval du récepteur à l'interféron-γ (IFN-γ) (Ní Cheallaigh et al., 2016) et du récepteur pour les produits de glycation avancés (RAGE, *Receptor for Advanced Glycation End products*) (Sakaguchi et al., 2011). Tirap peut également induire des voies de signalisation indépendamment de la signalisation de MyD88 (M. Srivastava & Baig, 2018). Néanmoins, le rôle de

¹ NFκB, pour *nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire à l'infection, la production de cytokines et la

Tirap dans l'établissement d'une inflammation et d'une réponse immunitaire protectrice contre les agents pathogènes est un sujet controversé. De nombreuses études métagénomiques sur la prévalence à des maladies infectieuses et non-infectieuses ont montré que des mutations héréditaires, dominantes ou récessives, du gène *tirap* étaient associées à des résultats différents chez les patients, suggérant un rôle paradoxal dans la protection contre ces maladies (Belhaouane, Hoffmann, Chamillard, Brodin, & Machelart, 2020).

Dans le domaine émergent des thérapies dirigées vers l'hôte contre les pathogènes intracellulaires (concept développé plus tard dans le manuscrit), les TLRs et leurs protéines adaptatrices ont été proposés comme cibles putatives pour le traitement des troubles inflammatoires et pour combattre la résistance aux antibiotiques (Al Tbeishat, 2022; Khan, Pahari, Vidyarthi, Aqdas, & Agrewala, 2016; Scheenstra, van Harten, Veldhuizen, Haagsman, & Coorens, 2020).

2. Rôle de Tirap/Mal, adaptateur des TLRs, dans l'inflammation et l'immunité innée

La mise en place d'une réponse immunitaire innée adaptée lors d'une infection est primordiale pour l'activation de la réponse adaptative. En revanche, la dérégulation de cette réponse et une inflammation exacerbée conduisent à des dommages tissulaires, l'augmentation de la sévérité des symptômes et à la dissémination de l'agent pathogène pouvant augmenter la contagiosité du patient. La revue qui suit, décrit l'implication de Tirap/Mal dans la régulation des voies de signalisation, TLRs ou non-TLR dépendants, et son impact sur l'évolution des maladies.

Publication 1

Paradoxical roles of the MAL/Tirap adaptor in pathologies

Imène Belhaouane¹, Eik Hoffmann¹, Mathias Chamaillard¹, Priscille Brodin^{1*}, Arnaud Machelart^{1*}

¹Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

*Corresponding authors: priscille.brodin@inserm.fr and arnaud.machelart@gmail.com

Frontiers in Immunology

2020 Sep 25;11:569127

Résumé

Les récepteurs de type Toll (TLRs) sont à l'avant-garde de la reconnaissance des agents pathogènes, assurant la protection de l'hôte en induisant les réponses cellulaires et humorales adéquates. Les voies de signalisation en aval des TLRs sont sensiblement régulées pour prévenir les dommages collatéraux causés par une inflammation exacerbée et la perte de tolérance envers les organismes commensaux. Pour déclencher une signalisation intracellulaire efficace, ces récepteurs nécessitent l'implication de protéines adaptatrices. Parmi celles-ci, la protéine adaptatrice contenant un domaine Toll/Interleukin-1 (Tirap ou Mal) joue un rôle important dans l'établissement des réponses immunitaires. La perte de fonction de Tirap a été associée à la susceptibilité ou à la résistance à certaines maladies. Ces effets opposés révèlent des fonctions paradoxales de Tirap et son importance dans le contrôle des maladies infectieuses et non infectieuses. Dans cette revue, nous résumons les connaissances actuelles sur les voies de signalisation impliquant Tirap dans différentes pathologies et l'impact d'une déficience de Tirap sur la réponse protectrice.



Paradoxical Roles of the MAL/Tirap Adaptor in Pathologies

Imène Belhaouane¹, Eik Hoffmann¹, Mathias Chamillard², Priscille Brodin^{1*} and Arnaud Machelart^{1*}

¹ Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France, ² Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, University of Lille, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jagadeesh Bayry
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
(INSERM), France

Reviewed by:

Catherine Ropert,
Federal University of Minas
Gerais, Brazil
Steve Ley,
Imperial College London,
United Kingdom

*Correspondence:

Priscille Brodin
priscille.brodin@inserm.fr
Arnaud Machelart
arnaud.machelart@gmail.com

Specialty section:

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

Received: 03 June 2020

Accepted: 24 August 2020

Published: 25 September 2020

Citation:

Belhaouane I, Hoffmann E,
Chamillard M, Brodin P and
Machelart A (2020) Paradoxical Roles
of the MAL/Tirap Adaptor in
Pathologies.
Front. Immunol. 11:569127.
doi: 10.3389/fimmu.2020.569127

Toll-like receptors (TLRs) are at the forefront of pathogen recognition ensuring host fitness and eliciting protective cellular and humoral responses. Signaling pathways downstream of TLRs are tightly regulated for preventing collateral damage and loss of tolerance toward commensals. To trigger effective intracellular signaling, these receptors require the involvement of adaptor proteins. Among these, Toll/Interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein (Tirap or MAL) plays an important role in establishing immune responses. Loss of function of MAL was associated with either disease susceptibility or resistance. These opposite effects reveal paradoxical functions of MAL and their importance in containing infectious or non-infectious diseases. In this review, we summarize the current knowledge on the signaling pathways involving MAL in different pathologies and their impact on inducing protective or non-protective responses.

Keywords: TLRs, MAL/Tirap, chronic diseases, signaling pathways, inflammation

INTRODUCTION

Commensal and pathogenic microorganisms contain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by different families of pattern-recognition receptors (PRRs) (1). Mammals have distinct classes of PRRs, including Toll-like receptors (TLRs), that are patrolling both, extracellular and intracellular environments. They are expressed in innate immune cells, such as dendritic cells (DCs) and macrophages, but also in non-immune cells, such as fibroblasts and epithelial cells. TLRs are composed of the Toll/Interleukin-1 receptor homology (TIR) domain capable of binding to intracellular signaling adaptor proteins. For more details on downstream signaling cascades, we direct the reader to comprehensive reviews (2, 3).

Among a variety of TLRs adaptor proteins, TIR-containing adaptor protein (Tirap), also named MyD88 adaptor-like protein [MAL, also referred to as megakaryoblastic leukemia (translocation) 1], was mostly reported for its involvement in the regulation of signaling cascades downstream of TLR-2 and TLR-4 by bridging the adaptor protein myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) (4–6). Human MAL consists of 221 amino acids (Figure 1A). At the N-terminus, there are a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding motif (PBM) and a putative proline, glutamic acid, serine and threonine (PEST) domain associated to short-lived proteins (7). At the C-terminus, a TIR domain extends from amino acid 84–221 and orchestrates the signal transduction pathways after TLR and Interleukin-1 (IL-1) receptor engagement. Because of its analogy with MyD88, MAL signaling was initially confused with that of MyD88. Actually, it impacts on inflammation and innate immune responses in a TLR- and MyD88-independent

manner (8), pinpointing its role to other putative cellular mechanisms, such as vesicular trafficking. Heterozygosity and homozygosity for some inherited mutations in *MAL* are associated with different outcomes in patients, suggesting a paradoxical role in protection against diseases. This may reflect the influence of gene-gene and gene-environment interactions that vary across populations. In this review, we summarize the current knowledge on cellular mechanisms of MAL/Tirap and highlight its role in disease predisposition.

MAL SIGNALING PATHWAYS DOWNSTREAM TLR-2 AND TLR-4

MAL recruitment at the plasma membrane occurs upon binding to PIP2 prior to its interaction with TLRs (Figure 1B) (9). MAL is then phosphorylated by Burton tyrosine kinase (Btk), which facilitates its interaction with the TIR domain of TLRs and consequently MyD88 to initiate the transduction signal (10). Recently, it has been shown that MAL is S-glutathionylated on

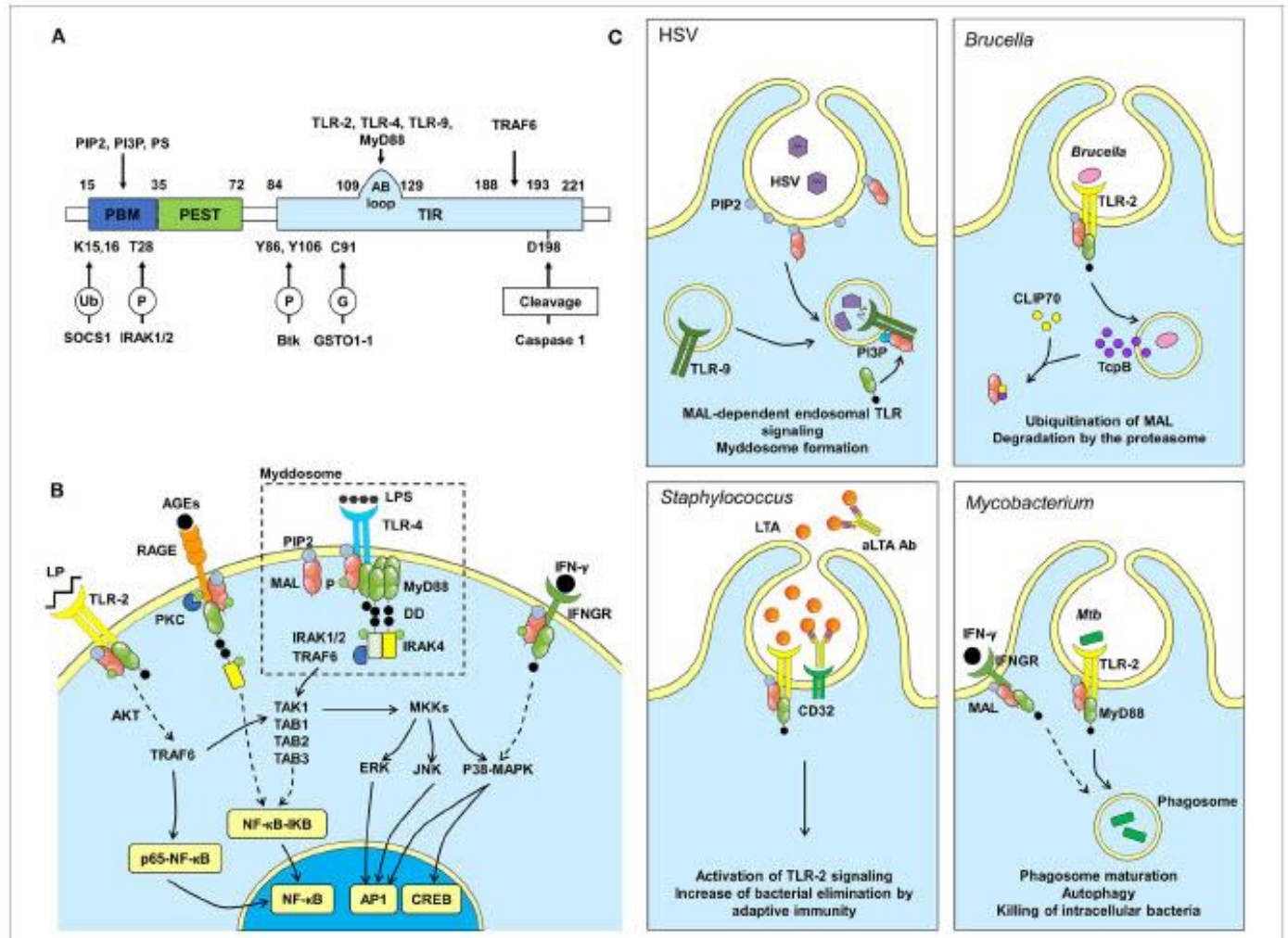


FIGURE 1 | MAL structure, pathway and dependent immune responses during infections. **(A)** Protein structure of MAL, binding sites (above) and regulation sites (below). P, phosphorylation; Ub, ubiquitination; G, S-glutathionylation. **(B)** Among other receptors, MAL affects signals downstream of TLR-2, TLR-4, RAGE and FNGR. When TLR-4 is activated by LPS, MAL is recruited by its PIP2 binding domain to TLR-4 rich regions of the plasma membrane. MAL then facilitates the recruitment of MyD88 and the formation of the myddosome, which is important for the activation of the NF- κ B pathway, thus inducing inflammation. Signaling pathway activated downstream of RAGE can also induce NF- κ B dependent inflammation. MAL induces the translocation of p65-NF- κ B to the nucleus through AKT phosphorylation, independently from MyD88 signaling. Also, independently from MyD88, MAL can activate CREB via p38-MAPK and Mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) signaling pathways. Another pathway involving MAL is downstream FNGR, which leads to phosphorylation of p38-MAPK. AGEs, Advanced Glycation End products; DD, Death Domain; P, Phosphate group; LP, Lipopeptide. **(C)** The *Herpes simplex virus* (HSV) infection model was used to confirm MAL signaling from endosomes. TLRs found at the cell surface signal from a PIP2-rich subdomain, and MAL is recruited to that location via interactions with PIP2. TLRs found on endosomes (TLR-9) signal from a domain rich in PI3P. These lipids direct MAL to endosomes to promote TLR-9 signaling after viral DNA recognition. *Brucella* infection: *Brucella* interferes with immune responses by producing TcpB, which targets MAL to inhibit NF- κ B activation. TcpB also targets CLIP70 inducing MAL ubiquitination and degradation by the proteasome. *Staphylococcus* infection: Lipoteichoic acid (LTA), a toxin produced by *Staphylococcus* bacteria, is recognized by TLR-2. TLR-2 activation induces MAL signaling to eliminate the toxin/bacteria. LTA is also recognized by antibodies (α LTA Ab), which are recognized by CD32 (Fc γ receptor II). In patients carrying the R121W mutation in MAL, adaptive immunity can compensate for defects in MAL function. *Mycobacterium* infection: Killing *M. tuberculosis* requires activation of TLR-2- and FNGR-dependent signaling pathways within phagocytes to induce phagosome maturation and autophagy.

Cys91 to facilitate the interaction with MyD88 (11). Notably, it is possible that the MAL-MyD88 tandem is prepositioned on the membrane awaiting ligand-induced TLR activation. Upon activation, MyD88 oligomerizes to form a large signaling platform called the “myddosome,” which also contains members of the Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase (IRAK) family. The N-terminal Death Domain of MyD88 recruits firstly IRAK4 and then IRAK1 and IRAK2, which are phosphorylated to interact with the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). TRAF6 is an E3 ubiquitin ligase able to generate K63-linked polyubiquitination chains. The linear ubiquitin assembly complex can bind these chains to recruit preassembled kinase complexes containing TAK1, TAB1, TAB2, and TAB3. This leads to nuclear factor kappa B (NF- κ B) translocation to the nucleus after inhibitor of NF- κ B (IKB) proteolytic degradation. Concomitantly, this complex controls the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling that activates members of the activator protein-1 (AP1) transcription factor family, Jun and Fos, resulting in cytokine production, initiation of inflammation and metabolic cell polarization (6, 12).

Thus, MAL is an important actor in the establishment of inflammation. Over the last decade, a large number of clinical and experimental studies focused on the role of MAL in the control of infectious and non-infectious diseases (Table 1). Unexpectedly, as shown in Table 1, genetic variation in MAL was associated with either protection or susceptibility to diseases. Recent studies have shown that MAL is involved in other processes besides TLR-2 and TLR-4 making its biology more complex than expected. These new functions, discussed below, will make it possible to emit new hypotheses explaining the paradoxical behavior of MAL.

DOES MAL SIGNAL THROUGH ENDOSOMAL TLRs?

Several studies have investigated whether intracellular TLRs require MAL to signal. While PIP2 is required for MAL recruitment at TLR-2 and TLR-4 (10, 52), functional analysis by Kagan's group revealed that Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) and Phosphatidylserine (PS) are needed to recruit MAL to endosomal TLR-9 (21). The authors used MAL-deficient plasmacytoid DCs, known to respond exclusively via endosomal TLRs, to demonstrate that MAL is required for production of type I interferon (IFN) downstream TLR-9 stimulation with *Herpes simplex Virus* (HSV) (Figure 1C). Wild type and MAL-deficient primary bone marrow-derived macrophages were stimulated with substrains of HSV-1 showing that deficient cells presented a defective production of IL-1 β and IL-6, specifically downstream of endocytic TLR-9 (21, 53). Since then, it became clear that multiple targets of the lipid-binding domain of MAL are functionally important and allow this adaptor to promote TLR signaling from both plasma membrane and endosomal compartments. Corroborating this, Shan et al., also demonstrated that MAL was recruited as an adaptor to endosomal compartments by TLR-8 (54). The complexity of the endosomal system fine-tunes the immune response by ensuring

the proper compartmentalization of intracellular TLRs. The contribution of MAL downstream of intracellular TLRs increases the complexity of its biology and further investigations are needed to fully understand the regulation of endosomal signaling which could provide new hypotheses explaining the paradoxical role of MAL.

COULD MAL SIGNALING BE INDEPENDENT OF TLRs?

Besides the above-mentioned MAL-mediated pathways that are downstream of TLRs, Keane's group discovered in murine macrophages that MAL binds to IFN- γ receptor (IFNGR), which triggered its interaction with MyD88 (Figure 1B). In the context of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) infection, authors reported that MAL leads to autophagy and vacuole acidification that kills the bacteria (Figure 1C). In addition, the S180L polymorphism (this single-nucleotide polymorphism (SNP) encodes a serine instead of a leucine), and its murine equivalent S200L, compromised IFNGR signaling impairing host responses to *Mtb* (8).

MAL was also described to interact with Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE), a type I single-pass transmembrane protein belonging to the immunoglobulin superfamily (Figure 1B). Upon binding of the extracellular domain of RAGE to its ligands, the cytoplasmic domain of this receptor is phosphorylated at Ser391 by PKC ζ . Consequently, this leads to the recruitment of MAL and MyD88, further inducing a recruitment of IRAK4, activation of the downstream effector kinases and finally production of inflammatory cytokines through activation of NF- κ B. RAGE and TLR-2/4 partly share an intracellular signaling pathway. These receptors display a precise motif in the intracellular domain (Q residue followed by three successive negatively charged residues), which, upon phosphorylation, enhances its affinity to MAL (55, 56). During infection, such as tuberculosis (Tb), the RAGE pathway is modulated (57). Since MAL is implicated in this signaling pathway, mutations in the adaptor could certainly impact on disease severity. It was shown that PKC ζ is upregulated during Tb progression, which increases effector killing functions (58). As PKC ζ facilitates the recruitment of MAL to RAGE, it becomes an interesting way of investigation to decipher MAL's role during *Mtb* infection. Furthermore, co-morbidities such as diabetes are known to increase the amount of RAGE ligands, which could influence MAL functions during infection (59). Based on these observations, we can legitimately assume that MAL is implicated in other unknown pathways.

HOW IS MAL REGULATED AND DEGRADED?

The PEST domain of MAL undergoes phosphorylation and polyubiquitination of lysine residues targeting degradation via the 26S proteasome. Mansell et al., demonstrated that

TABLE 1 | Effect of MAL deficiency during infectious and non-infectious diseases.

Host	Pathogen	Disease	Genotype	Effect	References
Mice	<i>Escherichia coli</i>	Bacteraemia	MAL/Tirap Knock-out	Protection	(13)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	MAL/Tirap Knock-out	None	(14)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia	MAL/Tirap Knock-out	Protection	(14)
	<i>Bordetella pertussis</i>	Whooping cough	MAL/Tirap Knock-out	Protection	(15)
	<i>Salmonella enterica</i>	Salmonellosis	MAL/Tirap Knock-out	None	(16, 17)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap Knock-out	Protection	(18)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap S200L	None	(19)
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas disease	MAL/Tirap Knock-out	Susceptibility	(8)
	<i>Herpes simplex</i>	Herpes	MAL/Tirap Knock-out	Protection	(20)
	–	Colorectal cancer	MAL/Tirap Knock-out	predicted susceptibility	(21)
Human	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap Knock-out	Susceptibility	(22)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap S180L	Susceptibility	(23–27)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap S180L	None	(28)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap S180L	Protection	(29–32)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap S55N	None	(23)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap D96N	Susceptibility	(26)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	MAL/Tirap A186A	Susceptibility	(23)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumococcal disease	MAL/Tirap S180L	Protection	(24, 33)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumococcal disease	MAL/Tirap 180L homozygous	Susceptibility	(33)
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas disease	MAL/Tirap S180L	Protection	(34)
	<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria	MAL/Tirap S180L	Protection	(24, 35, 36)
	<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria	MAL/Tirap S180L	None	(37)
	<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria	MAL/Tirap S180L	Susceptibility	(38, 39)
	<i>Haemophilus influenzae B</i>	Vaccine failure	MAL/Tirap S180L	Protection	(40, 41)
	HIV-1	AIDS	MAL/Tirap S180L	Protection	(42)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcal disease	MAL/Tirap R121W	Susceptibility	(43)
	<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis and peptic ulcer	MAL/Tirap S180L	Protection	(44)
	–	Lupus Erythematosus	MAL/Tirap S180L	Protection	(25, 45)
	–	Rheumatoid arthritis	MAL/Tirap S180L	None	(40)
	–	Rheumatoid arthritis	MAL/Tirap overexpression	Susceptibility	(46)
–	Behçet's disease	MAL/Tirap S180L	Protection	(47)	
–	Behçet's disease	MAL/Tirap S180L	None	(48)	
–	Gastric cancer	MAL/Tirap C558T	Susceptibility	(49)	
–	Lymphoma	MAL/Tirap R81C	Susceptibility	(50)	
–	Atopic dermatitis	MAL/Tirap S180L	Protection	(51)	
–	Atopic dermatitis	MAL/Tirap Q101Q	Protection	(51)	

stimulation of both TLR-2 and TLR-4 induced MAL degradation within 15–30 min after stimulation in order to avoid chronic inflammation. The degradation of MAL is a consequence of its polyubiquitination, which occurs via the SH2 domain of SOCS-1 and subsequent recruitment of the ubiquitin machinery (60). Tyrosine phosphorylation of MAL *via* Btk is necessary for the SOCS-1-mediated degradation. Moreover, MAL ubiquitination and degradation was also shown to be mediated by Cytoplasmic Linker Protein 170 (CLIP170) that is implicated in regulation of microtubule dynamics, cell migration and intracellular transport (7, 61). A study also demonstrated that MAL phosphorylation at Thr28 within its PBM reduces PI interactions

and cell membrane targeting, leading to its ubiquitination and degradation (62).

Moreover, limiting the amount of PIP₂ at the plasma membrane would prevent an exacerbated inflammation. Aksoy et al., showed in DCs that the interaction of MAL with phosphoinositol-3 kinases (PI3K) converts PIP₂ to PIP₃ and leads to the shedding of its membrane anchor sites. The change in the PIP₂/PIP₃ ratio favored the redistribution of MAL into the cytosol, where it was thus degraded. Moreover, TLR-4 is internalized, inactivating its downstream signaling pathway (1, 7).

ARE TLR/MAL-DERIVED INFLAMMATORY RESPONSES HELPFUL IN FIGHTING DISEASES?

In the context of whooping cough, a pulmonary infection caused by *Bordetella pertussis*, the absence of MAL induced susceptibility to the infection in mouse lungs with exacerbated dissemination leading to death (15). In this setting, MAL impacted on early local pro-inflammatory cytokine production by alveolar macrophages in lungs and prevented apoptosis-induced cell death and depletion of alveolar macrophages. As expected through this example, loss of function in MAL decreases the inflammatory response which leads to susceptibility to the infection. However, MAL biology is not as straightforward in other models for which the level of TLR/MAL-derived inflammation will strongly impact the severity of the disease. The impact of S180L polymorphism was deeply investigated. In a group of Pakistani population, it was observed that the 180L allele frequency is higher than that of the 180S allele in patients infected with *Plasmodium*, the causative agent of malaria, demonstrating that MAL deficiency enhances 3.000 times the chance of acquiring malaria caused by *Plasmodium falciparum* (35). In a cohort of adults from India, the heterozygous S180L mutation led to an optimal release of TNF- α that was shown to be protective against severe *P. falciparum* infection and mortality (36). Several studies also focused on the implication of MAL S180L polymorphism during Tb resulting in confusing conclusions. Indeed, S180L SNP has been often associated with protection. Capparelli et al., demonstrated that MAL S180L conferred resistance against Tb in heterozygous individuals, showing that those subjects displayed intermediate levels of IFN- γ , TNF- α or nitric oxide (NO), which helped to control the infection (29). Together, these results suggest that an intermediate level of inflammation decreases the severity of the pathology leading to a better protection to some pathogens that normally take advantage of an exacerbated inflammation.

Whereas MAL signaling was long considered important for antimicrobial immunity, recent studies demonstrated that genetic impairments in MAL are also associated with tumorigenesis. Interestingly, MAL overexpression was reported in ~20% of investigated lymphoma, and a whole exome sequencing in human recently revealed that MAL SNP R81C activated its downstream signaling to enhance NF- κ B gene expression, whose constitutive activity is characteristic of B cell lymphoma (50, 63). It became clear that TLR/MAL-dependent inflammation strongly influences disease control with versatile consequences.

DOES MAL HAVE IMMUNOREGULATORY PROPERTIES?

Following the hypothesis that negative feedback could avoid chronic inflammation and septic shock, a putative immunoregulatory role of MAL was investigated (20, 64). Mellett et al., demonstrated that MAL is the unique TIR adaptor protein capable of activating cyclic adenosine monophosphate (c-AMP) Response Element-binding proteins (CREB), a key

transcription factor that mediates regulation of gene expression. They showed that MAL-induced phosphorylation of CREB was induced by LPS that stimulated TLR-4, suggesting a positive feedback system in dysregulated inflammatory responses, where MAL induces the production of IL-10 and cyclooxygenase 2 (COX-2). During *Trypanosoma cruzi* infection, the causative agent of Chagas disease, it was shown in a mouse model of infection that MAL deficiency is associated to exacerbated inflammation, similarly to TLR-2 deficient mice, leading to decreased parasitemia and delayed mortality (20). Moreover, authors distinguished between pro-inflammatory Ly6C^{hi}TLR2^{hi} and anti-inflammatory Ly6C^{lo}TLR2^{hi} splenic monocytes and demonstrated that MAL was associated with cytokine production by the immunosuppressive population after triggering TLR-2 or TLR-9.

The confusing role of MAL could be explained by the fact that MAL induces both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses depending on the stimulated receptor and the targeted cell population. For example, *Mtb* is known to colonize different cell types and organs depending on the chronicity of the infection (65), possibly inducing different levels of inflammation. For instance, Russell's team demonstrated that *Mtb* grows differentially within interstitial macrophages compared to alveolar macrophages, which are more permissive to infection (66). The involvement of MAL in the immune response to *Mtb* infection in these two macrophage subtypes could provide new insights in the versatility of MAL functions.

CAN ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES COMPENSATE A LACK OF INNATE IMMUNE RESPONSES?

During *Staphylococcus aureus* infection, the rare human SNP R121W was identified to impair the interaction of MAL with MyD88, TLR-2 and TLR-4 (43). The effect of this SNP, initially predicted deleterious, resulted in increased compensatory adaptive immune responses and decreased invasive hematogenous infections in children (Figure 1C). This demonstrated that MAL not only affects innate immune responses but also adaptive immunity through not yet understood mechanisms.

WHAT ARE THE INTERACTIONS BETWEEN MAL AND PATHOGENS?

To counteract immune response activation triggered by PAMPs detection by PRRs, several pathogenic bacteria express virulence factors, such as TIR domain-containing proteins, to perturb TIR-dependent interactions, which are essential in the initiation of innate immune responses (67–69). Salcedo's team demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* PA7 has a TIR domain-containing protein called PumA (*Pseudomonas* UBAP1 modulator A) conferring the ability to downmodulate innate immune responses (70). Indeed, PumA was translocated into host cells during infection to directly interact with MAL at the plasma membrane controlling TLR signaling. Similarly,

Brucella produces a TIR domain-containing protein (TcpB/Btp1) to selectively target MAL and inhibit NF- κ B activation, which is essential for intracellular *Brucella* survival and replication (Figure 1C) (71). Moreover, TcpB/Btp1 was also described to target CLIP170 enhancing MAL proteasome-mediated degradation (61). Furthermore, a number of viral proteins were described to interfere with innate immune signaling, highlighting the implication of the TLR pathway in antiviral immunity (72). Among them, the poxvirus protein A46 was identified to inhibit TLR-4 signaling by interfering physically with MAL (73, 74). It is of interest to investigate if other pathogens are also able to physically modulate MAL signaling to determine whether its deficiency could interfere with the progression of infection. To answer this question, bioinformatics might be useful to identify potential effectors that may interact with MAL.

IS MAL ALONE RESPONSIBLE OF ITS VERSATILITY?

Epistasis is a gene-gene interaction that influences a phenotype. As MAL interacts with numerous proteins, it is possible that genetic variations in these partners could modulate its signaling. Fulgione et al., investigated an epistatic interaction between MyD88 and MAL during *Helicobacter pylori* infection. A cohort study revealed that heterozygosity for S180L confer increased resistance to infection, which was found associated with a low level of IL-6, COX-2, TNF- α , and IL-1 β production. Regardless of MAL, polymorphism in MyD88 alone did not influence the infection. However, in some combinations with MAL, MyD88 has an effect on the risk of infection. Together with MAL S180L, certain polymorphisms in MyD88 confer higher protection providing evidence of an epistatic interaction occurring between the two genes (44). The same polymorphic sites have also been documented to act epistatically against *Mtb* infection as well (29). These results showed that epistasis could play a key role in MAL versatility.

CONCLUSION

Impairment of MAL expression in diseases result in some controversy. These discrepant findings about the differential effect of MAL during diseases could simply represent

heterogeneity of association in different populations, which is well described for many immunogenetic polymorphisms (75). Frequencies of polymorphisms in MAL can vary among different races. This difference, along with gene-gene interactions, environmental and cultural factors, and variations in microbial strains make understanding the observed differences between ethnic groups even more complicated. Moreover, the size of the selected populations in different cohort studies can vary. This can impact the power of detection of small effects due to a rare mutation.

More investigations are still needed to characterize the contribution of MAL in each setting and to reach understanding of its impact on immune response to infection. In particular, the severity of the disease and its inflammatory status seem to have an essential impact. Deeper characterization of the local environments that are less favorable for the pathogen to survive may bring some cues.

In the emerging field of host-directed therapies to intracellular pathogens, TLRs and their adaptor proteins were proposed as putative targets for the treatment of inflammatory disorders and to overcome microbial resistance (76). For example, Gefitinib, Phycocyanin and other peptides were recently studied for their inhibiting effect on MAL in the context of endotoxic injury, lung cancers and autoimmune diseases, respectively, showing promising results (77–80).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors participated in the concept, preparation, and writing of the manuscript.

FUNDING

Financial support for this work was provided by the European Community (CyeloNHit no. 608407, ERC-STG INTRACELLTB no. 260901), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-EQPX-04-01, ANR-14-CE08-0017, ANR-16-CE35-0009, ANR-16-IDEX-0004 ULNE), the Projet Transversal de l'Institut Pasteur (PTR441, PTR22-16), the EMBO Young Investigator Program, the Feder [12001407 (D-AL) Equipex Imaginex BioMed], the Région Hauts-de-France (convention no. 12000080), and the Fondation pour la Recherche Medicale (SPF20170938709).

REFERENCES

- Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* (2017) 17:376–90. doi: 10.1038/nri.2017.25
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* (2010) 11:373–84. doi: 10.1038/ni.1863
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* (2015) 33:257–90. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* (2002) 420:329–33. doi: 10.1038/nature01180
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* (2002) 420:324–9. doi: 10.1038/nature01182
- Bernard NJ, O'neill LA. Mal, more than a bridge to MyD88. *IUBMB Life.* (2013) 65:777–86. doi: 10.1002/iub.1201
- Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilagy A, Banoczi Z, et al. On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem.* (2004) 279:20775–85. doi: 10.1074/jbc.M313873200
- Ni Cheallaigh C, Sheedy FJ, Harris J, Munoz-Wolf N, Lee J, West K, et al. A common variant in the adaptor mal regulates interferon gamma signaling. *Immunity.* (2016) 44:368–79. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.019

9. Patra MC, Choi S. Insight into phosphatidylinositol-dependent membrane localization of the innate immune adaptor protein toll/interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein. *Front Immunol.* (2018) 9:75. doi: 10.3389/fimmu.2018.00075
10. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* (2006) 125:943–55. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.047
11. Hughes MM, Lavrencic P, Coll RC, Ve T, Ryan DG, Williams NC, et al. Solution structure of the TLR adaptor MAL/TIRAP reveals an intact BB loop and supports MAL Cys91 glutathionylation for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:E6480–9. doi: 10.1073/pnas.1701868114
12. Gong L, Wang H, Sun X, Liu C, Duan C, Cai R, et al. Toll-Interleukin 1 Receptor domain-containing adaptor protein positively regulates BV2 cell M1 polarization. *Eur J Neurosci.* (2016) 43:1674–82. doi: 10.1111/ejn.13257
13. Jayaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, et al. Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is critical for early lung immune responses against *Escherichia coli* lipopolysaccharide and viable *Escherichia coli*. *J Immunol.* (2005) 175:7484–95. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7484
14. Jayaseelan S, Young SK, Yamamoto M, Arndt PG, Akira S, Kolls JK, et al. Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein (TIRAP) is a critical mediator of antibacterial defense in the lung against *Klebsiella pneumoniae* but not *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol.* (2006) 177:538–47. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.538
15. Bernard NJ, Finlay CM, Tannahill GM, Cassidy JB, O'Neill LA, Mills KH. A critical role for the TLR signaling adapter Mal in alveolar macrophage-mediated protection against *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 8:982–92. doi: 10.1038/mi.2014.125
16. Jerke S, Srinivasan A, Mccorley SJ. Expression of Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein. (TIRAP) is detrimental to primary clearance of *Salmonella* and is not required for the generation of protective immunity. *Immunol Lett.* (2008) 116:64–71. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.007
17. Talbot S, Totemeyer S, Yamamoto M, Akira S, Hughes K, Gray D, et al. Toll-like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunology.* (2009) 128:472–83. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03146.x
18. Corr SC, Palsson-Mcdermott EM, Grishina I, Barry SB, Aviello G, Bernard NJ, et al. MyD88 adaptor-like. (Mal) functions in the epithelial barrier and contributes to intestinal integrity via protein kinase C. *Mucosal Immunol.* (2014) 7:57–67. doi: 10.1038/mi.2013.24
19. Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, et al. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* (2007) 179:1178–89. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.1178
20. Gravina HD, Goes AM, Murta SM, Ropert C. MyD88 adapter-like. (Mal)/TIRAP is required for cytokine production by splenic Ly6CloTLR2hi but not by Ly6ChiTLR2hi Monocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* (2016) 291:23832–41. doi: 10.1074/jbc.M116.729509
21. Bonham KS, Orzalli MH, Hayashi K, Wolf AI, Glanemann C, Weninger W, et al. A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell.* (2014) 156:705–16. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.019
22. Aviello G, Corr SC, Johnston DG, O'Neill LA, Fallon PG. MyD88 adaptor-like. (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2014) 306:G769–78. doi: 10.1152/ajpgi.00399.2013
23. Hawn TR, Dunstan SJ, Thwaites GE, Simmons CP, Thuong NT, Lan NTN, et al. A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. *J Infect Dis.* (2006) 194:1127–34. doi: 10.1086/507907
24. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet.* (2007) 39:523–8. doi: 10.1038/ng1976
25. Castiblanco J, Varela DC, Castano-Rodriguez N, Rojas-Villarraga A, Hincapié ME, Anaya JM. TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. *Infect Genet Evol.* (2008) 8:541–4. doi: 10.1016/j.meegid.2008.03.001
26. Zhang YX, Xue Y, Liu JY, Zhao MY, Li FJ, Zhou JM, et al. Association of TIRAP (MAL) gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in a Chinese population. *Genet Mol Res.* (2011) 10:7–15. doi: 10.4238/vol10-1gmr980
27. Sanchez D, Lefebvre C, Rioux J, Garcia LF, Barrera LF. Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population. *Int J Immunogenet.* (2012) 39:216–23. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01077.x
28. Selvaraj B, Harishankar M, Singh B, Jawahar MS, Banurekha VV. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis.* (2010) 90:306–10. doi: 10.1016/j.tube.2010.08.001
29. Capparelli R, De Chiara F, Di Matteo A, Medaglia C, Iannelli D. The MyD88 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to human pulmonary tuberculosis. *Genes Immun.* (2013) 14:504–11. doi: 10.1038/gene.2013.48
30. Nejentsev S, Thyse T, Szeszko JS, Stevens H, Balabanova Y, Chinbush AM, et al. Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations. *Nat Genet.* (2008) 40:261–2; author reply 262–263. doi: 10.1038/ng0308-261
31. Miao R, Li J, Sun Z, Xu F, Shen H. Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis.* (2011) 91:268–72. doi: 10.1016/j.tube.2011.01.006
32. Liu Q, Li W, Li D, Feng Y, Tao C. TIRAP C539T polymorphism contributes to tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Infect Genet Evol.* (2014) 27:32–9. doi: 10.1016/j.meegid.2014.06.025
33. Siebert JN, Hamann L, Veroleto CM, Gameiro C, Grillet S, Siegrist CA, et al. Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein 180L single-nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to recurrent pneumococcal lower respiratory tract infections in children. *Front Immunol.* (2018) 9:1780. doi: 10.3389/fimmu.2018.01780
34. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Borba SC, Teixeira PC, Ferreira SC, et al. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis.* (2009) 199:1838–45. doi: 10.1086/599212
35. Nawaz SK, Ahmed B, Arshad N, Rani A, Rasool H, Arshad M. Role of S180L polymorphism in etiology of malaria caused by *Plasmodium falciparum* in a small group of Pakistani population. *Bosn J Basic Med Sci.* (2015) 15:20–3. doi: 10.17305/bjbm.2015.413
36. Panda AK, Das BK, Panda A, Tripathy R, Pattnaik SS, Mahto H, et al. Heterozygous mutants of TIRAP. (S180L) polymorphism protect adult patients with *Plasmodium falciparum* infection against severe disease and mortality. *Infect Genet Evol.* (2016) 43:146–50. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.035
37. Esposito S, Molteni CG, Zampiero A, Baggi E, Lavizzari A, Semino M, et al. Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J.* (2012) 11:196. doi: 10.1186/1475-2875-11-196
38. Zakeri S, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadjid ND. Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar J.* (2011) 10:77. doi: 10.1186/1475-2875-10-77
39. Rani A, Nawaz SK, Irfan S, Arshad M, Bashir R, Shaheen N. Role of MyD88-adaptor-like gene polymorphism rs8177374 in modulation of malaria severity in the Pakistani population. *Braz J Infect Dis.* (2017) 21:418–23. doi: 10.1016/j.bjid.2017.04.002
40. Sheedy FJ, Marinou I, O'Neill LA, Wilson AG. The Mal/TIRAP S180L and TLR4 G299D polymorphisms are not associated with susceptibility to, or severity of, rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2008) 67:1328–31. doi: 10.1136/ard.2007.083337
41. Ladhani SN, Davila S, Hibberd ML, Heath PT, Ramsay ME, Slack MR, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in Mal/TIRAP and interleukin-10 genes and susceptibility to invasive haemophilus influenzae serotype b infection in immunized children. *Clin Infect Dis.* (2010) 51:761–7. doi: 10.1086/656236

42. Papadopoulos AI, Ferwerda B, Antoniadou A, Sakka V, Galani L, Kavatha D, et al. Association of Mal/TIRAP S180L variant polymorphism with decreased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection. *Cytokine*. (2012) 60:104–7. doi: 10.1016/j.cyto.2012.05.008
43. Israel L, Wang Y, Bulek K, Della Mina E, Zhang Z, Pedergnana V, et al. Human adaptive immunity rescues an inborn error of innate immunity. *Cell*. (2017) 168:789–800 e710. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.039
44. Fulgione A, Di Matteo A, Contaldi F, Manco R, Ianniello F, Incerti G, et al. Epistatic interaction between MyD88 and TIRAP against *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett*. (2016) 590:2127–37. doi: 10.1002/1873-3468.12252
45. Rupasree Y, Naushad SM, Rajasekhar L, Uma A, Kutala VK. Association of TLR4 (D299G, T399I), TLR9–1486T>C, TIRAP S180L and TNF-alpha promoter (-1031,-863,-857) polymorphisms with risk for systemic lupus erythematosus among South Indians. *Lupus*. (2015) 24:50–7. doi: 10.1177/0961203314549792
46. Sacre SM, Andreaskos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. (2007) 170:518–25. doi: 10.2353/ajpath.2007.060657
47. Durrani O, Banahan K, Sheedy FJ, McBride L, Ben-Chetrit E, Greiner K, et al. TIRAP Ser180Leu polymorphism is associated with Behçet's disease. *Rheumatology*. (2011) 50:1760–5. doi: 10.1093/rheumatology/ker200
48. Turunc G, Coskun D, Albaz-Oner F, Coit B, Duzgun N, Alpsoy E, et al. TIR-domain-containing adaptor protein gene TIRAP S180L polymorphism is not increased in Behçet's disease patients in two ethnic cohorts. *Clin Exp Rheumatol*. (2013) 31:54–6.
49. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Pardo AL, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. Genetic polymorphisms in the Toll-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer. *Hum Immunol*. (2014) 75:808–15. doi: 10.1016/j.humimm.2014.06.001
50. Burkhard R, Keller I, Arambasic M, Juskevicius D, Tzankov A, Lundberg P, et al. TIRAP p.R81C is a novel lymphoma risk variant which enhances cell proliferation via NF-kappaB mediated signaling in B-cells. *Haematologica*. (2019) 104:766–77. doi: 10.3324/haematol.2018.201590
51. An Y, Ohnishi H, Matsui E, Funato M, Kato Z, Teramoto T, et al. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med*. (2011) 27:795–801. doi: 10.3892/ijmm.2011.645
52. Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead MA, et al. The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol*. (2012) 13:1045–54. doi: 10.1038/ni.2426
53. Zyzak J, Miśkiewicz M, Leszczynska E, Reniewicz P, Moynagh PN, Siednienko J. HSV-1/TLR9-Mediated IFNbeta and TNFalpha induction is Mal-dependent in macrophages. *J Innate Immunity*. (2019) 12:387–98. doi: 10.1159/000504542
54. Shan S, Liu R, Jiang L, Zhu Y, Li H, Xing W, et al. Carp Toll-like receptor 8 (Tlr8): An intracellular Tlr that recruits TIRAP as adaptor and activates AP-1 pathway in immune response. *Fish Shellfish Immunol*. (2018) 82:41–9. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.001
55. Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, et al. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS ONE*. (2011) 6:e23132. doi: 10.1371/journal.pone.0023132
56. Teissier T, Boulanger E. The receptor for advanced glycation end-products. (RAGE) is an important pattern recognition receptor. (PRR) for inflamming. *Biogerontology*. (2019) 20:279–301. doi: 10.1007/s10522-019-09808-3
57. Lui G, Wong CK, Ip M, Chu YJ, Yung IM, Cheung CS, et al. HMGB1/RAGE signaling and pro-inflammatory cytokine responses in non-HIV adults with active pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0159132. doi: 10.1371/journal.pone.0159132
58. Parihar SP, Ozturk M, Marakalala MJ, Loots DT, Hurdalay R, Maasdorp DB, et al. Protein kinase C-delta. (PKCδ), a marker of inflammation and tuberculosis disease progression in humans, is important for optimal macrophage killing effector functions and survival in mice. *Mucosal Immunol*. (2018) 11:496–511. doi: 10.1038/mi.2017.68
59. Kumar NB, Moideen K, Nancy A, Viswanathan V, Shruthi BS, Sivakumar S, et al. Systemic RAGE ligands are upregulated in tuberculosis individuals with diabetes co-morbidity and modulated by anti-tuberculosis treatment and metformin therapy. *BMC Infect Dis*. (2019) 19:1039. doi: 10.1186/s12879-019-4648-1
60. Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray B, Fenner JE, Crack PJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol*. (2006) 7:148–55. doi: 10.1038/ni1299
61. Jakka P, Bhargavi B, Namani S, Murugan S, Splitter G, Radhakrishnan G. Cytoplasmic linker protein CLIP170 negatively regulates TLR4 signaling by targeting the TLR adaptor protein TIRAP. *J Immunol*. (2018) 200:704–14. doi: 10.4049/jimmunol.1601559
62. Zhao X, Xiong W, Xiao S, Tang TX, Ellens JF, Armstrong GS, et al. Membrane targeting of TIRAP is negatively regulated by phosphorylation in its phosphoinositide-binding motif. *Sci Rep*. (2017) 7:43043. doi: 10.1038/srep43043
63. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. (2018) 24:679–90. doi: 10.1038/s41591-018-0016-8
64. Mellett M, Atzei P, Jackson R, O'Neill LA, Moynagh PN. Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. *J Immunol*. (2011) 186:4925–35. doi: 10.4049/jimmunol.1002739
65. Cohen SB, Gern BH, Delahaye JL, Adams KN, Plumlee CR, Winkler JK, et al. Alveolar macrophages provide an early *Mycobacterium tuberculosis* niche and initiate dissemination. *Cell Host Microbe*. (2018) 24:439–46 e434. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.001
66. Huang L, Nazarova EV, Tan S, Liu Y, Russell DG. Growth of *Mycobacterium tuberculosis in vivo* segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med*. (2018) 215:1135–52. doi: 10.1084/jem.20172020
67. Salcedo SB, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, et al. BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol*. (2013) 3:28. doi: 10.3389/fcimb.2013.00028
68. Rosadini CV, Kagan JC. Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol*. (2015) 32:61–70. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.011
69. Rosadini CV, Zanoni I, Odendall C, Green ER, Paczosa MK, Philip NH, et al. A single bacterial immune evasion strategy dismantles both MyD88 and TRIF signaling pathways downstream of TLR4. *Cell Host Microbe*. (2015) 18:682–93. doi: 10.1016/j.chom.2015.11.006
70. Imbert PR, Louche A, Luizet JB, Grandjean T, Bigot S, Wood TE, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors. *EMBO J*. (2017) 36:1869–87. doi: 10.15252/embj.201695343
71. Li W, Ke Y, Wang Y, Yang M, Gao J, Zhan S, et al. Brucella TIR-like protein TcpB/Btp1 specifically targets the host adaptor protein MAL/TIRAP to promote infection. *Biochem Biophys Res Commun*. (2016) 477:509–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.064
72. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. (2008) 8:911–22. doi: 10.1038/nri2436
73. Oda S, Franklin E, Khan AR. Poxvirus A46 protein binds to TIR domain-containing Mal/TIRAP via an alpha-helical sub-domain. *Mol Immunol*. (2011) 48:2144–50. doi: 10.1016/j.molimm.2011.07.014
74. Stack J, Bowie AG. Poxviral protein A46 antagonizes Toll-like receptor 4 signaling by targeting BB loop motifs in Toll-IL-1 receptor adaptor proteins to disrupt receptor/adaptor interactions. *J Biol Chem*. (2012) 287:22672–82. doi: 10.1074/jbc.M112.349225
75. Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. (2002) 186:1463–8. doi: 10.1086/344891
76. Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov*. (2018) 17:35–56. doi: 10.1038/nrd.2017.162
77. Hao S, Li S, Wang J, Yan Y, Ai X, Zhang J, et al. Phycocyanin exerts anti-proliferative effects through down-regulating TIRAP/NF-kappaB activity in human non-small cell lung cancer cells. *Cells*. (2019) 8:588. doi: 10.3390/cells8060588

78. Srivastava M, Saqib U, Banerjee S, Wary K, Kizil B, Muthu K, et al. Inhibition of the TIRAP-c-Jun interaction as a therapeutic strategy for AP1-mediated inflammatory responses. *Int Immunopharmacol.* (2019) 71:188–97. doi: 10.1016/j.intimp.2019.03.031
79. Achek A, Kwon HK, Patra MC, Shah M, Hong R, Lee WH, et al. A peptide derived from the core beta-sheet region of TIRAP decoys TLR4 and reduces inflammatory and autoimmune symptoms in murine models. *EBioMedicine.* (2020) 52:102645. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102645
80. Shah M, Kim GY, Achek A, Cho EY, Baek WY, Choi YS, et al. The alphaChelix of TIRAP holds therapeutic potential in TLR-mediated autoimmune diseases. *Biomaterials.* (2020) 245:119974. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119974

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

Copyright © 2020 Belhaouane, Hoffmann, Chamailard, Brodin and Machelart. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Pathogénèse de la tuberculose

3.1. La tuberculose, pertinence pour la santé mondiale

3.1.1. Généralités

La tuberculose (TB) est une maladie ancienne. L'étude des squelettes humains montre qu'elle affecte l'homme depuis des milliers d'années (Hershkovitz et al., 2015). L'agent étiologique de la TB est resté inconnu jusqu'au 24 mars 1882, lorsque Robert Koch a découvert le bacille responsable de la maladie, nommé par la suite *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Sakula, 1982). La TB est donc une maladie infectieuse qui affecte essentiellement les poumons. D'autres formes de TB, appelées TB extra pulmonaires, touchent d'autres parties du corps telles que les méninges et les ganglions lymphatiques, les os, les articulations et les reins. Ces formes sont plus fréquentes chez les sujets immunodéprimés (Golden & Vikram, 2005). La transmission de la maladie se produit généralement lors de l'inhalation de fines gouttelettes aéroportées contenant des bactéries émises par un patient symptomatique (généralement par la toux). Du point de vue clinique, la dynamique des spectres de la maladie va d'une infection tuberculeuse asymptomatique et non transmissible, déclarée comme infection tuberculeuse latente (LTBI), à une maladie tuberculeuse transmissible très active (Getahun, Matteelli, Chaisson, & Raviglione, 2015).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a considéré la TB comme une urgence mondiale pour la première fois en 1993. C'est l'une des dix premières causes de décès dans le monde et la deuxième cause de décès due à un seul agent infectieux (se classant après la Covid-19 et avant le VIH/SIDA depuis 2007). En 2020, plus de 1,5 million de personnes sont mortes de cette maladie et on estime à 10 millions le nombre de personnes atteintes de TB chaque année dans le monde (WHO, 2021).

La TB peut toucher n'importe qui n'importe où, mais la plupart des personnes qui développent la maladie (environ 90 %) sont des adultes avec plus de cas chez les hommes que chez les femmes. La distribution des cas de TB dans le monde se concentre en Asie du Sud-Est (43%) et l'Inde représente le pays le plus touché, avec 26 % des cas. Parmi tous les cas de TB, 8 % sont des personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La proportion de cas de TB coinfectés par le VIH est plus élevée dans les pays africains de l'OMS, dépassant 50 % dans certaines parties de l'Afrique australe (WHO, 2021).

3.1.2. Prévention

a. Le vaccin BCG

Découvert par Calmette et Guérin en 1921 à partir d'une souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis*, le vaccin BCG est actuellement le seul vaccin utilisé dans le monde pour prévenir de la TB. Des études montrent que la protection vaccinale par le BCG varie considérablement selon l'âge du

patient, la situation endémique du pays et la forme de TB (pulmonaire ou extra-pulmonaire) (Ahmed et al., 2021). De plus, l'immunité induite par le vaccin diminue avec le temps et assure une protection maximale de 10 à 20 ans (Rodrigues, Mangtani, & Abubakar, 2011). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. Au fil du temps, et en raison des différentes méthodes de culture et de production, de nombreuses souches vaccinales ont émergé avec des fonds génétiques différents comme BCG Pasteur, Danois, Glaxo ou Japon (Bottai & Brosch, 2016). Ces différences génétiques et phénotypiques affectent inévitablement l'efficacité du vaccin BCG tout comme la différence génétique entre les populations peut également avoir un effet (Boisson-Dupuis et al., 2015). De plus, l'immunisation à d'autres mycobactéries (non-tuberculeuses ou bactéries environnementales) confère une protection contre la TB qui n'est pas améliorée par le BCG (Ahmed et al., 2021). Ces préexpositions peuvent même diminuer l'efficacité du vaccin BCG dans les zones endémiques. Dans ce contexte, le développement d'un vaccin plus efficace contre Mtb qui protège toutes les populations reste une priorité mondiale en santé publique.

D'autres stratégies sont à l'étude pour augmenter la protection par le BCG. Une étude récente réalisée chez des macaques rhésus montre que l'administration intraveineuse du vaccin BCG augmente clairement la protection contre une infection tuberculeuse avec une réponse immunitaire renforcée (Darrah et al., 2020).

b. Nouveaux candidats vaccins antituberculeux en développement

Les nouveaux candidats vaccins antituberculeux sont classés en différentes catégories : les vaccins préventifs administrés avant l'infection par Mtb ; des vaccins préventifs injectés post-exposition pour empêcher une LTBI de devenir une TB active ; des vaccins thérapeutiques associés à un traitement antibiotique pour éliminer l'infection ou pour prévenir la réinfection. Ces vaccins candidats sont soit des vaccins dérivés de bactéries entières, soit des vaccins sous-unitaires (Fatima, Kumari, Das, & Dwivedi, 2020). Ces candidats vaccins se présentent sous différentes formes représentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1: Différentes formes vaccinales en développement

Vaccin vivant	Vaccin atténué ou inactivé	Vaccins sous-unitaires avec adjuvant	Vaccins recombinants à vecteur viral
VPM1002 - souche recombinante de BCG exprimant une listériolysine perforante de la membrane	MIP/Immuvac - <i>Mycobacterium indicus pranii</i> inactivée MTBVAC – souche clinique de Mtb contenant deux délétions dans les gènes <i>phoP</i> et <i>fadD26</i> codant pour deux facteurs de virulence majeurs	Ils sont basés sur l'administration de protéines antigéniques avec un adjuvant afin de potentialiser la réponse immunitaire de l'hôte. M72/AS01E est protéine de fusion immunogène M72 avec AS01E comme système adjuvant.	L'utilisation d'un vecteur viral permet une réponse immunitaire plus robuste aux antigènes. TB/FLU-04L est basé sur un vecteur de virus grippal atténué et non réplicatif exprimant les antigènes Ag85A et ESAT-6 de Mtb.
Ces deux formes de vaccin (bactéries entières) contiennent de nombreux composants antigéniques différents qui stimulent la réponse immunitaire de manière plus diversifiée.			

c. Facteurs de risque

Environ un quart de la population mondiale est infectée par *Mtb*, ce qui équivaut à environ 2 milliards de personnes. Une proportion relativement faible (5 à 10 %) développera une maladie active au cours de sa vie. Cependant, la probabilité de développer une maladie active est beaucoup plus élevée chez les personnes vivant avec le VIH et chez les personnes affectées par des facteurs de risque tels que la dénutrition, le diabète, le tabagisme et la consommation d'alcool.

Les infections à *Mtb* et au VIH sont co-endémiques dans plusieurs régions du monde. Les personnes infectées par le VIH sont 15 à 21 fois plus susceptibles de développer la TB et, en 2020, la TB associée au VIH était responsable de 214 000 décès (WHO, 2021). Les individus coinfectés par *Mtb*/VIH ont moins de lymphocytes T CD4 circulants spécifiques de *Mtb* et les cellules encore présentes sont fonctionnellement altérées. L'infection par le VIH interfère de manière significative avec les réponses systémiques des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires induites par *Mtb*. En résumé, l'infection par le VIH altère l'immunité fonctionnelle spécifique à *Mtb* (Amelio et al., 2019).

La prévalence du diabète sucré augmente dans le monde et 370 000 cas de TB en 2020 étaient associés au diabète (WHO, 2021). Bien que les diabètes de type 1 et de type 2 (DT2) soient associés à une susceptibilité accrue à la TB, le DT2 est plus répandu. En effet, le risque accru de TB découle probablement des conséquences métaboliques et inflammatoires de l'hyperglycémie chronique. Les macrophages alvéolaires de patients atteints de DT2 ont une capacité réduite à phagocyter *Mtb* attribuée à la diminution de l'expression des récepteurs de surface reconnaissant les bactéries

(Martinez, Ketheesan, West, Vallerskog, & Kornfeld, 2016), et un dysfonctionnement lysosomal les empêchant de contrôler la réplication de Mtb (Vrieling et al., 2019). En plus des macrophages, le nombre total de neutrophiles est augmenté chez les patients tuberculeux atteints de DT2, et les neutrophiles de ces individus sont moins capables de phagocyter Mtb (Raposo-García et al., 2017).

Le tabagisme augmente de 2 fois le risque de développer une TB (WHO, 2021). Plusieurs études ont montré que l'exposition à la fumée de cigarette diminue l'activation des lymphocytes T dans les poumons, engendre une morphologie anormale des macrophages qui produisent moins de cytokines pro-inflammatoires et augmente la charge bactérienne pulmonaire (Berg et al., 2016; Feng et al., 2011; O'Leary et al., 2014).

Environ 800 000 cas de TB en 2020 étaient associés à l'abus d'alcool (WHO, 2021). L'alcool a des effets immunosuppresseurs. Des souris nourries à l'éthanol et infectées par Mtb ont des charges bactériennes plus élevées et une augmentation des niveaux d'IFN de type I dans les poumons aux dépens de la production d'IFN- γ associée à une diminution de la survie (Mason, Dobard, Zhang, & Nelson, 2004; Tripathi et al., 2018).

Bien qu'il existe de nombreuses preuves de dysfonctionnement immunitaire résultant de la malnutrition (Bourke, Berkley, & Prendergast, 2016), les mécanismes de la sensibilité à la TB ne sont pas clairs. Néanmoins, des études suggèrent un risque multiplié par 6 à 10 de développer une tuberculose active en cas de malnutrition (Cegielski & McMurray, 2004).

Des différences physiologiques peuvent également expliquer la différence de susceptibilité à la TB entre les sexes. En effet, les hormones sont connues pour avoir des effets divers sur de nombreux types de cellules immunitaires, notamment les DC, les macrophages et les cellules NK. Par exemple, l'œstrogène améliore l'activation des macrophages (Neyrolles & Quintana-Murci, 2009). L'œstrogène stimule la sécrétion d'INF- γ , de TNF- α et d'IL-12 (une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la défense immunitaire contre le MTB) et inhibe la production d'IL-10 (une cytokine anti-inflammatoire) (Nhamoyebonde & Leslie, 2014).

Plusieurs études ont suggéré l'association de facteurs génétiques de l'hôte à la sensibilité ou à la résistance à la TB dans diverses populations ethniques (Harishankar, Selvaraj, & Bethunaickan, 2018).

- Susceptibilité mendélienne aux maladies mycobactériennes : une famille a développé une maladie à mycobactéries faiblement virulentes liée à un polymorphisme sur neuf gènes caractérisés (IFNGR1-2, STAT1, IL-12RB1, IL-12B, IRF8, ISG15, TYK2, IKBG et CYBB) (Harishankar et al., 2018).

- Antigènes leucocytaires humains (HLA)² : Les polymorphismes dans les gènes HLA de classe I et de classe II peuvent altérer l'affinité de liaison aux antigènes, ce qui pourrait conduire à une présentation antigénique altérée aux lymphocytes T CD4 et T CD8. Parmi les allèles de classe I et de classe II, HLADRB1 est le plus associé à la sensibilité/protection contre la TB.
- Les récepteurs Toll-like (TLRs) : Plusieurs TLRs jouent un rôle dans le contrôle de l'infection à Mtb par le système immunitaire, notamment les TLRs 2, 4, 8 et 9 (Azad, Sadee, & Schlesinger, 2012). En conséquence, les polymorphismes de ces TLRs modulent les risques de développer une TB parmi certaines populations ethniques (Y. Zhang et al., 2013). De plus, le TLR 8 étant codé par un gène du chromosome X, des études l'ont associé à la susceptibilité à la TB pulmonaire chez les enfants de sexe masculin (Salie et al., 2015).
- Récepteur à la vitamine D (VDR) : La vitamine D exerce ses effets pléiotropes par le récepteur de la vitamine D (VDR) qui est présent dans la majorité des cellules immunitaires, y compris les macrophages, les lymphocytes B et T, les neutrophiles et les DC (Baeke et al., 2010). Une carence en vitamine D a été signalée comme étant associée à la sensibilité à la TB (Martineau et al., 2010). Il a aussi été démontré que les polymorphismes de la protéine de liaison à la vitamine D (VDBP) perturbent le profil inflammatoire lors d'une infection à Mtb (Coussens et al., 2013). Le polymorphisme VDBP est également lié à la variation ethnique et associé à la susceptibilité à la TB (Lee et al., 2016).
- Polymorphismes des gènes codant pour les cytokines et leurs récepteurs : Les polymorphismes dans le promoteur ainsi que dans la région codante de ces gènes peuvent altérer la production des cytokines et de leurs récepteurs. Des études ont rapporté l'association de certains polymorphismes des gènes de cytokines/chimiokines (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 et IL-17) avec une susceptibilité aux maladies infectieuses, y compris la TB (Harishankar et al., 2018).
- Déficience héréditaire en PD-1³ (*Programmed cell Death protein 1*) : Une étude récente a montré que sans une signalisation PD-1 appropriée, due à une déficience du gène, les lymphocytes activés peuvent devenir sujets à l'épuisement et insensibles à la suppression immunitaire. Ceci a été associé à une susceptibilité à la TB et à des maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 (Ogishi et al., 2021).

² Les HLA représentent le complexe majeur d'histocompatibilité chez l'homme. Ce sont des molécules de surfaces sur toutes les cellules nucléées de l'organisme qui sont reconnues par le système immunitaire pour distinguer les cellules du soi de celles du non-soi.

³ PD-1 est une protéine de surface exprimée par les lymphocytes T activés. La liaison de PD-1 à son ligand PD-1L exprimés par les cellules tumorales, bloque le système immunitaire qui ne reconnaît plus ces dernières pour pouvoir initier leur destruction.

- Le rôle du polymorphisme génétique du gène codant pour Tirap/ Mal, acteur important de la réponse immunitaire, dans le développement de la TB, fera l'objet de cette thèse.

3.1.3. Diagnostic et traitements

La stratégie « End TB » adoptée par l'OMS en 2014, vise à mettre fin à l'épidémie mondiale de TB dans le cadre des objectifs de développement durable récemment adoptés. Elle sert de modèle aux pays pour réduire l'incidence de la TB de 80 %, les décès dus à la TB de 90 % et éliminer les coûts catastrophiques pour les ménages touchés par la TB d'ici 2030 (WHO, 2021).

a. Diagnostic

Les méthodes couramment utilisées pour dépister et diagnostiquer la TB sont les méthodes cliniques, immunologiques, microscopiques, radiographiques et bactériennes (Acharya et al., 2020).

Les principaux symptômes de la TB pulmonaire sont la toux chronique, l'hémoptysie, la fièvre légère, les sueurs nocturnes, la perte d'appétit, les malaises, la fatigue et la perte de poids. Les symptômes de la TB extra pulmonaire dépendent des organes concernés. Elle peut par exemple se manifester par une lymphadénite ; une atteinte rénale, osseuse ou articulaire ; une méningite ; ou une maladie disséminée (miliaire) (WHO, 2021).

La radiographie pulmonaire est un outil de dépistage qui permet de différencier la TB primaire (lésion unique dans le lobe inférieur droit et hypertrophie des ganglions lymphatiques) de la TB secondaire (lésion unique (cavité) dans la région apicale, ganglions lymphatiques négligeables et multiples tubercules secondaires). Cet outil permet le dépistage de la TB pulmonaire mais n'apporte aucun diagnostic étiologique. Elle ne peut pas non plus détecter l'infection latente (Acharya et al., 2020).

La coloration acido-résistante de Ziehl-Neelsen (Z-N) des frottis d'expectoration est une méthode largement utilisée pour la détection des mycobactéries. Cependant, cette méthode ne permet pas de différencier Mtb des autres bacilles acido-résistants et nécessite une quantité de bactéries élevée dans l'échantillon pour être exploitée (Acharya et al., 2020).

La culture d'expectations pour isoler les mycobactéries est une méthode de diagnostic très sensible qui permet de détecter un minimum de 10 à 100 bacilles viables dans le volume de matériel cultivé. La spécificité de la culture pour le diagnostic de TB est supérieure à 99 %. En plus des méthodes conventionnelles de culture de Mtb en milieu solide et liquide, des méthodes de culture plus rapides comme la méthode BACTEC MGIT ont été approuvées par l'OMS en 2007 pour le diagnostic de la TB.

- Test cutané tuberculinique

Le test cutané à la tuberculine (TCT ou TST ; *Tuberculin Skin Test*) a été développé il y a environ 100 ans et est toujours utilisé comme test de dépistage initial de la TB dans les pays industrialisés pour détecter l'exposition à Mtb. Ce test est basé sur l'injection intradermique de tuberculine pour détecter la réaction immunitaire d'un individu en mesurant le diamètre de l'induration (≥ 5 mm est considéré comme positif) après 48 à 72 heures dans la zone injectée. Bien que ce test soit plus efficace pour détecter l'exposition à Mtb dans les pays où la TB est rare, ce test donne des résultats faux positifs chez les individus provenant de pays à forte prévalence, vaccinés au BCG ou infectés par des mycobactéries non tuberculeuses. La sensibilité du TST est très faible chez les personnes immunodéprimées (Acharya et al., 2020; Farhat, Greenaway, Pai, & Menzies, 2006).

- **QuantiFERON-TB Gold**

QuantiFERON-TB Gold (QFT) ou IGRA (*Interferon-gamma Release Assay*) est un test de libération d'interféron-gamma (IFN- γ) pour mesurer la réponse immunitaire à médiation cellulaire et en alternative au TST dans les pays développés. L'utilisation de l'IGRA est justifiée chez les personnes qui ne sont pas susceptibles de revenir pour une lecture du TST, ou qui ont été exposées à Mtb, à l'infection par le VIH ou à une condition immunodéprimée existante due à d'autres problèmes médicaux. Des échantillons de sang sont prélevés à l'aide de tubes revêtus d'antigène de Mtb et la libération d'IFN- γ est mesurée à l'aide d'un immunodosage enzymatique (Acharya et al., 2020).

Une protéine de surface de Mtb, appelée HBHA (*Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin*), interagit spécifiquement avec les cellules non phagocytaires. Elle exprime une activité d'hémagglutination et se lie aux glycoconjugués sulfatés. Les individus infectés de manière latente développent une forte réponse des lymphocytes T à l'HBHA, alors que les patients atteints d'une TB active ne le font pas, ce qui suggère que l'HBHA est un bon marqueur pour un diagnostic immunologique de la LTBI (Locht, Hougardy, Rouanet, Place, & Mascart, 2006).

b. Antibiothérapie et antibiorésistance

Le traitement standard pour les cas de TB active sensibles aux médicaments consiste en une phase intensive de 2 mois avec une dose quotidienne d'isoniazide (INH), de rifampicine (RIF), de pyrazinamide (PZA) et d'éthambutol (EMB) (ou streptomycine), suivie d'une phase de 4 mois d'INH et de RIF. Ce long régime de 6 mois est associé à de nombreux effets secondaires, ce qui entraîne souvent une mauvaise observance du patient. Une mauvaise observance des schémas thérapeutiques augmente le risque de rechute de la maladie et de développement d'une TB résistante aux antibiotiques. En 2020, environ 19 % des cas nouvellement traités et 43 % des cas précédemment traités présentaient une résistance à l'INH ou à la RIF (Kinsella et al., 2021). L'INH est une prodrogue qui est converti en sa forme active par la catalase peroxydase KatG de Mtb (Vilchèze

& Jacobs, 2014). La cible la mieux caractérisée de l'INH est l'enzyme essentielle à la biosynthèse de l'acide mycolique InhA. Le mécanisme le plus courant de résistance à l'INH se produit par des mutations de KatG ; plus de 300 mutations différentes de KatG ont été rapportées dans des isolats cliniques de Mtb résistants à l'INH (**Figure 2**). Une résistance accrue à l'INH peut également se produire par le biais de mutations qui diminuent l'expression de KatG, augmentent l'expression de l'InhA ou diminuent la liaison de l'INH à InhA (Vilchère & Jacobs, 2014). La résistance à l'INH est associée à l'échec du traitement, à la rechute et à la progression vers une TB multirésistante (MDR-TB, *multidrug-resistant TB*), définie comme une TB résistante à au moins l'INH et la RIF. La RIF cible la sous-unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) et empêche la transcription (W. Lin et al., 2017). Les mutations de RpoB sont responsables de plus de 90 % des résistances à la RIF dans les isolats cliniques (**Figure 2**) (Jagielski et al., 2018). La majorité des mutations RpoB sont situées dans ou près de la poche de liaison de *rpoB* à la RIF et interfèrent avec cette liaison (W. Lin et al., 2017). Des isolats cliniques de Mtb résistants à la RIF sans mutations de *rpoB* ont été signalés mais sont rares et les mécanismes ne sont pas encore entièrement compris (Jagielski et al., 2018). Les patients atteints de résistance à la RIF (RR-TB) ou de MDR-TB sont traités avec une combinaison de médicaments de deuxième ligne associés à une toxicité significative et un taux de guérison de seulement 55 %. En 2017, 8,5 % des cas de MDR-TB étaient des cas de TB ultrarésistante (XDR-TB, *extensively drug-resistant TB*), définie comme une MDR-TB avec une résistance supplémentaire à une fluoroquinolone ainsi qu'à un médicament injectable de deuxième intention (Kinsella et al., 2021). Le pronostic de la XDR-TB se rapproche de celui d'une TB non traitée. La résistance à la PZA et à l'EMB a également été isolée cliniquement. La PZA est une prodrogue qui est convertie en sa forme active, l'acide pyrazinoïque, par l'amidase pyrazinamidase codée par *pncA* (Lamont, Dillon, & Baughn, 2020). La plupart des résistances à la PZA dans les isolats cliniques de Mtb sont attribuées à des mutations de *pncA* ; cependant, des isolats résistants sans mutations dans *pncA* indiquent que d'autres mécanismes de résistance sont cliniquement pertinents (Lamont et al., 2020) (**Figure 2**). L'EMB inhibe la biosynthèse du composant de la paroi cellulaire, l'arabinogalactane (Mikusová, Slayden, Besra, & Brennan, 1995), très probablement en inhibant EmbB, qui est une glycosyltransférase transmembranaire impliquée dans la synthèse de l'arabinane. Jusqu'à 70 % des isolats cliniques résistants à l'EMB présentent des mutations dans *embB* (Sreevatsan et al., 1997). En plus d'*embB*, d'autres gènes codant pour des glycosyltransférases (opéron *embABC*) et probablement impliqués dans la biosynthèse de l'arabinane ou du lipoarabinane, peuvent être mutés pour conférer une résistance à l'EMB (L. L. Zhao et al., 2015) (**Figure 2**). De plus, des mutations dans le promoteur ou les facteurs de transcription qui contrôlent l'expression d'*embBAC*, *EmbR*, sont également couramment trouvées dans les isolats résistants à l'EMB (Plinke et al., 2010).

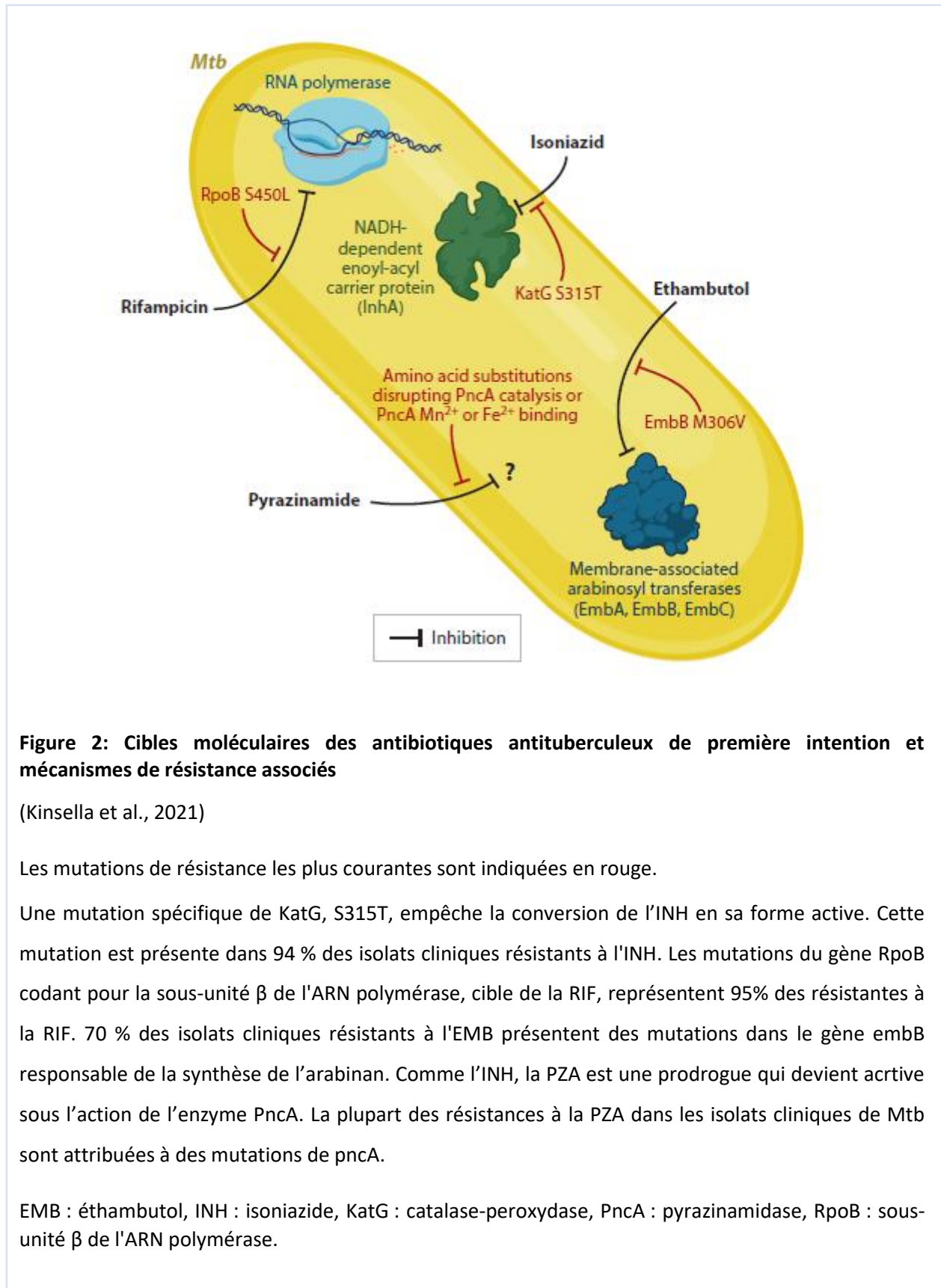


Figure 2: Cibles moléculaires des antibiotiques antituberculeux de première intention et mécanismes de résistance associés

(Kinsella et al., 2021)

Les mutations de résistance les plus courantes sont indiquées en rouge.

Une mutation spécifique de KatG, S315T, empêche la conversion de l'INH en sa forme active. Cette mutation est présente dans 94 % des isolats cliniques résistants à l'INH. Les mutations du gène RpoB codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, cible de la RIF, représentent 95% des résistantes à la RIF. 70 % des isolats cliniques résistants à l'EMB présentent des mutations dans le gène embB responsable de la synthèse de l'arabinan. Comme l'INH, la PZA est une prodrogue qui devient active sous l'action de l'enzyme PncA. La plupart des résistances à la PZA dans les isolats cliniques de Mtb sont attribuées à des mutations de pncA.

EMB : éthambutol, INH : isoniazide, KatG : catalase-peroxydase, PncA : pyrazinamidase, RpoB : sous-unité β de l'ARN polymérase.

c. Les thérapies dirigées vers l'hôte

Cette crise sanitaire, que représente la TB, est exacerbée par les co-infections et les comorbidités, l'antibiothérapie contraignante et l'émergence des souches MDR et XDR. Il est donc indispensable de développer de nouvelles thérapies innovantes pour lutter contre cette maladie.

Comme décrit plus tard dans l'introduction, le statut immunitaire joue un rôle déterminant dans l'évolution de la TB et *Mtb* détourne plusieurs mécanismes immunitaires et métaboliques de l'hôte pour établir sa niche répliquative dans le poumon et se disséminer. Les traitements d'appoint visant à « rééduquer » le système immunitaire sont des approches alternatives pour adapter les réponses antituberculeuses de l'hôte. L'utilisation des thérapies dirigées vers l'hôte (HDT) vise à accroître le succès du traitement antituberculeux en modulant ou en renforçant cette réponse immunitaire. Beaucoup d'entre ces HDT ont confirmé une manipulation thérapeutique efficace de l'immunité de l'hôte contre *Mtb* pour renforcer la protection immunitaire. Dans le contexte des médicaments repositionnés, les quatre principaux mécanismes par lesquels ces thérapies complémentaires sont censées améliorer l'immunité anti tuberculeuse sont résumés dans la **Figure 3** (Young, Walzl, & Du Plessis, 2020).

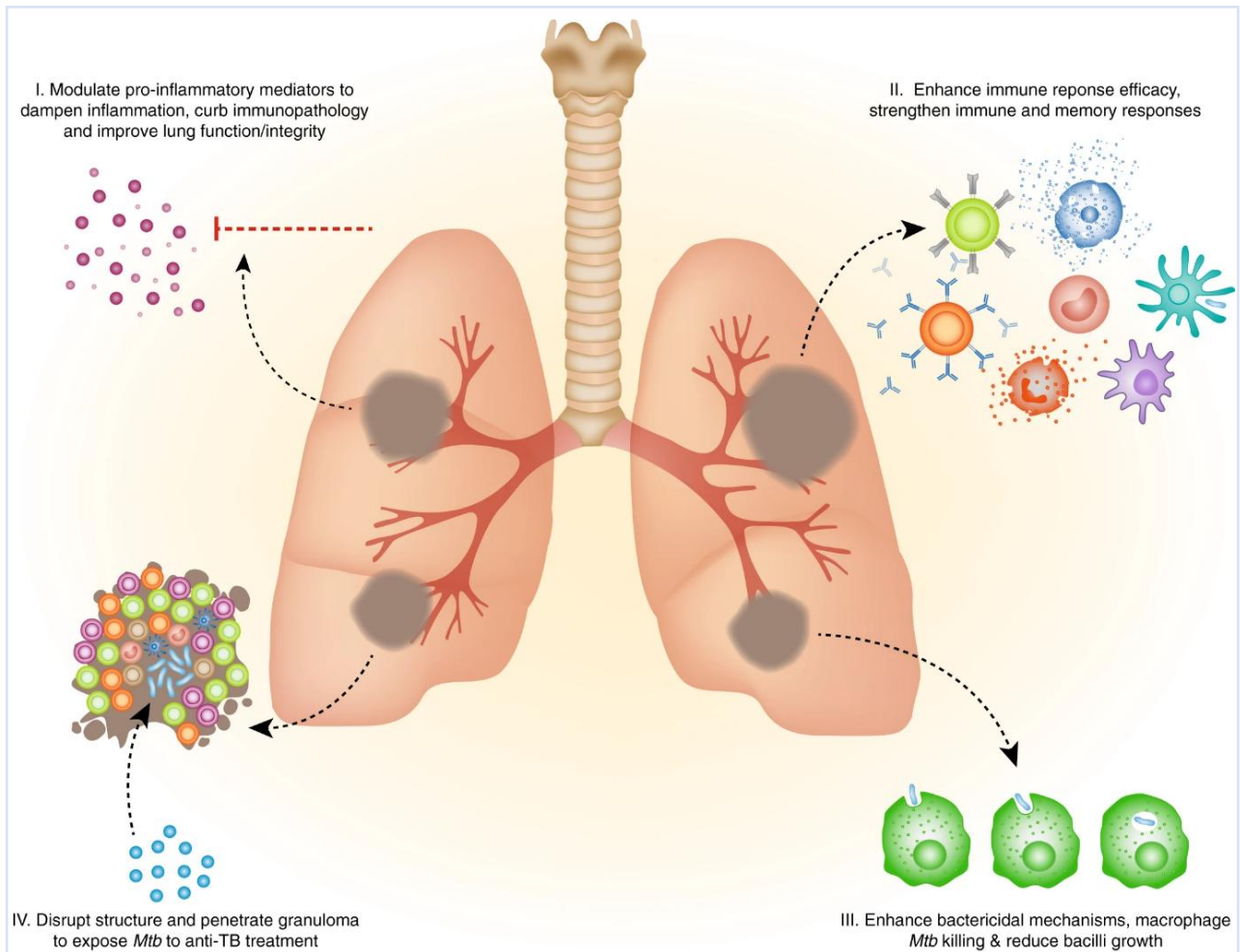


Figure 3: Principaux mécanismes cibles des HDT

(Young et al., 2020)

I. Moduler les voies et les médiateurs pro-inflammatoires pour atténuer les dommages tissulaires induits par l'inflammation et améliorer la fonction et l'intégrité pulmonaire

II. Améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte et renforcer la mémoire immunitaire

III. Améliorer l'activité bactéricide médiée par les macrophages et réduire la croissance des bacilles

IV. Perturber la structure du granulome pour exposer *Mtb* aux traitements antituberculeux

Contrairement aux antibiotiques, ces HDT sont moins susceptibles d'induire une résistance bactérienne car elles agissent uniquement sur les voies de l'hôte, en limitant par exemple l'inflammation ou les lésions tissulaires (Kaufmann, Dorhoi, Hotchkiss, & Bartenschlager, 2018). En raison des combinaisons possibles et des effets synergiques avec les antibiotiques, les HDT peuvent également raccourcir les schémas thérapeutiques de traitement de la TB et ainsi augmenter l'observance du patient. A l'échelle cellulaire, les HDT englobent de nombreuses molécules ciblant différentes voies de signalisation détaillées dans la **Figure 4**.

Des médicaments à petites molécules et des enzymes qui ont une valeur thérapeutique dans des maladies métaboliques sont étudiés pour leur potentiel en tant que HDT. Il a été démontré que la metformine augmente la réponse immunitaire effectrice et réduit la dissémination de la Mtb dans les modèles précliniques de TB. D'autres HDT en cours d'évaluation sont des médicaments en vente libre couramment utilisés, sûrs et bon marché, tels que l'aspirine, l'indométhacine, ainsi que des vitamines et des composés biologiques, par exemple des flavonoïdes et des stilbénoides. Des anticorps thérapeutiques ciblant les molécules de surface cellulaire des cellules infectées par Mtb, ou des molécules qui neutralisent des protéines circulantes préjudiciables à l'immunité protectrice, sont en cours de développement en tant que HDT à utiliser en complément des schémas thérapeutiques antituberculeux classiques. Les exosomes libérés par les lymphocytes T et B pourraient renforcer la réponse immunitaire anti-Mtb. Des complexes CMH-peptide, des microARN et des fragments d'ADN, ainsi que des inducteurs d'apoptose, pourraient jouer un rôle global dans l'immunomodulation (Tiberi, 2018).

Les voies des TLR sont également étudiées en tant que potentielles cibles de HDT. Des résultats prometteurs ont montré par exemple l'importance de l'axe TLR4-NOX2 dans la régulation de la phagocytose et l'élimination de Mtb par le macrophage (Lv, 2017).

Le développement de HDT efficaces nécessite la compréhension d'une part, de la physiopathologie de la TB et son évolution et d'autre part, des mécanismes de défense mis en place par le système immunitaire face à l'infection et des stratégies d'échappement à ces mécanismes développés par la bactérie.

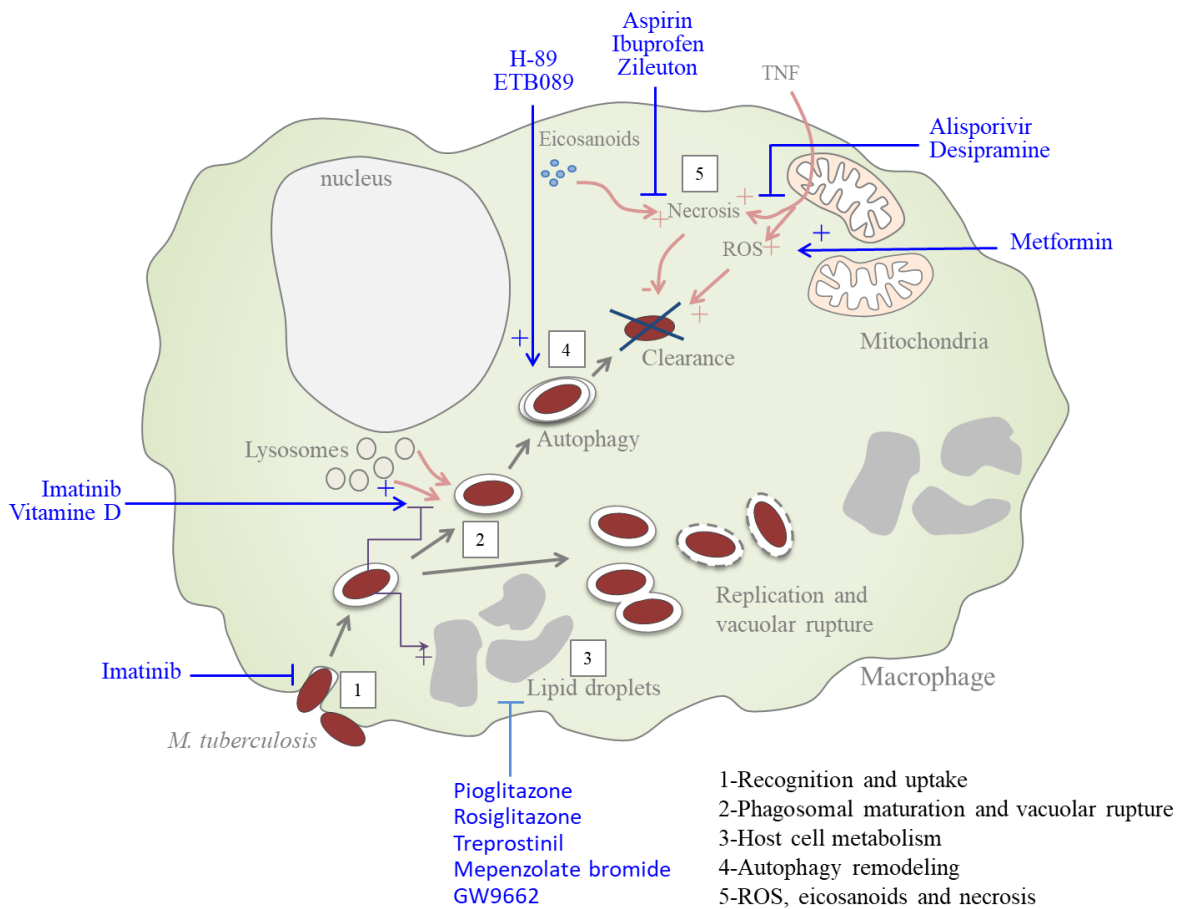


Figure 4: Trafic intracellulaire de Mtb et exemples de médicaments suggérés comme HDT

(Machelart, Song, Hoffmann, & Brodin, 2017)

Un large panel de récepteurs est connu pour être impliqué dans la reconnaissance et l'absorption des bactéries (1). À l'intérieur des macrophages, Mtb réside dans le phagosome et module des mécanismes de la cellule hôte pour inhiber sa maturation (inhibition de la fonction lysosomale et acidification de la vacuole) (2). De plus, la bactérie est capable de polariser et de moduler le métabolisme de la cellule hôte (par exemple, la production de corps lipidiques) (3). Mtb induit également une perturbation phagosomale pour favoriser leur réplication. De nombreux mécanismes effecteurs ont été décrits pour limiter la multiplication des mycobactéries, comme l'autophagie (4) ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (5). Sont indiqués en bleu, les médicaments connus pour moduler les défenses de la cellule hôte afin d'éliminer Mtb.

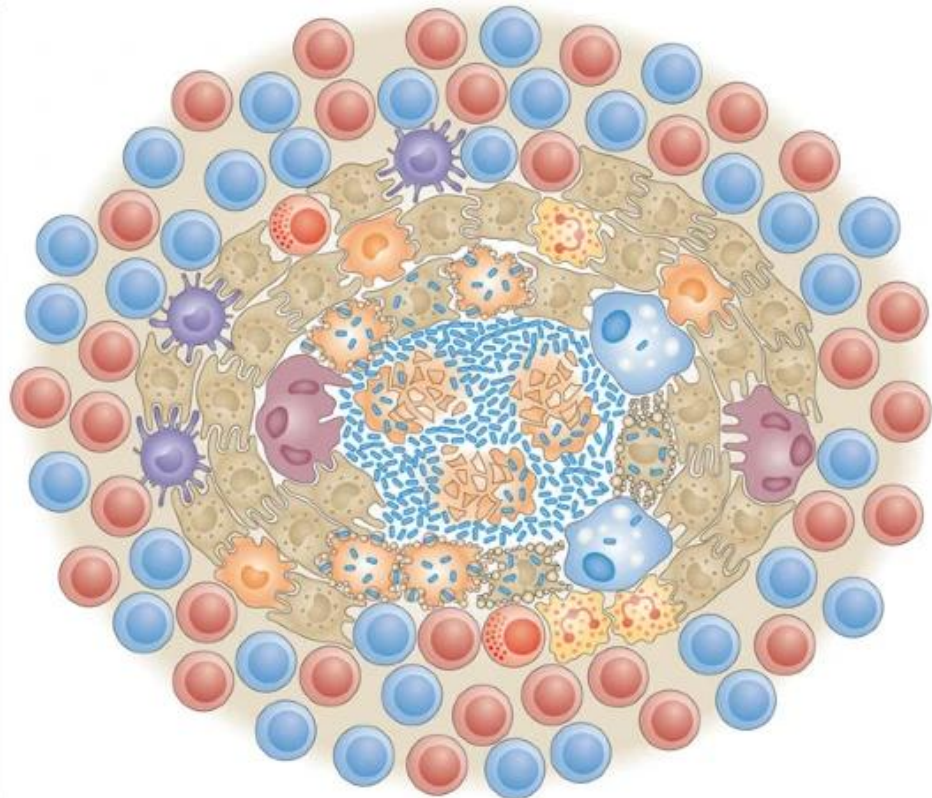
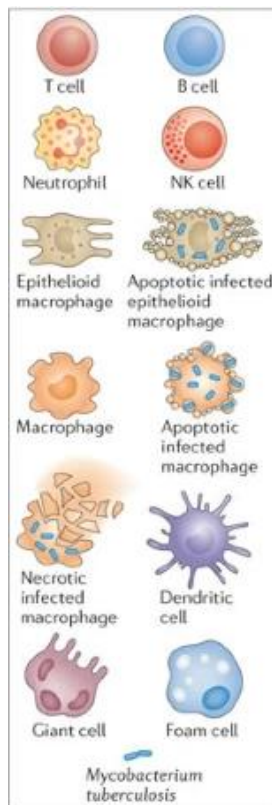
3.2. L'évolution de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb se propage à travers des particules en suspension dans l'air expulsées d'une personne atteinte de TB pulmonaire active. Les bactéries inhalées pénètrent dans les poumons, se déplacent vers les alvéoles et sont phagocytées par les macrophages alvéolaires. Après avoir phagocyté les bactéries, les macrophages alvéolaires traversent l'épithélium pulmonaire pour se rendre dans l'interstitium (Cohen et al., 2018; Dunlap et al., 2018). Les bactéries se répliquent dans les macrophages alvéolaires et se propagent grâce à la lyse cellulaire pour infecter d'autres cellules immunitaires innées qui ont été recrutées au site de l'infection. Les bacilles continuent à se répliquer jusqu'à ce qu'une réponse immunitaire à médiation cellulaire se mette en place (Ahmad, 2011). Cette réponse immunitaire est déclenchée lorsque les DC dérivées de monocytes prennent en charge l'antigène et se dirigent vers le ganglion lymphatique drainant pour permettre d'activer les lymphocytes T spécifiques de cet antigène (S. Srivastava & Ernst, 2014). Les cellules T activées sont recrutées au poumon infecté. Elles forment une structure en coiffe autour du foyer infecté qui conduit à la formation d'un granulome (**Figure 5**). L'infection peut être éliminée, contrôlée et conduisant à une LTBI, ou provoquer une TB active. La plupart des personnes immunocompétentes éliminent ou contrôlent l'infection. Bien que la compréhension de l'immunité protectrice contre l'infection à Mtb soit incomplète, les lymphocytes T, l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-12 sont tous nécessaires pour prévenir la TB active. Par exemple, le traitement avec un anti-TNF- α est associé à une réactivation accrue de la LTBI (Cantini, Niccoli, & Goletti, 2014). Les patients présentant des défauts de signalisation de l'IL-12 ou de l'IFN- γ sont plus sensibles aux infections mycobactériennes (van de Vosse, Hoeve, & Ottenhoff, 2004). Cependant, les personnes présentant des réponses T lymphocytaires robustes peuvent également développer une TB active, indiquant que d'autres voies immunitaires sont également essentielles pour contrôler l'infection à Mtb.

3.3. Le granulome tuberculeux

Les granulomes sont des agrégats complexes de cellules immunitaires qui se forment en réponse à des stimuli inflammatoires persistants et qui sont caractéristiques de l'infection pulmonaire à Mtb (**Figure 5**). Les granulomes de la TB présentent plusieurs types de lésions qui peuvent être fibreuses, caséuses ou non nécrosantes (P. L. Lin et al., 2009). Les lésions fibreuses sont associées à un contrôle immunitaire efficace avec une faible charge bactérienne, et les lésions caséuses sont associées à une faible élimination bactérienne (P. L. Lin et al., 2014; P. L. Lin et al., 2009). Les granulomes non nécrotiques sont présents chez les animaux présentant une maladie active et sont composés principalement de macrophages avec peu de lymphocytes (P. L. Lin et al., 2009). Les granulomes caséux sont caractérisés par un noyau central acellulaire nécrotique, appelé caséum, entouré de couches de macrophages différenciés et d'une coiffe lymphocytaire externe, composée

principalement de cellules T CD4 (McClellan & Tobin, 2016; Welsh, Risin, Actor, & Hunter, 2011). D'autres types de cellules, telles que les neutrophiles et les DC, peuvent également être présentes dans les granulomes caséux (Pagán & Ramakrishnan, 2014). Ceux-ci contiennent souvent du collagène autour de la coiffe lymphocytaire, contrairement aux lésions fibreuses stériles qui contiennent du collagène dans toute leur étendue (P. L. Lin et al., 2014). Une nécrose étendue du caséum interne des granulomes peut provoquer une pneumonie, une cavitation et la libération de bactéries dans les voies respiratoires (Hunter, 2016). Chez l'homme, les parois des lésions cavitaires réséquées contiennent une plus grande abondance de lymphocytes FOXP3+ (Lymphocytes T régulateurs) que les lésions granulomateuses (Welsh et al., 2011), ce qui correspond à un environnement non inflammatoire. Cependant, ces parois de cavité contiennent également de l'ARN messager (ARNm) de cytokines pro-inflammatoires (Subbian et al., 2015), ce qui suggère que la cavitation n'est pas simplement le résultat d'une réponse inflammatoire réprimée.



Nature Reviews | Immunology

Figure 5 : Structure et composition cellulaire du granulome tuberculeux

(Ramakrishnan, 2012).

Le granulome tuberculeux est un agrégat compact et organisé de cellules immunitaires parfois atypiques - les cellules épithélioïdes sont des macrophages qui ont subi une transformation spécialisée pour avoir des membranes cellulaires étroitement interdigitées qui relient les cellules adjacentes. Ces cellules peuvent être hautement phagocytaires mais, dans certains cas, ne contiennent aucune bactérie. - Les macrophages du granulome peuvent également fusionner en cellules géantes multinucléées ou se différencier en cellules spumeuses, caractérisées par une accumulation de lipides. Il a été observé que les cellules spumeuses sont le plus souvent localisées en bordure du centre nécrotique. Les raisons de la formation de ces cellules ne sont pas bien comprises, mais en général, les cellules spumeuses et les cellules géantes multinucléées ne contiennent que quelques bactéries, voire aucune. Les bactéries sont le plus souvent présentes dans les zones nécrotiques centrales dans lesquelles des macrophages morts et mourants peuvent être observés. De nombreux autres types de cellules peuplent également le granulome, tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules B et T, les cellules NK (*Natural Killer*), les fibroblastes et les cellules qui sécrètent des composants de la matrice extracellulaire.

3.4. Interaction hôte-agent pathogène pendant l'infection

3.4.1. L'agent pathogène : *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb est une bactérie intracellulaire qui infecte principalement l'homme. Elle appartient à un complexe de mycobactéries (MTBC ; *Mtb* Complex) génétiquement et physiologiquement similaires, pouvant toutes causer une TB. En plus de Mtb, qui est responsable de la plupart des cas de TB, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* et *M. mungi* font partie du MTBC. Les isolats cliniques du MTBC peuvent être classés en sept grandes lignées basées sur des polymorphismes à grande séquence. Elles ont des profils de virulence différents et présentent des variations dans la composition des lipides formant la paroi cellulaire (Coscolla & Gagneux, 2014). Chez Mtb, l'enveloppe cellulaire présente des caractéristiques typiques (**Figure 6**) (Jackson, 2014).

Sur la face externe de la membrane plasmique mycobactérienne se trouve un grand complexe de peptidoglycane lié par covalence à l'arabinogalactane et à des acides mycoliques. Les lipides et lipoglycane, notamment les phosphatidylinositol mannosides (PIM), les phthiocérols dimycocérosates (PDIM), les glycolipides phénoliques (PGL), le tréhalose dimycolate (TDM), et le lipoarabinomannane à coiffe de mannose (ManLAM) sont intercalés de manière non covalente dans la couche d'acide mycolique. Autour de cette mycomembrane se trouve un réseau de polysaccharides et de protéines qui forment collectivement une structure capsulaire. Cette enveloppe cellulaire unique contribue à la teneur élevée en lipides de Mtb, qui constitue 40 à 60 % du poids sec de la bactérie et qui confère une résistance à de nombreux antibiotiques et aux stress induits par l'hôte (Dulberger, Rubin, & Boutte, 2020; Jackson, 2014). L'enveloppe cellulaire confère également à Mtb la capacité de former des structures en cordes dans un processus appelé « *cording* », qui a été associé à la virulence (Hunter, Olsen, Jagannath, & Actor, 2006), induisant la nécrose des cellules hôtes (Kalsum et al., 2017) et la formation de lésions cavitaires chez l'homme (Hunter et al., 2006).

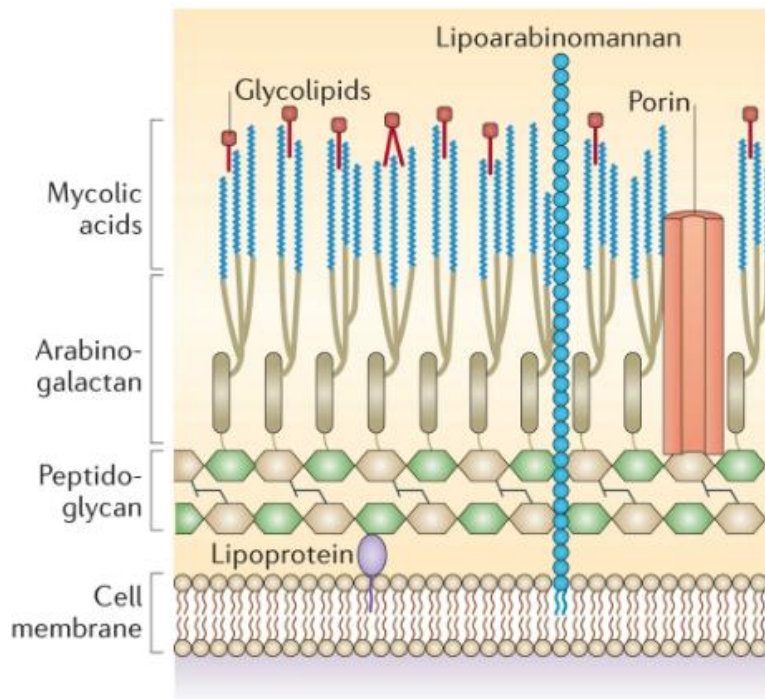


Figure 6: La paroi cellulaire des mycobactéries

(Brown, 2015)

Les parois cellulaires des mycobactéries sont constituées de fines couches de peptidoglycane et d'arabinogalactane, et d'une épaisse couche d'acides mycoliques. Des glycolipides et des porines se trouvent également dans ces parois cellulaires, tout comme le lipoarabinomannane, qui est ancré à la membrane cellulaire par le diacylglycérol. Cette paroi cellulaire entoure une seule membrane lipidique.

La capacité à sécréter des protéines dans la cellule hôte est également la clé de la pathogénicité de Mtb. Le bacille utilise plusieurs systèmes de sécrétion pour transporter les protéines à travers la membrane plasmique bactérienne, y compris la voie SecA1, la voie SecA2, le système TAT (*Twin Arginine Translocation*) et cinq systèmes de sécrétion de type VII (T7SS) (Feltcher, Sullivan, & Braunstein, 2010). SecA1 et SecA2 permettent la sécrétion de peptides dépliés par le translocon SecYEG. SecA1 permet la sécrétion de protéines essentielles à la survie de la bactérie, tandis que SecA2 permet la sécrétion d'un ensemble plus restreint de protéines, comme d'importants facteurs de virulence. Le système TAT est également essentiel pour la viabilité de Mtb qui sécrète des protéines avec un motif N-terminal conservé contenant deux résidus d'arginine. Les T7SS, appelés ESX-1 à ESX-5, sont chacun codés dans un locus multigénique et contribuent à divers aspects de la physiologie de Mtb avec ESX-1, ESX-3 et ESX-5 qui contribuent à la virulence (**Figure 7**). ESX-1, le premier des systèmes décrit, est situé dans la région RD1 (*Region of Difference*) qui est absente dans la souche vaccinale du BCG (Hsu et al., 2003). ESX-1 sécrète le facteur de virulence EsxA (ESAT-6, *Early secretory antigenic target protein 6*) sous forme d'hétérodimère associé à l'EsxB (CFP-10, *Culture filtrate protein 10*) (Abdallah et al., 2007). Le T7SS peut également sécréter les protéines Esp (*ESX-1-secreted substrate protein*) et une famille de protéines riches en proline et glutamate appelées protéines PE et PPE, dont beaucoup contiennent un motif d'acides aminés WXG qui adoptent une structure en faisceau à quatre hélices caractéristique des substrats T7SS (Abdallah et al., 2007). Les substrats du T7SS jouent plusieurs rôles dans la virulence et la physiologie de la bactérie. Par exemple, il a été démontré que les PE5/PPE4 permettent l'acquisition du fer (Tufariello et al., 2016), et certaines protéines PE/PPE fonctionnent comme des porines pour favoriser les transports à travers la paroi mycobactérienne (Wang et al., 2020).

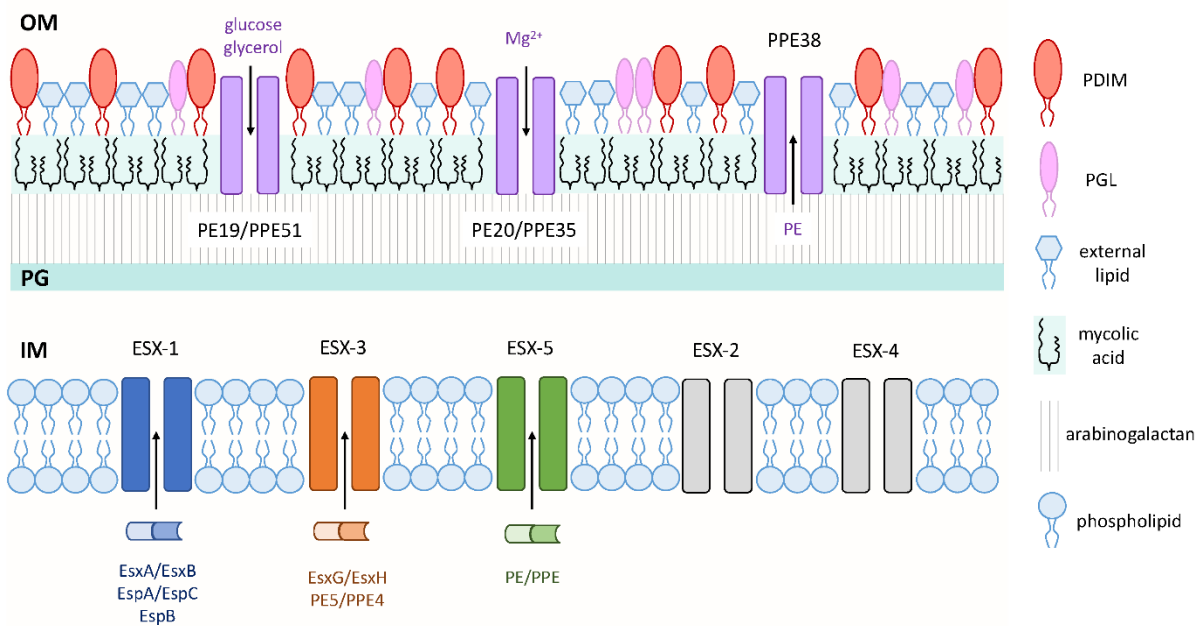


Figure 7: Les facteurs de virulence des Mycobactéries et structure de la mycomembrane.

(Ly & Liu, 2020)

Trois systèmes de sécrétion de type VII — le système de sécrétion ESAT-6-1 (ESX-1), ESX-3 et ESX-5 — sécrètent des protéines à travers la membrane interne. Les canaux sélectifs à petites molécules Pro-Glu (PE) / Pro-Pro-Glu (PPE) transportent les nutriments et les protéines à travers la membrane externe. Divers lipides de la paroi cellulaire mycobactérienne sont représentés sur le feuillet externe de la membrane externe. IM : Membrane interne, PG : peptidoglycane, OM : membrane externe.

3.4.2. L'hôte et les modèles d'études de l'immunité antituberculeuse

a. Modèles animaux : Pertinence du modèle souris pour l'étude de la tuberculose

La souris est le modèle animal le plus utilisé pour modéliser l'infection par Mtb en raison de la large gamme de souris génétiquement modifiées disponible, de sa petite taille et de son coût relativement faible. Le plus souvent, les souris sont infectées par voie pulmonaire, une dose d'environ 100 bactéries par souris entraînant une période initiale de trois semaines de réplication bactérienne dans les cellules de l'immunité innée. Huit à neuf jours après l'infection, les DC chargées d'antigènes de Mtb se déplacent vers le ganglion lymphatique drainant pour induire l'activation et la prolifération des cellules T spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes T spécifiques de Mtb arrivent dans le poumon 18-19 jours après l'infection, activant les cellules de l'immunité innée pour contrôler la réplication bactérienne et l'inflammation (Muñoz-Elías et al., 2005). Dans le but de mieux simuler l'exposition naturelle de l'homme, les souris peuvent également être exposées à de très faibles doses de Mtb, allant de 1 à 11 bactéries par souris. Trois à cinq semaines après l'infection, le modèle à faible dose entraîne des niveaux élevés de variabilité en terme de charge bactérienne, ce qui permet d'évaluer les mécanismes associés aux résultats hétérogènes de la TB (Gern, Plumlee, Gerner, & Urdahl, 2017). La souris C57BL/6 est la souche la plus couramment utilisée pour l'étude de la pathogenèse de la TB en raison du nombre de modèles génétiques disponibles, tandis que la souris BALB/c est surtout utilisée pour l'évaluation préclinique des molécules thérapeutiques. Les deux souches de souris peuvent survivre avec des charges élevées de Mtb dans les poumons sans manifestation clinique évidente de la maladie pendant plus d'un an (Orme, 2003). Les souris C57BL/6 génétiquement déficientes jouent un rôle déterminant dans notre compréhension actuelle de la pathogenèse de Mtb. Cependant, ces modèles de souris ne présentent pas les caractéristiques distinctives de la TB pulmonaire humaine, comme les lésions nécrotiques et caséuses et la fibrose dans les poumons (Orme, 2003).

Plus récemment, il a été démontré que la souche de souris C3He3B/FeJ (également appelée souris Kramnik) était plus sensible à l'infection par Mtb et présentait des lésions nécrotiques riches en neutrophiles (Irwin et al., 2015). Les souris C3He3B/FeJ peuvent être utilisées pour décrypter les événements impliqués dans la formation de lésions similaires à celles observées dans la TB humaine. La différence d'évolution de la maladie entre les souris C57BL/6 et les souris C3He3B/FeJ a été attribuée au locus *Sst1* (*Super Susceptibility to Tuberculosis 1*) (Pan et al., 2005). Ce locus est associé à une hyperproduction d'IFN de type I et d'une inhibition de la signalisation de l'IL-1 due à l'activité d'un antagoniste au récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) chez la souris C3He3B/FeJ (Ji et al., 2019).

b. Modèles cellulaires : Le macrophage

En étant la première lignée cellulaire répondant à l'infection, les macrophages alvéolaires présentent une opportunité thérapeutique pour cibler les premières étapes de mise en place de l'inflammation pulmonaire. Le rôle du macrophage alvéolaire dans les réponses innées précoces, a un impact important sur l'évolution de la maladie en influençant à la fois le recrutement d'autres effecteurs de l'immunité innée comme les neutrophiles, la réponse immunitaire adaptative, et plus tard la résolution de l'inflammation et le remodelage tissulaire (Greenlee-Wacker, 2016; Iwasaki & Medzhitov, 2015).

Les principales caractéristiques qui font des macrophages alvéolaires une cible thérapeutique efficaces sont détaillées ci-après :

- Les macrophages alvéolaires sont positionnés à l'interface des voies respiratoires et du tissu.

En raison de leur emplacement dans les voies respiratoires, les macrophages alvéolaires sont relativement faciles à cibler avec des molécules ou particules contenant des médicaments qui sont administrées par voie pulmonaire comme l'inhalation d'aérosol et l'administration intranasale et oropharyngée (Machelart et al., 2019). De plus, les macrophages alvéolaires se situent à une intersection unique entre les voies respiratoires et le tissu parenchymateux composé de capillaires sanguins. Ce positionnement permet au macrophage alvéolaire d'intégrer des signaux provenant des deux emplacements (Gehr, Bachofen, & Weibel, 1978).

- Les produits administrables par inhalation sont conçus pour cibler les macrophages alvéolaires (microparticules, nanoparticules, médicaments aérosolisés).

L'aérosolisation est conçue pour exposer toutes les cellules des voies respiratoires à un médicament ou à un traitement. En revanche, d'autres stratégies telles que l'encapsulation des composés dans des nanoparticules et des microparticules et les formulations de liposomes tirent parti de leurs propriétés physico-chimiques telles que la taille, l'hydrophobicité, les ligands de surface, et de la capacité des macrophages alvéolaires à phagocyter ces particules pour diriger les médicaments vers les alvéoles en ciblant en même temps l'agent pathogène au plus proche, en sein même de la cellule (Patel, Gupta, & Ahsan, 2015).

- Les macrophages alvéolaires ont une longue durée de vie et participe à la mémoire immunitaire innée

Des études récentes ont montré que le macrophage alvéolaire possède une mémoire à long terme des signaux inflammatoires acquis au cours d'une infection (Nemeth et al., 2020; Yao et al., 2018). Un modèle d'infection non-pathogène à Mtb en intra-dermique (*contained Mtb infection*) génère un

faible niveau systémique d'IFN- γ et conduit à une reprogrammation des macrophages alvéolaires entraînant une réponse pro-inflammatoire renforcée en réponse à une réinfection ultérieure par Mtb par aérosol (Nemeth et al., 2020).

3.4.3. Reconnaissance et entrée dans la cellule hôte

Dans le poumon, les molécules de surface de Mtb sont reconnues par les récepteurs de surveillance immunitaire de l'hôte, les PRRs, exprimés à la surface de la cellule hôte, incluant les TLRs et CLRs (**Figure 8**).

Parmi les 10 TLRs connus à ce jour, les TLR2, TLR4 et TLR9 jouent les rôles les plus importants dans l'initiation de la réponse immunitaire contre la TB. Le TLR2 est considéré comme le plus crucial pour la réponse inflammatoire des macrophages, principale niche de réplication de Mtb. Après son hétérodimérisation avec le TLR1 ou le TLR6, le TLR2 peut reconnaître des lipoprotéines de Mtb ainsi que des glycolipides mycobactériens contenant du mannose pour induire une réaction inflammatoire (Jo, Yang, Choi, & Harding, 2007; Salgame, 2005). Paradoxalement, la signalisation TLR2 permet également à Mtb d'échapper aux défenses de l'hôte en inhibant la présentation des antigènes bactériens et en induisant la production de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (Gehring, Dobos, Belisle, Harding, & Boom, 2004; Netea, van der Graaf, Van der Meer, & Kullberg, 2004; Noss et al., 2001). Des molécules de surface de Mtb peuvent aussi jouer un rôle antagoniste en se liant au TLR2 pour atténuer la production de cytokines inflammatoires. Bien que le TLR4 soit principalement connu pour être responsable de la signalisation LPS, dans le cas de la TB, ce récepteur joue un rôle important dans la reconnaissance de la protéine PE6⁴ (Rv0335c), une protéine sécrétoire effectrice de Mtb, activant la voie de signalisation canonique NF κ B pour stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Sharma et al., 2021). Cependant, RipA⁵ crée une niche de réplication permissive dans les cellules hôtes via la signalisation TLR4 en induisant la répression de l'autophagie et de l'apoptose, ainsi qu'une reprogrammation métabolique (Sharma et al., 2021). Le TLR9 a été initialement décrit comme récepteur pour des motifs CpG non méthylés dans l'ADN bactérien et viral (Krieg et al., 1995; Lund, Sato, Akira, Medzhitov, & Iwasaki, 2003), mais son implication dans le contrôle de l'infection à Mtb n'est pas encore bien caractérisée. En 2005, Bafica et al. ont montré que l'ADN mycobactérien stimule effectivement la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via TLR9 et ont établi un rôle pour ce TLR dans les réponses IL-12 et Th1 à l'infection *in vitro* et *in vivo* (Bafica et al., 2005).

⁴ Les protéines PE et PPE sont nommées ainsi d'après les résidus conservés de proline (P) et d'acide glutamique (E) retrouvés dans leurs séquences N-terminales.

⁵ RipA est une endopeptidase qui hydrolyse le peptidoglycane permettant une séparation adéquate des deux cellules filles après division de la bactérie.

Les CLRs jouent aussi un rôle important dans la reconnaissance des PAMPs de Mtb : le récepteur au mannose, la dectine-2, la collectine CL-LK et la DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) peuvent tous se lier et répondre au ManLAM, tandis que Mincle (*Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor*) et CLECSF8 se lient au TDM (C. H. Liu, Liu, & Ge, 2017).

En plus des interactions directes entre les molécules de surface de Mtb et les récepteurs de l'hôte, les bactéries peuvent également être opsonisées par divers facteurs de l'hôte comme le complément, les IgG ou la protéine A du surfactant, conduisant à l'internalisation bactérienne respectivement par, les récepteurs du complément, le récepteur Fcγ (FCGR), ou le récepteur de la protéine A du surfactant (Ernst, 1998). Une fois les récepteurs des cellules hôtes activés, ceci induit une phagocytose, conduisant à l'internalisation de Mtb (C. H. Liu et al., 2017).

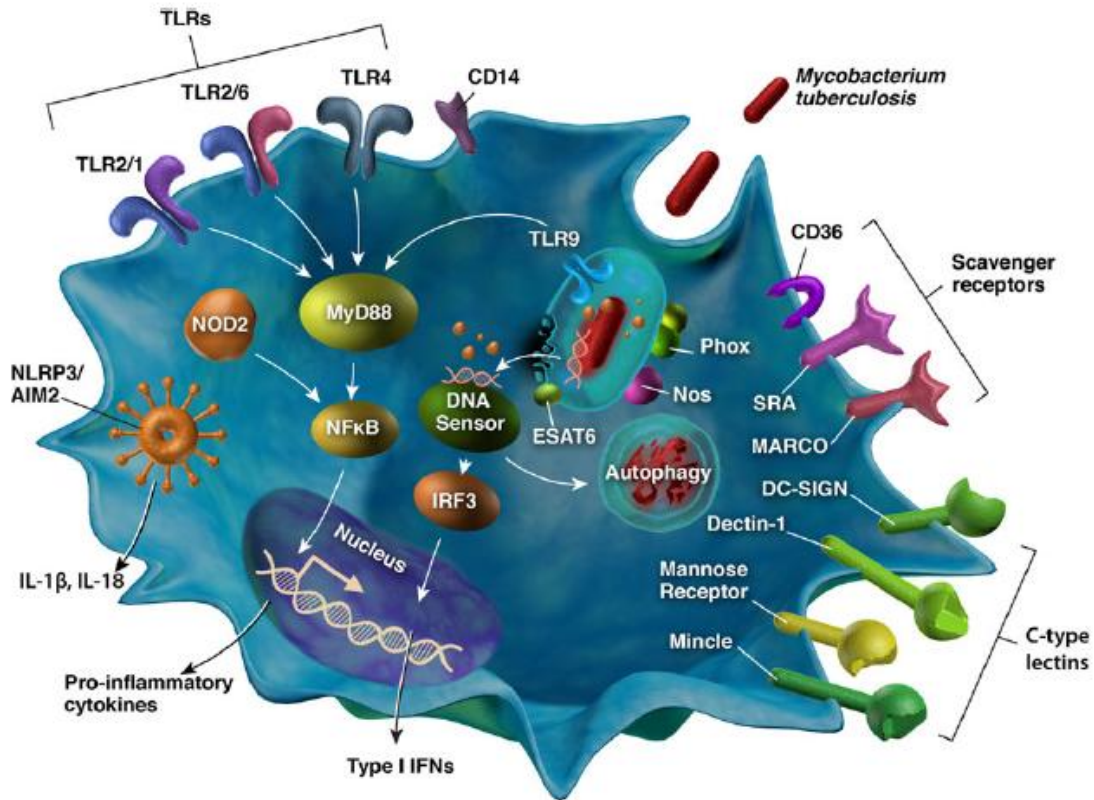


Figure 8: Reconnaissance des PAMPs mycobactériens par les récepteurs de l'immunité innée
(Stamm, Collins, & Shiloh, 2015)

Ce schéma montre les principaux récepteurs impliqués dans la reconnaissance de Mtb et leur localisation cellulaire. Les PRRs à la surface des cellules comprennent les TLRs, les CLR et les récepteurs scavenger. Les récepteurs cytoplasmiques reconnaissent les composants mycobactériens, tels que les protéines sécrétées et l'ADN qui accèdent au cytoplasme après perméabilisation de la membrane phagosomale. Sont représentées aussi, les principales voies de signalisation engagées après reconnaissance des PAMPs.

3.4.4. Maturation du phagosome contenant *Mtb*

Mtb est internalisée par phagocytose dans les cellules phagocytaires telles que les macrophages (**Figure 9**), les DC et les neutrophiles. Comme cité précédemment, ce processus dépendant de l'actine est régulé par de nombreux récepteurs et dépend du type de cellule (Bussi & Gutierrez, 2019).

Une fois que *Mtb* est internalisée par le macrophage, la bactérie va résider dans un compartiment, le phagosome, qui va mûrir sous le contrôle de protéines de l'hôte (Pauwels, Trost, Beyaert, & Hoffmann, 2017). Par exemple, la GTPase Rab5⁶ est présente sur les phagosomes précoces et permet le recrutement de protéines effectrices comme la phosphoinositide 3 (PI3) kinase vacuolar protein sorting 34 (VPS34) qui entraîne l'accumulation du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) au phagosome en maturation. Une fois sur la membrane, PI3P se lie à l'antigène 1 de l'endosome précoce (EEA1, *Early endosome antigen 1*), une protéine de liaison endosomale qui médie la fusion phagosome-lysosome. Au fur et à mesure que le phagosome mûrit, les niveaux de Rab5 diminuent à mesure que les niveaux d'une autre GTPase, Rab7, augmentent. Rab7 recrute ensuite des effecteurs supplémentaires tels que la protéine lysosomale interagissant avec Rab7 (RILP, *Rab-interacting lysosomal protein*), qui stimule le transport du phagosome vers le lysosome. De plus, le phagosome acquiert LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) et LAMP-2, nécessaires à la fusion phagosome-lysosomale (Huynh et al., 2007). Au cours de cette maturation, l'ATPase H⁺ associée à la vacuole (v-ATPase) et la NADPH oxydase sont recrutées dans la membrane phagosomale. Elles contribuent respectivement à l'acidification du phagosome et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Malgré ces mécanismes mis en place pour induire la dégradation des bactéries phagocytées, *Mtb* est capable de se répliquer dans les macrophages. En effet, *Mtb* utilise de multiples stratégies pour bloquer pratiquement toutes les étapes de la maturation des phagosomes et favorise ainsi sa survie (**Figure 9**). En raison de la faible acidification observée dans les compartiments contenant *Mtb*, des efforts se sont principalement concentrés sur la recherche des mécanismes par lesquels *Mtb* inhibe ce processus. Une caractéristique du phagosome contenant *Mtb* est un recrutement défectueux de la v-ATPase et un niveau réduit d'hydrolases lysosomales matures (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Le mécanisme d'exclusion de la v-ATPase par les phagosomes de *Mtb* est associé à l'expression, médiée par STAT-5, de la protéine Cish (*Cytokine inducible SH2 containing protein*), qui cible sélectivement la v-ATPase pour l'ubiquitination et la dégradation (Queval et al., 2017).

⁶ Rab5 se lie à une variété de protéines effectrices pour réguler les réponses cellulaires telles que le trafic membranaire intracellulaire, de la formation de vésicules de transport à leur fusion avec les membranes. La forme active liée au GTP est capable de recruter sur les membranes différents ensembles d'effecteurs responsables de la formation, du mouvement et de la fusion des vésicules. Rab5 est nécessaire à la fusion des membranes plasmiques et des endosomes précoces.

D'autres études ont également montré que Mtb était capable d'inhiber la conversion Rab5-Rab7 et l'accumulation de Ca²⁺ nécessaire à l'activité de VPS34 et au recrutement de EEA1 (Kinsella et al., 2021; Roberts, Chua, Kyei, & Deretic, 2006).

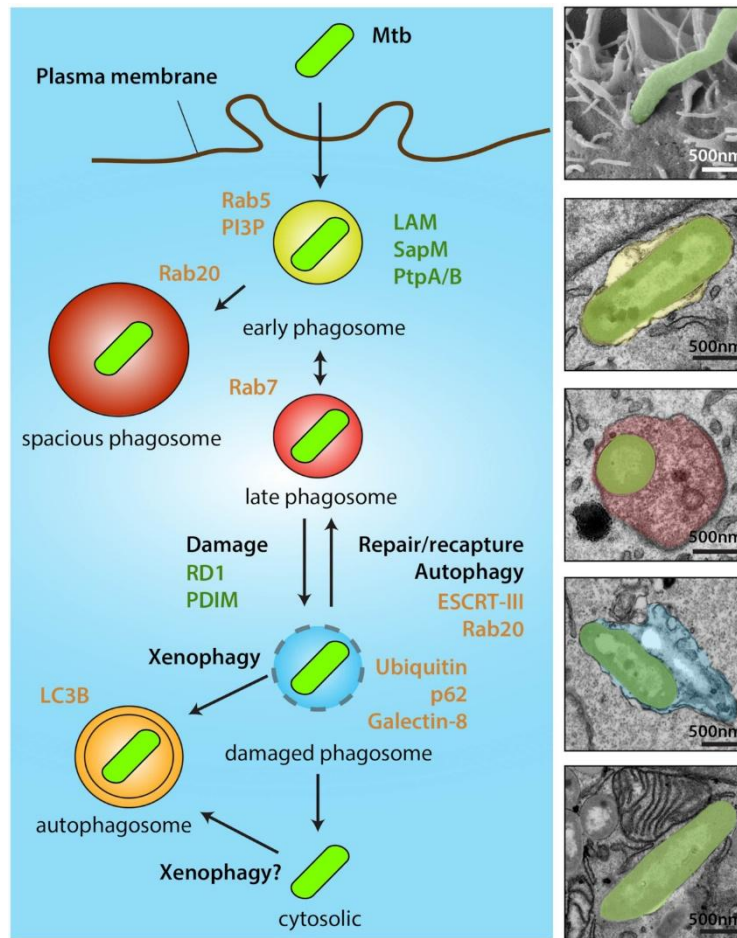


Figure 9: Localisation de Mtb dans les cellules humaines.

(Bussi & Gutierrez, 2019)

Une fois que Mtb est phagocyté par les macrophages, elle va résider dans des phagosomes précoces et inhiber de la fusion phagosome-lysosome pour assurer sa survie. La bactérie utilise différentes stratégies pour interférer avec la maturation des phagosomes. Certains phagosomes contenant des Mtb peuvent cependant fusionner avec des endosomes tardifs. D'autre part, Mtb peut perturber la membrane phagosomale et s'échapper vers le cytosol. Dans l'exemple présenté, des dommages à la membrane sont partiellement observés bien que des artefacts de fixation chimique ne puissent être exclus. Ces différentes étapes ne sont pas stables mais très dynamiques. Les images de microscopie électronique de droite sont représentatives de macrophages humains infectés par Mtb illustrant les différents compartiments cellulaires où Mtb peut résider dans les cellules hôtes. Les molécules hôtes associées aux différentes étapes de localisation sont représentées en orange et les facteurs de Mtb impliqués dans le processus sont représentés en vert.

3.4.5. Perturbation de la membrane phagosomale et signalisation

À l'intérieur du phagosome, Mtb sécrète des molécules effectrices qui perturbent la membrane phagosomale et qui induisent une signalisation en aval des PRRs cytosoliques (A. Mishra, Akhtar, Jagannath, & Khan, 2017; B. B. Mishra et al., 2010).

a. Perméabilisation et réparation de la membrane du phagosome

La rupture phagosomale est un événement clé dans l'interaction de Mtb avec les facteurs de l'hôte. L'action combinée des facteurs de virulence protéiques et lipidiques induit la rupture de cette structure contenant les bactéries. Ceci conduit à la libération des mycobactéries ou de leurs produits dans le cytosol induisant la mort de la cellule hôte (Simeone, Sayes, Lawarée, & Brosch, 2021).

Le système de sécrétion ESX-1 est essentiel à cette perturbation membranaire, grâce à la sécrétion d'EsxA (ESAT-6) (W. H. Conrad et al., 2017; Hsu et al., 2003). Il a été démontré qu'EsxA perméabilise directement les membranes. Cependant, ce modèle a récemment été discuté en raison de la potentielle présence de détergent dans les préparations de protéines EsxA utilisées pour induire la rupture phagosomale (W. H. Conrad et al., 2017). Les préparations sans détergent de cette protéine ne présentaient pas d'activité de perméabilisation de la membrane à pH neutre, et les dommages de la membrane causés par ESX-1 étaient plutôt médiés par un contact direct de la bactérie avec la membrane de l'hôte (W. H. Conrad et al., 2017). Des travaux ont également associé PDIM de la paroi de Mtb aux lésions de la membrane phagosomale (Augenstreich et al., 2017; Barczak et al., 2017). Cependant, la délétion de PDIM affecte la sécrétion d'EsxA (Barczak et al., 2017), ce qui suggère que les effets sur l'intégrité de la membrane phagosomale pourraient en effet dépendre d'EsxA et nécessitent une étude plus approfondie.

En cas de perturbation de la membrane phagosomale, la voie ESCRT⁷ (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) de la cellule hôte est activée pour favoriser la réparation du phagosome endommagé. Cependant, il a été montré que Mtb inhibait cette machinerie de réparation grâce à la sécrétion des effecteurs EsxG et EsxH du T7SS ESX-3 (Mittal et al., 2018).

b. Reconnaissance des PAMPs cytosoliques et signalisation

La perméabilisation de la membrane du phagosome permet la libération de PAMPs de Mtb dans le cytosol de la cellule hôte, qui peuvent être reconnus par les PRRs cytosoliques. L'ADN mycobactérien libéré active le récepteur d'ADN double brin cGAS (Collins et al., 2015; Watson, Manzanillo, & Cox, 2012), qui synthétise le GAMP cyclique (cGMP-AMP) qui signale via le STING/ TBK1 (*TANK Binding*

⁷ La machinerie ESCRT est composée de complexes protéiques cytosoliques, appelés ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III. Associés protéines accessoires, ces complexes permettent le remodelage membranaire qui se fait par un repliement / bourgeonnement des membranes. Ils jouent un rôle important dans le transport des protéines et des récepteurs ubiquitinés vers un lysosome.

Kinase 1) / IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) pour activer la production d'IFN de type I (Watson et al., 2015). Mtb peut également synthétiser le dinucléotide cyclique c-di-AMP, qui signale directement via STING (Dey et al., 2015). L'ARN de Mtb est transporté vers le cytosol de l'hôte de manière dépendante d'ESX-1 et de SecA2, conduisant à la reconnaissance par RIG-I et à la signalisation via MAVS (*Mitochondrial Antiviral-Signaling protein*) / TBK1/ IRF7 pour induire la production d'IFN de type I (Cheng & Schorey, 2018). La détection du peptidoglycane de Mtb via NOD2 conduit à une signalisation via RIP2 (*Receptor-interacting-serine/threonine-protein kinase 2*) / TBK1/ IRF5, induisant également la production d'IFN de type I (Pandey et al., 2009) (**Figure 10**). Le TLR9 peut aussi détecter l'ADN de Mtb et induire la production de cytokines pro-inflammatoires (C. H. Liu et al., 2017).

Suite à la rupture phagosomale, Mtb active aussi les NLRs, comme le NLRP3 ou le NLRC4, et le capteur d'ADN cytoplasmique AIM2, conduisant à l'assemblage de l'inflammasome⁸ et à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-1 β ainsi que la mort cellulaire par pyroptose⁹ (B. B. Mishra et al., 2010; Saiga et al., 2012; Wassermann et al., 2015).

Ces voies de signalisation induisent également un processus d'autolyse ou autophagocytose appelé autophagie, en induisant la translocation de l'ubiquitine et de LC3 au phagosomes contenant Mtb et à la formation ultérieure d'autophagosomes qui sont acheminés vers le lysosome (Budzik et al., 2020; Manzanillo et al., 2013; Watson et al., 2015; Watson et al., 2012). Les ligases E3 contribuent à l'ubiquitination des structures contenant Mtb (Franco et al., 2017; Manzanillo et al., 2013) qui seront reconnues par les récepteurs de l'autophagie comme p62, TAX1BP1, l'optineurine, NBR1 et NDP52 (Budzik et al., 2020; Manzanillo et al., 2013). La protéine de surface PE_PGRS29 de Mtb possède également un domaine de liaison à l'ubiquitine, qui facilite l'interaction de Mtb avec les chaînes d'ubiquitine de l'hôte et déclenche l'adressage de Mtb aux autophagosomes (Q. Chai et al., 2019). Cependant, malgré la colocalisation de certains bacilles avec la machinerie d'autophagie, Mtb utilise plusieurs mécanismes pour bloquer l'acheminement au lysosome médié par l'autophagie. La bactérie sécrète Eis (*Enhanced intracellular survival*), une N-acétyltransférase qui inhibe l'autophagie en limitant la disponibilité des ROS (Shin et al., 2010). Elle favorise également la rétention du facteur hôte Coronin-1A sur les phagosomes, bloquant la formation d'autophagosomes (Seto, Tsujimura, & Koide, 2012). La protéine ManLAM mycobactérienne et la protéine PE_PGRS47 sécrétée peuvent également bloquer la maturation des autophagosomes par des mécanismes inconnus (Saini et al., 2016; Shui et al., 2011). De plus, l'infection par Mtb induit l'expression accrue de mir-33, qui régule à

⁸ L'inflammasome est un complexe protéique qui se forme suite à la reconnaissance de divers signaux inflammatoires par des protéines de la familles NLRP ou par AIM2. Il favorise la maturation des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18, en les clivant via l'activation de la caspase 1.

⁹ La pyroptose est une forme hautement inflammatoire de mort cellulaire lytique programmée induite suite à l'activation de l'inflammasome.

la baisse l'expression des gènes de l'autophagie, entraînant une diminution du recrutement du récepteur de l'autophagie p62 et de LC3 (Ouimet et al., 2016).

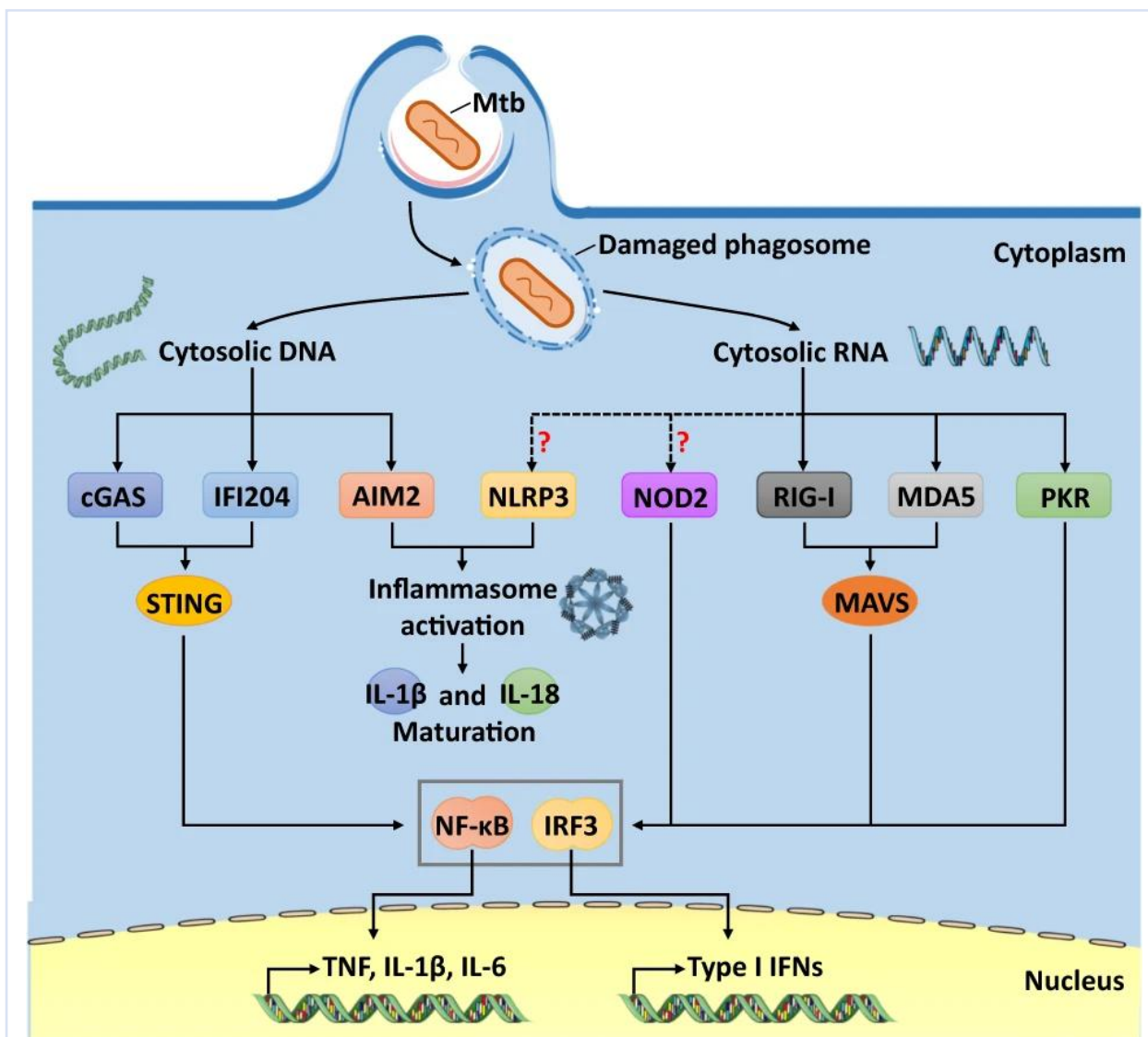


Figure 10: Voies de détection de l'ADN et de l'ARN cytosoliques Mtb.

(Qiyao Chai, Wang, Liu, & Ge, 2020)

Lors de l'infection, Mtb est internalisé dans des phagosomes par les cellules phagocytaires de l'hôte. La rupture du phagosome induits par Mtb libèrent de l'ADN et de l'ARN bactériens dans le cytosol de l'hôte. Les capteurs cytosoliques cGAS, IFI204 et AIM2 reconnaissent l'ADN de Mtb, tandis que RIG-I, MDA5 et PKR détectent l'ARN. Bien que NLRP3 et NOD2 répondent également à l'infection par Mtb, on ne sait pas s'ils sont directement activés par l'ARN de Mtb. Ces récepteurs cytosoliques activés induisent davantage l'activation des inflammasomes et des voies immunitaires innées médiées par NF-κB et IRF3 pour réguler les réponses anti-Mtb de l'hôte.

3.4.6. Régulation métabolique de la réponse immune

Au cours de l'infection par Mtb, les macrophages subissent un remodelage métabolique, qui implique un passage de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) à la glycolyse (Gleeson et al., 2016). Lors de cette conversion métabolique, les macrophages acquièrent un phénotype inflammatoire, appelé M1, avec une production élevée de molécules pro-inflammatoires qui est induite par la signalisation IFN- γ et médiée par le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*). L'inhibition de ce changement métabolique est accompagnée d'une réduction de production d'IL-1 β et une augmentation de production d'IL-10, contribuant à la survie intracellulaire de Mtb (Braverman, Sogi, Benjamin, Nomura, & Stanley, 2016; Gleeson et al., 2016). Les macrophages non infectés/naïfs de type M2 sont anti-inflammatoires et tirent leur énergie de l'OXPHOS et de l'oxydation des acides gras (R. Kumar et al., 2019).

Les macrophages alvéolaires sont moins puissants pour contrôler la réplication de Mtb que les macrophages interstitiels. En effet, le métabolisme de l'OXPHOS dans les macrophages alvéolaires est associé à la disponibilité du fer et des acides gras, à une prédominance de l'oxydation des acides gras et à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, le tout entraînant un environnement plus permissif pour Mtb (Huang, Nazarova, Tan, Liu, & Russell, 2018; Pisu, Huang, Grenier, & Russell, 2020). En revanche, les macrophages interstitiels glycolytiques limitent l'accès au fer par séquestration, produisent plus de NO (Nitric Oxide) et expriment des cytokines pro-inflammatoires (Huang et al., 2018; Pisu et al., 2020).

Le métabolisme de l'arginine est également un mécanisme régulateur important dans la polarisation des macrophages. L'arginine est le substrat de NOS2 (*Nitric oxide synthase 2*) et de l'ARG1 (*Arginase 1*). Par conséquent, ARG1 peut inhiber la production de NO par épuisement de l'arginine. Les macrophages déficients en Arg1 ont une activité bactéricide accrue contre Mtb (El Kasmi et al., 2008). Une analyse approfondie des sous-types de macrophages pendant l'infection à Mtb a mis en évidence différentes populations qui expriment des marqueurs associés à un phénotype inflammatoire M1 (iNOS) ou à un phénotype anti-inflammatoire et de réparation tissulaire M2 (ARG1 et ARG2). Un modèle ultérieur suggère que le rapport M1/ M2 est un indicateur de l'évolution du granulome vers une forme active (Huang, Nazarova, & Russell, 2019).

L'infection des macrophages par Mtb entraîne aussi une régulation positive d'Irg1 (*Immune-responsive gene 1*), une enzyme mitochondriale qui produit de l'itaconate pour contrôler les réponses pro-inflammatoires afin de limiter le recrutement des neutrophiles et prévenir la susceptibilité à l'infection (Nair et al., 2018). Mtb induit également l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), activant le catabolisme du tryptophane, qui réduit la prolifération des lymphocytes T,

permettant ainsi la réplication bactérienne et l'augmentation des lésions pulmonaires (Gautam et al., 2018). Chez les macaques infectés par Mtb, le blocage de l'IDO entraîne la formation de tissu lymphoïde associé aux bronches (iBALT), qui est associé à une protection contre la maladie, à une prolifération accrue des cellules T et à la localisation des cellules T au centre du granulome (Gautam et al., 2018).

3.4.7. Mort de la cellule hôte

Une conséquence supplémentaire de la signalisation prolongée des PRRs cytosoliques est la mort de la cellule hôte. Le mécanisme par lequel une cellule infectée par Mtb meurt peut avoir un impact sur le contrôle de l'infection (**Figure 11**). L'apoptose est une mort cellulaire non inflammatoire dépendante de la caspase-8 qui empêche la libération des PAMPs et des DAMPs. Après l'apoptose, les cellules apoptotiques infectées par Mtb sont éliminées par les cellules phagocytaires par efférocytose (Blomgran, Desvignes, Briken, & Ernst, 2012). L'apoptose elle-même n'est pas bactéricide, mais l'efférocytose des corps apoptotiques contenant Mtb permet un adressage au lysosome (Martin et al., 2012) et une présentation antigénique plus efficace (Blomgran et al., 2012). En revanche, la pyroptose et la nécroptose sont des formes lytiques de mort cellulaire qui libèrent Mtb avec les PAMPs et les DAMPs dans le milieu extracellulaire. Ceci amplifie l'inflammation et promeut la réplication bactérienne (Lerner et al., 2017).

Mtb produit plusieurs facteurs qui inhibent l'apoptose et induisent préférentiellement la nécrose. La neutralisation des ROS par des effecteurs bactériens comme SodA (superoxyde dismutase A) et l'inhibition de c-Jun N-terminale kinase (JNK) de l'hôte inhibent la mort par apoptose (Hinchey et al., 2007; Kim et al., 2012; Miller, Velmurugan, Cowan, & Briken, 2010; Schaaf et al., 2017; Sun et al., 2013).

Une étude a montré que les macrophages infectés par Mtb, *in vitro* ou chez la souris, subissent une forme de mort cellulaire dépendante de l'accumulation du fer, appelée ferroptose, qui favorise la réplication bactérienne (Amaral et al., 2019). La détection de Mtb par NLRP3 peut également entraîner une pyroptose ou une nécrose (Welin, Eklund, Stendahl, & Lerm, 2011; Wong & Jacobs, 2011).

Bien que le TNF- α soit nécessaire pour contrôler l'infection à Mtb, des niveaux élevés de cette cytokine peuvent favoriser la nécrose lorsque l'apoptose est inhibée, entraînant une inflammation supplémentaire, des lésions tissulaires et une réplication bactérienne accrue. Mtb produit une toxine nécrosante (TNT, *TB Necrotizing Toxin*), qui hydrolyse le NAD⁺ et active RIPK3 (*receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3*) induisant une nécrose. La délétion du gène RIPK3 entraîne une baisse des taux de TNF- α , une diminution de la charge pulmonaire de Mtb et une immunopathologie

réduite, ce qui suggère une diminution de la nécrose induite par RIPK3 (Pajuelo et al., 2018; X. Zhao et al., 2017)

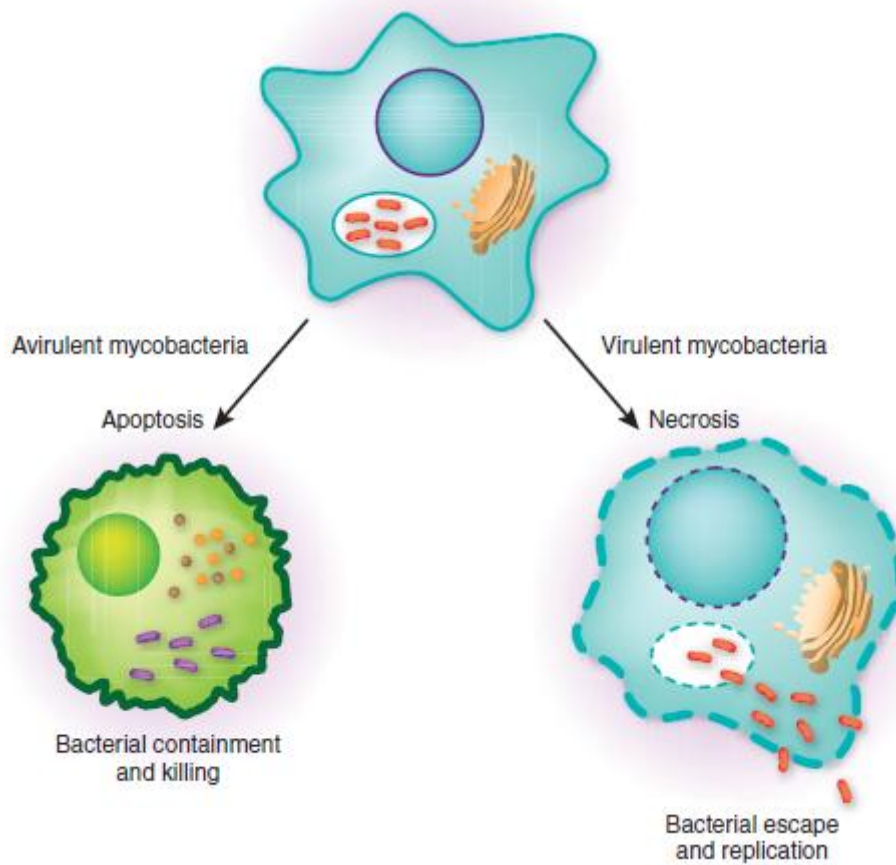


Figure 11: Les facteurs de virulence de Mtb modulent la mort cellulaire de l'hôte pour permettre la survie du bacille

(Porcelli & Jacobs, 2008)

Des formes alternatives de mort cellulaire sont stimulées par l'infection des macrophages par des mycobactéries avirulentes et virulentes. Les mycobactéries avirulentes, y compris les formes mutantes de Mtb, induisent l'apoptose du macrophage. L'enveloppe de ces corps apoptotiques est imperméable et empêche les bactéries de s'échapper. Ce processus conduit au confinement et à la destruction des bactéries et est également associé à un amorçage rapide des réponses des lymphocytes T spécifiques de l'antigène. En revanche, les mycobactéries virulentes provoquent la mort des macrophages par nécrose, qui produit une membrane cellulaire perméable qui permet aux bactéries de s'échapper et de se propager.

OBJECTIFS DE LA THESE

La TB est l'une des dix premières causes de mortalité dans le monde due à un seul agent infectieux et représente toujours une menace pour la santé publique. La protection par le BCG, seul vaccin administré jusqu'à aujourd'hui, n'est pas durable dans le temps et varie considérablement selon l'âge, l'ethnie et la forme de la maladie. Le non-respect du schéma thérapeutique est la première cause de l'émergence de souches résistantes. Bien que plusieurs antibiotiques soient actuellement en cours d'essais cliniques, Mtb développera certainement aussi une résistance contre ces nouvelles molécules. Dans ce contexte, des stratégies innovantes sont nécessaires pour éradiquer la TB.

Les thérapies dirigées vers l'hôte (HDT) sont considérées comme une stratégie prometteuse pour contrôler l'infection à Mtb. Les molécules HDT cibleraient l'hôte plutôt que les bactéries dans le but de :

- Améliorer l'activité bactéricide médiée par les macrophages et réduire la croissance des bacilles
- Moduler les voies anti-mycobactériennes de l'hôte qui sont bloquées ou altérées par Mtb pour favoriser sa survie
- Renforcer la mémoire immunitaire
- Perturber la structure du granulome pour exposer Mtb aux traitements antituberculeux
- Moduler les voies et les médiateurs pro-inflammatoires pour atténuer les lésions et favoriser le remodelage tissulaire du poumon

Le développement de HDT efficaces nécessite la compréhension d'une part, des mécanismes de défense mise en place par le système immunitaire face à l'infection et d'autre part, des stratégies d'échappement à ces mécanismes développés par la bactérie.

Au sein du macrophage, niche répliquative de la bactérie, Mtb parvient grâce à ses facteurs de virulence, à inhiber la maturation du phagosome dans lequel elle réside. Ce processus induit par l'inhibition de l'acidification de la vacuole grâce à l'inhibition de recrutement des hydrolases et à la dégradation des pompes à protons. Mtb est aussi capable de perturber l'intégrité membranaire du phagosome en sécrétant entre autres, des toxines perforantes. Ceci permet au bacille d'accéder au cytosol et de s'y répliquer. Cibler des voies de signalisation plus précoces chez l'hôte pourrait permettre en aval d'empêcher Mtb à détourner la machinerie cellulaire qui lui permet de survivre et se répliquer.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une protéine adaptatrice des TLRs, récepteurs importants dans la reconnaissance de Mtb et l'initiation de l'immunité antituberculeuse. Cet adaptateur appelé Tirap, joue un rôle important dans l'établissement de l'inflammation. La perte

de fonction de Tirap a été associée à la susceptibilité et à la résistance à certaines infections. Ces effets opposés révèlent des fonctions paradoxales de Tirap et l'importance de cet adaptateur dans le contrôle de l'infection. Dans le contexte de la TB, des mutations ponctuelles hétérozygotes dans le domaine fonctionnel de Tirap a révélé des effets contradictoires quant à la résistance à l'infection par Mtb. Par exemple, la mutation S180L, mutation la plus fréquente chez l'homme, a été associée à la fois à la résistance et à la susceptibilité et plusieurs études ont également montré que cette mutation n'avait aucun effet.

L'objectif principal de ma thèse est d'identifier le réel effet d'une déficience pour Tirap dans le contrôle de l'infection à Mtb chez la souris et dans le macrophage.

Différents aspects de la TB et du trafic intracellulaire de Mtb ont été abordés au cours de cette thèse :

- La réponse cytokinique cellulaire et chez la souris au cours de l'infection
- La capacité de la bactérie à inhiber la maturation du phagosome en bloquant son acidification
- La capacité de la bactérie à établir une niche favorable à sa réplication en induisant la formation de gouttelettes lipidiques

Identifier les facteurs de l'hôte impliqués dans les mécanismes qui induisent une plus forte résistance ou une susceptibilité accrue à l'infection permettrait de mieux comprendre la pathogénèse de la TB et prédire le développement de la maladie. Ces effecteurs de l'hôte pourraient être ciblés dans une stratégie de HDT afin d'améliorer les traitements actuels et réduire le risque d'émergence de nouvelles souches multi-résistantes.

RÉSULTATS

Tirap heterozygosity represses Cish-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis* phagosomal acidification

Imène Belhaouane¹, Christophe J. Queval², Eik Hoffmann¹, Nathalie Deboosere¹, Céline Boidin-Wichlacz¹, Valentin Sencio¹, Alexandre Vandeputte¹, Jonathan Chatagnon¹, François Trottein¹, Mathias Chamaillard^{3§}, Priscille Brodin^{1§*}, Arnaud Machelart^{1*}

¹Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

²Host-Pathogen Interactions in Tuberculosis Laboratory, The Francis Crick Institute, 1 Midland Road, London, NW1 1AT, UK.

³ Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, University of Lille, Lille, France.

§ Senior authors

*Corresponding authors:

Priscille Brodin: E-mail: priscille.brodin@inserm.fr

Arnaud Machelart : E-mail : arnaud.machelart@inserm.fr

Short title: Role of Tirap in tuberculosis.

Soumis à Plos Pathogens

Résumé

Le développement de la tuberculose est étroitement lié au déséquilibre de la balance immunitaire, entraînant l'incapacité de l'hôte à contrôler l'infection. Cette réponse immunitaire se caractérise principalement par la mise en place d'une inflammation. En plus des cytokines inflammatoires, la réponse immunitaire repose sur de nombreux autres partenaires interagissant dans des voies de signalisation complexes et leur déclenchement nécessite l'activation adéquate des récepteurs de l'immunité innée et une signalisation en aval de ceux-ci. Tirap est une protéine adaptatrice importante pour l'inflammation et la signalisation en aval des TLRs. Dans cet article, nous avons étudié comment une déficience génétique de cette protéine clé dans l'initiation de la réponse immunitaire, pourrait affecter l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dans un modèle de souris. Fait intéressant, nous avons montré que seules les souris hétérozygotes pour Tirap étaient plus résistantes à l'infection par Mtb. Ce résultat peut être corrélé avec d'autres études humaines montrant que le polymorphisme associé à une perte de fonction Tirap confère une résistance à la tuberculose. Au sein des macrophages, nous avons également observé que la bactérie ne parvenait pas à atteindre sa niche répliquative dans les cellules déficientes en Tirap. Dans les cellules non déficientes, nous avons montré également que l'infection induit l'expression de Tirap *via* la voie de signalisation en aval de TLR9 qui induit au travers d'une signalisation médiée par STAT5, l'expression de Cish, une protéine contrôlant l'acidification phagosomale. Grâce à ces résultats, nous apportons de nouvelles connaissances sur l'un des mécanismes que les mycobactéries emploient pour manipuler la cellule hôte afin de contourner cette interaction hôte-agent pathogène à son avantage.

Abstract

Progression of tuberculosis is tightly linked with a disordered immune balance, resulting in inability of the host to restrict intracellular bacterial replication and subsequent dissemination. The immune response is mainly characterized by an orchestrated recruitment of immune cells that secrete inflammatory cytokines. This response results from the activation of innate immunity receptors that trigger downstream intracellular signaling pathways involving adaptor proteins such as the TIR-containing adaptor protein (Tirap). In Humans, resistance to tuberculosis is associated with a loss of function in Tirap that is downstream of several TLR signaling. Here, we explored how genetic deficiency of Tirap may directly or indirectly control the initiation cellular and organismal resistance to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection in a mouse model and ex vivo. Interestingly, we showed that only Tirap heterozygous mice are more resistant to Mtb infection. Upon investigation at the cellular level, we observed that bacteria were not able to replicate in Tirap-deficient macrophages compared to wild-type counterpart. We further show that Mtb infection induced Tirap expression through TLR9 signaling and led to a STAT5-mediated expression of Cish, involved in the control phagosomal acidification. Our findings provide new molecular cues on how Mtb manipulates innate immune signaling for enabling intracellular replication and survival of the pathogen, thus paving the way to host-directed approaches against tuberculosis.

Keywords: *M. tuberculosis*, Macrophage, Mal/Tirap, MyD88, Cish, inflammatory response, innate immunity, bacterial intracellular survival.

Author summary

The efficiency of *Mycobacterium tuberculosis* in establishing its replicative niche relies on its capacity to manipulate host factors. The aim of our study was to identify the impact of a genetic deficiency in Tirap, a key factor of the innate immunity response, on the evolution of in vivo and ex vivo tuberculosis infections. Here, we show that heterozygous mice for a truncated Tirap protein were more resistant to the infection, displaying less bacterial burden in the lungs. At the cellular level, we identified a repression of Cish-mediated phagosomal acidification in heterozygous macrophages resulting in an enhanced bactericidal activity. Our results provide new insights about how Mtb infection could favour the expression of Tirap to ensure its survival.

Introduction

In a given population, individuals differ from each other in many of their genes. Infectious diseases have been major threats to health and survival throughout the history of human evolution. Natural selection is thereby expected to act significantly on host defense genes, particularly innate immunity genes whose products mediate the host interaction with the microbial environment (1). Toll like receptors (TLRs) play a central role in the coordination of innate and adaptive immunity. TLRs can recognize a distinct range of conserved microbial components. The TLRs-mediated detection of microbes activates a signalling cascade that leads to the initiation of an immunoregulatory response. The variability of this immune response is genetically controlled. In humans, genetic deficits and polymorphisms associated with TLR pathways are often described as influencing the course of many infections (2-4).

Among the various immune actors involved in this process, the TIRAP gene, located on chromosome 11q24.2, encodes for the Tirap/Mal (TIR-containing adaptor protein/ MyD88 adaptor-like) protein, which has a C-terminal TIR domain acting as a sorting and bridging adaptor between TLR2, TLR4 and TLR9 to bring a TLR adaptor, MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) into the immune pathway (5, 6). The signalling cascade initiated upon TLR stimulation leads to the activation of transcription factors resulting in the production of pro-inflammatory cytokines such as Interleukin (IL)-6, IL-12 and Tumour Necrosis Factor (TNF)- α (7). Tirap knock-out mice have been reported to be more susceptible to *Escherichia coli* (8) and *Klebsiella pneumonia* (9) infection. Furthermore, Tirap is the most polymorphic of all the adaptor proteins. In human populations, more than 30 SNPs (single nucleotide polymorphism) have been described in the Tirap protein and the surrounding region (8 of which are in its coding region) (10). These genetic variations have been associated with both disease susceptibility and resistance, suggesting paradoxical functions of Tirap to contain infections (11).

Contrasting roles of Tirap genetic variations have been particularly reported in patients facing tuberculosis (TB) (12-15). TB is a human infectious lung disease that kills more than 1.5 million people each year (16). *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the bacterium responsible for the disease, is a successful pathogen, which, upon inhalation, is able to infect host alveolar macrophages. The bacillus will then massively manipulate endocytic trafficking of macrophages to ensure its survival (17). One of these survival strategies is the manipulation of endosomal and lysosomal host compartments, which prevents the acidification of Mtb-containing vacuoles by blocking phagosome maturation (18). Ultimately, Mtb can escape from the vacuole and reside inside the cell cytoplasm (19). Therefore, Mtb has developed an extensive set of mechanisms to promote its survival and replicate intracellularly during its prolonged stay in the alveolar macrophages.

Epidemiological studies have identified a role of Tirap genetic variation and more precisely the S180L mutation in TB susceptibility (20-23). Substitution of a serine by a leucine amino acid at position 180 leads to altered NF- κ B signalling and lastly protection against exaggerated inflammation (10). The gene may have this polymorphism as homozygous ser/ser or leu/leu or heterozygous as ser/leu. The S180L (C539T) has been reported to be protective against several diseases but its role in TB susceptibility has been largely debated. For example, Capparelli et al., demonstrated that S180L heterozygosity confers resistance against TB in individuals (22) whereas another study showed the completely opposite effect of S180L (21). Even though a meta-analysis concluded that S180L polymorphism is significantly correlated with reduced risk of TB infection (15) further investigations are needed to understand the roles of this protein in the control of TB.

In this work, we compared the ability of wild type (WT/Tirap+/+), heterozygous (Tirap+/-) or homozygous knock-out (Tirap-/-) mice for Tirap to control Mtb infection. Interestingly, we observed that heterozygous mice are the more resistant to the infection. At the infected macrophage level, we observed that the bacterium has difficulties controlling its Cish-mediated intra-endocytic process in Tirap mutant cells, allowing weaker replication. Together these results suggest that a partial loss-of-function in the Tirap protein protects against Mtb infection.

Results

***In vivo* model of Tirap heterozygosity protects from Mtb infection**

C57BL/6 Tirap-deficient mice (Tirap^{-/-}) have been historically generated by gene targeting leading to the depletion of two exons coding for the TIR domain and the expression of non-functional Tirap protein (24). In accordance with the objective of this work, we generated a mouse model for Tirap heterozygosity (Tirap^{+/-}) by cross-breeding wild-type (Tirap^{+/+}) and knock-out (Tirap^{-/-}) mice (**Fig.S1A**). To determine the physiological relevance of a total or a partial loss of Tirap function during TB infection, we inoculated intranasally these mice with a high dose (1 x 10⁵ colony-forming units (CFU)) of the virulent Mtb H37Rv strain. During the experiment, no apparent differences in body weight or animal behavior were observed. 28 days post-infection, mice were sacrificed and lungs were harvested for histopathology, immunopathology and to study bacterial burden. Interestingly, determination of pulmonary mycobacterial loads showed a significant increase in Mtb replication ^{+/+} and Tirap^{-/-} mice compared to Tirap^{+/-} littermates suggesting that the latter are more resistant to infection (**Fig.1A**). To gain insight into the pathogenesis established during infection, we analyzed lung sections by histology and immune cells recruited to the lungs using flow cytometry.

Anatomopathological examination between the different Tirap genotypes revealed no difference in the overall aspect of the lungs and the lesions induced by the infection (**Fig.1B**). While the overall basal number of immune cells present in the lung of each genotype was not significantly different (Fig.S1B), the examination of innate immune cell profiles 28 days post-infection revealed a noticeable increase in neutrophils in the lungs of Tirap^{-/-} mice (**Fig.1C**). In contrast, the number of CD8 T cells, CD4 T cells and B lymphocytes increased in the lungs of infected Tirap^{+/-} mice, but not in Tirap^{+/+} and Tirap^{-/-} mice, indicating a more effective adaptive immune response, which could explain the resistance of heterozygous mice to Mtb infection (**Fig.1C**). Additionally, we compared the expression profile of inflammatory cytokines in total lung extract (**Fig.1D**). The only difference that we observed was a decrease in the transcription of IL-12p40 and TNF- α in Tirap^{-/-} mice.

Together, our results show that, as supported by several human reports, heterozygosity for Tirap confers protection against Mtb infection. We then decided to study Mtb replication abilities at the macrophage level and investigated specific features of Mtb trafficking that could explain the protection associated with heterozygosity for Tirap.

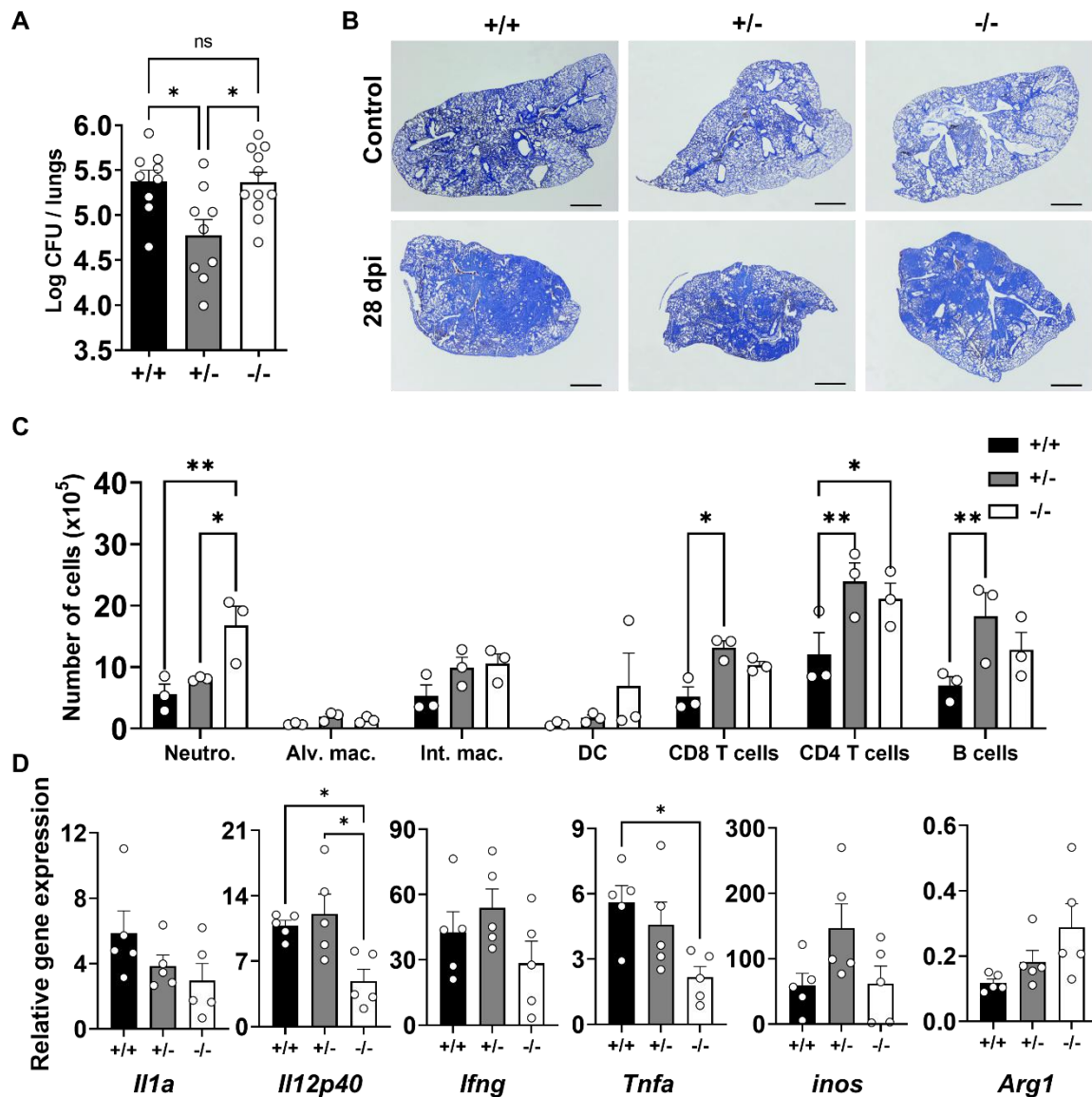


Figure 1: Comparative study of bacterial load, recruited immune cells and cytokines expression in lungs of Tirap +/+, +/- and -/- infected mice.

C57BL/6 WT (+/+), Tirap^{+/-} (+/-) and Tirap^{-/-} (-/-) mice were intranasally infected with Mtb H37Rv (10³ CFU/20μL). 28 days post-infection, mice were sacrificed to study their pathological state. **(A)** Mycobacterial load was determined by plating lung lysates and counting Colony-Forming Units (CFU) 2 weeks after plating. Shown are mean ± SEM of at least 9 infected mice per condition. **(B)** Toluidine blue staining of non-infected (control) and infected (28 days post-infection) slice lungs (5 μm) from +/+, +/-, -/- mice. Bar: 10 mm. **(C)** Histogram depicting changes of immune cells populations during the course of Mtb H37Rv infection, as determined by flow cytometry using specific cell surface markers. Cell numbers were normalized to the total cell number analyzed in the whole lung. Shown are mean ± SEM of cells obtained from three individual mice per group. **(D)** Histograms showing fold increase in different cytokines expression in lungs of infected +/+, +/- and -/- mice. Shown are mean ± SEM of 5 infected mice per condition. dpi: days post-infection, ns: non-significant, * P value < 0.05, ** P value < 0.01, as determined by Ordinary one-way ANOVA test.

Tirap deficiency impairs Mtb replication inside macrophages

In order to evaluate the contribution of Tirap partial loss-of-function to the molecular mechanisms involved in this resistance phenotype, we assessed the ability of Mtb to replicate in macrophages, the main reservoir for these bacteria. We first infected bone marrow-derived macrophages (BMDMs) derived from each genotype of mice with a GFP-expressing Mtb H37Rv strain (MOI (multiplicity of infection) of 2) and followed bacterial growth during 4 days. Cells were grown in 384-well plates and their nuclei were labelled to enable analysis by an automated confocal microscopy approach using in-house multiparametric imaging. This allowed acquisition and examination of hundreds of images generating robust and reproducible data sets (25). We applied algorithms to input images, allowing us to segment different fluorescent signals to detect nuclei and to select cells and bacteria. We first ensured that the proliferative capacity of the BMDMs was not altered by Tirap deficiency. As shown in **Fig.S1C**, the three types of macrophages showed the same growth profile over a period of 4 days. Further analysis allowed us to determine infection rate and bacterial load per cell. First, we observed that Tirap deficiency does not impair Mtb uptake by macrophages, as determined by the percentages of Mtb-infected BMDMs 3 h post-infection (hpi) (**Fig.2A**). We then compared the intracellular area of Mtb per infected cell, which directly correlates with the number of Mtb per cell (18). At 4 dpi, fold increase of bacterial load was lower in Tirap^{+/-} BMDMs than Tirap^{+/+} BMDMs, which is consistent with the phenotype observed in mice (**Fig.2A**). Intriguingly, fully deficient BMDMs also showed a lower bacterial load than Tirap^{+/+} BMDMs and a similar load to that of Tirap^{+/-} BMDMs. This resistance phenotype of Tirap^{-/-} macrophages suggests that the heightened inflammatory state and the recruited neutrophils in the lungs can be detrimental for bacterial clearance. Overall, the bacterial load in macrophages shows that Tirap promotes the survival and/or the intracellular growth of the virulent Mtb H37Rv strain. Moreover, in less virulent infection conditions using the attenuated Mtb H37Ra strain (**Fig.S2A**), Tirap deficiency did not show any impact on bacterial growth, suggesting that this event is dependent on bacterial virulence.

As Tirap seems to favor Mtb replication by a virulence-dependent mechanism, we measured Tirap expression in BMDMs by qRT-PCR. While tirap was expressed at steady state in non-infected (NI) Tirap^{+/+} and Tirap^{+/-} BMDMs at a similar rate, we observed a pronounced difference during Mtb infection at 3 hpi (MOI of 2), where tirap expression was increased three times in Tirap^{+/+} BMDMs (**Fig.2B**). On the contrary, no induction of the transcription of tirap was observed in heterozygous cells by Mtb infection. This suggests that the bacteria engage Tirap and/or its downstream signaling pathways to replicate inside macrophages.

As described in the literature (26), the lipid binding domain of Tirap allows the adaptor to be recruited to phospholipid membranes. With our observation that Tirap expression is increased during infection, we aimed to analyze its cellular distribution. Mtb-infected Tirap^{+/+} BMDMs were stained with anti-Tirap antibody and images were captured by confocal microscopy. We found that the percentage of Tirap-expressing cells increases with the MOI and that the Tirap signal is localized close to the bacteria, indicating that the adaptor could be recruited to the Mtb-containing vacuole (MCV) during infection (**Fig.2C**). We considered the impact of Tirap being recruited to the MCV on its implication in signaling pathways of intracellularly expressed TLRs. TLR9 is known to be localized to endosomes as well as to phagolysosomes, where it could be triggered by mycobacterial DNA after uptake of the pathogen. This led us to consider TLR9 as an important candidate pattern-recognition receptor that might account for the Tirap dependency of host resistance to Mtb. To investigate this hypothesis, we infected TLR9-deficient BMDMs with Mtb H37Rv-GFP and followed bacterial growth for 4 dpi. We found that TLR9 deficiency restricts excessive growth and replication of Mtb at a comparable rate to Tirap deficiency (**Fig.S2B**). We also investigated the impact of MyD88, TLR2 and TLR4 and found no differences compared to the bacterial load in infected WT BMDMs (**Fig.S2B**). This strongly suggests that the impact of Tirap on Mtb replication could be linked to TLR9 activation in a MyD88-independent signaling pathway.

The comparison of the inflammatory response initiated after infection showed that cytokine expression is poorly induced in Tirap^{-/-} macrophages, while heterozygous cells displayed an intermediate inflammatory level (**Fig.2D**). Indeed, gene expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was significantly lower in heterozygous cells compared to WT littermates.

Taken together, these data suggest that the increased expression of Tirap and its recruitment to the MCV during infection is the first evidence that Mtb has the capacity to dampen host defense mechanisms via Tirap among other host factors. Moreover, our results align with the intracellular replication of Mtb and the activation of inflammatory responses.

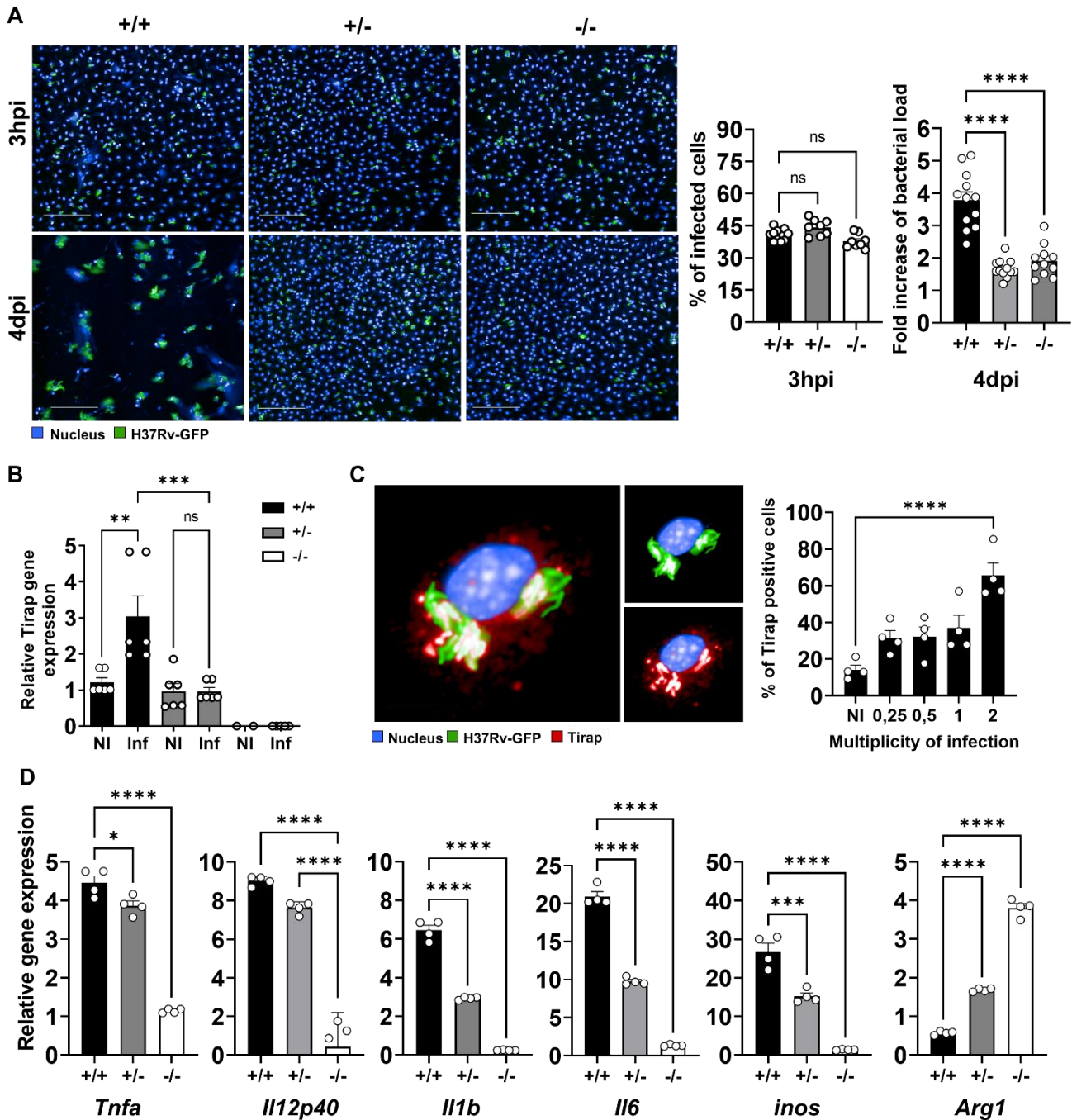


Figure 2: Tirap expression and localization in Mtb-infected BMDMs: Impact on bacterial growth and cytokines expression.

(A) BMDMs were grown in 384-well plates, infected with Mtb H37Rv-GFP (MOI of 2) and analyzed by automated confocal microscopy. Shown are representative images of +/+, +/- and -/- BMDMs at 3 hpi (upper panel) and 4 dpi (lower panel). Segmentation algorithms were applied to input images to detect nuclei labeled by Hoechst 33342 (cyan) and the GFP signal of Mtb H37Rv (green) to determine infection rate 3 hpi (left histogram) and replication fold increase from 3 hpi to 4 dpi (right histogram). Shown are mean \pm SEM obtained from at least 8 analyzed wells per condition. Bar: 50 μ m. (B) Histogram showing mean \pm SEM of relative *tirap* gene expression. +/+, +/- and -/- BMDMs were infected with Mtb H37Rv at MOI=2 for 3 hours. Non-infected (NI) +/+ cells served as control. Transcription of *tirap* was assessed by quantitative RT-PCR and normalized to the expression of *gapdh*, used in all samples as a housekeeping gene. (C) Confocal image of the subcellular localization

of Mtb H37Rv-GFP (green) and Tirap (red) in +/+ BMDM at 24 hpi. The nucleus was labeled with DAPI (blue). Bar: 5 μ m. Percentages of cells displaying red signals are reported on the graph and represent the percentage of Tirap positive cells according to the MOI. **(D)** Histograms showing mean \pm SEM of fold increase in different cytokines expression in BMDMs from +/+, +/- and -/- mice. NI: non-infected, Inf: infected, hpi: hours post-infection, dpi: days post-infection, ns: non-significant, * P value < 0.05, ** P value < 0.01, *** P value < 0.001, **** P value < 0.0001, as determined by Ordinary one-way ANOVA test.

Tirap inhibits maturation of the Mtb-containing vacuole (MCV)

To better understand why a lack in tirap expression results in significant containment of Mtb growth in macrophages, we compared the expression profiles of Mtb-infected WT and Tirap-deficient BMDMs by RNAseq. As Tirap^{+/-} and Tirap^{-/-} BMDMs displayed the same resistance phenotype, we first performed an analysis to discriminate genes that are commonly modulated compared to WT cells during infection (Fig.3A). Within just 3 hpi, the transcriptional signature in Tirap-deficient BMDMs differed markedly from WT BMDMs with 38 and 62 genes that were at least two-fold increased and decreased in Tirap-deficient BMDMs, respectively (**Fig.3A-C**). Enrichment analysis of transcriptomic datasets highlighted the downregulation of several genes related to inflammation (cytokines and inflammatory response) in Tirap-deficient macrophages (Fig.3D). Indeed, a lack of Tirap expression in Mtb-infected BMDMs resulted in reduction of IL-1, IL-6, IFN and NOS2 production as also previously observed in **Fig.2D**.

Apart from downregulated inflammatory genes, we identified the Cish gene (Fig.2D and Fig.3A), known as a key player of the Cytokine Signaling and Immune Regulation (SOCS) protein family in the manipulation of immune responses (27). Cish expression was 4- and 21-times higher in infected WT BMDMs compared to ^{+/-} and ^{-/-} BMDMs during infection, respectively (**Fig.4A**). Its role in TB pathogenesis was previously reported by our team (18). Data showed that during infection, Cish is overexpressed and the Cish protein is recruited to MCVs. Sequestration of Cish close to Mtb triggers the degradation of the proton v-ATPase, thus inhibiting the acidification of MCVs and allowing replication of bacteria. Inhibition of Cish expression in Tirap-deficient cells during infection could interfere with v-ATPase degradation, and this might explain the capacity of Tirap-deficient cells to control bacterial growth by inducing acidification of MCVs. To investigate phagosomal maturation, we monitored the fusion of Mtb phagosomes with lysosomes by fluorescence microscopy using the pH-sensitive LysoTracker dye. It has been demonstrated previously that the intensity of LysoTracker labeling directly correlates with the acidification of Mtb vacuoles (18). Upon Mtb infection, the LysoTracker intensity was significantly higher in heterozygous cells than that in WT cells (**Fig.4B**), strongly suggesting that Tirap interferes with the process of phagolysosome fusion, presumably by inducing Cish-dependent v-ATPase degradation. Intriguingly, acidification of MCVs in Tirap^{+/+} BMDMs was comparable with that of ^{-/-} BMDMs despite the resistance phenotype of the latter. These data were confirmed using a pHrodo probe that labeled Mtb H37Rv-GFP when it resides in acidic compartments (**Fig.4C**). Over the course of infection (up to 12 h), pHrodo intensity showed that overall acidification of Mtb-containing compartments was always higher in heterozygous BMDMs compared to values acquired in infected BMDMs from both homozygous mice (**Fig.4C**).

These results showed that the mechanism explaining the inability of the bacteria to replicate upon Tirap deficiency is different between heterozygous and full knock-out cells.

Several studies showed that the SOCS-mediated regulation of cell functions is closely connected with the activities of proteins of the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) family (28, 29). Queval et al. showed that infection of macrophages with Mtb leads to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Tactor (GM-CSF) secretion inducing STAT5-mediated expression of Cish. To determine whether Tirap participates in intracellular Mtb survival by inducing GM-CSF-dependent STAT5 signaling, we compared Gmcsf gene expression during infection between WT and Tirap-deficient BMDMs. In agreement with the expression pattern of Stat5, we showed that Gmcsf expression was higher in control BMDMs when compared to expression levels in Tirap-deficient cells (**Fig.4D**). This observation strongly suggests that Tirap acts as a modulator of macrophage defense by triggering STAT5 signaling via GM-CSF secretion. This also supports the hypothesis that Mtb uses Tirap to block the maturation of the vacuole by triggering Cish activity in mutant cells. If our hypothesis is correct, it is then conceivable that the enhanced Cish activity in homozygous mutant mice may create an inflammatory microenvironment that is deleterious to Mtb while being protective in heterozygous mice.



Figure 3: Identification of differentially regulated genes between +/+, +/- and -/- BMDMs during Mtb infection.

(A) Total RNA was extracted from non-infected and infected (3 h) +/+, +/- and -/- BMDMs and sequenced with the Illumina system and Deseq2 analysis as described in the Materials and Methods. **(B)** Volcano plot of RNA-seq data from non-infected versus infected cells shows the adjusted p-value (false discovery rate, FDR $-\log_{10}$) versus fold change, FC (\log_2). The 100 genes with an FDR < 0.01 and FC > 2 are shown in blue and orange for downregulated and upregulated genes respectively. **(C)** Heat map comparing the transcriptional changes that occur at 3 hpi in +/+, +/- and -/- BMDMs. Columns and rows show genotypes and genes, respectively. **(D)** The 100 modulated genes during infection were copy-pasted in Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) to perform a pathway enrichment analysis.

Tirap deficiency prevents Mtb to reside in its replicative niche

Although many studies have demonstrated that MCVs remain features of endosomes and early phagolysosomes (30), several other studies have shown that the phagosomal membrane rapidly undergoes progressive disruption through the action of canonical bacterial virulence factors, phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and ESX-1 (31, 32). This phagosomal permeabilization allows Mtb to access cytosolic components that aid mycobacterial replication and induce cell necrosis for further dissemination (19, 33). This led us to assess whether Tirap deficiency could interfere with Mtb phagosomal rupture. We used the CCF4-AM dye, a cell permeable β -lactamase substrate that shifts its emission wavelength from green to blue when converted into its negatively charged metabolite CCF4 (34). As Mtb expresses membrane-associated β -lactamase BlaC, this dye can be used to characterize the ability of mycobacteria to escape their phagosomal vacuoles and reach the cytosol. At 4 dpi, Tirap^{+/-} and Tirap^{-/-} infected BMDMs displayed lower metabolization of CCF4-AM, resulting in lower fluorescence intensity than that observed in infected ^{+/+} BMDMs, suggesting that disruption of MCVs was lower and less efficient in these deficient cells compared to WT ones (**Fig.4E**). It is also known that Mtb persistence and replication relies on host metabolic homeostasis shift and the availability of host nutrients in the cytosol. The formation of lipid droplets (LDs), which are a key reservoir of neutral host lipids and contain important carbon sources for Mtb, is clear evidence for the ability of the bacteria to manipulate host factors (35). In this context, LD formation was almost inhibited in Tirap-deficient cells (both in heterozygous and homozygous), whereas in WT BMDMs large amounts of LDs were induced upon Mtb infection and were also observed at 4 dpi (**Fig.4F**). This suggests that in Tirap-expressing cells, Mtb potentially has more access to host nutrients that fuel intracellular replication than in Tirap-deficient cells. This observation, associated with higher phagosomal rupture in WT cells, supports the hypothesis that Mtb manipulates Tirap as a host factor to build its replicative niche.

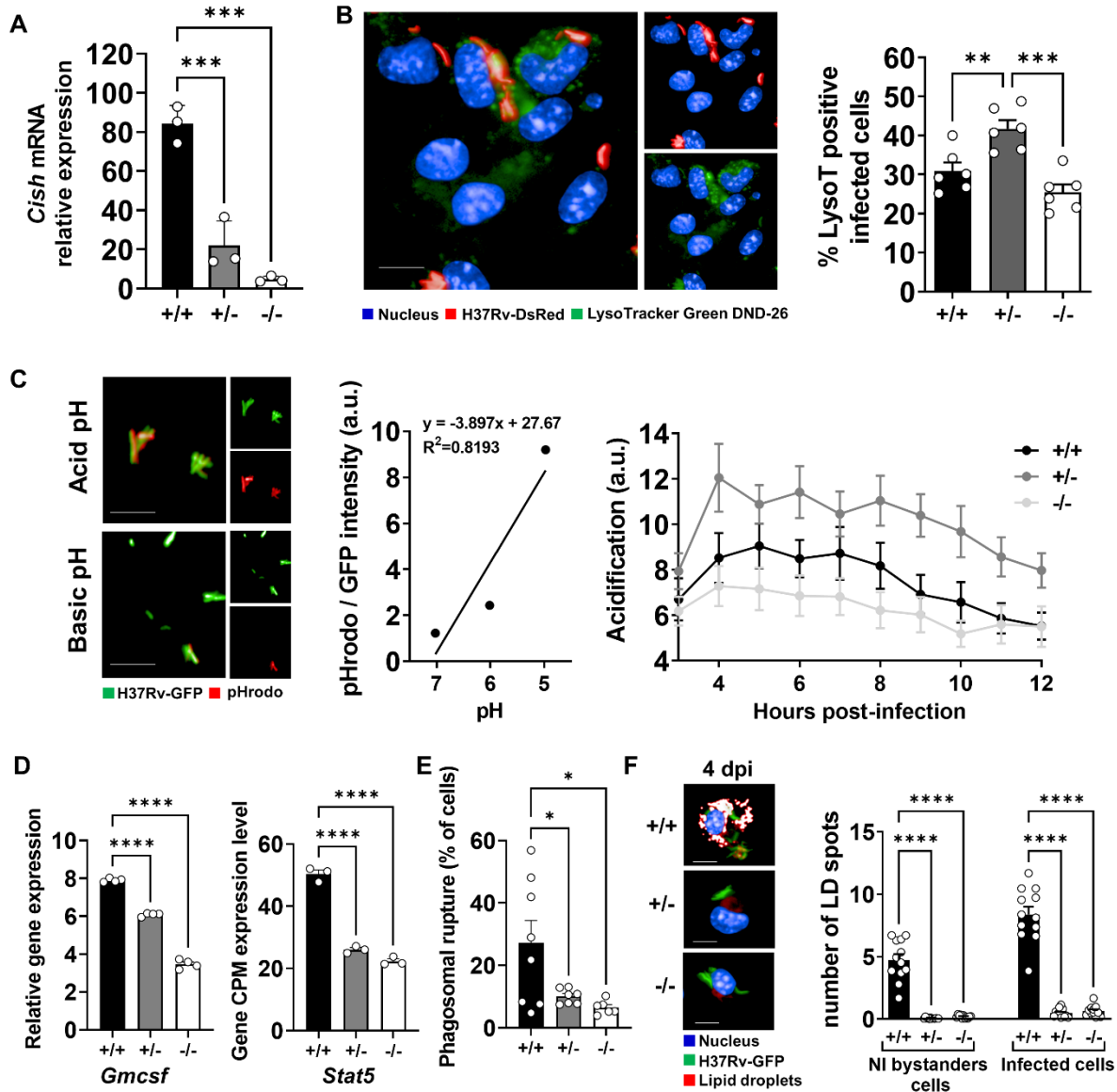


Figure 4: Tirap implication in phagosomal maturation and lipid droplet formation.

(A) BMDMs were infected with Mtb H37Rv at MOI of 2 for 3 hours. Non-infected (NI) +/+ cells served as control. Transcription of *cish* was assessed by quantitative RT-PCR and normalized to the expression of *gapdh*, used in all samples as housekeeping gene. Shown are mean \pm SEM obtained from duplicate of 3 biological replicates. (B) Typical images and related quantification of phagosome acidification of Mtb H37Rv-RFP-infected macrophages. DAPI-labeled cell nuclei are in blue, Mtb H37Rv-DsRed is in red, and acidic-pH-sensitive LysoTracker staining is in green. Bar: 10 μ m. The LysoTracker signal was set to the minimum in non-infected controls. The histogram shows mean \pm SEM of the percentage of infected cells displaying a LysoTracker signal. (C) Typical images of H37Rv-GFP bacteria labeled with pHrodo in acid (pH 4) and basic (pH 8) medium. Bar: 5 μ m. The pHrodo relative intensity of GFP-bacteria is reported to the pH on a standard curve (left histogram) to evaluate acidification. Kinetic acidification curve (right histogram) determined by measuring pHrodo relative intensity of GFP-bacteria per infected cell. Shown are mean \pm SEM obtained from 10 analyzed wells per condition. (D) Histograms showing mean \pm SEM of gene expression level in BMDMs from +/+, +/- and -/- mice 3hpi. GM-CSF expression was quantified by quantitative RT-PCR. Stat5a expression level is reported from RNAseq data. (E) Histogram showing mean \pm SEM of the percentage of BMDMs detected with

phagosomal rupture 4 dpi using CCF4 staining as described in Materials and Methods section. **(F)** Representative images and histograms showing the average LD number per cell for non-infected and infected (MOI of 2) +/+, +/- and -/- BMDMs 4 dpi. DAPI-labeled cell nuclei are in blue, Mtb H37Rv-GFP is in green, and LD staining (LipidTox) is in red. Bar: 5 μ m. NI: non-infected; Inf: infected; CPM: count per million; dpi: days post-infection, * P value < 0.05, ** P value < 0.01, *** P value < 0.001, **** P value < 0.0001, as determined by Ordinary one-way ANOVA test.

Discussion

TLRs are pattern recognition receptors, which sense invading pathogens by recognizing pathogen associated molecular patterns (PAMPs). TLRs recognize several PAMPs of Mtb, such as lipoprotein, lipomannan, lipoarabinomannan and the heat shock protein 65 (36). PAMP recognition initiates signalling pathways through adaptor proteins (MyD88/Tirap) leading to activation of inflammation. Human studies have indicated that genetic variations in TLR signalling pathway genes regulate the cellular immune response and may influence susceptibility to TB in different populations (37). Indeed, several studies have focused on the involvement of Tirap polymorphism during Mtb infection leading to conflicting conclusions (11).

In this work, we wanted to study the implication of a deficiency of the Tirap TIR domain in the control of Mtb infection. To this end, we crossbred WT and Tirap^{-/-} C57BL/6 mice to generate heterozygous individuals in order to compare the ability of these three mouse strains to control intranasal infection with Mtb H37Rv. As previously observed, fully deficient mice control the infection at similar rates as observed in WT mice (38). However, our results show that heterozygous Tirap-deficient mice are more resistant to infection. Interestingly, these results are consistent with human studies showing that the heterozygosity for the SNP S180L, a loss-of-function associated mutation (10), is also associated with protection against TB (14, 22). In these studies, the authors showed that heterozygous subjects display intermediate inflammatory levels. This aligns with our results at least in macrophages. It is evident that pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IFN- γ and TNF- α play a major role in controlling Mtb infection (39, 40). However, there is also evidence that overproduction of these molecules favour infection (41). For example, TNF- α is an influential factor of TB lung damage by promoting granuloma cavitation and its expression levels are inversely related with the resolution of lung lesions during TB treatment (42, 43). Adjuvant delivery of the TNF- α antagonist etanercept improved bacterial clearance and reduced relapse in mice (44, 45). There have been case reports of TNF- α inhibitors being used successfully to improve the clinical course of patients with advanced drug susceptibility (46). This suggests that Tirap heterozygous mice may be protected against TB as the infection induces only intermediate inflammation levels in lungs that help to control the infection. In fully deficient infected mice, we observed a significant increase in the number of recruited pulmonary neutrophils. This strong infiltration may be related to a compensatory and inappropriate response of the host due to a heightened response. Sustained neutrophils influx is most often associated with susceptibility to Mtb infection (47) and especially in genetically susceptible individuals (48, 49). For example, Nair et al. showed that neutrophil neutralization protects against Mtb exacerbation in ACOD-1 deficient mice (50). We also observed that heterozygous mice displayed a higher level of adaptive immune cells in lungs 28 days post-infection

which could explain its phenotype. Interestingly, a previous study showed that individuals with a recessive deficiency in Tirap, initially predicted to be deleterious, led to an increase in compensatory adaptive immune responses and a decrease in invasive hematogenous infections in children (51). Further investigation could focus on the specificity of these recruited regulatory and adaptive cells against Mtb antigens.

In order to decipher the molecular mechanisms involved in this phenotype, we next wanted to clarify how Mtb is able to replicate in macrophages, one of the main reservoirs of Mtb in the lung (18). Using high-content microscopy and image-based analysis, we observed that Tirap deficiency does not affect bacterial uptake but reduces severely Mtb replication levels in heterozygous and fully knocked-out macrophages. These observations showed that resistance of heterozygous mice could be correlated with phenotype in macrophages, whereas the resistance of fully deficient macrophages is not reflected in mice. This latter point suggests that despite the difficulty of replication in macrophages, the neutrophil-rich environment and the difficulty in activating inflammatory responses could ultimately allow Mtb replication in lungs.

Our findings also demonstrate that in wild type macrophages, Mtb infection induces overexpression of Tirap and its recruitment to the MCV. Tirap was identified to be recruited to the phagosome of intracellular pathogens bridging activated TLR9 (6, 26). Interestingly, we followed the replication of Mtb in mutant macrophages for TLRs involved in Mtb detection and we observed that only TLR9 deficiency impairs mycobacterial replication. Together with a human study showing that TLR9 polymorphism is associated with resistance against TB (52), we can expect that Mtb uses TLR9-Tirap signalling to enable its replication. Indeed, it has been described for other infections that exploiting Tirap signalling is an effective strategy to survive in macrophages (53-55). For example, it was shown that *Pseudomonas aeruginosa* PA7 has a TIR domain-containing protein called PumA (*Pseudomonas* UBAP1 modulator A) that is translocated into host cells during infection to directly interact with Tirap at the plasma membrane and controlling TLR signalling (54). Similarly, *Brucella* produces a TIR domain-containing protein (TcpB/Btp1) to selectively target Tirap and inhibit NF- κ B activation to allow survival and replication (55). In the future, it will be interesting to investigate whether Mtb does produce an effector responsible for the recruitment of Tirap to the phagosome to promote its replication. It has been shown that virulent strains of Mtb release dsDNA inside host macrophages to be recognised as PAMP by the innate cytosolic sensor AIM2, a crucial step in activating the inflammasome (56, 57). In this context, TLR9 is known to mature and induce signals from endosomal compartments in response to dsDNA (58, 59). In conjunction with our results showing that the phenotype observed in Tirap-deficient macrophages is virulence-dependent, we can hypothesize that Mtb releases dsDNA to be recognized by TLR9 in order to benefit from downstream signalling

pathways that aid intracellular replication. This hypothesis requires further investigation, especially knowing that Tirap is able to interact with many other cytosolic and membrane components, such as RAGE, C-Jun and Caspase 1 (5).

In order to identify the mechanism by which Mtb uses Tirap signalling to promote its replication, we performed a RNAseq analysis to compare gene expression between infected Tirap-deficient and WT macrophages. Among the hundred genes identified, the Cish gene was interestingly down-regulated in mutant macrophages.

A prior study from our group showed that the v-ATPase is targeted for ubiquitination and proteasomal degradation during Mtb infection due to the expression of Cish (18). V-ATPase degradation prevents MCV acidification and promotes Mtb replication. More precisely, Mtb infection leads to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secretion, inducing STAT5-mediated expression of Cish. Consistently, it was shown that inhibition of Cish expression leads to reduced replication of Mtb in macrophages. Therefore, we monitored GM-CSF expression and MCV acidification in Tirap-deficient cells.

Interestingly, Cish underexpression was associated with a lower expression of GM-CSF in both heterozygous and homozygous Tirap mutant macrophages. However, the use of two different image-based assays, relying on two different pH sensitive dyes LysoTracker and pHRodo, showed that MCV acidification only increased in infected heterozygous macrophages. This suggests that the Tirap-deficiency associated with resistance against Mtb would exhibit different mechanisms between heterozygous and fully deficient cells. We clearly hypothesize that in heterozygous macrophages, Mtb is not able to sufficiently activate the TLR9/Tirap pathway and its downstream signaling to produce GM-CSF, inducing STAT5-mediated Cish expression. Interestingly, it was described previously that lysosomal activity controls antigen presentation (60-62). It would be interesting to see if heterozygous macrophages display higher antigen presentation activity than WT cells. This hypothesis could explain why we observed more recruited B lymphocytes and CD4 T cells in lungs of infected heterozygous mice and ultimately why these mice are more resistant to Mtb infection. Alternatively, one may anticipate that the heightened ability of macrophages to secrete inflammatory cytokines may enhance the permissiveness of lung microenvironment of homozygous mutant mice. Indeed, fully deficient macrophages are also resistant to Mtb infection via an unidentified mechanism that is not reflected in Tirap^{-/-} infected mice showing high neutrophil burden in lungs.

Overall, our results show that only Tirap heterozygous mice are more resistant to Mtb infection, which may correlate with substantial studies showing that heterozygous polymorphism associated

with a Tirap loss-of-function confers resistance to Mtb infection in humans. In macrophages, we observed that heterozygous cells prevent bacterial replication by a mechanism that could be related to phagosomal acidification. As Tirap signaling during Mtb infection is still poorly understood at the cellular and molecular levels, it will be important to compare our results with a previous study identifying a TLR-independent function of Tirap in the context of Mtb infection (63). The authors showed that Tirap binding to IFN- γ receptor bridges MyD88 to regulate autophagy and intracellular killing. The use of quite different experimental procedures (higher MOI, IFN- γ macrophage activation, CFU readout for intracellular bacterial load evaluation) showed that Tirap-deficient macrophages are not able to control the infection. The identification of host genetic markers remains useful to predict TB development and understand the immunopathogenesis of the disease. Finally, understanding the genetic or epigenetic key targets controlling TB will enable the development of new tools for further innovative therapies. Together, further investigations are still needed to decipher the role of Tirap downstream signalling during Mtb infection through a dependent or non-dependent TLR interaction.

Material and methods

Antibodies and dyes

Tirap polyclonal antibody was purchased from ThermoFischer. For immunofluorescence, the antibodies were probed using secondary donkey anti-rabbit antibodies conjugated to Rhodamine Red X (Jackson ImmunoResearch). Cell nuclei were fluorescently labelled using DAPI (Sigma Aldrich) or Hoechst 33342 (ThermoFisher). LysoTracker Green DND-26, pHrodo Red succinimidyl ester, CCF4-AM and LipidTox Deep Red were obtained from ThermoFisher.

Mice

C57BL/6NJ wild type and Tirap^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All mice, were maintained and breeding was performed in the animal facility of the Pasteur Institute of Lille, France, together with heterozygous mice for TIRAP gene (Tirap^{+/-}) generated there (agreement B59-350009). All experimental procedures received ethical approval by the French Committee on Animal Experimentation and the Ministry of Education and Research (APAFIS#1 327 0232-2017061411305485 v6, approved on 14/09/2018). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs)

Murine bone-marrow progenitors were obtained by sampling tibias and femur bones from 8 to 12-week-old C57BL/6NJ wild type, Tirap^{+/-} and Tirap^{-/-} mice. BMDMs were obtained by seeding 10⁷ bone marrow cells in 75 cm² flasks in RPMI 1640 Glutamax medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco; RPMI-FBS) and 10% L929 cell supernatant containing Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF). Fresh medium was added every 3-4 days. After 7 days incubation at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂, the BMDMs monolayer was rinsed with D-PBS and cells harvested with Versene (Gibco). BMDM were resuspended into culture medium to be used for subsequent assays.

Bacteria

Recombinant strains of Mtb H37Rv expressing an enhanced green fluorescent protein (GFP) or a red fluorescent protein DsRed (Christophe et al., 2009) were cultured in Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC, Difco), 0.2% glycerol (Euromedex), 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich) and 50 µg/ml hygromycin (ThermoFisher Scientific) or 25 µg/ml kanamycin (Sigma-Aldrich) for H37Rv-GFP or H37Rv-DsRed, respectively. Cultures were maintained for 14 days until the exponential phase was reached. Before cell infection, bacilli were

washed with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, free from MgCl₂ and CaCl₂, Gibco), resuspended in 10 mL RPMI-FBS and centrifuged at 1000 RPM for 2 min at room temperature to remove bacterial aggregates. Bacterial titer of the suspension was determined by measuring the optical density (OD₆₀₀ nm) and GFP or DsRed fluorescence on a Victor Multilabel Counter (Perkin Elmer). The bacterial suspension was diluted at the required titre in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS prior to infection. For *in vivo* studies, the non-fluorescent Mtb H37Rv strain were grown in Middlebrook 7H9 medium, as described previously (Deboosère et al., 2017; Raze et al., 2018).

Infection of mice and determination of bacterial burden

8-12-week-old mice were inoculated with H37Rv via the intranasal route (i.n.) (10³ CFU/20 µL) as previously described (Machelart et al., 2019). 28 days post infection, mice were euthanized and lungs were harvested for bacterial burden evaluation by colony forming units (CFU) enumeration. Lungs were homogenized for 20 min in a tube containing 2.5 mm diameter glass beads and 1 ml of PBS using the MM 400 mixer mill (Retsch GmbH, Haan, Germany). Ten-fold serial dilutions (from 10⁻² to 10⁻⁹) of each sample were plated onto 7H11 medium agar plate (Difco) supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC, Difco). After a 2-week growth period at 37°C, CFUs were determined at the appropriate dilution allowing optimal colonies enumeration.

Lung histopathology

At the determined time-point, mice were euthanized, lungs were harvested perfused and soaked in 4% formaldehyde (10% formalin solution, neutral buffered, HT501128, Sigma-Aldrich) for 24 hours at 4°C and then dehydrated in a series of ethanol solutions to visualize their internal structures. Specimens were then embedded in a paraplast Plus® containing medium and cut in sections down to 5 µm thickness. Slices were colored using toluidine blue (0.1%) for 4 min after being dewaxed and rehydrated. Samples were examined using an optical microscope (Zeiss Axio lab A1) and a stereomicroscope (Zeiss Stemi 305) and a camera and the Zen 2011 module (Zeiss) for image analyses.

Flow cytometry

As described previously (Hanot Mambres et al., 2016), lungs were harvested, cut into small pieces and incubated for 1 hour at 37 °C with a mix of DNase I (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) and collagenase (400 U/ml 1.6 mg/ml, Roche). Lung cells were washed and filtered through a 100 µM filter before being incubated with saturating doses of purified 2.4G2 (anti-mouse Fc receptor, ATCC) in 200 µL PBS 0.2% BSA 0.02% NaN₃ (FACS buffer) for 20 minutes at 4 °C to prevent antibody binding on the Fc receptor. Various fluorescent mAb combinations in FACS buffer were used to determine cell populations (table

1). Acquisitions were done on FACScanto II cytofluorometer (Becton Dickinson) with the following mAbs from BD Biosciences: Fluorescein (FITC)-coupled HL3 (anti-CD11c), FITC-coupled 145-2C11 (anti-CD3), APC-coupled RB6-8C5 (anti-GR1), phycoerythrin (PE)-coupled RM4-5 (anti-CD4), PE-coupled E50-2440 (anti-SIGLEC-F), APC-coupled BM8 (anti-F4/80). APC-eF780-coupled M1/70 (anti-CD11b) were purchased from eBiosciences and fixable viability dye Aqua (ThermoFisher) was used to gate viable cells. Gating strategies are summarized in Supp. Fig. 3.

Cell type	Phenotype
Neutrophils	CD11b ⁺ Ly6G ⁺
Dendritic cells	CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ⁻
Alveolar macrophages	F4/80 ⁺ SiglecF ⁺ CD11c ⁺
Interstitial macrophages	F4/80 ⁺ SiglecF ⁻ CD11c ^{int}
CD4 T cells	CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8 T cells	CD3 ⁺ CD8 ⁺
B cells	CD3 ⁻ B220 ⁺ MHCII ⁺

Table 1: Phenotypic determination of pulmonary immune cells.

Infection for quantification of intracellular mycobacterial replication, phagosomal acidification, phagosomal rupture and Lipid Droplets (LDs) formation

2x10⁴ BMDM were seeded per well in 384-well plates. Cells were infected for 3 h with H37Rv-GFP at a MOI of 2. Cells were extensively washed with RPMI-FBS in order to remove extracellular Mtb and incubated at 37°C with 5% CO₂.

For intracellular mycobacterial replication assay, 10% formalin solution (Sigma-Aldrich) containing 10 µg/mL Hoechst 33342 (Life-Technologies) was replaced to each well at 3 h and 96 hpi. Plates were incubated for 30 min, allowing nuclei staining and cell fixation. Cells were stored in DPBS until image acquisition.

To quantify phagosomal acidification, 2 assays were carried out. For LysoTracker assay, 3 hpi, cells were incubated with 1mM LysoTracker Green DND-26 for 1.5h at 37°C with 5% CO₂. Cells were then fixed with a solution containing 10% formalin solution and 10 µg/mL Hoechst 33342. For pHrodo assay, prior to cell infection, H37Rv-GFP culture was incubated for 1 h at 37°C in 100 mM sodium bicarbonate, pH 8.5, containing 0.5 mM of amine-reactive. Labelled-bacteria were washed and

BMDMs were then infected with this pHrodo-labelled and GFP-expressing Mtb culture at a MOI of 2. Phagosomal acidification was kinetically evaluated (every hour up to 12h post-infection) as previously described (Deboosere et al., 2021).

For phagosomal rupture, 4 dpi, cells were stained with 8 μ M CCF4-AM in EM buffer (120 mM NaCl, 7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 2.5 μ M probenecid, and 25 mM Hepes, pH 7.3) for 1 h at room temperature in the dark. Cells were then washed three times using EM buffer before imaging.

For LD formation assay, cells were washed and fixed at 96 h post-infection, as previously described (Deboosere et al., 2021). Cells were washed twice with DPBS and intracellular LDs were stained with 25 μ L per well of 2000-fold diluted HCS LipidTOX deep Red neutral lipid probe (Invitrogen) in DPBS for 30 min at room temperature.

Immunofluorescence

2×10^4 BMDMs were seeded per well in 384-well plates and infected with Mtb H37Rv-GFP at a MOI of 2 for 24 h. Subsequently, cells were washed with PBS and fixed in PBS + 4% paraformaldehyde for 20 min at RT followed by quenching in PBS + 50 mM NH₄Cl for 10 min. Cells were labeled for Tirap and DNA using DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Cells were then extensively washed prior to imaging.

Image acquisition

Images were acquired using an automated fluorescent confocal microscope (In Cell analyzer 6000, GE) equipped with a 20X (NA 0.70) air lens or 60X (NA 1.2) water lens for Tirap localization, intracellular mycobacterial replication, phagosomal acidification and LD formation assays. The confocal microscope was equipped with 405, 488, 561 and 642 nm excitation lasers. The emitted fluorescence was captured using a camera associated with a set of filters covering a detection wavelength ranging from 450 to 690 nm. Hoechst 33342-stained nuclei were detected using the 405 nm laser with a 450/50-nm emission filter. Green signals corresponding to LysoTracker Green DND-26 and H37Rv-GFP were recorded using 488 nm laser with 540/75-nm emission filters. Red signals corresponding to H37Rv-DsRed, pHrodo and secondary Alexa fluor antibodies were recorded using 561 nm laser with 600/40-nm emission filters. LipidTOX signal was detected using 630-nm excitation and 690-nm emission wavelengths.

Image analysis

Images from the automated confocal microscope were analyzed using multi-parameter scripts developed using Columbus system (version 2.3.1; PerkinElmer). Segmentation algorithms were

applied to input images to detect nuclei and the signal of Mtb H37Rv to determine infection and replication rates. Briefly, the host cell segmentation was performed using two different Hoechst signal intensities—a strong intensity corresponding to the nucleus and a weak intensity in cytoplasm—with the algorithm “Find Nuclei” and “Find Cytoplasm”, as described previously (Deboosere et al., 2021). GFP or DsRed signal intensities in a cell were used for the intracellular bacterial segmentation with the algorithm “Find Spots”. The identified intracellular bacteria were quantified as intracellular Mtb area with number of pixels. Subsequently, population of infected cells was determined, and the increase of intracellular Mtb area, corresponding to intracellular mycobacterial replication, was calculated. For quantification of phagosomal acidification with Lysotracker Green DND-26, green signal intensity in a cell was used for the intracellular acidic compartment segmentation with the algorithm “Find Spots”.

RNA extraction

BMDMs were grown in 6-well plates and RNA was extracted using QIAzol lysis reagent and miRNeasy Mini Kit according to the manufacturer instructions (Qiagen). RNA concentration was determined using the GE SimpliNano device (GE Healthcare, UK). Remaining DNA in samples was digested using the amplification grade DNase I kit (Sigma-Aldrich, USA) for 6 min at RT. The reaction was stopped by heat inactivation for 10 min at 70°C.

Total RNA from lung tissues were extracted with the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, Germany).

Quantitative RT-PCR

For BMDMs RNA extracts, cDNA synthesis was achieved by reverse transcription using the Superscript IV Vilo Mastermix kit (ThermoFisher, USA) following the manufacturer’s instructions. RNA from lung extract was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies, USA). qPCR was performed using the applied biosystems SYBR Select Master Mix (Thermofischer) with 20 ng cDNA per sample and the appropriate primer pairs (table 2). Gapdh was used as the reference housekeeping gene for normalization. qPCR reactions were measured by the QuantStudio 12K Flex system (Applied Biosystems, USA) using the following cycles: 2 min 50°C, 10 min 95°C followed by 40 cycles of 15 s 95°C, 30 s 60°C and 30 s 72°C. The target mRNA fold change was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula, where the Gapdh gene was used as the reference gene, and RNA from non-infected wild type BMDMs was used as the standard condition.

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>arg1</i>	ATTGTGAAGAACCCACGGTCTG	ACTGTGGTCTCCACCCAGCA
<i>cish</i>	CTAGACCCTGAGGGGGATCT	GGGTGCTGTCTCGAACTAGG
<i>gapdh</i>	GCAAAGTGGAGATTGTTGCCA	GCCTTGACTGTGCCGTTGA
<i>gm-csf</i>	TGCCTGTACGTTGAATGAAGA	CCCGTAGACCCTGCTCGAATA
<i>ifng</i>	CAACAGCAAGGCGAAAAAG	GTGGACCACTCGGATGAGCT
<i>il12p40</i>	GACCCTGCCCATGAACTGGC	CAACGTTGCATCCTAGGATCG
<i>il1b</i>	TCGTGCTGTCGGACCCATA	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
<i>il6</i>	CAACCACGGCCTCCCTACT	CCACGATTTCCAGAGAACATG
<i>inos</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTCGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>tnfa</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

Table 2: Forward and reverse primers sequences

RNA sequencing

RNA quality was analysed by the measurement of the RNA integrity number (RIN) with a bioanalyzer RNA 6000 Nano assay prior to sequencing. mRNA library preparation was realized following manufacturer's recommendations (Ultra 2 mRNA kit from NEB). Final samples pooled library prep were sequenced on Novaseq6000 ILLUMINA with S1-200 cartridge (2x1600Millions of 100 bases reads) in one run. Corresponding to 2x30Millions of reads per sample after demultiplexing. Quality of raw data was evaluated with FastQC. Poor quality sequences and adapters were trimmed or removed with fastp tool, with default parameters, to retain only good quality paired reads. Illumina DRAGEN bio-IT Platform (v3.8.4) was used for mapping on mm10 reference genome and quantification with gencode vM25 annotation gtf file. Library orientation, library composition and coverage along transcripts were checked with Picard tools. Following analysis were conducted with R software. Differential expression analysis was performed with DESeq2 (v1.26.0) bioconductor package. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR with a threshold of significance at 0.05. The cut-off for absolute log2-ratio was set at 2.

Finally, enrichment analysis was performed by copy-pasting the identified genes in Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

Statistics

All analyses and histograms were performed using GraphPad Prism 9 software. Significance of obtained results was tested using Ordinary one-way ANOVA. Differences in the mean between two groups were analysed using Student's t-test (Supp. Fig. 2B). Indicated symbols of *, **, *** and **** denote $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Isabelle Ricard, Samuel Jouny, Eric Muraille and Fabrice Bureau for technical assistance and helpful discussions. We thank Nicolas Vandenabeele and Robin Prath for BSL-3 animal facility assistance. We would like to thank H el ene Bauderlique and the Flow Core Facility of BioImaging Center Lille (UMS 2014 - US 41 - PLBS, F-59000 Lille, France) for the expert technical assistance. We acknowledge the PICT-IBiSA, Elisabeth Werkmeister and Frank Lafont from BiCEL for providing access to microscopy equipment. We would like to acknowledge Be ata Gy orgy and the Paris Brain Institute's Data Analysis Core for the RNA sequencing analysis (<https://dac.institutducerveau-icm.org/>). Part of this work was carried out on the iGenSeq core facility of ICM (<https://igenseq.icm-institute.org>). We gratefully acknowledge Delphine BOUTEILLER & Yannick MARIE for NGS technical part and advices. Financial support for this work was provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE35-0009, ANR-18-JAM2-0002), the EMBO Young Investigator Program, the Feder (12001407 (D-AL) Equipex Imaginex BioMed), the I-SITE ULNE Foundation (ERC Generator Grant) and the Fondation pour la Recherche Medicale (SPF20170938709). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

I.B., C.Q., E.H., N.D., C.B-W, V.S., J.C., M.C., P.B. and A.M. designed and/or performed experiments. I.B., C.Q., E.H., C.B-W, V.S., A.V., P.B. and A.M. analyzed data. F.T. and M.C. generated critical reagents. I.B., E.H., P.B. and A.M. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

References

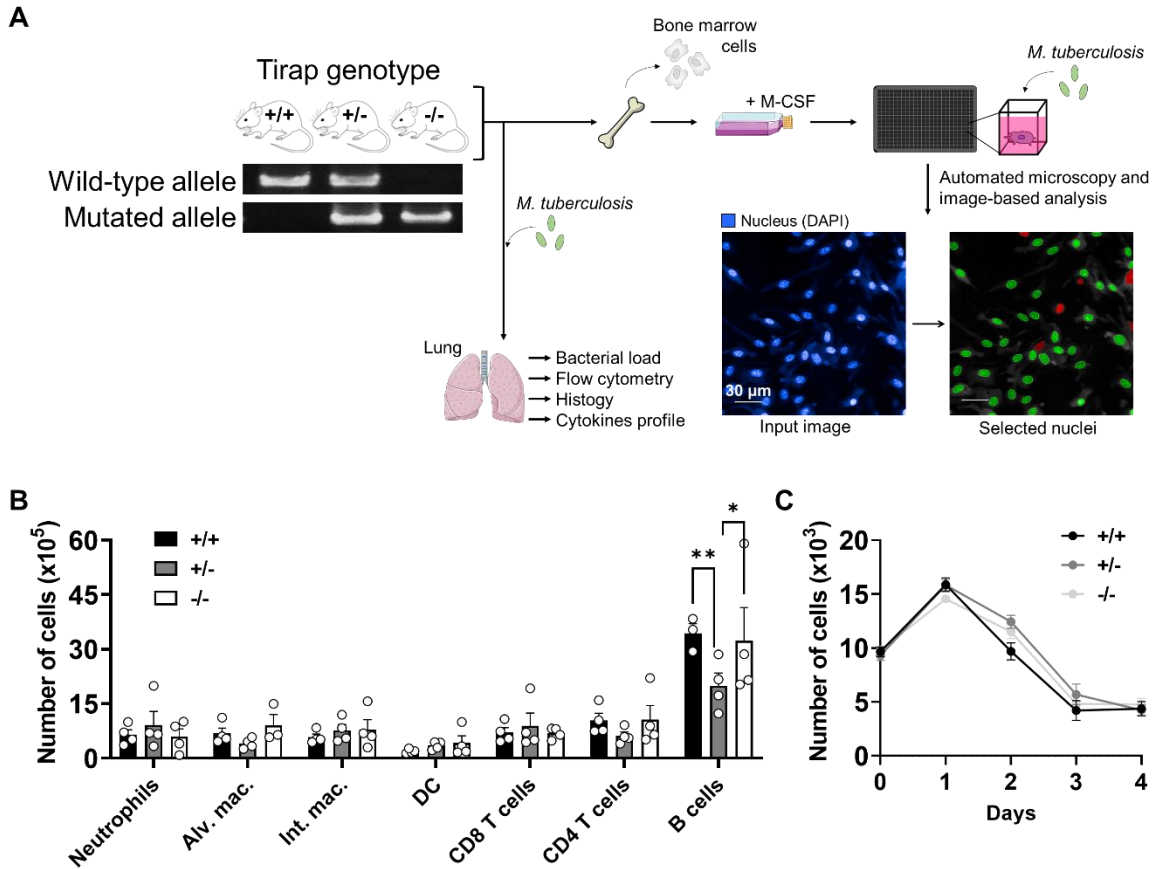
1. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, Laval G, Patin E, Pickrell JK, et al. Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet*. 2009;5(7):e1000562.
2. Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res*. 2015;62(2):234-52.
3. D'Onofrio V, Monnier AA, Kremer C, Stappers MHT, Netea MG, Gyssens IC. Lesion size is associated with genetic polymorphisms in TLR1, TLR6, and TIRAP genes in patients with major abscesses and diabetic foot infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(2):353-60.
4. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*. 2015;169(2):173-87.
5. Rajpoot S, Wary KK, Ibbott R, Liu D, Saqib U, Thurston TLM, et al. TIRAP in the Mechanism of Inflammation. *Front Immunol*. 2021;12:697588.
6. Zyzak J, Mitkiewicz M, Leszczyńska E, Reniewicz P, Moynagh PN, Siednienko J. HSV-1/TLR9-Mediated IFN β and TNF α Induction Is Mal-Dependent in Macrophages. *J Innate Immun*. 2020;12(5):387-98.
7. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*. 2004;34(2):73-82.
8. Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, et al. Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is critical for early lung immune responses against *Escherichia coli* lipopolysaccharide and viable *Escherichia coli*. *J Immunol*. 2005;175(11):7484-95.
9. Jeyaseelan S, Young SK, Yamamoto M, Arndt PG, Akira S, Kolls JK, et al. Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein (TIRAP) is a critical mediator of antibacterial defense in the lung against *Klebsiella pneumoniae* but not *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol*. 2006;177(1):538-47.
10. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet*. 2007;39(4):523-8.
11. Belhaouane I, Hoffmann E, Chamillard M, Brodin P, Machelart A. Paradoxical Roles of the MAL/Tirap Adaptor in Pathologies. *Front Immunol*. 2020;11:569127.
12. Saranathan R, Sathyamurthi P, Thiruvengadam K, Murugesan S, Shivakumar S, Gomathi NS, et al. MAL adaptor (TIRAP) S180L polymorphism and severity of disease among tuberculosis patients. *Infect Genet Evol*. 2020;77:104093.
13. Liu Q, Li W, Li D, Feng Y, Tao C. TIRAP C539T polymorphism contributes to tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Infect Genet Evol*. 2014;27:32-9.
14. Castiblanco J, Varela DC, Castaño-Rodríguez N, Rojas-Villarraga A, Hincapié ME, Anaya JM. TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. *Infect Genet Evol*. 2008;8(5):541-4.
15. Miao R, Li J, Sun Z, Xu F, Shen H. Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(3):268-72.
16. WHO. Global Tuberculosis Report 2021. 2021.
17. Kinsella RL, Zhu DX, Harrison GA, Mayer Bridwell AE, Prusa J, Chavez SM, et al. Perspectives and Advances in the Understanding of Tuberculosis. *Annu Rev Pathol*. 2021;16:377-408.

18. Queval CJ, Song OR, Carralot JP, Saliou JM, Bongiovanni A, Deloison G, et al. Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep*. 2017;20(13):3188-98.
19. Simeone R, Sayes F, Song O, Gröschel MI, Brodin P, Brosch R, et al. Cytosolic access of Mycobacterium tuberculosis: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):e1004650.
20. Sánchez D, Lefebvre C, Rioux J, García LF, Barrera LF. Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population. *Int J Immunogenet*. 2012;39(3):216-23.
21. Selvaraj P, Harishankar M, Singh B, Jawahar MS, Banurekha VV. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(5):306-10.
22. Capparelli R, De Chiara F, Di Matteo A, Medaglia C, Iannelli D. The MyD88 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to human pulmonary tuberculosis. *Genes Immun*. 2013;14(8):504-11.
23. Nejentsev S, Thye T, Szeszko JS, Stevens H, Balabanova Y, Chinbuah AM, et al. Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations. *Nat Genet*. 2008;40(3):261-2; author reply 2-3.
24. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 2002;420(6913):324-9.
25. Deboosere N, Belhaouane I, Machelart A, Hoffmann E, Vandeputte A, Brodin P. High-Content Analysis Monitoring Intracellular Trafficking and Replication of Mycobacterium tuberculosis Inside Host Cells. *Methods Mol Biol*. 2021;2314:649-702.
26. Bonham Kevin S, Orzalli Megan H, Hayashi K, Wolf Amaya I, Glanemann C, Weninger W, et al. A Promiscuous Lipid-Binding Protein Diversifies the Subcellular Sites of Toll-like Receptor Signal Transduction. *Cell*. 2014;156(4):705-16.
27. Khor CC, Vannberg FO, Chapman SJ, Guo H, Wong SH, Walley AJ, et al. CISH and susceptibility to infectious diseases. *N Engl J Med*. 2010;362(22):2092-101.
28. Durham GA, Williams JLL, Nasim MT, Palmer TM. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(5):298-308.
29. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(7).
30. Hoffmann E, Machelart A, Song OR, Brodin P. Proteomics of Mycobacterium Infection: Moving towards a Better Understanding of Pathogen-Driven Immunomodulation. *Front Immunol*. 2018;9:86.
31. Barczak AK, Avraham R, Singh S, Luo SS, Zhang WR, Bray MA, et al. Systematic, multiparametric analysis of Mycobacterium tuberculosis intracellular infection offers insight into coordinated virulence. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006363.
32. Augenstein J, Arbues A, Simeone R, Haanappel E, Wegener A, Sayes F, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol*. 2017;19(7).

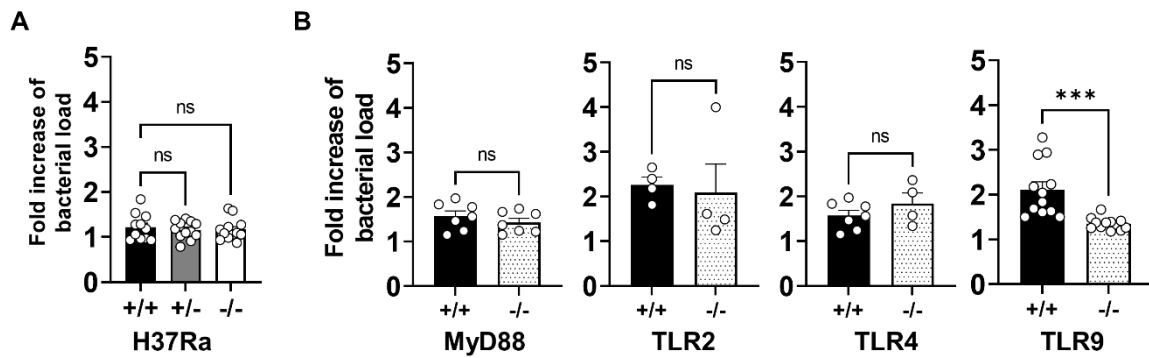
33. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, Cameron J, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(6):1371-6.
34. Song OR, Deboosere N, Delorme V, Queval CJ, Deloison G, Werkmeister E, et al. Phenotypic assays for Mycobacterium tuberculosis infection. *Cytometry A*. 2017;91(10):983-94.
35. den Brok MH, Raaijmakers TK, Collado-Camps E, Adema GJ. Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends Immunol*. 2018;39(5):380-92.
36. Stamm CE, Collins AC, Shiloh MU. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunol Rev*. 2015;264(1):204-19.
37. Harishankar M, Selvaraj P, Bethunaickan R. Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. *Frontiers in Medicine*. 2018;5.
38. Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, et al. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 2007;179(2):1178-89.
39. Casanova JL, Abel L. Lethal Infectious Diseases as Inborn Errors of Immunity: Toward a Synthesis of the Germ and Genetic Theories. *Annu Rev Pathol*. 2021;16:23-50.
40. Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hieny S, Sher A. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to Mycobacterium tuberculosis associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun*. 2004;72(4):2400-4.
41. Krug S, Parveen S, Bishai WR. Host-Directed Therapies: Modulating Inflammation to Treat Tuberculosis. *Front Immunol*. 2021;12:660916.
42. Mootoo A, Stylianou E, Arias MA, Reljic R. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):53-62.
43. Su WL, Perng WC, Huang CH, Yang CY, Wu CP, Chen JH. Association of reduced tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-1beta (IL-1beta) but increased IL-10 expression with improved chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(2):223-31.
44. Skerry C, Harper J, Klunk M, Bishai WR, Jain SK. Adjunctive TNF inhibition with standard treatment enhances bacterial clearance in a murine model of necrotic TB granulomas. *PLoS One*. 2012;7(6):e39680.
45. Wallis RS, Kyambadde P, Johnson JL, Horter L, Kittle R, Pohle M, et al. A study of the safety, immunology, virology, and microbiology of adjunctive etanercept in HIV-1-associated tuberculosis. *Aids*. 2004;18(2):257-64.
46. Wallis RS, van Vuuren C, Potgieter S. Adalimumab treatment of life-threatening tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2009;48(10):1429-32.
47. Dallenga T, Schaible UE. Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathog Dis*. 2016;74(3).
48. Yeremeev V, Linge I, Kondratieva T, Apt A. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95(4):447-51.
49. Fonseca KL, Maceiras AR, Matos R, Simoes-Costa L, Sousa J, Cá B, et al. Deficiency in the glycosyltransferase Gcnt1 increases susceptibility to tuberculosis through a mechanism involving neutrophils. *Mucosal Immunol*. 2020;13(5):836-48.

50. Nair S, Huynh JP, Lampropoulou V, Loginicheva E, Esaulova E, Gounder AP, et al. Irg1 expression in myeloid cells prevents immunopathology during M. tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2018;215(4):1035-45.
51. Israel L, Wang Y, Bulek K, Della Mina E, Zhang Z, Pedernana V, et al. Human Adaptive Immunity Rescues an Inborn Error of Innate Immunity. *Cell*. 2017;168(5):789-800.e10.
52. Chen Z, Wang W, Liang J, Wang J, Feng S, Zhang G. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2015;15:57.
53. Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, et al. BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:28.
54. Imbert PR, Louche A, Luizet JB, Grandjean T, Bigot S, Wood TE, et al. A Pseudomonas aeruginosa TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors. *Embo j*. 2017;36(13):1869-87.
55. Ke Y, Li W, Wang Y, Yang M, Guo J, Zhan S, et al. Inhibition of TLR4 signaling by Brucella TIR-containing protein TcbB-derived decoy peptides. *Int J Med Microbiol*. 2016;306(6):391-400.
56. Dorhoi A, Nouailles G, Jörg S, Hagens K, Heinemann E, Pradl L, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2012;42(2):374-84.
57. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoheh N, Griffiths G, Moita LF, et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*. 2010;12(8):1046-63.
58. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):49-56.
59. Zannetti C, Parroche P, Panaye M, Roblot G, Gruffat H, Manet E, et al. TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. *J Immunol*. 2014;193(7):3398-408.
60. Mantegazza AR, Zajac AL, Twelvetrees A, Holzbaur EL, Amigorena S, Marks MS. TLR-dependent phagosome tubulation in dendritic cells promotes phagosome cross-talk to optimize MHC-II antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15508-13.
61. Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(6):472-82.
62. Cruz-Leal Y, Grubaugh D, Nogueira CV, Lopetegui-González I, Del Valle A, Escalona F, et al. The Vacuolar Pathway in Macrophages Plays a Major Role in Antigen Cross-Presentation Induced by the Pore-Forming Protein Sticholysin II Encapsulated Into Liposomes. *Front Immunol*. 2018;9:2473.
63. Ní Cheallaigh C, Sheedy FJ, Harris J, Muñoz-Wolf N, Lee J, West K, et al. A Common Variant in the Adaptor Mal Regulates Interferon Gamma Signaling. *Immunity*. 2016;44(2):368-79.
64. Christophe T, Jackson M, Jeon HK, Fenistein D, Contreras-Dominguez M, Kim J, et al. High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000645.
65. Deboosère N, Iantomasi R, Queval CJ, Song OR, Deloison G, Jouny S, et al. LppM impact on the colonization of macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2017;19(1).

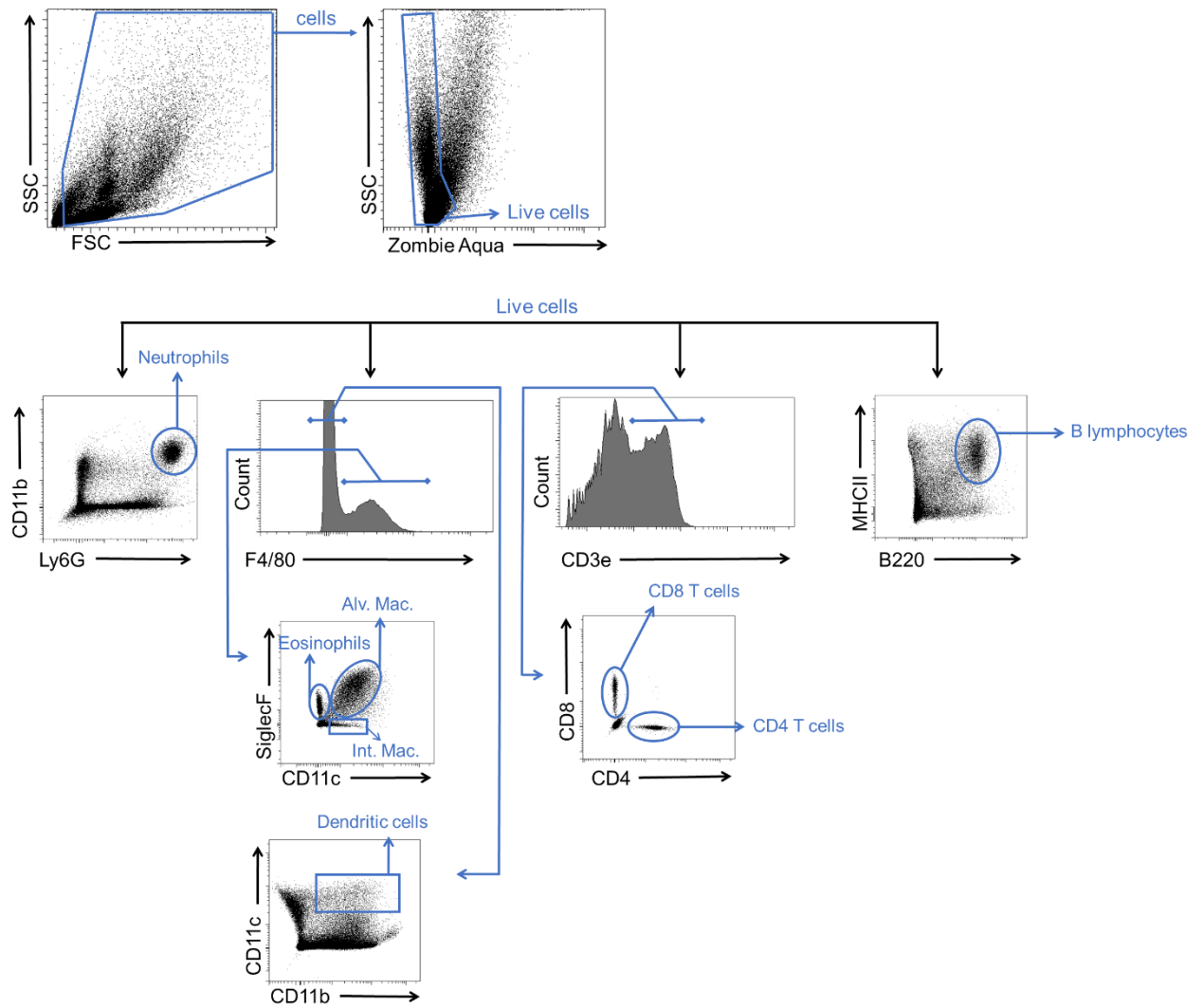
66. Raze D, Verwaerde C, Deloison G, Werkmeister E, Coupin B, Loyens M, et al. Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA) Is Involved in Intracytosolic Lipid Inclusions Formation in Mycobacteria. *Front Microbiol.* 2018;9:2258.
67. Machelart A, Salzano G, Li X, Demars A, Debie AS, Menendez-Miranda M, et al. Intrinsic Antibacterial Activity of Nanoparticles Made of β -Cyclodextrins Potentiates Their Effect as Drug Nanocarriers against Tuberculosis. *ACS Nano.* 2019;13(4):3992-4007.
68. Hanot Mambres D, Machelart A, Potemberg G, De Trez C, Ryffel B, Letesson JJ, et al. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. *J Immunol.* 2016;196(9):3780-93.



Supplementary figure 1: (A) Workflow of mycobacterial *in vivo* and *in vitro* infection experiments indicating different read-outs. **(B)** Comparison of the number of resident immune cells in the lungs of 4 naive mice for each mouse strain. Cell numbers were normalized to the total cell number analyzed in each sample and were extrapolated to the whole lung. Shown are mean \pm SEM of cells obtained in each group. **(C)** Comparison of BMDMs proliferation from the 3 mouse strains. * P value < 0.05, ** P value < 0.01, as determined by Ordinary one-way ANOVA test.



Supplementary figure 2: (A) BMDMs from +/+, +/- and -/- mice were infected with a non-virulent strain of Mtb (H37Ra-GFP) (MOI of 2) and analyzed by automated confocal microscopy. The histogram shows the replication fold increase from 3 hpi to 4 dpi. Shown are mean \pm SEM obtained from at least 12 analyzed wells per condition. (B) Wild-type (+/+), knocked-out (-/-) for Myd88, TLR2, TLR4 and TLR9 BMDMs were infected with H37Rv-GFP at a MOI of 2 for 3 h and 4 days. Using immunofluorescence and image analysis, intracellular bacterial load was measured based on the H37Rv-GFP area per cell to determine replication fold increase. Shown are mean \pm SEM obtained from at least 4 analyzed wells per condition. *** P value < 0.001 as determined by Ordinary one-way ANOVA test.



Supplementary figure 3: Gating strategies in flow cytometry to analyze the different populations in lungs of mice

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Rappel de la problématique et des objectifs

La TB représente toujours une menace pour la santé publique avec 10 millions de personnes touchées chaque année, 1.5 million de décès en 2020 et l'émergence continue des souches MDR et XDR. Les HDT sont de nouvelles approches dans le domaine des médicaments anti-infectieux pour améliorer les traitements actuels et surmonter la résistance aux antimicrobiens. Ces nouvelles thérapies ciblent les facteurs de la cellule hôte qui sont manipulés par un agent pathogène lui permettant de se répliquer et persister. Elles permettent de renforcer les réponses immunitaires protectrices contre un agent pathogène et à réduire l'inflammation exacerbée. Dans le cas de la TB, les HDT visent à renforcer l'activité antimicrobienne des cellules phagocytaires en améliorant par exemple la maturation phagosomale et l'autophagie. Elles réduisent également l'inflammation en interférant avec des facteurs solubles (eicosanoïdes ou cytokines) ou cellulaires (molécules co-stimulatrices) et modulent les granulomes pour permettre l'accès aux antimicrobiens ou limiter les lésions tissulaires (Kaufmann et al., 2018).

Mtb persiste dans les macrophages en subvertissant plusieurs mécanismes antimicrobiens intracellulaires. Elle se réplique dans les endosomes précoces, empêche la fusion avec les lysosomes, bloque l'acidification et s'échappe dans le cytosol de l'hôte. Mtb inhibe l'apoptose et l'autophagie des cellules hôtes et provoque leur lyse (Lugo-Villarino & Neyrolles, 2014). En se répliquant dans les macrophages, Mtb peut induire leur transformation en cellules épithélioïdes géantes, ainsi qu'en cellules spumeuses riches en cholestérol stocké dans les corps lipidiques, qui sont une importante source de carbone pour le bacille.

L'étude des interactions entre l'hôte et la bactérie permet d'identifier et de caractériser des voies de signalisation qui pourraient être ciblées afin d'empêcher la bactérie de détourner la machinerie cellulaire à son avantage.

L'étude de voies de signalisations précoces comme celles induites après reconnaissance des PAMPs par les TLRs permet de cibler des facteurs de l'hôte à des temps précoces de l'infection et limiter Mtb dans ses stratégies d'échappement. La reconnaissance des PAMPs initie des voies de signalisation *via* des protéines adaptatrices (MyD88/Tirap) conduisant à l'activation de l'inflammation. Des études humaines ont indiqué que les variations génétiques des gènes de la voie de signalisation des TLRs régulent la réponse immunitaire cellulaire et peuvent influencer la sensibilité à la TB dans différentes populations (Harishankar et al., 2018). En effet, plusieurs études se sont focalisées sur l'implication du polymorphisme Tirap lors de l'infection à Mtb conduisant à des conclusions parfois contradictoires (Belhaouane et al., 2020) (**Tableau 2**).

Tableau 2: Effets de différentes mutations de Tirap sur la résistance à la TB

Hôte	Génotype de Tirap	Effet	Références
Souris	Déficiance homozygote	Pas d'effet	(Fremond et al., 2007)
	Mutation S200L	Protection	(Ní Cheallaigh et al., 2016)
Homme	Mutation S180L	Pas d'effet	(Castiblanco et al., 2008; Hawn et al., 2006; Khor et al., 2007; Sánchez et al., 2012; Y. X. Zhang et al., 2011)
	Mutation S180L	Susceptibilité	(Selvaraj et al., 2010)
	Mutation S180L	Protection	(Capparelli et al., 2013; Q. Liu et al., 2014; Miao et al., 2011; Nejentsev et al., 2008)
	Mutation S55N	Pas d'effet	(Hawn et al., 2006)
	Mutation D96N	Susceptibilité	(Y. X. Zhang et al., 2011)
	Mutation A186A	Susceptibilité	Hawn 2006 J infect Disease

L'étude de l'implication de Tirap dans différents modèles de pathologies a permis le développement de souris génétiquement modifiées qui sont délétées de deux exons du domaine TIR de Tirap traduisant une protéine tronquée et non fonctionnelle (Hornig et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Ce modèle de souris permet d'étudier indirectement l'effet de différents SNP de Tirap chez l'homme, comme le S180L, mutation la plus fréquente et associée à une perte de fonction de la protéine (Capparelli et al., 2013).

Dans cette thèse, nous nous sommes proposés d'étudier l'impact d'une déficiance pour Tirap, sur la susceptibilité d'un modèle murin d'infection et sur le trafic intracellulaire de Mtb au sein du macrophage.

Au niveau cellulaire, la déficiance pour Tirap a été investiguée pour son impact sur :

- La rentrée et la répllication intracellulaire de la bactérie
- L'expression de gènes inflammatoires induits pendant l'infection
- L'acidification de la vacuole contenant Mtb
- La rupture phagosomale induite par Mtb
- L'accumulation de gouttelettes lipidiques suite à l'infection

Une déficiance pour Tirap inhibe la répllication de Mtb dans le macrophage

1. Effet de Tirap sur le contrôle de la répllication de Mtb

Dans les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris (BMDMs, *Bone Marrow Derived Macrophages*), nous avons montré qu'une déficiance hétérozygote (+/-) ou homozygote (-/-) pour Tirap inhibait la répllication d'une souche virulente de Mtb (H37Rv) et que dans les macrophages wild

type (+/+), la bactérie induisait l'expression du gène Tirap et sa localisation à la vacuole qui contient la bactérie (MCV, *Mtb-Containing Vacuole*) suggérant que ce facteur de l'hôte soit important pour la croissance de bactérienne. L'infection des BMDMs avec la souche avirulente de Mtb (H37Ra) n'a montré aucune différence de répliation entre les trois types de macrophages. L'effet d'une déficience pour Tirap sur la répliation de Mtb serait lié aux facteurs de virulence exprimés par la bactérie.

Dans le poumon, il existe plusieurs types de macrophages qui ont des ontogénies distinctes leur conférant un phénotype métabolique différent selon le statut inflammatoire de l'organe (Huang et al., 2018). Le BMDM est souvent utilisé pour l'étude de la répliation intracellulaire de Mtb. Cependant, il n'est sans doute pas le meilleur modèle pour mimer une infection d'un macrophage alvéolaire et a une durée de vie courte. Les cellules du Max Plank Institute (MPI) sont des cellules auto-renouvelables et non transformées provenant du foie fœtal de souris C57BL/6J. Les cellules MPI ont été utilisées comme modèle de macrophages alvéolaires, en raison de leur profil plus proche (Fejer et al., 2013).

2. Tirap et la signalisation des TLRs pendant l'infection à Mtb

Historiquement, Tirap a été principalement étudiée pour son implication dans la régulation des cascades de signalisation en aval des TLR2 et TLR4 en facilitant le recrutement de MyD88 (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002) aboutissant à la nucléarisation du facteur de transcription NFkB. Ceci induit la sécrétion de cytokines inflammatoires qui permettent le recrutement et l'activation des cellules effectrices et l'établissement d'une réponse adaptative et d'une mémoire immunitaire. Plus récemment, des études ont montré que Tirap était également importante pour la signalisation à partir de compartiments endosomaux en aval du TLR9 suite à la reconnaissance d'acides nucléiques microbiens (Bonham et al., 2014; Zyzak et al., 2020). Nous avons suivi la répliation bactérienne dans des macrophages déficients pour les TLRs impliqués dans la détection de Mtb et induisant une signalisation dépendante de Tirap. Nous avons observé que seule la déficience en TLR9 altérait la répliation du bacille. En s'appuyant sur une étude réalisée chez l'homme montrant que le polymorphisme TLR9 est associé à la résistance contre la TB (Chen et al., 2015), on peut s'attendre à ce que Mtb utilise la signalisation TLR9-Tirap pour permettre sa répliation. Il n'est pas non plus à exclure que les mycobactéries possèdent des ligands TLR9 distincts de l'ADN bactérien génomique. Une précédente étude a par exemple décrit une stimulation de TLR9 par l'hémozoïne, pigment de l'agent du paludisme (Bafica et al., 2005; Coban et al., 2005).

Il est également important de prendre en compte les différences entre l'homme et la souris dans les gènes qui codent pour les TLRs. Par exemple, bien que le locus codant pour le TLR11 soit présent

dans le génome humain, il ne s'agit que d'un pseudogène et n'est pas exprimé en récepteur. Le TLR11 a été décrit pour son interaction avec la flagelline de *Salmonella* et *E. coli*, et la profiline de *T. godii* et *Leishmania* (Hatai, Lepelley, Zeng, Hayden, & Ghosh, 2016; Shukla et al., 2018). Bien qu'aucune étude à ce jour ne fait référence à l'implication du TLR11 dans l'infection à Mtb, une activation celui-ci *via* Tirap n'est pas exclue. En effet, une étude récente sur l'infection à *L. major*, a montré que l'expression de TLR11 est augmentée suite à l'activation d'une voie MyD88-Tirap en aval du TLR2. Ceci a été associé à une susceptibilité à l'infection (Shukla et al., 2018).

Tirap interagit avec de nombreuses protéines dans diverses voies de signalisation. Il est donc possible que des variations génétiques chez l'un de ces partenaires modulent sa signalisation. L'effet d'une telle interaction s'appelle épistasie. Fulgione *et al.* ont étudié une interaction épistatique entre MyD88 et Tirap lors d'une infection à *Helicobacter pylori*. L'étude de cohorte a révélé que l'hétérozygotie pour S180L de Tirap confère une résistance accrue à l'infection, qui s'est avérée associée à un faible niveau de production d'IL-6, de COX-2, de TNF- α et d'IL-1 β . Indépendamment de Tirap, le polymorphisme dans MyD88 seul n'a pas d'effet sur l'infection. Cependant, en combinaison avec Tirap S180L, certains polymorphismes dans MyD88 confèrent une protection plus élevée, ce qui prouve une interaction épistatique entre les deux gènes (Fulgione et al., 2020). Il a également été documenté que les mêmes sites polymorphes agissent de manière épistatique contre l'infection à Mtb (Capparelli et al., 2013). Ces résultats ont montré que l'épistasie pourrait jouer un rôle important dans l'influence d'une déficience pour Tirap sur la résistance à la TB.

D'autres fonctions indépendantes des TLRs peuvent aussi être attribuées à Tirap. Ní Cheallaigh *et al.* ont montré que pendant l'infection à Mtb, Tirap activerait la signalisation en aval du récepteur à l'IFN- γ pour induire la phosphorylation de p38, l'autophagie et l'élimination de la bactérie (Ní Cheallaigh et al., 2016). Cette étude associe la mutation hétérozygote S180L (associée à une perte de fonction) à une réponse atténuée de l'IFN- γ conduisant à une susceptibilité à la TB *in vivo* et *in vitro*. L'étude montre aussi que les macrophages déficients pour Tirap (délétion des deux allèles) ne sont pas capables de contrôler l'infection. Ces résultats sont contradictoires avec ceux générés au cours de cette thèse et avec ce qui est observé dans les études de cohortes chez l'homme. L'utilisation de procédures expérimentales assez différentes (MOI plus élevée, activation des macrophages par l'IFN- γ , comptage de CFU (*Colonie Forming Unit*) pour l'évaluation de la charge bactérienne intracellulaire pourrait aider à expliquer ces divergences.

3. Interaction Mtb-Tirap

Il a été décrit pour d'autres infections que l'exploitation de la signalisation Tirap est une stratégie efficace pour survivre dans les macrophages (Imbert et al., 2017; Ke et al., 2016; Salcedo et al., 2013).

Par exemple, il a été montré que *Pseudomonas aeruginosa* possède une protéine contenant un domaine TIR appelée PumA (*Pseudomonas UBAP1 modulator A*) qui est transloquée dans les cellules hôtes pendant l'infection pour interagir directement avec Tirap au niveau de la membrane plasmique et contrôler la signalisation des TLRs (Imbert et al., 2017). De même, *Brucella* produit une protéine contenant un domaine TIR (TcbB/Btp1) pour cibler sélectivement Tirap et inhiber l'activation de NF- κ B pour permettre la survie et la réplication (Ke et al., 2016). À l'avenir, il sera intéressant d'étudier si Mtb produit un effecteur responsable du recrutement de Tirap dans le phagosome pour favoriser sa réplication.

4. Effet de Tirap sur la production de cytokines inflammatoires pendant l'infection

Nous avons investigué l'expression de gènes de cytokines inflammatoires. De manière intéressante, nous avons montré que bien qu'une déficience pour Tirap soit corrélée à une inhibition de réplication bactérienne comparable, l'inflammation induite dans les macrophages +/- était plus importante que celles dans les macrophages -/-. L'expression des gènes codant pour le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et iNOS était cependant plus importante dans les macrophages +/+. Ce profil inflammatoire intermédiaire associé aux macrophages +/- corrèle avec les résultats d'une étude qui montre que des individus portant la mutation hétérozygote S180L présentaient des taux intermédiaires d'IFN- γ , de TNF- α et de monoxyde d'azote (NO), ce qui représentait un réel avantage biologique dans le contrôle de l'infection (Capparelli et al., 2013).

Il est intéressant de considérer que dans les macrophages +/-, Tirap soit exprimée à un niveau optimal pour induire une expression adéquate des cytokines inflammatoires après activation des TLRs. Dans le macrophage +/+, l'expression de Tirap est augmentée pendant l'infection ce qui explique les niveaux plus élevés des cytokines inflammatoires.

Notre modèle d'infection des BMDMs ne tient cependant pas compte des stimuli inflammatoires engendrés dans le tissu pulmonaire suite à l'infection, et l'activation de ces macrophages avec de l'IFN- γ avant infection modulerait certainement les réponses de la cellule face à la bactérie. En effet, comme décrit dans l'étude de Ní Cheallaigh *et al.*, Tirap est impliqué dans la signalisation du récepteur à l'IFN- γ et induit l'expression du TNF- α (Ní Cheallaigh et al., 2016). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'activation de nos modèles de cellules déficientes avec de l'IFN- γ avec notre protocole d'infection.

5. Effet de Tirap sur la maturation de la vacuole

Afin d'identifier quelles voies de signalisation de Tirap pouvaient être manipulées par Mtb pour favoriser sa réplication, nous avons effectué une analyse RNAseq pour comparer l'expression des gènes entre les macrophages déficients pour Tirap et les macrophages +/+. Parmi la centaine de

gènes identifiés, le gène *Cish* était sous-exprimé dans les macrophages déficients pour Tirap. Une précédente étude de l'équipe a montré que la v-ATPase est ubiquitinée et ensuite dégradée par le protéasome pendant l'infection à Mtb suite à l'augmentation de l'expression de *Cish* (Queval et al., 2017). La dégradation de la v-ATPase empêche l'acidification de la MCV et favorise sa réplication. Plus précisément, l'infection à Mtb induit la sécrétion de GM-CSF qui active la voie STAT5 aboutissant à l'expression de *Cish*. De manière cohérente, il a été démontré que l'inhibition de l'expression de *Cish* inhibe la réplication de Mtb dans les macrophages. Nous avons donc étudié l'expression du GM-CSF et l'acidification de la MCV dans les cellules déficientes pour Tirap. Nos résultats ont montré que la sous-expression de *Cish* était associée à une expression plus faible de GM-CSF dans les macrophages déficients pour Tirap. Cependant, l'acidification de la MCV n'était augmentée que dans les macrophages +/- . Cela suggère que la résistance contre Mtb associée à la déficience pour Tirap présenterait des mécanismes différents entre les cellules hétérozygotes et les cellules totalement déficientes pour Tirap. Pour confirmer le rôle de GM-CSF dans l'activation de la voie STAT5/*Cish*, il serait intéressant d'étudier l'effet de surnageant de culture de BMDM +/+ infecté par Mtb sur l'acidification des vacuoles de BMDMs +/- . On pourrait s'attendre que le surnageant contenant du GM-CSF sécrété par les BMDMs +/+ active le recrutement des protéine *Cish* dans les BMDMs +/- bloquant l'acidification des MCV.

Dans les macrophages -/-, la résistance à l'infection par Mtb ne serait donc pas liée à une augmentation de l'acidification vacuolaire malgré l'inhibition de l'expression de *Cish*. Cependant, une rupture phagosomale moins importante et l'absence de gouttelettes lipidiques dans ces macrophages après infection montre que la déficience pour Tirap empêche la bactérie d'établir sa niche répliquative (Laval et al., 2021; Menon et al., 2019). Nous pourrions donc nous attendre à ce que les bactéries résident dans un compartiment différent d'un phagosome habituel ou du moins, dans un compartiment incapable de mûrir correctement. Dans ce contexte, la bactérie serait incapable d'établir sa niche répliquative et même si la sous-expression de *Cish* empêche la dégradation des v-ATPase, elle ne pourrait pas atteindre ce compartiment particulier. Il sera intéressant de suivre et de comparer le recrutement de marqueurs clés impliqués dans la maturation de la MCV tels que Rab5, Rab7, PI3P et Galectin-8 dans les macrophages déficients pour Tirap (Bussi & Gutierrez, 2019; E. Hoffmann et al., 2018). L'étude de l'expression de TFEB, un activateur transcriptionnel du système lysosomal, permettrait aussi de comprendre cette différence d'acidification observée entre les macrophages +/- et les macrophages -/-.

En résumé, nous suggérons qu'à l'échelle cellulaire, la présence d'un seul allèle codant pour une protéine fonctionnelle inhibe la réplication de Mtb grâce à un mécanisme qui pourrait être lié à la maturation phagosomale et l'acidification du compartiment. La résistance des cellules -/- quant à

elle, ne semble pas être liée à ce mécanisme. La perturbation de la membrane de la MCV habituellement observée au cours de l'infection par Mtb, semble être également inhibée dans les macrophages déficients pour Tirap. Comme décrit précédemment, en cas de perturbation de la membrane phagosomale, la voie ESCRT de la cellule hôte est activée pour favoriser la réparation du phagosome endommagé. Mtb est capable d'inhiber cette machinerie de réparation grâce à la sécrétion de EsxG et EsxH du T7SS ESX-3 (Mittal et al., 2018). Il sera intéressant dans le futur, d'étudier l'activation de cette voie de réparation membranaire dans les cellules déficientes pour Tirap et infectées par Mtb.

Comme décrit dans l'introduction, suite à la rupture phagosomale, Mtb active aussi les NLRs conduisant à l'assemblage de l'inflammasome et à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-1 β ainsi que la mort cellulaire par pyroptose (B. B. Mishra et al., 2010; Saiga et al., 2012; Wassermann et al., 2015). Le niveau important d'IL-1 β contribue également à la compréhension de la susceptibilité des macrophages +/- face à l'infection. L'étude de l'expression des différents acteurs responsable de l'assemblage de l'inflammasome pourrait confirmer cela.

Nous avons également montré, que la réplication de Mtb dépendante de Tirap et le recrutement de celle-ci à la MCV pouvaient être associés à la voie de signalisation du TLR9. L'étude de l'expression et de la distribution cellulaire de Tirap dans des macrophages déficients pour le TLR9 pourrait confirmer cette observation. Nous nous attendons à ce que dans les macrophages déficients pour TLR9, Tirap soit plus faiblement recrutée à la MCV ce qui inhiberait l'expression et le recrutement de Cish permettant au phagosome de mûrir et d'éliminer les bactéries. Nous pouvons aussi supposer que dans des macrophages hétérozygotes pour TLR9, la signalisation de Tirap serait diminuée ce qui induirait un phénotype de résistance comparable aux cellules hétérozygotes pour Tirap.

L'hétérozygotie pour Tirap protège de l'infection par Mtb chez la souris

1. Effet de Tirap sur la charge bactérienne dans le poumon

Dans un autre volet de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une déficience pour Tirap sur la susceptibilité d'un modèle murin d'infection. De manière intéressante, nos résultats montrent que seules les souris hétérozygotes étaient plus résistantes à l'infection. Les souris complètement déficientes étaient susceptibles à l'infection ne reflétant pas le phénotype observé *in vitro*. Ces résultats sont cohérents avec les études chez l'homme montrant que seul l'hétérozygotie pour le SNP S180L, est associée à la protection contre la TB (Capparelli et al., 2013; Castiblanco et al., 2008).

2. Effet de Tirap sur la production des cytokines inflammatoires

Comme décrit précédemment et comme le montrent nos résultats *in vitro*, une sécrétion intermédiaire de cytokines et molécules inflammatoires semble être liée au contrôle de l'infection.

Cependant, l'étude de l'expression de ces gènes dans les poumons entiers de souris infectées n'a pas révélé de différences significatives entre les trois souches de souris. Une analyse de l'expression des cytokines inflammatoires dans des zones plus restreintes de lésions induites par l'infection pourrait se révéler plus concluante quant à l'inflammation induite lors d'une déficience pour Tirap. L'étude de l'expression des ARNm de ces cytokines pourrait être réalisée par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes spécifiques (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*). En effet, un granulome typique de la TB représente un microenvironnement distinct du reste du tissu pulmonaire qui permet, soit de contenir l'infection grâce à une réponse immunitaire locale efficace et les bactéries s'y trouvant sont dans un état de latence, soit de fournir à Mtb une niche favorable à sa réplication. Cependant, le modèle de souris C57B/L6 infecté par Mtb ne présente pas les caractéristiques distinctives de la TB pulmonaire humaine, comme les lésions nécrotiques et caséuses et la fibrose dans les poumons. Il existe un autre modèle de souris décrit précédemment dans l'introduction (souris C3He3B/FeJ ou *Kramnik mouse*), qui est plus sensible à l'infection par Mtb et caractérisé par la formation de lésions nécrotiques riches en neutrophiles similaires à celles observées chez l'homme. Ces régions granulomateuses peuvent être excisées pour une meilleure caractérisation du microenvironnement inflammatoire (Chiu, Stolberg, Freeman, & Chensue, 2007). La seule limite aujourd'hui, c'est la non disponibilité de souris déficientes pour Tirap dans ce modèle de souris Kramnik. Il serait également intéressant d'étudier l'infection de Mtb chez des souris portant la mutation S200L dans le gène de Tirap, qui est l'équivalent murin du SNP S180L chez l'homme (Ní Cheallaigh et al., 2016).

3. Effet d'une déficience pour Tirap sur le recrutement des cellules immunitaires

Nous avons également observé une importante augmentation du nombre de neutrophiles recrutés aux poumons des souris -/-. Cette forte infiltration peut être liée à une réponse compensatoire et inappropriée de l'hôte due à une plus faible signalisation après détection de Mtb par le système immunitaire. Les neutrophiles sont le plus souvent associés à la susceptibilité à l'infection par Mtb (Dallenga & Schaible, 2016) et en particulier chez les individus génétiquement sensibles (Fonseca et al., 2020; Yermeev et al., 2015). Une étude a montré que la neutralisation des neutrophiles protège contre l'exacerbation de Mtb chez les souris déficientes pour ACOD-1 (Nair et al., 2018). Nous pouvons nous attendre à ce que le traitement des souris totalement déficientes pour Tirap avec un anticorps anti-Ly6G (qui entraîne la déplétion des neutrophiles), puisse les rendre plus résistantes à l'infection en comparaison aux souris non traitées. Il serait intéressant également, d'étudier la réplication de Mtb dans les macrophages alvéolaires directement isolés à partir de poumons de souris. Cette expérience nous permettra de savoir si un macrophage alvéolaire de souris -/- est capable de contrôler la réplication de Mtb comme observé *in vitro*, et que la susceptibilité de ces souris est liée au recrutement massif des neutrophiles qui représentent un autre réservoir de la

bactérie. Un séquençage du transcriptome des macrophages alvéolaires pourrait aussi nous renseigner sur l'état d'activation des cellules et leur capacité à éliminer la bactérie.

Nous avons également observé que les souris +/- présentaient un niveau plus élevé de cellules immunitaires adaptatives dans les poumons 28 jours après l'infection, ce qui pourrait être un indicateur d'une activation efficace du système immunitaire adaptative. De manière intéressante, une étude précédente a montré que des individus portant un déficit récessif pour Tirap, initialement prédit comme étant délétère, présentaient une augmentation des réponses immunitaires adaptatives compensatoires et une diminution des infections invasives à pneumocoque chez l'enfant (Israel et al., 2017). En concordance avec ce qui a été observé *in vitro*, de nombreuses études ont également décrit que l'activité lysosomale contrôle la présentation antigénique (Cruz-Leal et al., 2018; Honey & Rudensky, 2003; Mantegazza et al., 2014). Le rôle d'une mutation hétérozygote pour Tirap dans l'activation du système immunitaire adaptatif, peut être étudié grâce à l'approche des hybridomes rapporteurs (Sayes et al., 2018). Ces derniers sont des cellules T exprimant des récepteurs (TCRs, *T cell receptors*) spécifiques aux antigènes de Mtb comme les produits de sécrétion du système Esx-1. L'infection de cellules présentatrices d'antigènes (macrophages ou DC) issues de moelle osseuses de souris +/+, +/- ou -/- activeraient plus ou moins efficacement ces hybridomes T qui sécrèteraient en conséquence de l'IL-2, marqueur précoce de l'activation des lymphocytes T. Cette même approche d'hybridomes rapporteurs peut également nous permettre de discriminer quels facteurs de virulence de la bactérie sont impliqués dans cette interaction avec la protéine Tirap. En effet, Sayes *et al.* ont développé une approche pour exprimer des rapporteurs fluorescents distincts basée sur la reconnaissance spécifique des épitopes de Mtb (présentés par les molécules du MHC classe II) par des hybridomes de cellules T hautement discriminants.

Conclusion et perspectives

En résumé, nos résultats montrent que l'hétérozygotie pour Tirap confère une résistance à la TB chez la souris. Cette résistance peut s'expliquer à différentes échelles (**Figure 12**) :

- Dans les macrophages hétérozygotes, Mtb se trouverait dans un phagosome capable de maturer en exprimant des v-ATPase et des hydrolases qui permettent l'acidification de la MCV et l'élimination ou le contrôle de la réplication de la bactérie.
- Les MCV sont moins sensibles aux effecteurs de Mtb qui induisent la rupture phagosomale.
- Ceci empêche la bactérie d'établir sa niche répliquative et d'échanger de manière efficace avec le compartiment cytosolique de l'hôte.

- Dans les macrophages hétérozygotes, les corps lipidiques, qui représentent une source de nutriments pour Mtb, sont moins disponibles dans le cytosol.
- L'expression de Tirap à un niveau intermédiaire induit une inflammation intermédiaire de cytokines inflammatoires ce qui peut représenter un stimulus optimal pour l'activation de la cellule et potentiellement le recrutement d'autres effecteurs immunitaires.

Notre hypothèse est que l'expression de Tirap dans les macrophages +/- est suffisante pour induire l'inflammation dépendante de la signalisation TLR2-TLR4, mais la présence d'un seul allèle fonctionnel n'est pas suffisante pour le recrutement des différents effecteurs de l'hôte et de Mtb qui bloqueraient la maturation de la MCV.

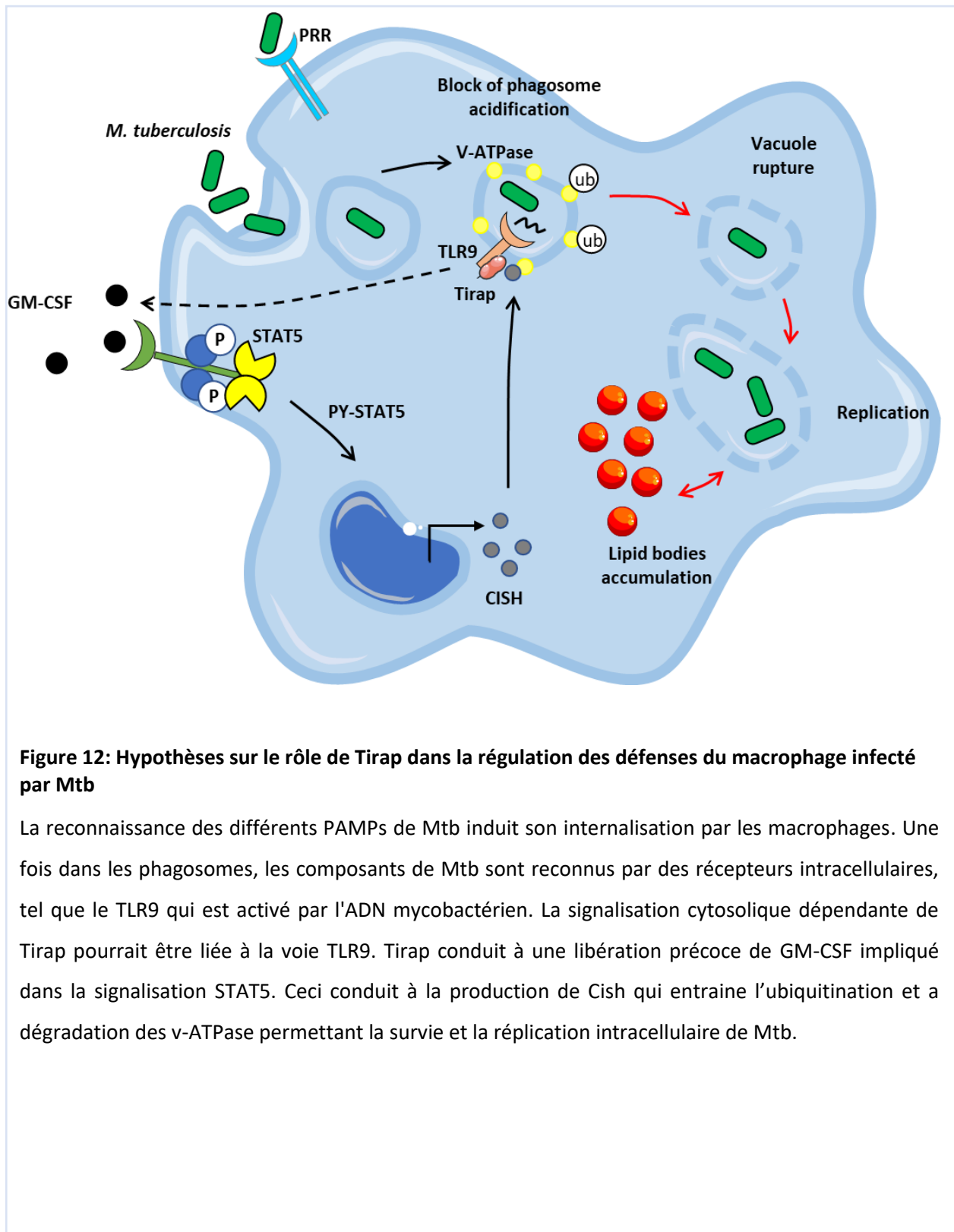


Figure 12: Hypothèses sur le rôle de Tirap dans la régulation des défenses du macrophage infecté par Mtb

La reconnaissance des différents PAMPs de Mtb induit son internalisation par les macrophages. Une fois dans les phagosomes, les composants de Mtb sont reconnus par des récepteurs intracellulaires, tel que le TLR9 qui est activé par l'ADN mycobactérien. La signalisation cytosolique dépendante de Tirap pourrait être liée à la voie TLR9. Tirap conduit à une libération précoce de GM-CSF impliqué dans la signalisation STAT5. Ceci conduit à la production de Cish qui entraîne l'ubiquitination et a dégradation des v-ATPase permettant la survie et la réplication intracellulaire de Mtb.

L'inhibition des voies de signalisation impliquant Tirap à des fins thérapeutiques, a déjà fait l'objet de précédentes études (Hao et al., 2019; M. Srivastava et al., 2019). En effet, une étude a montré que le traitement d'un modèle cellulaire et murin de septicémie avec le Géfitinib, interférait avec l'interaction Tirap-c-Jun inhibant une réponse inflammatoire majeure (médiée par le facteur de sécrétion AP1) souvent observée chez les patients souffrant de septicémie (M. Srivastava et al., 2019). Dans l'optique d'une HDT utilisant un inhibiteur de Tirap associé à un traitement antibiotique, nous avons réalisé une expérience préliminaire d'infection de macrophages déficients pour Tirap pour s'assurer de l'efficacité d'antibiotiques de première ligne, l'isoniazide et la rifampicine (**Figure 13**). La quantification de l'aire bactérienne par cellule infectée, qui est représentative de la réplication de Mtb, a montré que le traitement à l'isoniazide ou à la rifampicine présentait la même efficacité dans les trois souches de macrophages. Ceci ne représente évidemment qu'une preuve indirecte de l'efficacité des antibiotiques dans un modèle d'inhibition de Tirap. Il sera important dans le futur, de tester l'effet d'un traitement avec des inhibiteurs sur l'efficacité des antibiotiques *in vitro* et *in vivo*. Il n'est pas aussi à exclure que la molécule sélectionnée puisse avoir un effet direct sur la bactérie extracellulaire.

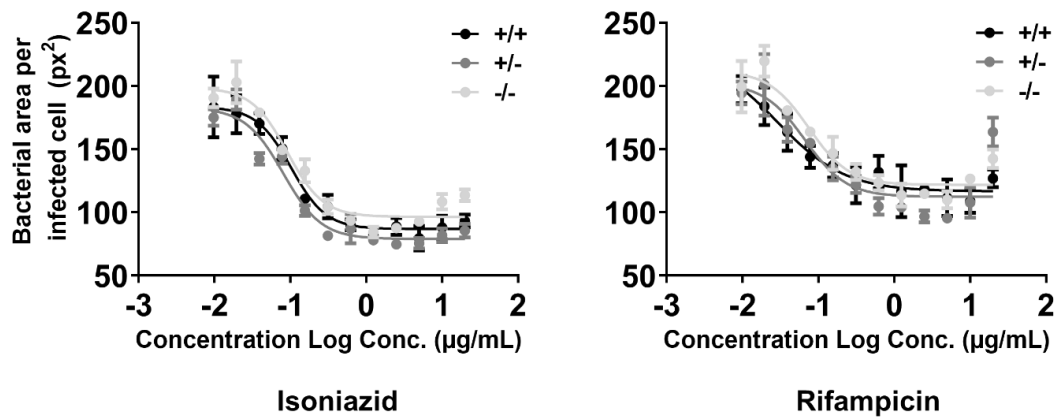


Figure 13: Test d'efficacité de l'isoniazide et la rifampicine sur la réplication bactérienne au sein de macrophages wild type et de macrophages déficients pour Tirap

Les BMDMs ont été cultivés dans des plaques à 384 puits, infectés avec Mtb H37Rv-GFP (MOI de 2) puis traités par l'isoniazide ou la rifampicine à différentes concentrations pendant 4 jours. Les courbes représentent l'aire bactérienne dans les cellules infectées en fonction de la concentration croissante de l'antibiotique utilisé. Chaque point de la courbe est représentatif de la moyenne de 12 puits \pm SEM.

Cependant, l'inhibition de Tirap chez la souris à l'aide de molécules bioactives ou de siRNA inhibant le gène de Tirap, pourrait ne pas améliorer la résistance à l'infection, comparablement au phénotype observé chez la souris *-/-*. Au niveau cellulaire, les macrophages *-/-* parviennent quand même à contenir l'infection. Nous pourrions émettre l'hypothèse que l'inhibition de Tirap spécifiquement dans les macrophages alvéolaires des souris permettrait à ces cellules de contenir l'infection. Une précédente étude de l'équipe a montré que l'administration de nanoparticules de poly- β cyclodextrines chargées d'antibiotiques permettait de cibler spécifiquement les macrophages alvéolaires dans les poumons de souris infectées par Mtb et induire leur apoptose (Machelart et al., 2019). Ces nanoparticules permettraient d'encapsuler des inhibiteurs de Tirap associés à des antibiotiques et de les acheminer directement aux macrophages alvéolaires infectés par Mtb.

En conclusion, l'utilisation des HDT pour le traitement de la TB en est clairement à ses débuts et nécessite des études et des analyses plus approfondies pour pouvoir représenter un élément principal du traitement de la TB. L'étude du système immunitaire et des interactions hôte-Mtb constitue une étape clé pour l'identification des voies de signalisation qui pourraient être ciblées afin d'empêcher la bactérie de détourner la machinerie cellulaire à son avantage. Cibler des voies précoces impliquées dans cette interaction comme la reconnaissance du pathogène par les TLRs a fait l'objet de plusieurs études dans le traitement de différentes pathologies infectieuses et semble être une stratégie prometteuse.

METHODES

Anticorps et marqueurs

L'anticorps polyclonal Tirap a été acheté chez ThermoFischer. Pour l'immunofluorescence, les anticorps ont été sondés en utilisant des anticorps secondaires d'âne anti-lapin conjugués à Rhodamine Red X (Jackson ImmunoResearch). Les noyaux cellulaires ont été marqués par fluorescence en utilisant le DAPI (Sigma Aldrich) ou le Hoechst 33342 (ThermoFisher). Le LysoTracker Green DND-26, le pHrodo Red succinimidyl ester, le CCF4-AM et le LipidTox Deep Red ont été obtenus auprès de ThermoFisher.

Souris

Les souris C57BL/6NJ de type sauvage et Tirap^{-/-} ont été achetées auprès du Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Tout l'élevage de souris a été réalisé dans l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, France, avec des souris hétérozygotes pour le gène Tirap (Tirap^{+/-}) qui y ont été générés (accord B59-350009). Toutes les procédures expérimentales ont fait l'objet d'une validation éthique par le Comité français de l'expérimentation animale et le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche (APAFIS#1 327 0232-2017061411305485 v6, agréé le 14/09/2018). Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives et réglementations en vigueur.

Macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM)

Des progéniteurs murins de moelle osseuse ont été obtenus en prélevant des tibias et des fémurs chez des souris de type sauvage C57BL/6NJ, Tirap^{+/-} et Tirap^{-/-} âgées de 8 à 12 semaines. Les BMDM ont été obtenus en ensemençant 10^7 cellules de moelle osseuse dans des flasques de 75 cm² dans du milieu RPMI 1640 Glutamax (Gibco) additionné de 10 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (FBS, Gibco ; RPMI-FBS) et de 10 % de surnageant de culture de cellules L929 contenant du M-CSF. Du milieu frais a été ajouté tous les 3-4 jours. Après 7 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, la monocouche de BMDM a été rincée avec du D-PBS et les cellules récoltées avec de la Versene (Gibco). Les BMDM ont été remis en suspension dans un milieu de culture pour être utilisés pour des essais ultérieurs.

Bactéries

Des souches recombinantes de Mtb H37Rv exprimant une protéine fluorescente verte (GFP) ou une protéine fluorescente rouge DsRed (Christophe et al., 2009) ont été cultivées dans du milieu Middlebrook 7H9 (Difco) additionné de 10 % d'acide oléique-albumine-dextrose-catalase (OADC, Difco), 0,2 % de glycérol (Euromedex), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich) et 50 µg/ml d'hygromycine (ThermoFisher Scientific) ou 25 µg/ml de kanamycine (Sigma-Aldrich) pour H37Rv-GFP ou H37Rv-DsRed, respectivement. Les cultures ont été maintenues pendant 14 jours jusqu'à ce que la phase exponentielle soit atteinte. Avant l'infection cellulaire, les bacilles ont été lavés avec du DPBS,

sans MgCl₂ ni CaCl₂, (Gibco), remis en suspension dans 10 ml de RPMI-FBS et centrifugés à 1000 rpm/min pendant 2 min à température ambiante pour éliminer les agrégats bactériens. Le titre bactérien de la suspension a été déterminé en mesurant la densité optique (OD_{600 nm}). La suspension bactérienne a été diluée à la concentration voulue dans du RPMI 1640 additionné de 10 % de FBS avant l'infection. Pour les études in vivo, la souche non fluorescente Mtb H37Rv a été cultivée dans du milieu Middlebrook 7H9, comme décrit précédemment (Deboosère et al., 2017 ; Raze et al., 2018).

Infection des souris et détermination de la charge bactérienne

Des souris âgées de 8 à 12 semaines ont été inoculées avec H37Rv par voie intranasale (i.n.) (10^5 CFU/20 μ L) comme décrit précédemment (Machelart et al., 2019). 28 jours après infection, les souris ont été euthanasiées et les poumons ont été récoltés pour une évaluation de la charge bactérienne par CFU. Les poumons ont été homogénéisés pendant 20 min dans un tube contenant des billes de verre de 2,5 mm de diamètre et 1 ml de PBS à l'aide du broyeur MM 400 mixer mill (Retsch GmbH, Haan, Allemagne). Des dilutions en série de dix fois (de 10^{-2} à 10^{-9}) de chaque échantillon ont été étalées sur une plaque de gélose 7H11 (Difco) additionnée de 10 % d'OADC. Après une période de croissance de 2 semaines à 37°C, les CFU ont été déterminées à la dilution appropriée permettant un dénombrement optimal des colonies.

Histopathologie pulmonaire

Les poumons ont été récoltés, perfusés et trempés dans du formaldéhyde à 4 % (solution de formol à 10 %, HT501128, Sigma-Aldrich) pendant 24 heures à 4 °C, puis déshydratés dans une série de solutions d'éthanol pour visualiser leurs structures internes. Les échantillons ont ensuite été inclus dans un milieu contenant du paraplast Plus® et coupés en sections de 5 μ m d'épaisseur. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine (0,1%) pendant 4 min après avoir été déparaffinées et réhydratées. Les échantillons ont été examinés à l'aide d'un microscope optique (Zeiss Axio lab A1) et d'un stéréomicroscope (Zeiss Stemi 305).

Cytométrie en flux

Comme décrit précédemment (Hanot Mambres et al., 2016), les poumons ont été récoltés, coupés en petits morceaux et incubés pendant 1 heure à 37 °C avec un mélange de DNase I (100 μ g/ml, Sigma-Aldrich) et de collagénase (400 U/ml 1,6 mg/ml, Roche). Les cellules pulmonaires ont été lavées et filtrées sur un filtre de 100 μ M avant d'être incubées avec des doses saturantes de 2.4G2 purifié (anti-récepteur Fc de souris, ATCC) dans 200 μ L PBS 0,2% BSA 0,02% Na₃N (tampon FACS) pendant 20 minutes à 4° C pour empêcher les anticorps de se lier au récepteur Fc. Diverses combinaisons d'anticorps monoclonaux fluorescents (dilués dans du tampon FACS) ont été utilisées

pour déterminer les populations cellulaires (**Tableau 3**). Les acquisitions ont été effectuées sur un cytomètre en flux, le FACScanto II (Becton Dickinson) avec les anticorps suivants de BD Biosciences : HL3 couplé à la fluorescéine (FITC) (anti-CD11c), 145-2C11 couplé à la FITC (anti-CD3), RB6-8C5 couplé à l'APC (anti-GR1), RM4-5 couplé à la phycoérythrine (PE) (anti-CD4), E50-2440 couplé à la PE (anti-SIGLEC-F), BM8 couplé à l'APC (anti-F4/80). Le M1/70 couplés à APC-eF780 (antiCD11b) ont été achetés chez eBiosciences et un marqueur de viabilité Aqua (ThermoFisher) a été utilisé pour distinguer les cellules viables des mortes.

Type cellulaire	Phénotype
Neutrophils	CD11b ⁺ Ly6G ⁺
Dendritic cells	CD11b ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ⁻
Alveolar macrophages	F4/80 ⁺ SiglecF ⁺ CD11c ⁺
Interstitial macrophages	F4/80 ⁺ SiglecF ⁻ CD11c ^{int}
CD4 T cells	CD3 ⁺ CD4 ⁺
CD8 T cells	CD3 ⁺ CD8 ⁺
B cells	CD3 ⁻ B220 ⁺ MHCII ⁺

Tableau 3: Détermination phénotypique des cellules immunitaires pulmonaires.

Quantification de la réplication mycobactérienne intracellulaire, l'acidification phagosomale, la rupture phagosomale et la formation de gouttelettes lipidiques (DL)

2x10⁴ BMDM ont étéensemencés par puits dans des plaques à 384 puits. Les cellules ont été infectées pendant 3 h avec H37Rv-GFP à une MOI de 2. Les cellules ont été lavées abondamment avec RPMI-FBS afin d'éliminer les bactéries extracellulaires puis incubées à 37 ° C avec 5% de CO₂.

Pour le test de réplication intracellulaire, les cellules ont été incubées dans une solution de formol à 10 % (Sigma-Aldrich) contenant 10 µg/mL de Hoechst 33342 (Life-Technologies) à 3 h et 96 h post-infection (hpi). Les plaques ont été incubées pendant 30 min, permettant la coloration des noyaux et la fixation des cellules. Les cellules ont été stockées dans du DPBS jusqu'à l'acquisition de l'image.

Pour quantifier l'acidification phagosomale, 2 essais ont été réalisés. Pour le test LysoTracker, 3 hpi, les cellules ont été incubées avec 1 mM de LysoTracker Green DND-26 pendant 1,5 h à 37 ° C avec 5 % de CO₂. Les cellules ont ensuite été fixées avec une solution contenant du formol à 10 % et 10 µg/mL de Hoechst 33342. Pour le test pHrodo, avant l'infection cellulaire, la culture H37Rv-GFP a été incubée pendant 1 h à 37 ° C dans du bicarbonate de sodium 100 mM, pH 8,5, contenant 0,5 mM

d'amine réactive. Les bactéries marquées ont été lavées et les BMDM ont ensuite été infectées avec cette culture de Mtb marquée au pHrodo et exprimant la GFP à une MOI de 2. L'acidification phagosomale a été évaluée (toutes les heures jusqu'à 12 hpi) comme décrit précédemment (Deboosere et al. , 2021).

Pour la rupture phagosomale, à 4 jours post-infection (dpi), les cellules ont été colorées avec 8 μ M CCF4-AM dans du tampon EM (120 mM NaCl₂, 7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 2,5 μ M probénécide et 25 mM Hepes, pH 7.3) pendant 1 h à température ambiante et dans l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois en utilisant un tampon EM avant l'imagerie.

Pour le test de formation de LD, les cellules ont été lavées et fixées à 96 hpi, comme décrit précédemment (Deboosere et al., 2021). Les cellules ont été lavées deux fois avec du DBPS et les LD intracellulaires ont été marquées avec 25 μ L par puits par la sonde HCS LipidTox Deep Red diluée 2000 fois (Invitrogen) dans du DPBS pendant 30 min à température ambiante.

Immunofluorescence

2×10^4 BMDM ont étéensemencés par puits dans des plaques à 384 puits et infectés avec Mtb H37Rv-GFP à une MOI de 2 pendant 24 h. Par la suite, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées dans du PBS + paraformaldéhyde à 4 % pendant 20 min à température ambiante, suivies d'une incubation dans du PBS + NH₄Cl 50 mM pendant 10 min. Les cellules ont été marquées pour Tirap et le noyau l'ADN à l'aide du DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Les cellules ont ensuite été lavées abondamment avant l'imagerie.

Acquisition d'image

Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence automatisé (In Cell Analyzer 6000, GE) équipé d'une lentille 20X (NA 0,70) ou d'une lentille à immersion 60X (NA 1,2) pour la localisation de Tirap, la réplication mycobactérienne, l'acidification phagosomale et les essais de formation de LD. Le microscope confocal est équipé de lasers d'excitation à 405, 488, 561 et 642 nm. La fluorescence émise a été capturée à l'aide d'une caméra associée à un ensemble de filtres couvrant une longueur d'onde de détection allant de 450 à 690 nm. Les noyaux colorés au Hoechst 33342 ont été détectés à l'aide du laser 405 nm avec un filtre d'émission 450/50 nm. Les signaux verts correspondant à LysoTracker Green DND-26 et H37Rv-GFP ont été détectés à l'aide d'un laser de 488 nm avec des filtres d'émission de 540/75 nm. Les signaux rouges correspondant aux anticorps secondaires Alexa fluor, à H37Rv-DsRed, et au pHrodo ont été détectés à l'aide d'un laser de 561 nm avec des filtres d'émission de 600/40 nm. Le signal LipidTOX a été détecté en utilisant des longueurs d'onde d'excitation de 630 nm et d'émission de 690 nm.

L'analyse d'image

Les images du microscope confocal automatisé ont été analysées à l'aide de scripts multiparamètres développés à l'aide du système Columbus (version 2.3.1; PerkinElmer). Des algorithmes de segmentation ont été appliqués aux images d'entrée pour détecter les noyaux et le signal de Mtb H37Rv afin de déterminer les taux d'infection et de réplication. En bref, la segmentation de la cellule hôte a été réalisée en utilisant deux intensités de signal Hoechst différentes - une forte intensité correspondant au noyau et une faible intensité dans le cytoplasme - avec l'algorithme "Find Nuclei" et "Find Cytoplasm", comme décrit précédemment (Deboosere et al. , 2021). Les intensités du signal GFP ou DsRed dans une cellule ont été utilisées pour la segmentation bactérienne intracellulaire avec l'algorithme "Find Spots". Les bactéries intracellulaires identifiées ont été quantifiées en nombre de pixels ce qui correspond à l'aire bactérienne intracellulaire. Par la suite, la population de cellules infectées a été déterminée et l'augmentation de la surface intracellulaire de Mtb, correspondant à la réplication mycobactérienne intracellulaire, a été calculée. Pour la quantification de l'acidification phagosomale avec Lysotracker Green DND-26, l'intensité du signal vert dans une cellule a été utilisée pour la segmentation du compartiment acide intracellulaire avec l'algorithme "Find Spots".

Extraction d'ARN

Les BMDM ont été cultivés dans des plaques à 6 puits et l'ARN a été extrait à l'aide du réactif de lyse QIAzol et du kit miRNeasy Mini conformément aux instructions du fabricant (Qiagen). La concentration d'ARN a été déterminée à l'aide du SimpliNano (GE Healthcare, Royaume-Uni). L'ADN restant dans les échantillons a été dégradé à l'aide de du kit amplification grade DNase I (Sigma-Aldrich, USA) pendant 6 min à température ambiante. La réaction a été stoppée par inactivation thermique pendant 10 min à 70°C.

L'ARN total des tissus pulmonaires a été extrait avec le kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, Allemagne).

RT-PCR quantitative

Pour les extraits d'ARN des BMDM, la synthèse d'ADNc a été réalisée par transcription inverse à l'aide du kit Superscript IV Vilo Mastermix (ThermoFisher, USA) en suivant les instructions du fabricant. L'ARN de l'extrait de poumon a été rétrotranscrit avec le kit High-Capacity cDNA Archive (Life Technologies, États-Unis). La qPCR a été réalisée à l'aide du SYBR Select Master Mix (Thermofischer) avec 20 ng d'ADNc par échantillon et les paires d'amorces appropriées (**Tableau 4**). Gapdh a été utilisé comme gène de ménage de référence pour la normalisation. Les réactions qPCR ont été mesurées par le système QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, USA) en utilisant les

cycles suivants : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C suivis de 40 cycles de 15 s à 95°C, 30 s à 60°C et 30 s à 72°C. L'expression relative de l'ARNm cible a été calculée sur la base de la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où le gène Gapdh a été utilisé comme gène de référence, et l'ARN des BMDM de type sauvage non infectés a été utilisé comme condition standard (contrôle négatif).

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>arg1</i>	ATTGTGAAGAACCCACGGTCTG	ACTGTGGTCTCCACCCAGCA
<i>cish</i>	CTAGACCCTGAGGGGGATCT	GGGTGCTGTCTCGAACTAGG
<i>gapdh</i>	GCAAAGTGGAGATTGTTGCCA	GCCTTGACTGTGCCGTTGA
<i>gm-csf</i>	TGCCTGTCACGTTGAATGAAGA	CCCGTAGACCCTGCTCGAATA
<i>ifng</i>	CAACAGCAAGGCGAAAAAG	GTGGACCACTCGGATGAGCT
<i>il12p40</i>	GACCCTGCCCATTGAACTGGC	CAACGTTGCATCCTAGGATCG
<i>il1b</i>	TCGTGCTGTCGGACCCATA	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
<i>il6</i>	CAACCACGGCCTTCCCTACT	CCACGATTTCAGAGAACATG
<i>inos</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTCGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>tnfa</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC

Tableau 4: Séquences des amorces sens et anti-sens

Séquençage de l'ARN

La qualité de l'ARN a été analysée par la mesure du numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) avec un bioanalyseur RNA 6000 Nano assay avant le séquençage. La préparation de la bibliothèque d'ARNm a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant (kit Ultra 2 mRNA de NEB). La bibliothèque regroupant les échantillons finaux a été séquencée sur le Novaseq6000 ILLUMINA (2x1600 millions de lectures de 100 bases) en une seule passe, correspondant à 2x30 millions de lectures par échantillon après démultiplexage. La qualité des données brutes a été évaluée avec FastQC. Les séquences et les adaptateurs de mauvaise qualité ont été coupés ou supprimés avec l'outil fastp, avec les paramètres par défaut, pour ne conserver que les lectures appariées de bonne qualité. La plateforme bio-IT Illumina DRAGEN (v3.8.4) a été utilisée pour la cartographie sur le génome de référence mm10 et la quantification avec le fichier gtf d'annotation gencode vM25. La composition de la bibliothèque et la couverture des transcrits ont été vérifiées avec les outils Picard. Les analyses suivantes ont été réalisées avec le logiciel R. L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée

avec le package bioconductor DESeq2 (v1.26.0). Les valeurs de p ajustées aux hypothèses multiples ont été calculées avec la procédure de Benjamini-Hochberg pour contrôler le FDR avec un seuil de significativité à 0,05. Le seuil du rapport log2 absolu a été fixé à 2.

Enfin, une analyse d'enrichissement a été réalisée en copiant-collant les gènes identifiés dans Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

Statistiques

Toutes les analyses et tous les histogrammes ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. La significativité des résultats obtenus a été testée à l'aide du test Ordinary one-way ANOVA. Les différences de moyenne entre deux groupes ont été analysées à l'aide du test t Student. Les symboles *, **, *** et **** indiquent respectivement $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ et $p < 0,0001$.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Uncategorized References

- Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., . . . Bitter, W. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, 5(11), 883-891. doi:10.1038/nrmicro1773
- Acharya, B., Acharya, A., Gautam, S., Ghimire, S. P., Mishra, G., Parajuli, N., & Sapkota, B. (2020). Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Biol Rep*, 47(5), 4065-4075. doi:10.1007/s11033-020-05413-7
- Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol*, 2011, 814943. doi:10.1155/2011/814943
- Ahmed, A., Rakshit, S., Adiga, V., Dias, M., Dwarkanath, P., D'Souza, G., & Vyakarnam, A. (2021). A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunol Rev*, 301(1), 98-121. doi:10.1111/imr.12968
- Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8), 675-680. doi:10.1038/90609
- Al Tbeishat, H. (2022). Novel In Silico mRNA vaccine design exploiting proteins of M. tuberculosis that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Sci Rep*, 12(1), 4645. doi:10.1038/s41598-022-08506-4
- Amaral, E. P., Costa, D. L., Namasivayam, S., Riteau, N., Kamenyeva, O., Mittereder, L., . . . Sher, A. (2019). A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. *J Exp Med*, 216(3), 556-570. doi:10.1084/jem.20181776
- Amelio, P., Portevin, D., Hella, J., Reither, K., Kamwela, L., Lweno, O., . . . Perreau, M. (2019). HIV Infection Functionally Impairs Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 and CD8 T-Cell Responses. *J Virol*, 93(5). doi:10.1128/jvi.01728-18
- Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., . . . Astarie-Dequeker, C. (2017). ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol*, 19(7). doi:10.1111/cmi.12726
- Azad, A. K., Sadee, W., & Schlesinger, L. S. (2012). Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun*, 80(10), 3343-3359. doi:10.1128/iai.00443-12
- Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2010). Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 121(1-2), 221-227. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.037
- Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., & Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 202(12), 1715-1724. doi:10.1084/jem.20051782
- Barczak, A. K., Avraham, R., Singh, S., Luo, S. S., Zhang, W. R., Bray, M. A., . . . Hung, D. T. (2017). Systematic, multiparametric analysis of Mycobacterium tuberculosis intracellular infection offers insight into coordinated virulence. *PLoS Pathog*, 13(5), e1006363. doi:10.1371/journal.ppat.1006363
- Barreiro, L. B., Ben-Ali, M., Quach, H., Laval, G., Patin, E., Pickrell, J. K., . . . Quintana-Murci, L. (2009). Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet*, 5(7), e1000562. doi:10.1371/journal.pgen.1000562
- Barton, G. M., Kagan, J. C., & Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, 7(1), 49-56. doi:10.1038/ni1280

- Belhaouane, I., Hoffmann, E., Chamaillard, M., Brodin, P., & Machelart, A. (2020). Paradoxical Roles of the MAL/Tirap Adaptor in Pathologies. *Front Immunol*, *11*, 569127. doi:10.3389/fimmu.2020.569127
- Berg, R. D., Levitte, S., O'Sullivan, M. P., O'Leary, S. M., Cambier, C. J., Cameron, J., . . . Ramakrishnan, L. (2016). Lysosomal Disorders Drive Susceptibility to Tuberculosis by Compromising Macrophage Migration. *Cell*, *165*(1), 139-152. doi:10.1016/j.cell.2016.02.034
- Bienenstock, J. (1984). The lung as an immunologic organ. *Annu Rev Med*, *35*, 49-62. doi:10.1146/annurev.me.35.020184.000405
- Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V., & Ernst, J. D. (2012). Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*, *11*(1), 81-90. doi:10.1016/j.chom.2011.11.012
- Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., El-Baghdadi, J., Camcioglu, Y., Parvaneh, N., El Azbaoui, S., . . . Abel, L. (2015). Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol Rev*, *264*(1), 103-120. doi:10.1111/imr.12272
- Bonham, Kevin S., Orzalli, Megan H., Hayashi, K., Wolf, Amaya I., Glanemann, C., Weninger, W., . . . Kagan, Jonathan C. (2014). A Promiscuous Lipid-Binding Protein Diversifies the Subcellular Sites of Toll-like Receptor Signal Transduction. *Cell*, *156*(4), 705-716. doi:10.1016/j.cell.2014.01.019
- Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, *19*(4), 447-459. doi:10.1016/j.str.2011.02.004
- Bottai, D., & Brosch, R. (2016). The BCG Strain Pool: Diversity Matters. *Mol Ther*, *24*(2), 201-203. doi:10.1038/mt.2016.18
- Bourke, C. D., Berkley, J. A., & Prendergast, A. J. (2016). Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol*, *37*(6), 386-398. doi:10.1016/j.it.2016.04.003
- Braverman, J., Sogi, K. M., Benjamin, D., Nomura, D. K., & Stanley, S. A. (2016). HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, *197*(4), 1287-1297. doi:10.4049/jimmunol.1600266
- Brown, L., Wolf, J., Prados-Rosales, R. *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* **13**, 620–630 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Budzik, J. M., Swaney, D. L., Jimenez-Morales, D., Johnson, J. R., Garelis, N. E., Repasy, T., . . . Cox, J. S. (2020). Dynamic post-translational modification profiling of Mycobacterium tuberculosis-infected primary macrophages. *Elife*, *9*. doi:10.7554/eLife.51461
- Bussi, C., & Gutierrez, M. G. (2019). Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev*, *43*(4), 341-361. doi:10.1093/femsre/fuz006
- Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell*, *159*(7), 1497-1509. doi:10.1016/j.cell.2014.11.024
- Cantini, F., Niccoli, L., & Goletti, D. (2014). Tuberculosis risk in patients treated with non-anti-tumor necrosis factor- α (TNF- α) targeted biologics and recently licensed TNF- α inhibitors: data from clinical trials and national registries. *J Rheumatol Suppl*, *91*, 56-64. doi:10.3899/jrheum.140103
- Capparelli, R., De Chiara, F., Di Matteo, A., Medaglia, C., & Iannelli, D. (2013). The MyD88 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to human pulmonary tuberculosis. *Genes Immun*, *14*(8), 504-511. doi:10.1038/gene.2013.48
- Carroll, P., Schreuder, L. J., Muwanguzi-Karugaba, J., Wiles, S., Robertson, B. D., Ripoll, J., . . . Parish, T. (2010). Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS One*, *5*(3), e9823. doi:10.1371/journal.pone.0009823
- Casanova, J. L., & Abel, L. (2021). Lethal Infectious Diseases as Inborn Errors of Immunity: Toward a Synthesis of the Germ and Genetic Theories. *Annu Rev Pathol*, *16*, 23-50. doi:10.1146/annurev-pathol-031920-101429

- Castiblanco, J., Varela, D. C., Castaño-Rodríguez, N., Rojas-Villarraga, A., Hincapié, M. E., & Anaya, J. M. (2008). TIRAP (MAL) S180L polymorphism is a common protective factor against developing tuberculosis and systemic lupus erythematosus. *Infect Genet Evol*, *8*(5), 541-544. doi:10.1016/j.meegid.2008.03.001
- Cegielski, J. P., & McMurray, D. N. (2004). The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis*, *8*(3), 286-298.
- Chai, Q., Wang, L., Liu, C. H., & Ge, B. (2020). New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular & Molecular Immunology*, *17*(9), 901-913. doi:10.1038/s41423-020-0502-z
- Chai, Q., Wang, X., Qiang, L., Zhang, Y., Ge, P., Lu, Z., . . . Liu, C. H. (2019). A *Mycobacterium tuberculosis* surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy. *Nat Commun*, *10*(1), 1973. doi:10.1038/s41467-019-09955-8
- Chen, Z., Wang, W., Liang, J., Wang, J., Feng, S., & Zhang, G. (2015). Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *BMC Pulm Med*, *15*, 57. doi:10.1186/s12890-015-0049-4
- Cheng, Y., & Schorey, J. S. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*-induced IFN- β production requires cytosolic DNA and RNA sensing pathways. *J Exp Med*, *215*(11), 2919-2935. doi:10.1084/jem.20180508
- Chiu, B. C., Stolberg, V. R., Freeman, C. M., & Chensue, S. W. (2007). Mononuclear phagocyte-derived interleukin-10 suppresses the innate pulmonary granuloma cytokine response in aged mice. *Am J Pathol*, *171*(3), 829-837. doi:10.2353/ajpath.2007.061122
- Christophe, T., Ewann, F., Jeon, H. K., Cechetto, J., & Brodin, P. (2010). High-content imaging of *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages: an in vitro model for tuberculosis drug discovery. *Future Med Chem*, *2*(8), 1283-1293. doi:10.4155/fmc.10.223
- Christophe, T., Jackson, M., Jeon, H. K., Fenistein, D., Contreras-Dominguez, M., Kim, J., . . . Brodin, P. (2009). High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS Pathog*, *5*(10), e1000645. doi:10.1371/journal.ppat.1000645
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., . . . Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*, *201*(1), 19-25. doi:10.1084/jem.20041836
- Cohen, S. B., Gern, B. H., Delahaye, J. L., Adams, K. N., Plumlee, C. R., Winkler, J. K., . . . Urdahl, K. B. (2018). Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host Microbe*, *24*(3), 439-446.e434. doi:10.1016/j.chom.2018.08.001
- Collin, M., Dickinson, R., & Bigley, V. (2015). Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*, *169*(2), 173-187. doi:10.1111/bjh.13317
- Collins, A. C., Cai, H., Li, T., Franco, L. H., Li, X. D., Nair, V. R., . . . Shiloh, M. U. (2015). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe*, *17*(6), 820-828. doi:10.1016/j.chom.2015.05.005
- Conrad, C., Wunsche, A., Tan, T. H., Bulkescher, J., Sieckmann, F., Verissimo, F., . . . Ellenberg, J. (2011). Micropilot: automation of fluorescence microscopy-based imaging for systems biology. *Nat Methods*, *8*(3), 246-249. doi:10.1038/nmeth.1558
- Conrad, W. H., Osman, M. M., Shanahan, J. K., Chu, F., Takaki, K. K., Cameron, J., . . . Ramakrishnan, L. (2017). *Mycobacterial* ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(6), 1371-1376. doi:10.1073/pnas.1620133114
- Coscolla, M., & Gagneux, S. (2014). Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*, *26*(6), 431-444. doi:10.1016/j.smim.2014.09.012

- Coussens, A. K., Wilkinson, R. J., Nikolayevskyy, V., Elkington, P. T., Hanifa, Y., Islam, K., . . . Martineau, A. R. (2013). Ethnic variation in inflammatory profile in tuberculosis. *PLoS Pathog*, *9*(7), e1003468. doi:10.1371/journal.ppat.1003468
- Cruz-Leal, Y., Grubaugh, D., Nogueira, C. V., Lopetegui-González, I., Del Valle, A., Escalona, F., . . . Lanio, M. E. (2018). The Vacuolar Pathway in Macrophages Plays a Major Role in Antigen Cross-Presentation Induced by the Pore-Forming Protein Sticholysin II Encapsulated Into Liposomes. *Front Immunol*, *9*, 2473. doi:10.3389/fimmu.2018.02473
- D'Onofrio, V., Monnier, A. A., Kremer, C., Stappers, M. H. T., Netea, M. G., & Gyssens, I. C. (2020). Lesion size is associated with genetic polymorphisms in TLR1, TLR6, and TIRAP genes in patients with major abscesses and diabetic foot infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *39*(2), 353-360. doi:10.1007/s10096-019-03732-7
- Dallenga, T., Linnemann, L., Paudyal, B., Repnik, U., Griffiths, G., & Schaible, U. E. (2018). Targeting neutrophils for host-directed therapy to treat tuberculosis. *Int J Med Microbiol*, *308*(1), 142-147. doi:10.1016/j.ijmm.2017.10.001
- Dallenga, T., & Schaible, U. E. (2016). Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? *Pathog Dis*, *74*(3). doi:10.1093/femspd/ftw012
- Darrah, P. A., Zeppa, J. J., Maiello, P., Hackney, J. A., Wadsworth, M. H., 2nd, Hughes, T. K., . . . Seder, R. A. (2020). Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature*, *577*(7788), 95-102. doi:10.1038/s41586-019-1817-8
- Deboosere, N., Belhaouane, I., Machelart, A., Hoffmann, E., Vandeputte, A., & Brodin, P. (2021). High-Content Analysis Monitoring Intracellular Trafficking and Replication of Mycobacterium tuberculosis Inside Host Cells. *Methods Mol Biol*, *2314*, 649-702. doi:10.1007/978-1-0716-1460-0_29
- Deboosère, N., Iantomasi, R., Queval, C. J., Song, O. R., Deloison, G., Jouny, S., . . . Veyron-Churlet, R. (2017). LppM impact on the colonization of macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol*, *19*(1). doi:10.1111/cmi.12619
- den Brok, M. H., Raaijmakers, T. K., Collado-Camps, E., & Adema, G. J. (2018). Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends Immunol*, *39*(5), 380-392. doi:10.1016/j.it.2018.01.012
- Dey, B., Dey, R. J., Cheung, L. S., Pokkali, S., Guo, H., Lee, J. H., & Bishai, W. R. (2015). A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nat Med*, *21*(4), 401-406. doi:10.1038/nm.3813
- Dorhoi, A., Nouailles, G., Jörg, S., Hagens, K., Heinemann, E., Pradl, L., . . . Kaufmann, S. H. (2012). Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur J Immunol*, *42*(2), 374-384. doi:10.1002/eji.201141548
- Dulberger, C. L., Rubin, E. J., & Boutte, C. C. (2020). The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 47-59. doi:10.1038/s41579-019-0273-7
- Dunlap, M. D., Howard, N., Das, S., Scott, N., Ahmed, M., Prince, O., . . . Khader, S. A. (2018). A novel role for C-C motif chemokine receptor 2 during infection with hypervirulent Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol*, *11*(6), 1727-1742. doi:10.1038/s41385-018-0071-y
- Durham, G. A., Williams, J. J. L., Nasim, M. T., & Palmer, T. M. (2019). Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends Pharmacol Sci*, *40*(5), 298-308. doi:10.1016/j.tips.2019.03.001
- El Kasmí, K. C., Qualls, J. E., Pesce, J. T., Smith, A. M., Thompson, R. W., Henao-Tamayo, M., . . . Murray, P. J. (2008). Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol*, *9*(12), 1399-1406. doi:10.1038/ni.1671
- Ernst, J. D. (1998). Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, *66*(4), 1277-1281. doi:10.1128/iai.66.4.1277-1281.1998

- Farhat, M., Greenaway, C., Pai, M., & Menzies, D. (2006). False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*, *10*(11), 1192-1204.
- Fatima, S., Kumari, A., Das, G., & Dwivedi, V. P. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci*, *252*, 117594. doi:10.1016/j.lfs.2020.117594
- Fejer, G., Wegner, M. D., Györy, I., Cohen, I., Engelhard, P., Voronov, E., . . . Freudenberg, M. A. (2013). Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(24), E2191-2198. doi:10.1073/pnas.1302877110
- Feltcher, M. E., Sullivan, J. T., & Braunstein, M. (2010). Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis: novel targets for drug development? *Future Microbiol*, *5*(10), 1581-1597. doi:10.2217/fmb.10.112
- Feng, Y., Kong, Y., Barnes, P. F., Huang, F. F., Klucar, P., Wang, X., . . . Shams, H. (2011). Exposure to cigarette smoke inhibits the pulmonary T-cell response to influenza virus and Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, *79*(1), 229-237. doi:10.1128/iai.00709-10
- Fonseca, K. L., Maceiras, A. R., Matos, R., Simoes-Costa, L., Sousa, J., Cá, B., . . . Saraiva, M. (2020). Deficiency in the glycosyltransferase Gcmt1 increases susceptibility to tuberculosis through a mechanism involving neutrophils. *Mucosal Immunol*, *13*(5), 836-848. doi:10.1038/s41385-020-0277-7
- Franco, L. H., Nair, V. R., Scharn, C. R., Xavier, R. J., Torrealba, J. R., Shiloh, M. U., & Levine, B. (2017). The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of Mycobacterium tuberculosis and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host Microbe*, *21*(1), 59-72. doi:10.1016/j.chom.2016.11.002
- Freeman, S. A., & Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*, *262*(1), 193-215. doi:10.1111/imr.12212
- Fremont, C. M., Togbe, D., Doz, E., Rose, S., Vasseur, V., Maillat, I., . . . Quesniaux, V. F. (2007). IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, *179*(2), 1178-1189. doi:10.4049/jimmunol.179.2.1178
- Fulgione, A., Papaiani, M., Cuomo, P., Paris, D., Romano, M., Tuccillo, C., . . . Capparelli, R. (2020). Interaction between MyD88, TIRAP and IL1RL1 against Helicobacter pylori infection. *Scientific Reports*, *10*(1), 15831. doi:10.1038/s41598-020-72974-9
- Gautam, U. S., Foreman, T. W., Bucsan, A. N., Veatch, A. V., Alvarez, X., Adekambi, T., . . . Mehra, S. (2018). In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(1), E62-e71. doi:10.1073/pnas.1711373114
- Gehr, P., Bachofen, M., & Weibel, E. R. (1978). The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol*, *32*(2), 121-140. doi:10.1016/0034-5687(78)90104-4
- Gehring, A. J., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Harding, C. V., & Boom, W. H. (2004). Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*, *173*(4), 2660-2668. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2660
- Gern, B., Plumlee, C., Gerner, M., & Urdahl, K. (2017). Investigating Immune Correlates of Protection to Tuberculosis Using an Ultra-Low Dose Infection in a Mouse Model. *Open Forum Infectious Diseases*, *4*(suppl_1), S47-S48. doi:10.1093/ofid/ofx162.112
- Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R. E., & Raviglione, M. (2015). Latent Mycobacterium tuberculosis infection. *N Engl J Med*, *372*(22), 2127-2135. doi:10.1056/NEJMra1405427
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, *51*(5), 1417-1423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357758>

- Gleeson, L. E., Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E. M., Triglia, D., O'Leary, S. M., O'Sullivan, M. P., . . . Keane, J. (2016). Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication. *J Immunol*, *196*(6), 2444-2449. doi:10.4049/jimmunol.1501612
- Golden, M. P., & Vikram, H. R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician*, *72*(9), 1761-1768.
- Greenlee-Wacker, M. C. (2016). Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*, *273*(1), 357-370. doi:10.1111/imr.12453
- Guo, M., Hartlova, A., Dill, B. D., Prescott, A. R., Gierlinski, M., & Trost, M. (2015). High-resolution quantitative proteome analysis reveals substantial differences between phagosomes of RAW 264.7 and bone marrow derived macrophages. *Proteomics*, *15*(18), 3169-3174. doi:10.1002/pmic.201400431
- Hanot Mambres, D., Machelart, A., Potemberg, G., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J. J., & Muraille, E. (2016). Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. *J Immunol*, *196*(9), 3780-3793. doi:10.4049/jimmunol.1502265
- Hao, S., Li, S., Wang, J., Yan, Y., Ai, X., Zhang, J., . . . Wang, C. (2019). Phycocyanin Exerts Anti-Proliferative Effects through Down-Regulating TIRAP/NF- κ B Activity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cells*, *8*(6). doi:10.3390/cells8060588
- Harishankar, M., Selvaraj, P., & Bethunaickan, R. (2018). Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. *Frontiers in Medicine*, *5*. doi:10.3389/fmed.2018.00213
- Hatai, H., Lepelley, A., Zeng, W., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2016). Toll-Like Receptor 11 (TLR11) Interacts with Flagellin and Profilin through Disparate Mechanisms. *PLoS One*, *11*(2), e0148987. doi:10.1371/journal.pone.0148987
- Hawn, T. R., Dunstan, S. J., Thwaites, G. E., Simmons, C. P., Thuong, N. T., Lan, N. T. N., . . . Aderem, A. (2006). A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. *J Infect Dis*, *194*(8), 1127-1134. doi:10.1086/507907
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., May, H., Lee, O. Y., Feldman, M., . . . Bar-Gal, G. K. (2015). Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. *Tuberculosis (Edinb)*, *95 Suppl 1*, S122-126. doi:10.1016/j.tube.2015.02.021
- Hinchev, J., Lee, S., Jeon, B. Y., Basaraba, R. J., Venkataswamy, M. M., Chen, B., . . . Porcelli, S. A. (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, *117*(8), 2279-2288. doi:10.1172/jci31947
- Hoffmann, E., Machelart, A., Belhaouane, I., Deboosere, N., Pauwels, A.-M., Saint-André, J.-P., . . . Brodin, P. (2019). IRG1 controls immunometabolic host response and restricts intracellular *Mycobacterium tuberculosis* infection. *bioRxiv*, 761551. doi:10.1101/761551
- Hoffmann, E., Machelart, A., Song, O. R., & Brodin, P. (2018). Proteomics of *Mycobacterium* Infection: Moving towards a Better Understanding of Pathogen-Driven Immunomodulation. *Front Immunol*, *9*, 86. doi:10.3389/fimmu.2018.00086
- Honey, K., & Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, *3*(6), 472-482. doi:10.1038/nri1110
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., & Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, *420*(6913), 329-333. doi:10.1038/nature01180
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., . . . Jacobs, W. R., Jr. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(21), 12420-12425. doi:10.1073/pnas.1635213100

- Huang, L., Nazarova, E. V., & Russell, D. G. (2019). Mycobacterium tuberculosis: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. *Microbiol Spectr*, 7(2). doi:10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019
- Huang, L., Nazarova, E. V., Tan, S., Liu, Y., & Russell, D. G. (2018). Growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med*, 215(4), 1135-1152. doi:10.1084/jem.20172020
- Hunter, R. L. (2016). Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 97, 8-17. doi:10.1016/j.tube.2015.11.010
- Hunter, R. L., Olsen, M. R., Jagannath, C., & Actor, J. K. (2006). Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci*, 36(4), 371-386.
- Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P., & Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo j*, 26(2), 313-324. doi:10.1038/sj.emboj.7601511
- Imbert, P. R., Louche, A., Luizet, J. B., Grandjean, T., Bigot, S., Wood, T. E., . . . Salcedo, S. P. (2017). A Pseudomonas aeruginosa TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors. *Embo j*, 36(13), 1869-1887. doi:10.15252/embj.201695343
- Irwin, S. M., Driver, E., Lyon, E., Schrupp, C., Ryan, G., Gonzalez-Juarrero, M., . . . Lenaerts, A. J. (2015). Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. *Dis Model Mech*, 8(6), 591-602. doi:10.1242/dmm.019570
- Israel, L., Wang, Y., Bulek, K., Della Mina, E., Zhang, Z., Pedergnana, V., . . . Puel, A. (2017). Human Adaptive Immunity Rescues an Inborn Error of Innate Immunity. *Cell*, 168(5), 789-800.e710. doi:10.1016/j.cell.2017.01.039
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, 16(4), 343-353. doi:10.1038/ni.3123
- Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(10). doi:10.1101/cshperspect.a021105
- Jagielski, T., Bakula, Z., Brzostek, A., Minias, A., Stachowiak, R., Kalita, J., . . . Dziadek, J. (2018). Characterization of Mutations Conferring Resistance to Rifampin in Mycobacterium tuberculosis Clinical Strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(10). doi:10.1128/aac.01093-18
- Jeyaseelan, S., Manzer, R., Young, S. K., Yamamoto, M., Akira, S., Mason, R. J., & Worthen, G. S. (2005). Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is critical for early lung immune responses against Escherichia coli lipopolysaccharide and viable Escherichia coli. *J Immunol*, 175(11), 7484-7495. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7484
- Jeyaseelan, S., Young, S. K., Yamamoto, M., Arndt, P. G., Akira, S., Kolls, J. K., & Worthen, G. S. (2006). Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein (TIRAP) is a critical mediator of antibacterial defense in the lung against Klebsiella pneumoniae but not Pseudomonas aeruginosa. *J Immunol*, 177(1), 538-547. doi:10.4049/jimmunol.177.1.538
- Ji, D. X., Yamashiro, L. H., Chen, K. J., Mukaida, N., Kramnik, I., Darwin, K. H., & Vance, R. E. (2019). Type I interferon-driven susceptibility to Mycobacterium tuberculosis is mediated by IL-1Ra. *Nat Microbiol*, 4(12), 2128-2135. doi:10.1038/s41564-019-0578-3
- Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H., & Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol*, 9(5), 1087-1098. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x
- Kalsum, S., Braian, C., Koeken, V., Raffetseder, J., Lindroth, M., van Crevel, R., & Lerm, M. (2017). The Cording Phenotype of Mycobacterium tuberculosis Induces the Formation of Extracellular Traps in Human Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 278. doi:10.3389/fcimb.2017.00278

- Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R. S., & Bartenschlager, R. (2018). Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov*, *17*(1), 35-56. doi:10.1038/nrd.2017.162
- Ke, Y., Li, W., Wang, Y., Yang, M., Guo, J., Zhan, S., . . . Chen, Z. (2016). Inhibition of TLR4 signaling by Brucella TIR-containing protein TcpB-derived decoy peptides. *Int J Med Microbiol*, *306*(6), 391-400. doi:10.1016/j.ijmm.2016.05.003
- Khan, N., Pahari, S., Vidyarthi, A., Aqdas, M., & Agrewala, J. N. (2016). Stimulation through CD40 and TLR-4 Is an Effective Host Directed Therapy against Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*, *7*, 386. doi:10.3389/fimmu.2016.00386
- Khor, C. C., Chapman, S. J., Vannberg, F. O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E. Y., . . . Hill, A. V. (2007). A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet*, *39*(4), 523-528. doi:10.1038/ng1976
- Khor, C. C., Vannberg, F. O., Chapman, S. J., Guo, H., Wong, S. H., Walley, A. J., . . . Hill, A. V. (2010). CISH and susceptibility to infectious diseases. *N Engl J Med*, *362*(22), 2092-2101. doi:10.1056/NEJMoa0905606
- Kim, K. H., An, D. R., Song, J., Yoon, J. Y., Kim, H. S., Yoon, H. J., . . . Suh, S. W. (2012). Mycobacterium tuberculosis Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(20), 7729-7734. doi:10.1073/pnas.1120251109
- Kinsella, R. L., Zhu, D. X., Harrison, G. A., Mayer Bridwell, A. E., Prusa, J., Chavez, S. M., & Stallings, C. L. (2021). Perspectives and Advances in the Understanding of Tuberculosis. *Annu Rev Pathol*, *16*, 377-408. doi:10.1146/annurev-pathol-042120-032916
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., . . . Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, *374*(6522), 546-549. doi:10.1038/374546a0
- Krug, S., Parveen, S., & Bishai, W. R. (2021). Host-Directed Therapies: Modulating Inflammation to Treat Tuberculosis. *Front Immunol*, *12*, 660916. doi:10.3389/fimmu.2021.660916
- Kumar, R., Singh, P., Kolloli, A., Shi, L., Bushkin, Y., Tyagi, S., & Subbian, S. (2019). Immunometabolism of Phagocytes During Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front Mol Biosci*, *6*, 105. doi:10.3389/fmolb.2019.00105
- Kumar, V. (2020). Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. *Frontiers in Immunology*, *11*. doi:10.3389/fimmu.2020.01722
- Lamont, E. A., Dillon, N. A., & Baughn, A. D. (2020). The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. *Microbiol Mol Biol Rev*, *84*(2). doi:10.1128/mmb.00070-19
- Laval, T., Chaumont, L., & Demangel, C. (2021). Not too fat to fight: The emerging role of macrophage fatty acid metabolism in immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Immunol Rev*, *301*(1), 84-97. doi:10.1111/imr.12952
- Lee, S. W., Chuang, T. Y., Huang, H. H., Liu, C. W., Kao, Y. H., & Wu, L. S. (2016). VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. *J Microbiol Immunol Infect*, *49*(5), 783-787. doi:10.1016/j.jmii.2015.12.008
- Lerner, T. R., Borel, S., Greenwood, D. J., Repnik, U., Russell, M. R., Herbst, S., . . . Gutierrez, M. G. (2017). Mycobacterium tuberculosis replicates within necrotic human macrophages. *J Cell Biol*, *216*(3), 583-594. doi:10.1083/jcb.201603040
- Lin, P. L., Ford, C. B., Coleman, M. T., Myers, A. J., Gawande, R., Ioerger, T., . . . Flynn, J. L. (2014). Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med*, *20*(1), 75-79. doi:10.1038/nm.3412
- Lin, P. L., Rodgers, M., Smith, L., Bigbee, M., Myers, A., Bigbee, C., . . . Flynn, J. L. (2009). Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect Immun*, *77*(10), 4631-4642. doi:10.1128/iai.00592-09
- Lin, W., Mandal, S., Degen, D., Liu, Y., Ebright, Y. W., Li, S., . . . Ebright, R. H. (2017). Structural Basis of Mycobacterium tuberculosis Transcription and Transcription Inhibition. *Mol Cell*, *66*(2), 169-179.e168. doi:10.1016/j.molcel.2017.03.001

- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*, *14*(12), 963-975. doi:10.1038/cmi.2017.88
- Liu, Q., Li, W., Li, D., Feng, Y., & Tao, C. (2014). TIRAP C539T polymorphism contributes to tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Infect Genet Evol*, *27*, 32-39. doi:10.1016/j.meegid.2014.06.025
- Locht, C., Hougardy, J. M., Rouanet, C., Place, S., & Mascart, F. (2006). Heparin-binding hemagglutinin, from an extrapulmonary dissemination factor to a powerful diagnostic and protective antigen against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, *86*(3-4), 303-309. doi:10.1016/j.tube.2006.01.016
- Lugo-Villarino, G., & Neyrolles, O. (2014). Manipulation of the mononuclear phagocyte system by Mycobacterium tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *4*(11), a018549. doi:10.1101/cshperspect.a018549
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., & Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, *198*(3), 513-520. doi:10.1084/jem.20030162
- Lv, J., He, X., Wang, H., Wang, Z., Kelly, G. T., Wang, X., Chen, Y., Wang, T., & Qian, Z. (2017). TLR4-NOX2 axis regulates the phagocytosis and killing of Mycobacterium tuberculosis by macrophages. *BMC pulmonary medicine*, *17*(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0517-0>
- Ly, A., & Liu, J. (2020). Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins. *Int J Mol Sci*, *21*(11). doi:10.3390/ijms21113985
- Machelart, A., Salzano, G., Li, X., Demars, A., Debrie, A. S., Menendez-Miranda, M., . . . Brodin, P. (2019). Intrinsic Antibacterial Activity of Nanoparticles Made of β -Cyclodextrins Potentiates Their Effect as Drug Nanocarriers against Tuberculosis. *ACS Nano*, *13*(4), 3992-4007. doi:10.1021/acsnano.8b07902
- Machelart, A., Song, O. R., Hoffmann, E., & Brodin, P. (2017). Host-directed therapies offer novel opportunities for the fight against tuberculosis. *Drug Discov Today*, *22*(8), 1250-1257. doi:10.1016/j.drudis.2017.05.005
- Mansell, A., Brint, E., Gould, J. A., O'Neill, L. A., & Hertzog, P. J. (2004). Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem*, *279*(36), 37227-37230. doi:10.1074/jbc.C400289200
- Mantegazza, A. R., Zajac, A. L., Twelvetrees, A., Holzbaur, E. L., Amigorena, S., & Marks, M. S. (2014). TLR-dependent phagosome tubulation in dendritic cells promotes phagosome cross-talk to optimize MHC-II antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(43), 15508-15513. doi:10.1073/pnas.1412998111
- Manzanillo, P. S., Ayres, J. S., Watson, R. O., Collins, A. C., Souza, G., Rae, C. S., . . . Cox, J. S. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*, *501*(7468), 512-516. doi:10.1038/nature12566
- Martin, C. J., Booty, M. G., Rosebrock, T. R., Nunes-Alves, C., Desjardins, D. M., Keren, I., . . . Behar, S. M. (2012). Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe*, *12*(3), 289-300. doi:10.1016/j.chom.2012.06.010
- Martineau, A. R., Leandro, A. C., Anderson, S. T., Newton, S. M., Wilkinson, K. A., Nicol, M. P., . . . Wilkinson, R. J. (2010). Association between Gc genotype and susceptibility to TB is dependent on vitamin D status. *Eur Respir J*, *35*(5), 1106-1112. doi:10.1183/09031936.00087009
- Martinez, N., Ketheesan, N., West, K., Vallerskog, T., & Kornfeld, H. (2016). Impaired Recognition of Mycobacterium tuberculosis by Alveolar Macrophages From Diabetic Mice. *J Infect Dis*, *214*(11), 1629-1637. doi:10.1093/infdis/jiw436
- Mason, C. M., Dobard, E., Zhang, P., & Nelson, S. (2004). Alcohol exacerbates murine pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*, *72*(5), 2556-2563. doi:10.1128/iai.72.5.2556-2563.2004

- McClellan, C. M., & Tobin, D. M. (2016). Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathog Dis*, *74*(7). doi:10.1093/femspd/ftw068
- Menon, D., Singh, K., Pinto, S. M., Nandy, A., Jaisinghani, N., Kutum, R., . . . Gandotra, S. (2019). Quantitative Lipid Droplet Proteomics Reveals Mycobacterium tuberculosis Induced Alterations in Macrophage Response to Infection. *ACS Infect Dis*, *5*(4), 559-569. doi:10.1021/acscinfecdis.8b00301
- Miao, R., Li, J., Sun, Z., Xu, F., & Shen, H. (2011). Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis (Edinb)*, *91*(3), 268-272. doi:10.1016/j.tube.2011.01.006
- Mikusová, K., Slayden, R. A., Besra, G. S., & Brennan, P. J. (1995). Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*, *39*(11), 2484-2489. doi:10.1128/aac.39.11.2484
- Miller, J. L., Velmurugan, K., Cowan, M. J., & Briken, V. (2010). The type I NADH dehydrogenase of Mycobacterium tuberculosis counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog*, *6*(4), e1000864. doi:10.1371/journal.ppat.1000864
- Mishra, A., Akhtar, S., Jagannath, C., & Khan, A. (2017). Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Mol Immunol*, *87*, 240-248. doi:10.1016/j.molimm.2017.05.001
- Mishra, B. B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacoheh, N., Griffiths, G., Moita, L. F., & Anes, E. (2010). Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*, *12*(8), 1046-1063. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01450.x
- Mittal, E., Skowyra, M. L., Uwase, G., Tinaztepe, E., Mehra, A., Köster, S., . . . Philips, J. A. (2018). Mycobacterium tuberculosis Type VII Secretion System Effectors Differentially Impact the ESCRT Endomembrane Damage Response. *mBio*, *9*(6). doi:10.1128/mBio.01765-18
- Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A., & Reljic, R. (2009). TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflamm Allergy Drug Targets*, *8*(1), 53-62. doi:10.2174/187152809787582543
- Muñoz-Elías, E. J., Timm, J., Botha, T., Chan, W. T., Gomez, J. E., & McKinney, J. D. (2005). Replication dynamics of Mycobacterium tuberculosis in chronically infected mice. *Infect Immun*, *73*(1), 546-551. doi:10.1128/iai.73.1.546-551.2005
- Nair, S., Huynh, J. P., Lampropoulou, V., Loginicheva, E., Esaulova, E., Gounder, A. P., . . . Diamond, M. S. (2018). Irg1 expression in myeloid cells prevents immunopathology during M. tuberculosis infection. *J Exp Med*, *215*(4), 1035-1045. doi:10.1084/jem.20180118
- Nejentsev, S., Thye, T., Szeszko, J. S., Stevens, H., Balabanova, Y., Chinbuah, A. M., . . . Horstmann, R. D. (2008). Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations. *Nat Genet*, *40*(3), 261-262; author reply 262-263. doi:10.1038/ng0308-261
- Nemeth, J., Olson, G. S., Rothchild, A. C., Jahn, A. N., Mai, D., Duffy, F. J., . . . Diercks, A. H. (2020). Contained Mycobacterium tuberculosis infection induces concomitant and heterologous protection. *PLoS Pathog*, *16*(7), e1008655. doi:10.1371/journal.ppat.1008655
- Netea, M. G., van der Graaf, C., Van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2004). Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol*, *75*(5), 749-755. doi:10.1189/jlb.1103543
- Neyrolles, O., & Quintana-Murci, L. (2009). Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Med*, *6*(12), e1000199. doi:10.1371/journal.pmed.1000199
- Nhamoyebonde, S., & Leslie, A. (2014). Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, *209* Suppl 3, S100-106. doi:10.1093/infdis/jiu147
- Ní Cheallaigh, C., Sheedy, F. J., Harris, J., Muñoz-Wolf, N., Lee, J., West, K., . . . Keane, J. (2016). A Common Variant in the Adaptor Mal Regulates Interferon Gamma Signaling. *Immunity*, *44*(2), 368-379. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.019

- Noreen, M., & Arshad, M. (2015). Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res*, *62*(2), 234-252. doi:10.1007/s12026-015-8640-6
- Noss, E. H., Pai, R. K., Sellati, T. J., Radolf, J. D., Belisle, J., Golenbock, D. T., . . . Harding, C. V. (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, *167*(2), 910-918. doi:10.4049/jimmunol.167.2.910
- O'Leary, S. M., Coleman, M. M., Chew, W. M., Morrow, C., McLaughlin, A. M., Gleeson, L. E., . . . Keane, J. (2014). Cigarette smoking impairs human pulmonary immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, *190*(12), 1430-1436. doi:10.1164/rccm.201407-1385OC
- O'Neill, L. A., Bryant, C. E., & Doyle, S. L. (2009). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*, *61*(2), 177-197. doi:10.1124/pr.109.001073
- O'Neill, L. A., Dunne, A., Edjeback, M., Gray, P., Jefferies, C., & Wietek, C. (2003). Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, *9*(1), 55-59. doi:10.1179/096805103125001351
- Ogishi, M., Yang, R., Aytakin, C., Langlais, D., Bourgey, M., Khan, T., . . . Casanova, J.-L. (2021). Inherited PD-1 deficiency underlies tuberculosis and autoimmunity in a child. *Nature Medicine*, *27*(9), 1646-1654. doi:10.1038/s41591-021-01388-5
- Orme, I. M. (2003). The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, *83*(1-3), 112-115. doi:10.1016/s1472-9792(02)00069-0
- Ouimet, M., Koster, S., Sakowski, E., Ramkhalawon, B., van Solingen, C., Oldebeken, S., . . . Moore, K. J. (2016). Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. *Nat Immunol*, *17*(6), 677-686. doi:10.1038/ni.3434
- Pagán, A. J., & Ramakrishnan, L. (2014). Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *5*(9). doi:10.1101/cshperspect.a018499
- Pajuelo, D., Gonzalez-Juarbe, N., Tak, U., Sun, J., Orihuela, C. J., & Niederweis, M. (2018). NAD(+) Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Rep*, *24*(2), 429-440. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.042
- Pan, H., Yan, B. S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., . . . Kramnik, I. (2005). Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature*, *434*(7034), 767-772. doi:10.1038/nature03419
- Pandey, A. K., Yang, Y., Jiang, Z., Fortune, S. M., Coulombe, F., Behr, M. A., . . . Kelliher, M. A. (2009). NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, *5*(7), e1000500. doi:10.1371/journal.ppat.1000500
- Patel, B., Gupta, N., & Ahsan, F. (2015). Particle engineering to enhance or lessen particle uptake by alveolar macrophages and to influence the therapeutic outcome. *Eur J Pharm Biopharm*, *89*, 163-174. doi:10.1016/j.ejpb.2014.12.001
- Pauwels, A. M., Trost, M., Beyaert, R., & Hoffmann, E. (2017). Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. *Trends Immunol*, *38*(6), 407-422. doi:10.1016/j.it.2017.03.006
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol*, *7*, 353-384. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132458
- Pisu, D., Huang, L., Grenier, J. K., & Russell, D. G. (2020). Dual RNA-Seq of Mtb-Infected Macrophages In Vivo Reveals Ontologically Distinct Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep*, *30*(2), 335-350.e334. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.033
- Plinke, C., Cox, H. S., Zarkua, N., Karimovich, H. A., Braker, K., Diel, R., . . . Niemann, S. (2010). embCAB sequence variation among ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates without embB306 mutation. *J Antimicrob Chemother*, *65*(7), 1359-1367. doi:10.1093/jac/dkq120
- Porcelli, S. A., & Jacobs, W. R., Jr. (2008). Tuberculosis: unsealing the apoptotic envelope. *Nat Immunol*, *9*(10), 1101-1102. doi:10.1038/ni1008-1101

- Queval, C. J., Song, O. R., Carralot, J. P., Saliou, J. M., Bongiovanni, A., Deloison, G., . . . Brodin, P. (2017). Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep*, *20*(13), 3188-3198. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.101
- Queval, C. J., Song, O. R., Deboosere, N., Delorme, V., Debie, A. S., Iantomasi, R., . . . Brodin, P. (2016). STAT3 Represses Nitric Oxide Synthesis in Human Macrophages upon Mycobacterium tuberculosis Infection. *Sci Rep*, *6*, 29297. doi:10.1038/srep29297
- Queval, C. J., Song, O. R., Delorme, V., Iantomasi, R., Veyron-Churlet, R., Deboosere, N., . . . Brodin, P. (2014). A microscopic phenotypic assay for the quantification of intracellular mycobacteria adapted for high-throughput/high-content screening. *J Vis Exp*(83), e51114. doi:10.3791/51114
- Rajpoot, S., Wary, K. K., Ibbott, R., Liu, D., Saqib, U., Thurston, T. L. M., & Baig, M. S. (2021). TIRAP in the Mechanism of Inflammation. *Front Immunol*, *12*, 697588. doi:10.3389/fimmu.2021.697588
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*, *12*(5), 352-366. doi:10.1038/nri3211
- Raposo-García, S., Guerra-Laso, J. M., García-García, S., Juan-García, J., López-Fidalgo, E., Díez-Tascón, C., . . . Rivero-Lezcano, O. M. (2017). Immunological response to Mycobacterium tuberculosis infection in blood from type 2 diabetes patients. *Immunol Lett*, *186*, 41-45. doi:10.1016/j.imlet.2017.03.017
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, *15*(1), 261-267. doi:0092-8674(78)90101-0 [pii]
- Raze, D., Verwaerde, C., Deloison, G., Werkmeister, E., Coupin, B., Loyens, M., . . . Loch, C. (2018). Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA) Is Involved in Intracytosolic Lipid Inclusions Formation in Mycobacteria. *Front Microbiol*, *9*, 2258. doi:10.3389/fmicb.2018.02258
- Riches, D. W. H., & Martin, T. R. (2018). Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. *Methods Mol Biol*, *1809*, 17-30. doi:10.1007/978-1-4939-8570-8_2
- Roberts, E. A., Chua, J., Kyei, G. B., & Deretic, V. (2006). Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. *J Cell Biol*, *174*(7), 923-929. doi:10.1083/jcb.200603026
- Rodrigues, L. C., Mangtani, P., & Abubakar, I. (2011). How does the level of BCG vaccine protection against tuberculosis fall over time? *Bmj*, *343*, d5974. doi:10.1136/bmj.d5974
- Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M., . . . Takeda, K. (2012). Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int Immunol*, *24*(10), 637-644. doi:10.1093/intimm/dxs062
- Saini, N. K., Baena, A., Ng, T. W., Venkataswamy, M. M., Kennedy, S. C., Kunnath-Velayudhan, S., . . . Porcelli, S. A. (2016). Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. *Nat Microbiol*, *1*(9), 16133. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.133
- Sakaguchi, M., Murata, H., Yamamoto, K., Ono, T., Sakaguchi, Y., Motoyama, A., . . . Huh, N. H. (2011). TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One*, *6*(8), e23132. doi:10.1371/journal.pone.0023132
- Sakula, A. (1982). Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*, *37*(4), 246-251. doi:10.1136/thx.37.4.246
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Degos, C., Terwagne, M., Von Bargen, K., Lepidi, H., . . . Gorvel, J. P. (2013). BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol*, *3*, 28. doi:10.3389/fcimb.2013.00028
- Salgame, P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol*, *17*(4), 374-380. doi:10.1016/j.coi.2005.06.006
- Salie, M., Daya, M., Lucas, L. A., Warren, R. M., van der Spuy, G. D., van Helden, P. D., . . . Möller, M. (2015). Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infect Genet Evol*, *34*, 221-229. doi:10.1016/j.meegid.2015.07.004

- Sánchez, D., Lefebvre, C., Rioux, J., García, L. F., & Barrera, L. F. (2012). Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population. *Int J Immunogenet*, *39*(3), 216-223. doi:10.1111/j.1744-313X.2011.01077.x
- Saranathan, R., Sathyamurthi, P., Thiruvengadam, K., Murugesan, S., Shivakumar, S., Gomathi, N. S., . . . Hanna, L. E. (2020). MAL adaptor (TIRAP) S180L polymorphism and severity of disease among tuberculosis patients. *Infect Genet Evol*, *77*, 104093. doi:10.1016/j.meegid.2019.104093
- Sayes, F., Blanc, C., Ates, L. S., Deboosere, N., Orgeur, M., Le Chevalier, F., . . . Majlessi, L. (2018). Multiplexed Quantitation of Intraphagocyte *Mycobacterium tuberculosis* Secreted Protein Effectors. *Cell Reports*, *23*(4), 1072-1084. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.125
- Scanga, C. A., Bafica, A., Feng, C. G., Cheever, A. W., Hieny, S., & Sher, A. (2004). MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun*, *72*(4), 2400-2404. doi:10.1128/iai.72.4.2400-2404.2004
- Schaaf, K., Smith, S. R., Duverger, A., Wagner, F., Wolschendorf, F., Westfall, A. O., . . . Sun, J. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* exploits the PPM1A signaling pathway to block host macrophage apoptosis. *Sci Rep*, *7*, 42101. doi:10.1038/srep42101
- Scheenstra, M. R., van Harten, R. M., Veldhuizen, E. J. A., Haagsman, H. P., & Coorens, M. (2020). Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation. *Front Immunol*, *11*, 1137. doi:10.3389/fimmu.2020.01137
- Selvaraj, P., Harishankar, M., Singh, B., Jawahar, M. S., & Banurekha, V. V. (2010). Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis (Edinb)*, *90*(5), 306-310. doi:10.1016/j.tube.2010.08.001
- Seto, S., Tsujimura, K., & Koide, Y. (2012). Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell Microbiol*, *14*(5), 710-727. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01754.x
- Sharma, N., Shariq, M., Quadir, N., Singh, J., Sheikh, J. A., Hasnain, S. E., & Ehtesham, N. Z. (2021). *Mycobacterium tuberculosis* Protein PE6 (Rv0335c), a Novel TLR4 Agonist, Evokes an Inflammatory Response and Modulates the Cell Death Pathways in Macrophages to Enhance Intracellular Survival. *Frontiers in Immunology*, *12*(2680). doi:10.3389/fimmu.2021.696491
- Shin, D. M., Jeon, B. Y., Lee, H. M., Jin, H. S., Yuk, J. M., Song, C. H., . . . Jo, E. K. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog*, *6*(12), e1001230. doi:10.1371/journal.ppat.1001230
- Shui, W., Petzold, C. J., Redding, A., Liu, J., Pitcher, A., Sheu, L., . . . Bertozzi, C. R. (2011). Organelle membrane proteomics reveals differential influence of mycobacterial lipoglycans on macrophage phagosome maturation and autophagosome accumulation. *J Proteome Res*, *10*(1), 339-348. doi:10.1021/pr100688h
- Shukla, D., Chandel, H. S., Srivastava, S., Chauhan, P., Pandey, S. P., Patidar, A., . . . Saha, B. (2018). TLR11 or TLR12 silencing reduces *Leishmania major* infection. *Cytokine*, *104*, 110-113. doi:10.1016/j.cyto.2017.10.005
- Simeone, R., Sayes, F., Lawarée, E., & Brosch, R. (2021). Breaching the phagosome, the case of the tuberculosis agent. *Cell Microbiol*, *23*(7), e13344. doi:10.1111/cmi.13344
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M. I., Brodin, P., Brosch, R., & Majlessi, L. (2015). Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog*, *11*(2), e1004650. doi:10.1371/journal.ppat.1004650
- Skerry, C., Harper, J., Klunk, M., Bishai, W. R., & Jain, S. K. (2012). Adjunctive TNF inhibition with standard treatment enhances bacterial clearance in a murine model of necrotic TB granulomas. *PLoS One*, *7*(6), e39680. doi:10.1371/journal.pone.0039680
- Soldati, T., & Neyrolles, O. (2012). *Mycobacteria* and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic*, *13*(8), 1042-1052. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01358.x

- Song, O. R., Deboosere, N., Delorme, V., Queval, C. J., Deloison, G., Werkmeister, E., . . . Brodin, P. (2017). Phenotypic assays for Mycobacterium tuberculosis infection. *Cytometry A*, *91*(10), 983-994. doi:10.1002/cyto.a.23129
- Song, O. R., Queval, C. J., Iantomasi, R., Delorme, V., Marion, S., Veyron-Churlet, R., . . . Brodin, P. (2018). ArfGAP1 restricts Mycobacterium tuberculosis entry by controlling the actin cytoskeleton. *EMBO Rep*, *19*(1), 29-42. doi:10.15252/embr.201744371
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K. E., Pan, X., Kreiswirth, B. N., Moghazeh, S. L., Jacobs, W. R., Jr., . . . Musser, J. M. (1997). Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, *41*(8), 1677-1681. doi:10.1128/aac.41.8.1677
- Srivastava, M., & Baig, M. S. (2018). NOS1 mediates AP1 nuclear translocation and inflammatory response. *Biomed Pharmacother*, *102*, 839-847. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.069
- Srivastava, M., Saqib, U., Banerjee, S., Wary, K., Kizil, B., Muthu, K., & Baig, M. S. (2019). Inhibition of the TIRAP-c-Jun interaction as a therapeutic strategy for AP1-mediated inflammatory responses. *Int Immunopharmacol*, *71*, 188-197. doi:10.1016/j.intimp.2019.03.031
- Srivastava, S., & Ernst, J. D. (2014). Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. *Cell Host Microbe*, *15*(6), 741-752. doi:10.1016/j.chom.2014.05.007
- Stamm, C. E., Collins, A. C., & Shiloh, M. U. (2015). Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunol Rev*, *264*(1), 204-219. doi:10.1111/imr.12263
- Stanley, E. R., & Heard, P. M. (1977). Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem*, *252*(12), 4305-4312.
- Stanley, S. A., Barczak, A. K., Silvis, M. R., Luo, S. S., Sogi, K., Vokes, M., . . . Hung, D. T. (2014). Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular Mycobacterium tuberculosis growth. *PLoS Pathog*, *10*(2), e1003946. doi:10.1371/journal.ppat.1003946
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., . . . Russell, D. G. (1994). Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, *263*(5147), 678-681. doi:10.1126/science.8303277
- Su, W. L., Perng, W. C., Huang, C. H., Yang, C. Y., Wu, C. P., & Chen, J. H. (2010). Association of reduced tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-1beta (IL-1beta) but increased IL-10 expression with improved chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, *17*(2), 223-231. doi:10.1128/cvi.00381-09
- Subbian, S., Tsenova, L., Kim, M. J., Wainwright, H. C., Visser, A., Bandyopadhyay, N., . . . Kaplan, G. (2015). Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study. *PLoS One*, *10*(7), e0132249. doi:10.1371/journal.pone.0132249
- Sun, J., Singh, V., Lau, A., Stokes, R. W., Obregón-Henao, A., Orme, I. M., . . . Hmama, Z. (2013). Mycobacterium tuberculosis nucleoside diphosphate kinase inactivates small GTPases leading to evasion of innate immunity. *PLoS Pathog*, *9*(7), e1003499. doi:10.1371/journal.ppat.1003499
- Takeda, K., & Akira, S. (2004a). Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*, *34*(2), 73-82. doi:10.1016/j.jdermsci.2003.10.002
- Takeda, K., & Akira, S. (2004b). TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, *16*(1), 3-9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
- Tiberi, S., du Plessis, N., Walzl, G., Vjecha, M. J., Rao, M., Ntoumi, F., Mfinanga, S., Kapata, N., Mwaba, P., McHugh, T. D., Ippolito, G., Migliori, G. B., Maeurer, M. J., & Zumla, A. (2018). Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet. Infectious diseases*, *18*(7), e183-e198. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30110-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30110-5)
- Tripathi, D., Welch, E., Cheekatla, S. S., Radhakrishnan, R. K., Venkatasubramanian, S., Paidipally, P., . . . Vankayalapati, R. (2018). Alcohol enhances type 1 interferon- α production and mortality in

- young mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, 14(8), e1007174. doi:10.1371/journal.ppat.1007174
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26(2), 171-176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6970727>
- Tufariello, J. M., Chapman, J. R., Kerantzas, C. A., Wong, K. W., Vilchèze, C., Jones, C. M., . . . Jacobs, W. R., Jr. (2016). Separable roles for Mycobacterium tuberculosis ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(3), E348-357. doi:10.1073/pnas.1523321113
- van de Vosse, E., Hoeve, M. A., & Ottenhoff, T. H. (2004). Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*, 4(12), 739-749. doi:10.1016/s1473-3099(04)01203-4
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, 59, 391-412. doi:10.1016/j.intimp.2018.03.002
- Vilchèze, C., & Jacobs, W. R., Jr. (2014). Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr*, 2(4), Mgm2-0014-2013. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013
- Vrieling, F., Wilson, L., Rensen, P. C. N., Walzl, G., Ottenhoff, T. H. M., & Joosten, S. A. (2019). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) supports Mycobacterium tuberculosis survival in macrophages by inducing lysosomal dysfunction. *PLoS Pathog*, 15(4), e1007724. doi:10.1371/journal.ppat.1007724
- Wallis, R. S., Kyambadde, P., Johnson, J. L., Horter, L., Kittle, R., Pohle, M., . . . Okwera, A. (2004). A study of the safety, immunology, virology, and microbiology of adjunctive etanercept in HIV-1-associated tuberculosis. *Aids*, 18(2), 257-264. doi:10.1097/00002030-200401230-00015
- Wallis, R. S., van Vuuren, C., & Potgieter, S. (2009). Adalimumab treatment of life-threatening tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 48(10), 1429-1432. doi:10.1086/598504
- Wang, Q., Boshoff, H. I. M., Harrison, J. R., Ray, P. C., Green, S. R., Wyatt, P. G., & Barry, C. E., 3rd. (2020). PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 367(6482), 1147-1151. doi:10.1126/science.aav5912
- Wassermann, R., Gulen, M. F., Sala, C., Perin, S. G., Lou, Y., Rybniker, J., . . . Ablasser, A. (2015). Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host Microbe*, 17(6), 799-810. doi:10.1016/j.chom.2015.05.003
- Watson, R. O., Bell, S. L., MacDuff, D. A., Kimmey, J. M., Diner, E. J., Olivas, J., . . . Cox, J. S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe*, 17(6), 811-819. doi:10.1016/j.chom.2015.05.004
- Watson, R. O., Manzanillo, P. S., & Cox, J. S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4), 803-815. doi:10.1016/j.cell.2012.06.040
- Welin, A., Eklund, D., Stendahl, O., & Lerm, M. (2011). Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing M. tuberculosis undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis. *PLoS One*, 6(5), e20302. doi:10.1371/journal.pone.0020302
- Welsh, K. J., Risin, S. A., Actor, J. K., & Hunter, R. L. (2011). Immunopathology of postprimary tuberculosis: increased T-regulatory cells and DEC-205-positive foamy macrophages in cavitory lesions. *Clin Dev Immunol*, 2011, 307631. doi:10.1155/2011/307631
- WHO. (2021). *Global Tuberculosis Report 2021*. Retrieved from
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., . . . Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*, 185(2), 317-328. doi:10.1084/jem.185.2.317
- Wong, K. W., & Jacobs, W. R., Jr. (2011). Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol*, 13(9), 1371-1384. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01625.x

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., . . . Akira, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, *420*(6913), 324-329. doi:10.1038/nature01182
- Yao, Y., Jeyanathan, M., Haddadi, S., Barra, N. G., Vaseghi-Shanjani, M., Damjanovic, D., . . . Xing, Z. (2018). Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*, *175*(6), 1634-1650.e1617. doi:10.1016/j.cell.2018.09.042
- Yeremeev, V., Linge, I., Kondratieva, T., & Apt, A. (2015). Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *Tuberculosis (Edinb)*, *95*(4), 447-451. doi:10.1016/j.tube.2015.03.007
- Yoshimura, A., Ito, M., Chikuma, S., Akanuma, T., & Nakatsukasa, H. (2018). Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *10*(7). doi:10.1101/cshperspect.a028571
- Young, C., Walzl, G., & Du Plessis, N. (2020). Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, *13*(2), 190-204. doi:10.1038/s41385-019-0226-5
- Zannetti, C., Parroche, P., Panaye, M., Roblot, G., Gruffat, H., Manet, E., . . . Hasan, U. A. (2014). TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. *J Immunol*, *193*(7), 3398-3408. doi:10.4049/jimmunol.1400249
- Zhang, Y., Jiang, T., Yang, X., Xue, Y., Wang, C., Liu, J., . . . Li, J. C. (2013). Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, *8*(5), e63357. doi:10.1371/journal.pone.0063357
- Zhang, Y. X., Xue, Y., Liu, J. Y., Zhao, M. Y., Li, F. J., Zhou, J. M., . . . Li, J. C. (2011). Association of TIRAP (MAL) gene polymorphisms with susceptibility to tuberculosis in a Chinese population. *Genet Mol Res*, *10*(1), 7-15. doi:10.4238/vol10-1gmr980
- Zhao, L. L., Sun, Q., Liu, H. C., Wu, X. C., Xiao, T. Y., Zhao, X. Q., . . . Wan, K. L. (2015). Analysis of embCAB mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(4), 2045-2050. doi:10.1128/aac.04933-14
- Zhao, X., Khan, N., Gan, H., Tzelepis, F., Nishimura, T., Park, S. Y., . . . Remold, H. G. (2017). Bcl-x(L) mediates RIPK3-dependent necrosis in M. tuberculosis-infected macrophages. *Mucosal Immunol*, *10*(6), 1553-1568. doi:10.1038/mi.2017.12
- Zyzak, J., Mitkiewicz, M., Leszczyńska, E., Reniewicz, P., Moynagh, P. N., & Siednienko, J. (2020). HSV-1/TLR9-Mediated IFN β and TNF α Induction Is Mal-Dependent in Macrophages. *J Innate Immun*, *12*(5), 387-398. doi:10.1159/000504542

ANNEXE

High-content analysis monitoring intracellular trafficking and replication of *Mycobacterium tuberculosis* inside host cells

Nathalie Deboosere^{1*□}, **Imène Belhaouane**^{1*}, Arnaud Machelart¹, Eik Hoffmann¹, Alexandre Vandeputte¹, Priscille Brodin^{1□}

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille Cedex, France.

* Nathalie Deboosere and Imène Belhaouane contributed equally.

□ For correspondence: priscille.brodin@inserm.fr, nathalie.deboosere@pasteur-lille.fr

Methods in molecular biology

2021; 2314:649-702

Résumé

Mycobacterium tuberculosis est capable de coloniser, de persister et de se répliquer massivement dans les cellules hôtes, comme les cellules phagocytaires et les cellules épithéliales. Différentes étapes du trafic intracellulaire de la bactérie sont essentielles au développement de la pathogenèse de la tuberculose. Les mécanismes détaillés du trafic intracellulaire du bacille ne sont pas entièrement compris et nécessitent des investigations supplémentaires. Accroître nos connaissances sur ce processus aidera à développer des outils thérapeutiques qui réduiront l'incidence de la tuberculose. *M. tuberculosis* peut être génétiquement modifiée et exprimer des protéines fluorescentes. Ainsi, la distribution intracellulaire des bactéries exprimant ces marqueurs peut être facilement suivie à l'aide de la microscopie confocale. Les progrès des techniques d'imagerie et de l'analyse d'images permettent la quantification rapide d'objets biologiques dans des environnements complexes. Dans ce chapitre, nous avons détaillé les méthodes d'imagerie à haut contenu / haut débit pour suivre le bacille dans les différentes étapes de son trafic dans la cellule hôte.

High-content analysis monitoring intracellular trafficking and replication of *Mycobacterium tuberculosis* inside host cells.

Nathalie Deboosere^{1*}□, Imène Belhaouane^{1*}, Arnaud Machelart¹, Eik Hoffmann¹, Alexandre Vandeputte¹, Priscille Brodin¹□

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille Cedex, France.

* Nathalie Deboosere and Imène Belhaouane contributed equally.

□ For correspondence: priscille.brodin@inserm.fr, nathalie.deboosere@pasteur-lille.fr

Methods Mol Biol. 2021; 2314:649-702. doi: 10.1007/978-1-0716-1460-0_29.

Running head: High-content analysis of host-pathogen interactions

Abstract

Mycobacterium tuberculosis is able to colonize, persist and massively replicate in host cells, such as phagocytes and epithelial cells. The intracellular stage of the bacteria is critical to the development of tuberculosis pathogenesis. The detailed mechanisms of intracellular trafficking of the bacillus are not fully understood and require further investigations. Therefore, increasing the knowledge of this process will help to develop therapeutic tools that will lower the burden of tuberculosis. *M. tuberculosis* is genetically tractable and tolerates the expression of heterologous fluorescent proteins. Thus, the intracellular distribution of the bacteria expressing fluorescent tracers can be easily defined using confocal microscopy. Advances in imaging techniques and images-based analysis allow the rapid quantification of biological objects in complex environments. In this chapter, we detailed high content / high-throughput imaging methods to track the bacillus within host cell settings.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis, High-content/High-throughput screening, drug discovery, siRNA library, phenotypic assays, automated confocal microscopy, image-based analysis

1. Introduction

There is a strong interplay between *M. tuberculosis* and the host cell at various levels, including uptake, intracellular trafficking and metabolic reprogramming (Soldati & Neyrolles, 2012). Once internalized, mycobacteria prevent and control the acidification of the *M. tuberculosis*-containing vacuole (pH at around 6.3–6.5), thereby inducing an intra-phagosomal environment favouring its survival (Christophe et al., 2009). These organelles were long considered sealed, but it was recently shown that the bacilli induce vacuolar rupture, thereby allowing direct interactions of bacterial components with host cytosolic proteins (Cambier, Falkow, & Ramakrishnan, 2014; Simeone et al., 2015). Thus, *M. tuberculosis* blocks innate immune defense of the host to establish its intracellular replicative niche. However, the host machinery and bacterial effectors that control the spatio-temporal vacuolar maturation and intracellular survival are not fully characterized and need further investigation (Philips & Ernst, 2012).

With the alarming emergence of multi-drug resistant strains, it has become a race against time to discover new anti-tuberculosis drugs. Antibacterial compounds identified during the last decades were mainly revealed by whole cell phenotypic screens. To study mycobacterial survival within host cells, *in vitro* models usually rely on the enumeration of colony forming units (CFU), which is labor-intensive and time-consuming. Moreover, these assays do not take into account individual host cell behavior from the sample. In this context, the identification of small molecule inhibitors, siRNA, or molecular genetic interventions interfering with the pathological cycle of the bacteria would help to elaborate new therapeutic strategies.

Fluorescence microscopy-based approaches and user-friendly interfaces of image analysis provide the possibility to visualize and quantify biological events at different time points post-infection, making them particularly well-suited for host-pathogen interaction studies (C. Conrad et al., 2011). In this chapter, taking into account that dynamics of *M. tuberculosis* infection can vary depending on the virulence of the strain and the type of host cells, we detailed miniaturized and automated assays allowing the screening of large libraries of compounds, genetic modulators of host pathways and their mutants. Moreover, we also described high-content fluorescent microscopy assays and their analysis to follow successive biological events implicated in the intracellular establishment of *M. tuberculosis*.

1.1. Experiment outline

We provide here multiple fluorescence-based high-content and high-throughput phenotypic assays to monitor the intracellular trafficking and replication of *M. tuberculosis*. These methods allow the quantitative and qualitative investigation of the impact of various genetic or chemical modulators on

M. tuberculosis-infected host cells (**Fig. 1**) (Christophe, Ewann, Jeon, Cechetto, & Brodin, 2010; Christophe et al., 2009; Queval et al., 2017; Queval et al., 2014; Song et al., 2017; Song et al., 2018; S. A. Stanley et al., 2014).

The following protocols describe details of the preparation of various types of professional phagocytes as well as a type II pulmonary epithelial cell model to monitor *M. tuberculosis* interactions with the host at the single cell level, thereby adding a considerable value over the CFU-based methods that fail to take into account individual host cell parameters. The high-throughput screening (HTS) assays presented here are based on the adaptation of cellular imaging to automation, which consist of acquiring automated images from a large set of samples. The acquisition device used in this method is an automated confocal fluorescence microscope recording several fields and different focal planes for each well of optical multi-well plates, such as 96-well, 384-well, etc. Due to the high-resolution capacity that can now be obtained with modern devices, not only can quantification of bacterial survival be recorded, but phenotypic changes of either the bacteria or the host cell can also be observed simultaneously. The methodology presented here was developed to quantify intracellular *M. tuberculosis* by detecting enhanced-GFP (eGFP)-expressing bacteria inside fluorescently labelled phagocytic or non-phagocytic cells.

The first part of this chapter explains the preparation and use of the reagents and the equipment required for the different assays. In the second part, the cultivation methodology of selected cell lines and primary cells are provided, which we use successfully for the investigation of *M. tuberculosis* infection in our laboratory. The robustness and rapid growth of the murine macrophage cell line RAW264.7 make this cell model a good candidate for large-scale screens. However, readers should consider differences in cell surface receptor expression and the different composition of the phagosomal proteome between RAW264.7 and primary macrophages (Guo et al., 2015) , when choosing their experimental model. More specific assays have been efficaciously adapted in our laboratory to other cell lines, such as the human monocyte cell line THP-1, the A549 human type II pneumocyte-like cell line, murine bone-marrow-derived macrophages or dendritic cells, and human peripheral blood-derived macrophages. We also describe protocols for preparing and dispensing all the components involved in the various screening methodologies, which include the distribution of infected cells directly onto library compounds, and distribution and transfection of siRNA for cell infection. We describe how macrophages are prepared and infected at a low multiplicity of infection (MOI) with an eGFP-expressing *M. tuberculosis* strain prior to incubation with compounds. Particular attention is given to the description of bacterial culture methods allowing the growth of non-clumping bacteria and the use of two-week pre-cultures of mycobacteria, as these parameters are crucial for successful and reproducible infections of macrophages.

Then, we describe cell staining procedures to monitor intracellular trafficking and replication of *M. tuberculosis* inside host cells, either for end point studies when kinetic data are not needed, or for dynamic studies requiring image acquisition for at least three days. We propose a population-based, multi-parametric analysis pipeline that can be used to monitor the intracellular fate of *M. tuberculosis* and the dynamics of cellular events involved in host defense, such as phagosomal maturation (acidification) and vacuolar rupture, generation of reactive oxygen species (RO) and nitric oxide (NO) synthesis, a zinc-poisoning system and the investigation of the accumulation of lipid droplets, also known as lipid bodies.

Finally, we outline basic image parameters that can best depict the impact of the intervention (compounds or siRNA) on mycobacterial survival or virulence.

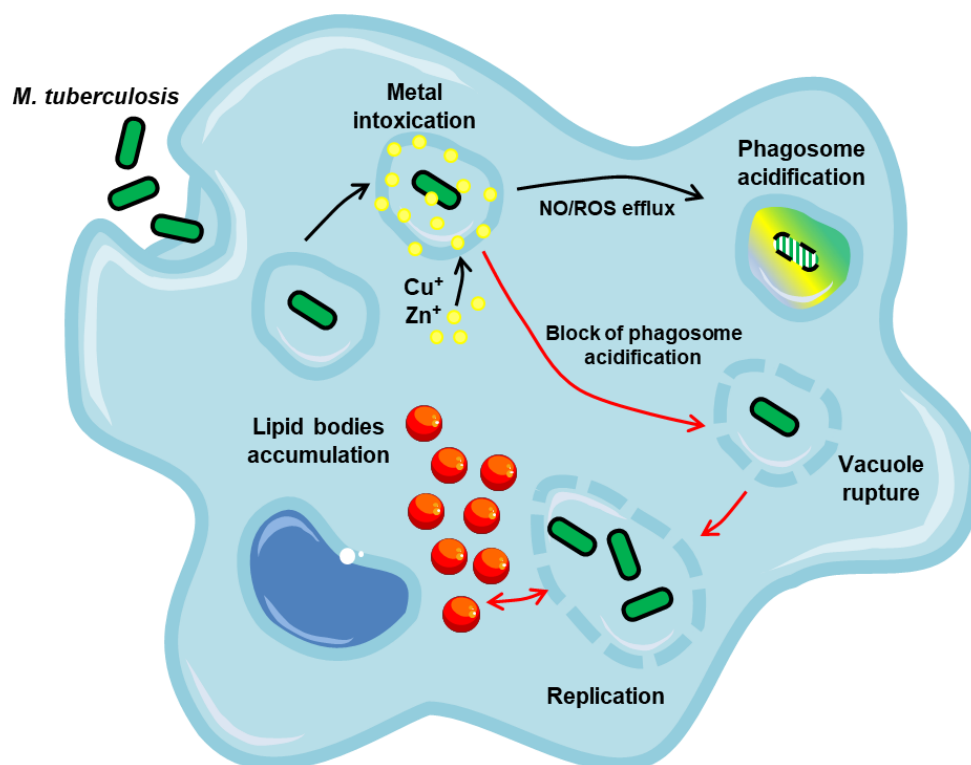


Fig. 1. Summary of the main subcellular events that can be monitored using the proposed pipeline following *M. tuberculosis* infection in macrophage.

2. Materials

2.1. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* strains for cellular infection assay

N.B. Requirement of a biosafety cabinet and a dedicated biosafety laboratory adapted for pathogens of class 3.

1. Bacterial strains (see **Note 1**).
2. 20% w/v Tween 80: Add 20 g of Tween 80 in 100 mL of deionized water. Filter-sterilize through a 0.22 µm cellulose ester membrane.
3. Hygromycin B: 50 mg/mL stock solution (supplied ready to use). Store at 4°C for 24 months from date of manufacture. Add to medium at a final concentration of 50 µg/mL.
4. Kanamycin sulfate: store powder at 4°C. Prepare 25 mg/mL stock in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). Store at -20°C in 500 µL aliquots for up to one year. Add to medium at a final concentration of 25 µg/mL.
5. Middlebrook OADC enrichment (supplied ready to use), containing oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase and NaCl. Store at 4°C in the dark.
6. Complete 7H9 medium (7H9-OADC-Tw): Add 4.7 g of 7H9 powder and 5 mL of glycerol to 900 mL of deionized water; autoclave for 10 min at 121°C. Cool to room temperature and add 100 mL of OADC and 2.5 mL of 20% w/v Tween 80. Add 50 µg/mL hygromycin B or 25 µg/mL kanamycin, as required (see **Note 1**).
7. Middlebrook 7H11 agar: Add 21 g of 7H11 powder and 5 mL of glycerol to 900 mL of deionized water; autoclave for 10 min at 121°C. Cool to 55°C and add 100 mL of OADC. Add 50 µg/mL hygromycin B or 25 µg/mL kanamycin, as required (see **Note 1**).
8. Sterile and ventilated 125 and 250-mL Erlenmeyer.
9. Sterile 50-mL Polypropylene Conical Centrifuge tubes.
10. Sterile 384-well assay plates with lids, compatible with cell culture and laser-scanning confocal microscope (see **Note 2**).
11. Laboratory centrifuge to achieve 3750 × *g*.
12. Humidified 37°C incubator maintaining a 5% CO₂ atmosphere.
13. 37°C shaking incubator.
14. Microplate fluorescence reader, *e.g.* Victor 3 (Perkin Elmer) or any other microplate fluorescence reader, equipped with emission and excitation filters at 488 and 520 nm, respectively.

2.2. RAW264.7 macrophage cell line culture

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. RAW264.7 cells: a murine tumour-derived macrophage cell line (Raschke, Baird, Ralph, & Nakoinz, 1978) available from the American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71) (*see Note 3*).
2. Fetal bovine serum (FBS): heat-inactivated at 56°C for 30 min. Store at -20°C in 50 mL aliquots (*see Note 4*).
3. Complete RPMI medium (RPMI-FBS): add 50 mL of FBS to a 500 mL bottle of RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine. Store at 4°C for up to one month.
4. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), modified without calcium chloride and magnesium chloride, suitable for cell culture.
5. Laboratory centrifuge to achieve from 220 up to 330 × *g*.
6. Sterile 50-mL Polypropylene Conical Centrifuge tubes.
7. Counting chamber.
8. Humidified 37°C incubator maintaining a 5% CO₂ atmosphere.
9. Dimethylsulfoxide (DMSO): store at room temperature.
10. Sterile and ventilated 75 cm² and 175 cm²-tissue culture flasks (75 and 175 cm² flasks).
11. Versene solution (Gibco) formulated as EDTA solution (0.48 mM) in PBS: store at 4°C and use within one month after opening.

2.3. THP1 macrophage cell line culture

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. *See items 2-11* under Subheading 2.2.
2. THP-1 cells: Human monocyte cell line (Tsuchiya et al., 1980) (ATCC, TIB-202) (*see Note 3*).
3. 50 µg/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stock solution: dissolve 1 mg of PMA in 20 mL of DMSO. Store 0.1-1 mL aliquots at -20°C in the dark for up to 6 months.

2.4. A549 human type II pneumocyte-like cell line culture

1. *See items 2-11* under Subheading 2.2.
2. A549 cells: Human type II pneumocyte-like cell line (Giard et al., 1973) (ATCC, CCL-185) (*see Note 3*).

2.5. Production of L929-derived M-CSF conditioned medium for murine primary macrophage differentiation and culture (E. R. Stanley & Heard, 1977)

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. See **items 2-10** under Subheading 2.2.
2. Murine L929 fibroblast cell line (ATCC[®] CCL-1[™]) (see **Note 3**).
3. Trypsin-EDTA (0.05%) solution (Gibco): store at 4°C and use within one month after opening.

2.6. Production of J558-derived GM-CSF conditioned medium for murine primary dendritic cell differentiation and culture (Winzler et al., 1997)

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. See **items 2-10** under Subheading 2.2.
2. Murine J558 cell line (ATCC[®] TIB-6[™]) (see **Note 3**).
3. Complete IMDM medium (IMDM-FBS): add 50 mL of FBS to a 500 mL bottle of IMDM medium supplemented with 50 mM β-mercaptoethanol. Store at 4°C for up to one month.
4. 50 mg/ml Geneticin stock solution (G418 disulfate salt). Store at 4°C for up to one year. For J558 cell maintenance, freshly prepare IMDM-FBS supplemented with 1 mg/ml Geneticin.

2.7. Murine primary monocyte isolation

N.B. Requirement of an animal facility and a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. See **items 2-10** under Subheading 2.2.
2. 6- to 10-weeks old C57BL6 mice (used to collect bone marrow and purify murine primary monocytes).
3. 10× Red blood cell lysis buffer: add 15.6 g of NH₄Cl, 2 g of NaHCO₃ and 74 mg of EDTA in 200 mL of deionized water. Adjust the pH to 7.3 using 12 M HCl and filter-sterilize through a 0.22 μm cellulose ester membrane. Store 5 mL aliquots at -20°C for up to one year. For cell preparation: freshly prepare 1× Red blood cell lysis buffer by diluting 5 mL of the 10× solution with 45 mL of deionized water. Store at 4°C.

2.8. Culture of murine bone marrow-derived macrophages (BMDM)

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. See **items 2-11** under Subheading 2.2.
2. Murine primary monocytes purified from 6- to 10-weeks old C57BL6 mice bone-marrow (see Subheading 2.7, **items 1-3**, and **Note 5**).
3. Murine Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) stock (0.1 mg/mL): resuspend 100 µg of lyophilized M-CSF in 1 mL of sterile deionized water. Store at -20°C in 100 µL aliquots (see **Note 6**). Avoid more than 3 freeze/thaw cycles.

2.9. Culture of murine bone marrow-dendritic cells (BMDC)

N.B. Requirement of a dedicated laboratory with a type 2 biosafety cabinet.

1. See **items 2-8** under Subheading 2.2.
2. Murine hematopoietic stem cells purified from 6- to 10-weeks old C57BL6 mice bone-marrow (see Subheading 2.7 **items 1-3**, and **Note 5**).
3. Murine Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) stock (0.1 mg/mL): resuspend 100 µg of lyophilized GM-CSF in 1 mL of sterile deionized water. Store at -20°C in 100 µL aliquots (see **Note 7**). Avoid more than 3 freeze/thaw cycles.
4. 0.5 M EDTA solution (Sigma-Aldrich): store at 4°C for up to 3 years. For cell preparation, freshly prepare 2 mM EDTA solution from the 0.5 M stock solution with pre-warmed (37°C) DPBS, no calcium, no magnesium.
5. 2 mM EDTA solution. For cell preparation, freshly prepare 2 mM EDTA solution by dissolving 29.2 mg of EDTA in 50 mL of DPBS. Filter-sterilize through a 0.22 µm PTFE membrane and pre-heat up to 37°C.
6. Sterile 78.5 cm (100 x 20 mm) and 500 cm (245 x 245 x 25 mm) square culture petri dishes.

2.10. Human primary cell purification and culture

N.B. Requirement of a type 2 biosafety cabinet in a dedicated biosafety laboratory adapted for pathogens of class 2.

1. See **items 2-9** under Subheading 2.2.
2. Healthy volunteer peripheral blood samples.
3. Ficoll's density gradient solution (density = 1.077). Store at room temperature in the dark.

4. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS): add 5 mL of FBS in a 500 mL DPBS bottle. Store at 4°C for up to one month.
5. 2 mM EDTA in DPBS supplemented with 2% FBS (PBMC-buffer): dissolve 58.4 mg of EDTA in 98 mL of DPBS, no calcium, no magnesium. Filter-sterilize through a 0.22 µm PTFE membrane. Add 2 mL of FBS and sonicate for 30 min. Store at 4°C for up to one week.
6. Human Macrophage-Colony Stimulating Factor (*hM-CSF*) stock (0.1 mg/mL): resuspend 100 µg of lyophilized *hM-CSF* in 1 mL of sterile water. Store 100 µL aliquots at -20°C. Avoid more than 3 freeze/thaw cycles.
7. CD14⁺ beads: magnetic micro-beads conjugated to monoclonal anti-human CD14 antibodies (Miltenyi Biotec).
8. Magnet, column adaptors and columns for magnetic separation (Miltenyi Biotec).
9. Sterile single-use beaker.
10. Sterile 144 cm² (120 x 120 mm) culture petri dishes.
11. Laboratory centrifuge to achieve 330 × *g* for 10 min and 850 × *g* for 20 min (using a rotor with swing-out buckets).

2.11. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for siRNA screening

N.B. Requirement of a sterile environment, such as a biosafety cabinet in a dedicated laboratory.

1. RNase AWAY Spray Bottle (see **Note 8**).
2. Lipofectamine LTX Reagent.
3. Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent.
4. HiPerFect Transfection Reagent.
5. RNase-free DEPC-treated water (see **Note 8**).
6. 5× siRNA buffer (Horizon Discovery). Prepare 1× siRNA buffer by mixing 1 volume of 5× siRNA buffer with 4 volumes of RNase-free water.
7. siRNA solution: dilute 5 nmol lyophilized siRNA in 500 µL DEPC-treated water to reach a final stock concentration of 10 µM. Vortex and keep on ice during 15 min before use. Store stock solutions at -20°C.

8. Scramble siRNA solution: dilute ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool (Horizon Discovery or Dharmacon), for RNAi experiments in human and mouse cells, or siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2 (Horizon Discovery) for human cell screening, with 1× siRNA buffer to reach a final stock concentration of 10 or 20 μM. Store stock solutions at -20°C.
9. Echo (Labcyte) or any other High Precision Automatic Liquid Dispenser able to accurately dispense volumes of 5-50 μL, adapted to your 384-well plates (see **Note 9**).
10. Automatic Plate Washer/Dispenser adapted to your 384-well plates (see **Note 10**).
11. Sterile 384-well assay plates with lids, compatible with cell culture and laser-scanning confocal microscope (see **Note 2**).
12. Breathable sealing tape for microplates (Corning) or any equivalent adhesive breathable sealing film suitable for your 384-well plates.
13. Laboratory centrifuge for tubes and microplates to achieve 220 × g.
14. Sterile 50-mL polystyrene reservoirs.
15. Multichannel 50-μL pipette (16 channels).
16. Humidified 37°C incubator maintaining a 5% CO₂ atmosphere.

2.12. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for compound screening

N.B. Requirement of a sterile environment, such as a biosafety cabinet in a dedicated laboratory.

1. See **items 9-16** under Subheading 2.11.
2. Dimethylsulfoxide (DMSO): store at room temperature.
3. Borosilicate amber glass vials with hermetic polypropylene PVDF or PTFE-coated screw caps (see **Note 11**).
4. Microplate aluminum sealing film (Corning) or any equivalent adhesive aluminum sealing film suitable for your 384-well plates.
5. Sterile and ventilated 125 and 250-mL Erlenmeyer.
6. 37°C shaking incubator.
7. Amikacin disulfate salt: store powder at 4°C. Prepare 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS. Filter-sterilize through a 0.22 μm PTFE membrane and store 100 μL aliquots at -20°C for up to

one year. For experiments, freshly dilute the 50 mg/mL Amikacin solution 1:1000 in RPMI-FBS to obtain a 50 µg/mL Amikacin solution.

8. 5 mM SYTO™ 60 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain solution (Invitrogen) in DMSO: store at -20°C and protect from light. For intracellular mycobacterial replication assay, (i) firstly dilute the 5 mM SYTO 60 solution 1:200 in appropriate complete medium to prepare 25 µM SYTO 60 solution. (ii) Directly add the 25 µM SYTO 60 1:5 into the volume of medium contained in wells of 384-well assay plate to obtain a final concentration of 5 µM SYTO™ 60 per well.

2.13. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for mutant screening

N.B. Requirement of a sterile environment, such as a biosafety cabinet in a dedicated laboratory.

1. See **items 10-16** under Subheading 2.11.
2. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).

2.14. Intracellular Mycobacterial Uptake and Replication assays

N.B. Requirement of a biosafety cabinet in a dedicated laboratory.

1. See **items 11-16** under Subheading 2.11.
2. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).

2.15. Staining of cell nucleus on live cells for dynamic studies

1. See **items 14-15** under Subheading 2.11.
2. 10 mg/mL Hoechst 33342 solution: store at 4°C and protect from light. Freshly dilute the 10 µg/mL Hoechst 33342 solution 1:40 in appropriate complete medium to make a 250 ng/mL Hoechst solution.

2.16. Staining of cell nucleus and plasma membrane on live/fixed cells

1. 10% Neutral buffered formalin solution (containing 4% formaldehyde): store at room temperature and use within one month after opening.
2. 10 mg/mL Hoechst 33342 solution: store at 4°C and protect from light. Freshly dilute the 10 mg/mL Hoechst 33342 solution 1:1000 in appropriate complete medium or formalin solution to make a 10 µg/mL solution.
3. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI): store powder at 4°C and protect from light. Prepare 1 mg/mL DAPI solution by mixing 10 mg of DAPI in 10 mL of PBS. Filter-sterilize through a

0.22 µm membrane. Store 500 µL aliquots at -20°C. For assay, freshly dilute the 1 mg/mL DAPI solution 1:1000 in DPBS or 10% formalin solution to make a 1 µg/mL working solution.

4. 5 mg/mL CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain (Life Technologies). Store at -20°C and protect from light. For appropriate assay, freshly dilute 5 mg/mL CellMask Plasma Membrane 1:1000 in RPMI-FBS to obtain 5 µg/mL CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain solution.
5. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS): add 5 mL of FBS in a 500 mL DPBS bottle. Store at 4°C for up to one month

2.17. Staining of cell nucleus, cytoplasm and/or F-Actin on fixed and permeabilized cells

1. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).
2. 0.1% w/v Triton X-100 solution: add 0.1 g Triton X-100 to 100 mL of PBS. Solubilize by agitation at 37°C and filter-sterilize through a 0.22 µm polyethersulfone membrane. Store at 4°C for several months.
3. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, item 2).
4. HCS CellMask™ Blue Stain (Invitrogen). Reconstitute HCS CellMask™ Stain in 25 µL DMSO (supplied) to make a 10 mg/mL stock solution. Store at -20°C and protect from light. For appropriate assay, freshly dilute the stock solution 1:5000 in DPBS to obtain 2 µg/mL CellMask Blue stain solution.
5. 100 nmoles Alexa Fluor 660 Phalloidin (Life Technologies, 300 Units). Reconstitute Alexa Fluor 660 Phalloidin in 1.5 mL of methanol to obtain an equivalent to approximately 66 µM Alexa Fluor 660 Phalloidin stock solution. Store at -20°C and protect from light. For appropriate assay, freshly dilute Alexa Fluor 660 Phalloidin stock solution 1:40 in DPBS to obtain 1.65 µM working solution.
6. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.18. Phagosomal acidification assay using LysoTracker reagent

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. Heat-killed bacteria. Heat 1 ml of the bacterial suspension corresponding to the tested MOI, used for infection, at 95 °C for 30 min.
3. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).

4. 1 mM LysoTracker™ Green DND-26 and Red DND-99 dyes (Life Technologies) in DMSO: store at -20°C and protect from light. For phagosomal acidification assay, freshly dilute the 1 mM LysoTracker dye 1:1000 in appropriate complete medium to obtain 1 µM LysoTracker solution (see **Note 12**).
7. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).
5. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, **item 2**).
6. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.19. Phagosomal acidification assay using pHrodo reagent

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. Laboratory centrifuge to achieve 3750 × *g*.
3. 100 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.3.
4. 1 mg amine-reactive pHrodo™ Red succinimidyl (NHS) Ester (Life Technologies): resuspend 1 mg of in 1 mL of acetonitrile solvent to obtain a stock solution of approximately 1.5 mM pHrodo Red. Make 50 µL aliquots in 1.5-mL microtubes and dry by use speed vacuum in dark. Store dried aliquots at -20° C. For phagosomal acidification assay (pHrodo assay), (i) freshly prepare 50 mL of 100 mM sodium bicarbonate, pH 8.5. Filter-sterilize through a 0.22 µm cellulose ester membrane. Then (ii) resuspend 50 µL of pHrodo Red in 10 µL of DMSO for a working solution of approximately 7.6 mM pHrodo Red.
5. CO₂-independent Medium (Gibco). For phagosomal acidification assay, freshly adjust 10 mL of CO₂-independent Medium to a pH range from 4 to 10 (with 100% acetic acid or 5 N NaOH).
6. Mixed and temperature-controlled microtube incubator.
7. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, **item 2**).
8. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.20. Phagosomal vacuole rupture assay

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. Bafilomycin (SIGMA): store at -20°C. Prepare 0.1 mg/mL Bafilomycin stock solution (0.16 mM) in DMSO, store 50 µL aliquots at -20°C for up to one year. For phagosomal permeabilization, firstly

prepare a 0.16 μM Bafilomycin solution by diluting the 0.16 mM stock solution 1:1000 in RPMI-FBS. Secondly, dilute the 0.16 μM Bafilomycin solution 1:8 in RPMI-FBS to make a 20 nM Bafilomycin working solution (See **Note 13**).

3. Heat-killed bacteria (see Subheading 2.18, **item 2**).
4. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).
5. 5 mg dried CCF4-AM (Life Technologies): store at -20°C and protect from light. (i) Prepare 1 mM CCF4-AM stock solution (named "Solution A" provided in Loading kit with CCF4-AM) by mixing 5 mg of CCF4-AM in 4.6 mL of DMSO (provided). Store 50 and 100 μL aliquots at -20°C . (ii) Prepare 50 mM Probenecid stock solution in DMSO by suspending 142.68 mg of Probenecid in 10 mL of DMSO. Store 500 μL aliquots at -20°C . For phagosomal vacuole rupture assay, (i) freshly prepare EM buffer, containing 120 mM NaCl_2 , 7 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 , 5 mM glucose and 25 mM Hepes in deionized water. Adjust pH from 5.3 to 7.3 with 5 N NaOH. Filter-sterilize through a 0.22 μm polyethersulfone membrane. Store at room temperature. Then (ii) dilute the 50 mM Probenecid stock solution 1:100 in EM buffer to prepare 500 μM Probenecid solution. Prepare 2.5 μM Probenecid solution in EM buffer by diluting the 500 μM solution 1:200 in EM buffer (EM buffer-2.5 μM Probenecid). And (iii) dilute the 1 mM CCF4-AM stock solution 1:6 in Solution B (provided in Loading kit with CCF4-AM, stored at room temperature and protected from light) and mix well by vortexing. And directly add EM buffer-2.5 μM Probenecid to the previous CCF4-AM mix to obtain a substrate loading solution containing 8 μM CCF4-AM. A volume of 25 μL /well is required.
6. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).
7. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.21. Oxidative stress assays using Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).
3. LPS-EB Ultrapure (InvivoGen): store at -20°C . Prepare 5 mg/mL and 1 mg/mL LPS stock solutions by mixing LPS solution in endotoxin-free water (provided). Store 20 μL aliquots at -20°C .
4. 100 μg recombinant murine IFN γ (ImmunoTools): Reconstitute the lyophilized IFN γ in 1 mL sterile water to obtain a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rm IFN γ stock solution. Store 20 μL aliquots at -80°C .

5. LPS/ IFN γ solution containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IFN γ : Dilute 1 mg/mL LPS stock solution 1:100 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rm IFN γ stock solution 1:50 in RPMI-FBS. And secondly dilute this solution 1:100 in RPMI-FBS to make a working solution containing 100 ng/mL LPS and 20 ng/mL IFN γ , respectively.
6. 100 mM NO inducer (L-Arginine) stock solution in deionized water, 100 μL supplied in ROS-ID NO Detection Kit (ENZO). Store 10 μL aliquots at -20°C . Avoid repeated freezing and thawing. Dilute 1:100 in RPMI-FBS to obtain a 1 mM working solution.
7. 2.5 mM CellROX[®] Deep Red or Green Oxidative Stress Reagent in DMSO (Life Technologies). Store at -20°C and protect from light. For oxidative stress assay, (i) freshly dilute the 2.5 mM CellROX Reagent 1: 500 in RPMI-FBS to obtain 5 μM CellROX Reagent solution. And (ii) prepare 1 \times Wash buffer (provided in the CellROX[®] Oxidative Stress kit) by dilution of 10 \times Wash buffer in deionized water.
8. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).
9. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, **item 2**).
10. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.22. Oxidative stress assays using intracellular nitric oxide (NO) detection assay

1. ROS-ID[®] NO Detection Reagent (Red) in Dimethylformamide (DMF) (ENZO). Store 6 μL aliquots at -20°C and protect from light. Avoid repeated freezing and thawing. For oxidative stress assay, freshly dilute the probe 1:400 by adding 2.5 μL of the reagent per 1ml of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS.
2. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, **item 2**).
3. Lyophilized NO Scavenger (c-PTIO), 400 nmoles supplied in ROS-ID NO Detection Kit (ENZO). Reconstitute in 100 μL of anhydrous 100% Dimethylformamide (DMF) to make a 4 mM stock concentration. Store 10 μL aliquots at -20°C . For oxidative stress assay, dilute the 4 mM stock solution from 1:50 up to 1:200 in RPMI-FBS to obtain the recommended final concentration from 20 up to 80 μM .
4. 5 mM NO Inducer (L-Arginine): dilute the 5 mM stock solution 1:5 in RPMI-FBS to obtain final concentration of 1 mM.

5. Complete RPMI medium without red phenol (RPMI-FBS without red phenol): add 50 mL of FBS to a 500 mL bottle of RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine. Store at 4°C for up to one month.

2.23. Zinc poisoning assay

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).
3. FluoZinTM-3, AM, cell permeant (Invitrogen). (i) Reconstitute 100 µg in high-quality anhydrous DMSO to obtain concentrations of 2 mM. Store 10 µL aliquots at -20°C and protect from light. Avoid repeated freezing and thawing. For zinc poisoning assay, freshly dilute the probe 1:1000 in DPBS to obtain 2 µM FluoZin-3.
4. Indicator salts, 500 µg provided in FluoZinTM-3, AM, cell permeant (Invitrogen). Prepare stock solutions of water-soluble indicator salts by diluting in distilled water to obtain 1-10 mM indicator solutions. Store 50 µL aliquots at -20°C and protect from light. For zinc poisoning assay, freshly dilute the salt 1:100 in pre-warmed (37°C) RPMI-FBS to obtain a final intracellular indicator concentration of 10-100 µM.
5. 1 mg/mL DAPI stock solution (see Subheading 2.16, **item 3**).
6. DPBS, no calcium, no magnesium, supplemented with 1% FBS (DPBS-FBS) (see Subheading 2.16, **item 5**).

2.24. Lipid body accumulation assay

1. See **items 11-15** under Subheading 2.11.
2. 50 mg/mL Amikacin stock solution in PBS (see Subheading 2.12, **item 7**).
3. LPS-EB Ultrapure (InvivoGen) (see Subheading 2.21, **item 3**).
4. 100 µg recombinant murine IFN γ (ImmunoTools) (see Subheading 2.21, **item 4**).
5. LPS/IFN γ solution containing 100 ng/mL LPS and 20 ng/mL IFN γ (see Subheading 2.21, **item 5**).
7. Oleic acid. Prepare 6 mM Oleic acid stock solution. For lipid body accumulation assays in bone marrow dendritic cells (BMDC), prepare a 60 µM Oleic acid solution by diluting the stock solution 1:1000 in RPMI-FBS.
8. 4% formaldehyde solution (see Subheading 2.16, **item 1**).

9. 10 mg/mL Hoechst 33342 stock solution (see Subheading 2.16, **item 2**).
10. HCS LipidTOX™ Far-Red or Green Neutral Lipid Stain solution (Invitrogen) (corresponding to 1000× solution in DMSO). Store at -20°C and protect from light. For lipid body accumulation assay, freshly dilute the 1000× LipidTOX neutral lipid stain 1:2000 in PBS to make a 0.5× solution (see **Note 14**).

2.25. Image acquisition and analysis

1. Cell nuclei and cytoplasm dyes: SYTO 60 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain, Hoechst, DAPI, CellMask Blue Stain, CellMask Deep Red Plasma Membrane stain (see Subheadings 2.12 and 2.15 to 2.17).
2. Organelle labelling: Alexa Fluor 660 Phalloidin Stain, LysoTracker Green Dye, LysoTracker Red Dye, CCF4-AM, LipidTox Green Neutral Lipid Stain, LipidTox Far-Red Neutral Lipid Stain, (see Subheadings 2.17, 2.18, 2.20 and 2.24).
3. Molecules or pH change detection: CellROX® Green Oxidative Stress Reagent, ROS-ID® Red NO Detection Reagent, FluoZin™-3 AM cell permeant, Amine-reactive pHrodo™ Red NHS Ester (see Subheadings 2.19 and 2.21 to 2.23).
4. Automated laser-scanning confocal microscope: Opera (Perkin Elmer) or similar instrument adapted for 384-well plates, equipped with 405 nm, 488 nm, 561 nm and 640 nm excitation lasers as well as 20× and 60× objectives.
5. Image analysis software (see **Note 15**).

3. Methods

3.1. Growth and preparation of mycobacteria for cellular infection assay

1. Inoculate frozen *M. tuberculosis* strains in the required volume of fresh pre-warmed (37°C) 7H9-OADC-Tw medium (less than 50 mL) containing the appropriate antibiotic (see **Note 1**), to reach a starting OD₆₀₀ of 0.2, in a sterile and ventilated 125-mL Erlenmeyer.
2. Incubate at 37°C, 5% CO₂ without shaking for 7 days.
3. Measure the OD₆₀₀ and dilute the 7-days old *M. tuberculosis* culture into 50 mL of pre-warmed 7H9-OADC-Tw plus required antibiotic (see **Note 1**), to reach a starting OD₆₀₀ of 0.2.
4. Incubate at 37°C, 5% CO₂ without shaking for 7 days more (see **Note 16**).

5. Measure the OD₆₀₀ and dilute the *M. tuberculosis* culture into 100 mL of pre-warmed 7H9-OADC-Tw plus required antibiotic (see **Note 1**), to reach a starting OD₆₀₀ of 0.2, in a sterile and ventilated 250-mL Erlenmeyer.
6. Incubate for 3 days at 37°C with shaking at 200 rpm.
7. Pellet bacteria by centrifugation at 3750 × *g* for 5 min at room temperature.
8. Resuspend in 35 mL of pre-warmed PBS and pellet bacteria by centrifugation at 3750 × *g* for 5 min at room temperature.
9. Repeat **step 8**.
10. Resuspend bacteria in 5 to 10 mL of freshly prepared and pre-warmed RPMI-FBS.
11. Centrifuge at 220 × *g* for 2 min to pellet clumped bacteria and use homogeneous supernatant for infection (see **Note 17**).
12. Calculate the bacterial concentration by measuring the optical density (O.D.) and the relative fluorescence units (RFU) of the bacterial stock suspension using a spectrophotometer and the microplate fluorescence reader, respectively. Determine the bacterial concentration referring to the pre-established relationship, such as 1-unit O.D. is corresponding to 10⁸ CFU/mL bacteria concentration, and the CFU = *f*(RFU) linear relationship previously established for the used fluorescent bacterial stock (as described below in step 14). Dilute bacteria in RPMI-FBS to reach the needed MOI (see **Note 18**).
13. OPTIONAL: mycobacterial batch titration.
 - a. Prepare series of 10-fold dilutions of bacteria in PBS using a 384-well plate (dilutions from 1 to 10⁻¹⁰ fold).
 - b. Record fluorescence levels (RFU) of each dilution using a microplate fluorescence reader.
 - c. Plate dilutions on 7H11 agar plates and grow for 2-3 weeks at 37°C.
 - d. Count CFU on plates from the different dilutions.
 - e. Plot CFU as a function of RFU and fit the curve using a linear regression to obtain parameters for the CFU = *f*(RFU) relationship. Same parameters can be reused for all aliquots of the same stock, but a new regression should be established for each stock of bacteria.

3.2. RAW264.7 macrophage cell line culture

1. Establish RAW264.7 macrophage monolayer by plating 1×10^6 cells in 20 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS per 75 cm² flask or 2×10^6 cells in 40 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 175 cm² flask (see **Note 3**).
2. Incubate for three to four days at 37°C and 5% CO₂.
3. Remove the medium and carefully wash the monolayer twice using pre-warmed DPBS.
4. Incubate cells with 3 mL (75 cm² flasks) or 6 mL (175 cm² flasks) of versene solution for 20 min at 37°C and 5% CO₂.
5. Detach cells from the flask substrate by tapping and use a scraper, if needed.
6. Rinse the flask with 10 mL or 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS and collect cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
7. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
8. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
9. Count cells using a counting chamber (expect to obtain $20 - 40 \times 10^6$ cells per 75 cm² flask).
10. Use cells for any phenotypic assay (see Subheadings 3.11 to 3.24).
11. Repeat **steps 1 to 9** twice a week to maintain and passage RAW264.7 cells, for a maximum of ten passages, or pellet and dilute cells in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 5×10^6 cells/mL suspension for long-term storage in liquid nitrogen (see **Note 3**)

3.3. THP-1 macrophage cell line culture

1. Just after thawing, establish a THP-1 cell suspension at 0.5×10^6 cells/mL in 20 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS per 75 cm² flask (see **Note 3**).
2. Incubate for four days at 37°C, 5% CO₂ (incubate the flask vertically).
3. Collect the cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
4. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
5. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
6. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 20×10^6 cells in 20 mL per 75 cm² flask) and adjust to $0.2 - 0.4 \times 10^6$ cells/mL in maximum 40 mL per 75 cm² flask and 80 mL per 175 cm² flask.

7. Repeat **steps 2 to 6** to maintain and passage undifferentiated THP-1 cells twice a week, for a maximum of 10 passages, or pellet and dilute cells in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 5×10^6 cells/mL suspension for long-term storage in liquid nitrogen (*see Note 3*).
8. To differentiate cells into macrophages for infection assays, adjust to 20×10^6 cells in 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 75 cm² flask or 40×10^6 cells in 40 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 175 cm² flask.
9. Directly add 50 µg/mL PMA stock solution 1:1000 diluted in the flask to obtain a final concentration of 50 ng/mL.
10. Incubate for three days at 37°C, 5% CO₂ (incubate the flask horizontally).
11. Remove the medium and carefully wash the monolayer twice using pre-warmed (37°C) DPBS.
12. Incubate cells with 3 mL (75 cm² flasks) or 6 mL (175 cm² flasks) of versene solution for 20 min at 37°C and 5% CO₂.
13. Detach cells from the flask substrate by tapping and use a scraper, if needed.
14. Rinse the flask with 10 mL or 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS and collect cell suspension in a sterile centrifuge 50-mL tube.
15. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
16. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
17. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 10×10^6 cells per 75 cm² flask, corresponding to cell number needed to prepare one 384-well plate).
18. Use for any phenotypic assay (*see Subheadings 3.11 to 3.24*).

3.4. A549 human type II pneumocyte-like cell line culture

1. Establish A549 human type II pneumocyte-like cell monolayer by plating $0.5-1 \times 10^6$ cells in 20 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS per 75 cm² flask or 2×10^6 cells in 40 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 175 cm² flask (*see Note 3*).
2. Incubate three to four days at 37°C, 5% CO₂.
3. Remove the medium and carefully wash the monolayer twice using pre-warmed (37°C) DPBS.
4. Incubate cells with 3 mL (75 cm² flasks) or 6 mL (175 cm² flasks) of versene solution for 20 min at 37°C and 5% CO₂.

5. Detach cells from the flask substrate by tapping and use a scraper, if needed.
6. Rinse the flask with 10 mL or 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS and collect cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
7. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
8. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
9. Count cells using a counting chamber (expect to obtain $10\text{-}20 \times 10^6$ cells/mL per 75 cm^2 flask).
10. Use cells for any phenotypic assay (see Subheadings 3.11 to 3.24).
11. Repeat **steps 1 to 9** to maintain and passage A549 cells twice a week, for a maximum of ten passages, or pellet and dilute cells in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 5×10^6 cells/mL suspension for long-term storage in liquid nitrogen (see **Note 3**).

3.5. Production of L929-derived M-CSF conditioned medium for murine primary macrophage differentiation and culture (E. R. Stanley & Heard, 1977).

1. Establish murine L929 fibroblast cell line cell monolayer by plating 5×10^6 cells in 20 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS per 75 cm^2 flask or 10×10^6 cells in 40 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 175 cm^2 flask (see **Note 3**).
2. Incubate three to four days at 37°C , 5% CO_2 .
3. Remove the medium and carefully wash the monolayer twice using pre-warmed (37°C) DPBS.
4. Incubate cells with 3 mL (75 cm^2 flasks) or 6 mL (175 cm^2 flasks) of Trypsin-EDTA solution for 10 min at 37°C and 5% CO_2 .
5. Detach cells from the flask substrate by tapping and use a scraper, if needed.
6. Rinse the flask with 10 mL or 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS and collect cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
7. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
8. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
9. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 20×10^6 cells/mL per 75 cm^2 flask).
10. Repeat **steps 1 to 9** to maintain and passage L929 cells twice a week for a maximum of ten passages or pellet and dilute cells in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 5×10^6 cells/mL suspension for long-term storage in liquid nitrogen (see **Note 3**).

11. To produce M-CSF-enriched supernatant, adjust to 7×10^6 L929 cells in 70 mL of pre-warmed RPMI-FBS per 175 cm² flask.
12. Incubate for seven to eight days at 37°C, 5% CO₂.
13. Collect and pool the cell supernatants in sterile 50-mL centrifuge tubes.
14. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
15. Filter-sterilize the cell supernatants through a 0.22 μm polyether sulfone membrane.
16. Store 10 mL and 50 mL aliquots at -20°C and avoid refreezing.
17. Determine the M-CSF concentration of the L929-culture supernatants to be used to obtain differentiation of monocytes into macrophages (see Subheading 3.8 and **Note 6**).

3.6. Production of J558-derived GM-CSF conditioned medium for murine primary dendritic cell differentiation and culture (Winzler et al., 1997).

1. Establish murine J558 cell line cell monolayer by plating 5×10^6 cells in 10 mL of pre-warmed (37°C) IMDM-FBS supplemented with Geneticin per 25 cm² flask (see **Note 3**).
2. Incubate two days at 37°C, 5% CO₂.
3. Collect the cell supernatant and transfer into a new 25 cm² flask.
4. Gently replace 10 mL of freshly pre-warmed IMDM-FBS supplemented with Geneticin in the first 25 cm² flask containing adherent cells.
5. Incubate the two 25 cm² flasks for two days at 37°C, 5% CO₂.
6. Detach adherent cells by using a scraper and resuspend in the cell supernatants (expect to obtain total 2×10^6 cells).
7. Collect and pool the cell suspensions obtained from the two 25 cm² flasks in sterile 50-mL centrifuge tubes.
8. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 10 min at room temperature.
9. Seed 2×10^6 cells in 20 mL of pre-warmed IMDM-FBS supplemented with Geneticin per 75 cm² flask.
10. Incubate two-three days at 37°C, 5% CO₂.

11. Detach adherent cells from the flask substrate by using a scraper and resuspend in the cell supernatants (expect to obtain 2×10^7 cells per 75 cm² flask).
12. Collect and pool the cell suspensions obtained from the flasks in sterile 50-mL centrifuge tubes.
13. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 10 min at room temperature.
14. Seed 7×10^6 cells in 40 mL of pre-warmed IMDM-FBS supplemented with Geneticin per 175 cm² flask.
15. Incubate two days more at 37°C, 5% CO₂.
16. On day 8-9, repeat **steps 11 to 13**.
17. Resuspend cells in adapted volume of pre-warmed IMDM-FBS.
18. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 3×10^7 cells/mL per 175 cm² flask).
19. Repeat **steps 14 to 16** to maintain and passage J558 cells twice a week for a maximum of ten passages or pellet and dilute cells in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 5×10^6 cells/mL suspension for long-term storage in liquid nitrogen (see **Note 3**).
20. To produce GM-CSF, adjust to 3.5×10^6 J558 cells in 70 mL of pre-warmed IMDM-FBS (without Geneticin) per 175 cm² flask.
21. Incubate for six to seven days at 37°C, 5% CO₂.
22. Collect and pool the cell supernatants.
23. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
24. Filter-sterilize the cell supernatants through a 0.22 μm polyethersulfone membrane.
25. Store 10 mL and 50 mL aliquots at -20°C and avoid refreezing.
26. Determine the GM-CSF concentration of the J558-culture supernatant to be used to obtain differentiation of hematopoietic stem cells into dendritic cells (**Subheading 3.9** and **Note 7**).

3.7. Murine primary monocyte isolation

Murine macrophages and dendritic cells are differentiated from mice bone-marrow.

1. Collect and pool bone marrow from at least one mouse in 50 mL of cold (4°C) RPMI-FBS in sterile 50-mL centrifuge tubes.
2. Centrifuge at $220 \times g$ for 5 min and discard the supernatant.

3. Resuspend cells in 1 mL of 1× Red blood cell lysis buffer and incubate for exactly 1 min at room temperature.
4. Immediately dilute with 49 mL of cold RPMI-FBS.
5. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
6. Resuspend cells in 10 mL of cold RPMI-FBS and count the cells using a counting chamber (expect to obtain $3\text{-}4 \times 10^7$ cells per mouse).
7. Repeat **step 5** and resuspend the pellet in pre-warmed (37°C) RPMI-FBS for macrophage and dendritic cell differentiation and culture (see Subheadings 3.8 and 3.9) or in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 2×10^7 cells/mL for long-term storage in liquid nitrogen (see **Note 5**).

3.8. Culture of murine bone marrow-derived macrophages (BMDM)

1. Establish macrophage monolayer by plating 1×10^7 isolated macrophage progenitor cells in 20 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS supplemented with 40 ng/mL M-CSF (or M-CSF containing L929 supernatant) per 75 cm^2 -tissue culture flasks, or 2×10^7 cells in 40 mL of medium per 175 cm^2 -tissue culture flasks (see **Note 5**).
2. Incubate for two to three days at 37°C , 5% CO_2 .
3. Remove culture medium and replace with fresh pre-warmed RPMI-FBS supplemented with M-CSF. (If confluency is reached, follow **steps 5 to 10** and subculture the cells into two new 75 cm^2 or 175 cm^2 -tissue culture flasks).
4. Incubate cells for three days more at 37°C , 5% CO_2 .
5. Remove the medium and carefully wash the monolayer twice using pre-warmed (37°C) DPBS.
6. Incubate cells with 3 mL (75 cm^2 flasks) or 6 mL (175 cm^2 flasks) of versene solution for 20 min at 37°C and 5% CO_2 .
7. Detach cells from the flask substrate by tapping and use a scraper, if needed.
8. Rinse the flask with 10 mL or 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS and collect cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
9. Pellet cells by centrifugation at $220 \times g$ for 5 min at room temperature.
10. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.

11. Count cells using a counting chamber (expect to obtain $4\text{-}6 \times 10^7$ cells per 175 cm^2 flask, corresponding to cell number needed to prepare four to six 384-well plates).
12. Use for any phenotypic assay (see Subheadings 3.11 – 3.24).

3.9. Culture of murine bone marrow-dendritic cells (BMDC)

1. Establish dendritic cell monolayer by plating 2×10^7 isolated dendritic progenitor cells in 100 mL of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS supplemented with 40 ng/mL GM-CSF (or GM-CSF containing J558 supernatant) per 500-cm^2 square petri dish or 2×10^6 cells in 10 mL of RPMI-FBS supplemented with GM-CSF per 78.5-cm^2 petri dish (see **Note 5**).
2. Incubate cells for four days at 37°C , 5% CO_2 .
3. On day 4, add 50 mL per 500-cm^2 or 5 mL per 78.5-cm^2 petri dish of fresh pre-warmed RPMI-FBS supplemented with GM-CSF.
4. Incubate cells for three days more at 37°C , 5% CO_2 .
5. On day 7, repeat the **steps 3 and 4**.
6. On day 10, remove and discard the culture medium from the petri dishes (using a 25 mL pipette).
7. Flush the cell monolayer by 5 aspiration/discharge cycles with 50 mL or 5 mL of pre-warmed (37°C) DPBS (using a 25 mL pipette).
8. Remove and discard the supernatant.
9. Add 50 mL or 5 mL of pre-warmed (37°C) 2 mM EDTA solution in DPBS.
10. Incubate cells for 5 min at 37°C , 5% CO_2 .
11. Flush the cell monolayer by 5 aspiration/discharge cycles with 50 mL or 5 mL of 2 mM EDTA in DPBS.
12. Collect cell suspension in a sterile 50-mL centrifuge tube.
13. Centrifuge at $220 \times g$ for 5 min and discard the supernatant.
14. Resuspend cells in 10 mL of pre-warmed RPMI-FBS.
15. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 7×10^7 cells per 500-cm^2 petri dish, corresponding to cell number needed to prepare approximately four 384-well plates).

16. Use for any phenotypic assay (see Subheadings 3.11 – 3.24).

3.10. Human primary macrophage cell culture

Human macrophages are CD14⁺ differentiated peripheral blood mononucleated cells (PBMC), isolated from healthy volunteer peripheral blood samples.

1. Dilute blood (approximately 500 mL) or buffy coat (approximately 50 mL) 1:2 in pre-warmed (37°C) DPBS-FBS. Use a sterile single-use beaker or sterile 50-mL tubes.
2. Distribute first 15 mL of Ficoll solution in 50-mL centrifuge tubes and carefully deposit 30 mL of diluted blood on top of Ficoll solution. Do not mix the tube.
3. Centrifuge at $850 \times g$ for 20 min using a rotor with swing-out buckets, with braking speed of the centrifuge set to zero (expect to obtain total duration centrifugation of 40 min).
4. Carefully remove and collect the upper fraction corresponding to plasma (using a 25 mL pipette).
5. Collect PBMC by carefully pipetting the white ring located at the interface between the plasma (top) and the Ficoll (bottom) layer and add to the plasma fraction (using a 2 mL suction bulb).
6. Wash PBMC two times by centrifugation at $330 \times g$ for 10 min at room temperature and resuspension of the pellet in 45 mL DPBS-FBS in 50-mL centrifuge tubes.
7. Resuspend and pool PBMC pellets in 45 mL DPBS-FBS in 50-mL centrifuge tubes.
8. Count cells using a counting chamber (expect to obtain about 6×10^8 cells per Buffy coat).
9. Centrifuge at $330 \times g$ for 10 min at room temperature.
10. Resuspend the pellet in cold (4°C) PBMC-buffer for monocyte purification by magnetic separation or in FBS supplemented with 10% DMSO to reach a 2×10^7 cells/mL for long-term storage (see **Note 19**).
11. Resuspend cell pellet in the appropriate volume of cold PBMC-buffer, based on the use of 80 μ L per 10^7 total cells.
12. Incubate for 5 min on ice.
13. Add the appropriate quantity of CD14⁺ magnetic beads, based on the use of 10 μ L per 10^7 total cells.
14. Incubate for 15 min at 4°C, using a rotating shaker to homogenize.
15. Dilute cells in 15 mL of cold PBMC-buffer.

16. Centrifuge at $330 \times g$ for 10 min at 4°C .
17. Resuspend the pellet in the appropriate volume of cold PBMC-buffer, based on the use of $50 \mu\text{L}$ per 10^7 total cells.
18. Apply cell suspension onto a column attached to the magnet and wash three times with 2.5 mL of cold PBMC-buffer.
19. Remove the column from the magnet and elute CD14^+ monocytes in a clean 15-mL tube by firmly flushing out the column with 5 mL of cold PBMC-buffer.
20. Repeat **steps 18 and 19** on a second column to increase the purification rate.
21. Complete to 15 mL with DPBS.
22. Count CD14^+ PBMC using a counting chamber (expect to obtain about 60 up to 120×10^6 CD14^+ cells per Buffy coat to prepare from two up to four $\times 144 \text{ cm}^2$ petri dish).
23. Centrifuge cells at $330 \times g$ for 10 min at room temperature in 15-mL centrifuge tubes.
24. Resuspend the cell pellet in pre-warmed (37°C) RPMI-FBS containing 20 ng/mL *hM-CSF* and adjust to have 1×10^6 cells/mL.
25. Seed 30 mL per 144-cm^2 petri dish (30×10^6 cells per 144-cm^2 petri dish) (see **Note 19**).
26. Incubate for three days at 37°C , 5% CO_2 .
27. Replace the medium with fresh pre-warmed RPMI-FBS containing 20 ng/mL *hM-CSF*.
28. OPTIONAL: To collect non-adhered cells in supernatant, centrifuge the removed supernatant at $330 \times g$ for 10 min, resuspend the cell pellet and add in the previous 144-cm^2 petri dish.
29. Incubate cells for three days at 37°C , 5% CO_2 .
30. Collect supernatants in a sterile 50-mL centrifuge tube.
31. Add 15 ml per 144-cm^2 petri dish of warm (37°C) DPBS to rinse and pool with supernatants.
32. Add 20 mL per 144-cm^2 petri dish of pre-warmed Buffer-PBMC.
33. Incubate cells for 20 min at 37°C , 5% CO_2 .
34. Collect 10 mL of cell suspension in a new sterile 50 mL tube.
35. Flush the 144-cm^2 petri dish with the last 10 mL and pool the cell suspension.
36. Add 10 mL per 144-cm^2 petri dish of pre-warmed Buffer-PBMC and repeat **step 35**.

37. Centrifuge collected supernatants and cells at $330 \times g$ for 10 min at room temperature and discard the supernatants.
38. Resuspend and pool cells in 45 mL pre-warmed DPBS.
39. Count cells using a counting chamber (expect to obtain 10×10^6 cells per 144 cm² petri dish, corresponding to cell number needed to prepare approximately 50 wells of 384-well plate).
40. Use for any phenotypic assay (see Subheadings 3.11 – 3.23).

3.11. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for siRNA screening

The overview diagram of the following steps is shown in **Fig. 2A**. The infection procedure (infection of adherent cells) is detailed in **Fig. 3B**.

1. Clean all equipment with decontamination reagent for RNase (RNase AWAY Spray) to work in RNase-free condition (see **Note 8**).
2. Prepare siRNA and scramble siRNA solutions in 384-well plates to reach the recommended final concentration (**Table 1**), by automatic liquid handling (see **Note 9**).
3. Prepare transfection reaction by mixing together DPBS and transfection reagent (Lipofectamine LTX, RNAiMAX or HiPerfect Transfection Reagent). Vortex briefly. Refer to **Table 1** for the appropriate transfection reagent and volumes needed for each cell type.
4. Incubate 3 min at room temperature.
5. Distribute 10 μ L of the transfection reaction per well for each plate using an automatic plate dispenser (see **Note 10**) or a multichannel pipette.
6. Incubate 20 min at room temperature.
7. Prepare cells as required (see Subheadings 3.2 - 3.4 and 3.7 - 3.10) in RPMI-FBS, containing 40 ng/mL M-CSF, GM-CSF or hM-CSF for primary murine macrophages, murine dendritic cells and human macrophages, respectively, or no growth factors for cell lines.
8. Add the appropriate number of cells in 20 μ L per well (**Table 1**).
9. Incubate 6 h at 37°C, 5% CO₂.
10. Add 20 μ L RPMI-FBS containing or not growth factors (see **step 7**).
11. Incubate three days at 37°C, 5% CO₂.
12. Remove the supernatant from plates using a multichannel pipette.

13. Add 50 μL per well of bacteria at a MOI from 0.5 up to 2 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**). You will need 20 mL of bacterial suspension per plate.
14. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge at $220 \times g$ for 1 min.
15. Incubate for 2 h at 37°C , 5% CO_2 .
16. Remove the breathable sealing films.
17. Wash the cells using an automatic plate washer (see **Note 10**) or by carefully pipetting up and down 50 μL of RPMI-FBS in each well using a multichannel pipette. Finish by removing the supernatant from the plates.
18. Add 50 μL per well of RPMI-FBS with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
19. Incubate for 1 h at 37°C , 5% CO_2 .
20. Remove the supernatants from the plates using a multichannel pipette.
21. Repeat **step 17** twice.
22. Add 50 μL per well of RPMI-FBS containing or not growth factors (see **Step 7**).
23. Incubate for 1 to 5 days at 37°C , 5% CO_2 .
24. Remove the supernatants from the plates using a multichannel pipette.
25. Perform any staining or any phenotypic assay: follow the detailed steps from the step describing the addition of staining solutions (see Subheadings 3.15 – 3.24)

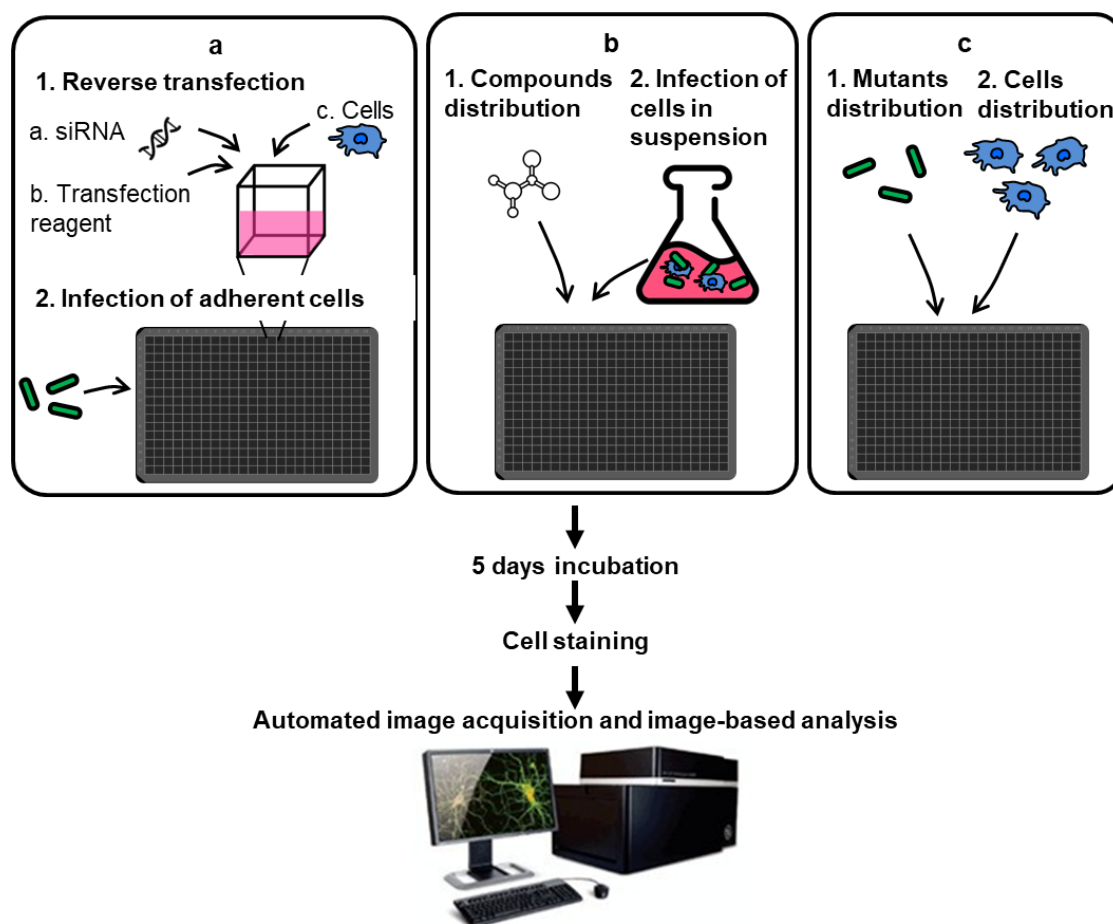


Fig. 2. Overall scheme for the different assays described in this chapter.

3.12. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for compound screening

The overview diagram of the following steps is shown in **Fig. 2b**. The infection procedure (infection of cells in suspension) is detailed in **Fig. 3a**.

1. Prepare compound stock solutions at 10 mM by dissolving pure compounds in 100% DMSO. Use borosilicate amber glass vials (see **Note 11**). Store stock solutions at -20°C.
2. Design the source and assay plate layout. An example of a plate layout is given in **Fig. 4**.
3. Transfer stock solutions into the 384-well source plates and prepare intermediate dilutions to reach the final concentration needed, using micropipettes.
4. Prepare assay plates by transferring compounds directly from the source plate, using a high precision automatic liquid dispenser (see **Note 9**). The final amount of DMSO in the assay plate should be <1% v/v for each well.

5. Store assay and source plates at -20°C , sealed with an adhesive aluminum sealing film, until the day of infection.
6. Prepare a bacterial suspension at 2×10^6 CFU/mL (see Subheading 3.1 and **Note 18**). A volume of 10 mL of bacterial suspension per plate is required.
7. Prepare a cellular suspension as previously described (see Subheadings 3.2 - 3.4 and 3.7 - 3.10) to have the cell type-adapted MOI (i.e. a cell suspension at 1×10^6 cells/mL to obtain MOI 2 for RAW264.7 and THP-1 macrophage cell lines or 2×10^6 cells/mL to obtain MOI 1 for human and murine primary macrophages cells) (see **Note 18** and **Note 20**). A volume of 10 mL of cellular suspension per plate is required.
8. Mix one volume of cells with one volume of bacteria in a sterile and ventilated bacterial-culture Erlenmeyer of appropriate volume.
9. Incubate the suspension with mild shaking (100 rpm) for 2 h at 37°C and up to 4 h for THP-1 macrophage cells.
10. Distribute the infected cell suspension equally in sterile 50 mL centrifuge tubes.
11. Centrifuge at $220 \times g$ for 10 min.
12. Resuspend in 20 mL of RPMI-FBS supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amikacin. A volume of 20 mL of cell suspension per plate is required.
13. Incubate the suspension with mild shaking (100 rpm) for 1 h at 37°C . This step is required to kill remaining extracellular bacteria.
14. Repeat three times the **steps 10-12**, using 50 mL of RPMI-FBS for cell pellet resuspension.
15. Resuspend in 20 ml or 40 ml of RPMI-FBS (to have the cell type-adapted concentration per well) containing 40 ng/mL M-CSF, GM-CSF or hM-CSF for primary murine macrophages, murine dendritic cells and human macrophages, respectively, or no growth factors for cell lines. A volume of 20 mL of cellular suspension per plate is required.
16. Dispense 40 μL (corresponding to 1×10^3 A549, or 2×10^4 RAW264.7, THP-1 macrophages and BMDM, or 4×10^4 BMDC cells/well) of infected cells per well for each assay plate prepared for compound screening, using a multichannel pipette or an automatic plate dispenser (see **Note 10**). If needed, fill empty wells with medium to limit evaporation and border effects.
17. Incubate the plates for 5 days at 37°C , 5% CO_2 .

18. Directly add 10 μL of 25 μM SYTOTM 60 into the wells of 384-well assay plate to obtain a final concentration of 5 μM SYTOTM 60 per well.

OPTIONAL step: Perform any staining or any phenotypic assay following the different detailed steps from the addition of dye solutions (see Subheadings 3.15 to 3.24).

19. Seal plates using breathable sealing films.

20. Incubate the plates for 30 min at 37 °C with 5 % CO₂.

21. Proceed to image the cells without washing, using the high-content confocal microscope (see **Subheading 3.25**). Use 20 \times magnification. Plates cannot be stored.

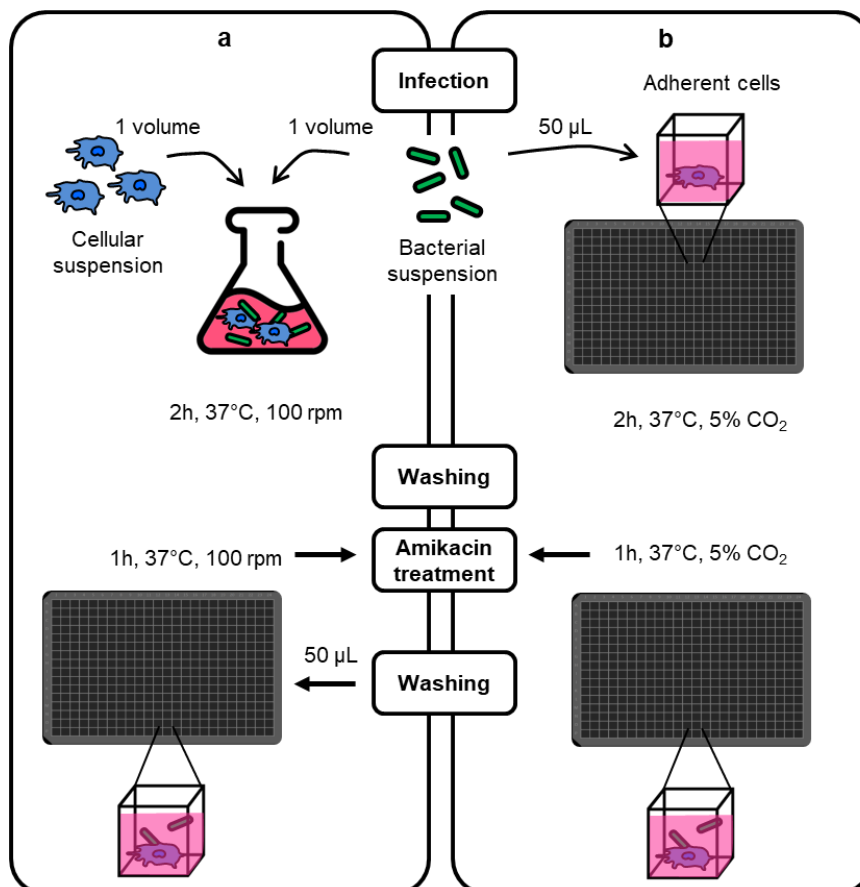


Fig. 3. Overall scheme for (a) infection of cells in suspension and (b) infection of plated cells.

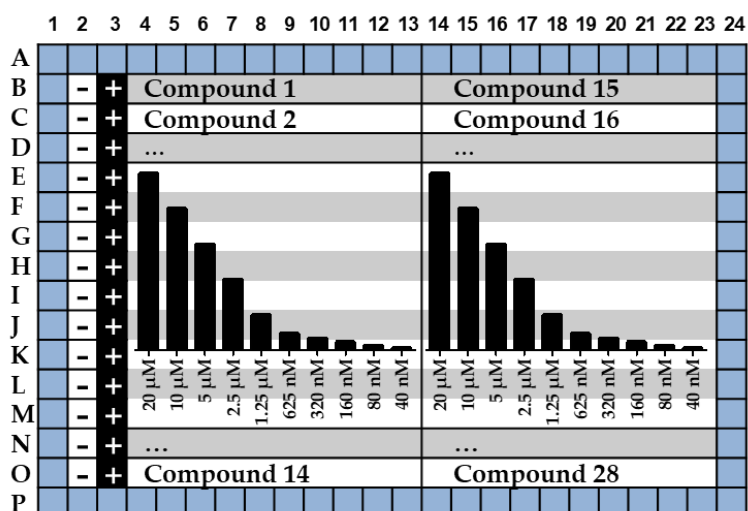


Fig. 4. Example of a 384-well assay plate layout. In this design, all wells located at the border (in blue), are filled with medium only, to limit side-effect during incubation. Positive (+) and negative (-) controls are added columns 2 and 3, respectively. Each compound is assayed in a dose-response format including a total of 10 concentrations, starting from 20 μM (columns 4 and 14) down to 40 nM (columns 13 and 23). Using this layout, 28 different compounds (lines B to O) can be tested in a single plate.

3.13. Intracellular Mycobacterial Replication Assays for mutant screening

The overview diagram of the following steps is shown in **Fig. 2C**.

1. Prepare bacterial suspensions of mutants at 2×10^6 CFU/mL (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
2. Distribute 20 μL of bacterial suspensions into 384-well assay plates (see **Note 10**).
3. Prepare a cellular suspension as previously described (see Subheadings 3.2 - 3.4 and 3.7 - 3.10) to have the cell type-adapted MOI (see **Note 18**). A volume of 12 mL of cellular suspension per plate is required.
4. Distribute 30 μL of cellular suspension in the 384-well assay plates containing the mutants, using an automatic plate dispenser (see Note 10) or a multichannel pipette.
5. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min.
6. Incubate for 2 h at 37°C with 5% CO₂.
7. Remove the breathable sealing films.
8. Carefully remove the supernatant from the plates and wash the cells using an automatic plate washer (see **Note 10**) or by carefully pipetting up and down 50 μL of RPMI-FBS in each well using a multichannel pipette. Finish by removing the supernatant from the plates.

9. Add 50 μL per well of RPMI-FBS with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
10. Incubate for 1 h at 37°C, 5% CO_2 .
11. Repeat **step 8** twice.
12. Add 50 μL per well of the appropriate complete medium containing 40 ng/mL M-CSF, GM-CSF or hM-CSF for primary murine macrophages, murine dendritic cells and human macrophages, respectively, or no growth factors for cell lines.
13. Seal plates using breathable sealing films.
14. Incubate the plates for 5 days at 37°C, 5% CO_2 .
15. Perform any staining or any phenotypic assay following the different detailed steps from the addition of dye solutions (see Subheadings 3.15 to 3.24).

3.14. Intracellular Mycobacterial Uptake and Replication assays

The infection procedure (infection of adherent cells) is detailed in **Fig. 3B**.

1. Seed 1×10^3 A549 cells, 2×10^4 RAW264.7 and THP-1 macrophages and BMDM or 4×10^4 BMDC (see Subheadings 3.2 to 3.4 and 3.7 to 3.9) in 40 μL of appropriate complete medium (with M-CSF or GM-CSF for BMDM or BMDC, respectively) per well in 384-well plates.
2. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO_2 .
3. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
4. In dedicated wells for cell infection: add 50 μL per well of bacteria at a MOI from 0.5 up to 2 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
5. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min.
6. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO_2 .
7. Remove the breathable sealing films.
8. Carefully remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette and avoid disturbing the cell layer.
9. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
10. Add 50 μL per well of RPMI-FBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
11. Incubate plates for 1 h at 37°C with 5% CO_2 .

12. Wash cells twice with RPMI-FBS (repeat **steps 8 and 9**).
13. For dynamics studies on live cells, perform staining of cell nucleus on live cells (*see* Subheading 3.15).
14. For uptake assay, perform staining of cell nucleus on live or fixed cells (*see* Subheading 3.16).
15. For replication assay, add 50 μ L of RPMI-FBS containing 40 ng/mL M-CSF, GM-CSF or hM-CSF for primary murine macrophages, murine dendritic cells and human macrophages, respectively, or no growth factors for cell lines.
16. Incubate the plates for the desired infection time (up to 5 days) at 37°C, 5% CO₂.
17. Perform staining of cell nucleus, cytoplasm, plasma membrane or F-actin for end-point studies on live and/or fixed cells (*see* Subheadings 3.16 and 3.17).

3.15. Staining of cell nucleus on live cells for dynamic studies

When kinetic data are required, cells can be stained at the beginning of the experiment using the Hoechst 33342 stain. Plates can be kept for three days at 37°C without cell toxicity.

1. Perform an intracellular mycobacterial replication assays (*see* Subheadings 3.11-3.14).
2. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
3. Add 50 μ L per well of 250 ng/mL Hoechst solution in appropriate complete medium RPMI-FBS (with M-CSF or GM-CSF for BMDM or BMDC, respectively).
4. Incubate from 30 min up to 3 days at 37°C, 5% CO₂.
5. Read plates at regular time points, using the high-content confocal microscope (*see* Subheading 3.25). Use 20 \times or 60 \times magnification.

3.16. Staining of cell nucleus and plasma membrane on live/fixed cells

For live cell imaging, fixation is not required and you can directly proceed with cell staining. If you do not want to proceed immediately with image acquisition, a fixation step is required prior to imaging (*see* Fig. 5A).

1. Perform an intracellular mycobacterial replication assays (*see* Subheadings 3.11-3.14).
2. Carefully remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette and avoid to disturb the cell layer.
3. Wash cells with 50 μ L per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.

4. Repeat **steps 2 and 3**.
5. Add 50 μL per well of (i) a staining solution in RPMI-FBS containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain or (ii) a staining/fixative solution, obtained by diluting 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 or DAPI solution in 4% formaldehyde solution.
6. Incubate for 30 min at 37°C, 5% CO_2 .
7. For (i) stained live cells, immediately proceed to image acquisition without washing or add 50 μL per well of 4% formaldehyde solution, incubate for 30 min at room temperature and wash cells twice with DPBS, before proceeding with image acquisition using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 20 \times or 60 \times magnification. After fixation, plates can be stored for up to one month, sealed and kept in the dark at 4°C.
8. For (ii) stained and fixed cells, wash cells twice with 50 μL of DPBS, before proceeding with image acquisition, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 20 \times or 60 \times magnification. Plates can be stored.

3.17. Staining of cell nucleus, cytoplasm and/or F-Actin on fixed and permeabilized cells

If you do not want to proceed immediately with staining for immunofluorescence assay, a fixation step is required prior to staining (see **Fig. 5A**).

1. Perform the intracellular mycobacterial replication assays (see Subheadings 3.11-3.14).
2. Carefully remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette and avoid to disturb the cell layer.
3. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
4. Repeat **steps 2 and 3**.
5. Add 50 μL per well of 4% formaldehyde solution used as fixative solution.
6. Incubate for 30 min at room temperature.
7. Repeat twice **steps 2 and 3** with DPBS.
8. Add 50 μL per well of 0.1% w/v Triton X-100 solution in DPBS, used as permeabilization solution
9. Incubate for 5 min at room temperature.
10. Repeat twice **steps 2 and 3** with DPBS.

11. Add 25 μL per well of a staining solution in DPBS containing (i) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CellMask Blue Stain or (ii) 1.65 μM Alexa Fluor 660 Phalloidin staining solution.
12. Incubate for 30 min at room temperature in the dark.
13. Repeat twice **steps 2 and 3** with DPBS-FBS.
14. Immediately proceed to image acquisition for F-actin staining (phalloidins are stable for a short amount of time in 4% formaldehyde fixation buffers), using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 20 \times or 60 \times magnification. Plates used for Hoechst and CellMask Blue staining can be stored for up to one month, sealed and kept in the dark at 4°C.

3.18. Phagosomal acidification assay using LysoTracker reagent

This assay can be used in conjunction with *M. tuberculosis* mutants for the discovery of new virulence factors, as well as siRNA-silenced host macrophages or small molecules to determine effectors involved in phagosomal acidification. *M. tuberculosis* blocks phagosomal acidification, stabilizing the intra-vacuolar pH around 6.3-6.5. Fluorescent acidotropic probes, such as LysoTracker (Life Technologies), allow the study of vacuole acidification upon infection. After cell phagocytosis, live *M. tuberculosis* resides in phagosomal vesicles escaping acidification and their co-localization with acidic vacuoles, while heat-killed inactivated bacteria are targeted by the acidified compartment.

1. Seed 1×10^3 A549 cells, 2×10^4 RAW264.7, THP-1 macrophages, BMDM, or 4×10^4 BMDC (see Subheadings 3.2 to 3.4 and 3.7 to 3.9) in 40 μL of appropriate complete medium (with M-CSF or GM-CSF for BMDM or BMDC) per well in 384-well plates (see **Note 21**).
2. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO_2 .
3. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
4. In dedicated wells for positive control (positive phagosomal acidification or LysoTracker), add 50 μL per well of heat-killed bacteria at a MOI up to 5.
5. In dedicated wells for cell infection: add 50 μL per well of bacteria at increasing MOI up to MOI 5 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
6. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min.
7. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO_2 .
8. Remove the breathable sealing films.

9. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
10. Wash cells with 50 μ L per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
11. Add 50 μ L per well of RPMI-FBS containing 50 μ g/mL amikacin.
12. Incubate plates for 1 h at 37°C with 5% CO₂.
13. Repeat twice **steps 9 and 10** with RPMI-FBS.
14. Add 25 μ L per well of RPMI-FBS containing 1 μ M LysoTracker Red DND-99 or Green DND-26 (see **Note 13**).
15. Incubate plates for 1.5 h at 37°C with 5% CO₂.
16. Repeat twice **steps 9 and 10** with DPBS-FBS.
17. Add 50 μ L per well of a nucleus staining/cell fixative solution by diluting 10 μ g/mL Hoechst 33342 solution in 4% formaldehyde solution.
18. Incubate plates for 30 min at room temperature.
19. Repeat twice **steps 9 and 10** with DPBS-FBS.
20. Proceed to image the cells in 50 μ L per well of DPBS-FBS, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 60 \times magnification. Plates can be stored for up to one month, sealed and kept in the dark at 4°C.

3.19. Phagosomal acidification assay using pHrodo reagent

1. Seed 2×10^4 RAW264.7 macrophages and differentiated CD14⁺ hPBMCs (see Subheadings 3.2 and 3.10) in 40 μ L per well of RPMI-FBS supplemented or not with 50 ng/mL hM-CSF in 384-well plates.
2. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO₂.
3. Pellet 1×10^9 H37Rv-GFP bacteria (see Subheading 3.1 and **Note 18**) in a 1.5-mL microtube by centrifugation at $3750 \times g$ for 5 min at room temperature.
4. Resuspend in 140 μ L of fresh 100 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.3.
5. For labeling bacteria, add 10 μ L of 7.6 mM pHrodo Red suspension to obtain a 0.5 mM final concentration and mix by pipetting up and down several times.

6. Incubate microtube for 60 min at room temperature with shaking (800 rpm), using a mixed and temperature-controlled microtube incubator, and protect from light.
7. For removing unincorporated dye from the bacteria conjugate, add 1 mL of DPBS to bacteria conjugate and vortex the samples for 30 seconds.
8. Centrifuge at $3750 \times g$ for 5 min at room temperature.
9. Carefully remove the supernatant using a micropipette (see red supernatant).
10. Resuspend the bacterial pellet in 1 mL of DPBS.
11. Repeat twice **steps 8 to 10** to make sure that the supernatant appears clear after 3 washings.
12. Centrifuge at $3750 \times g$ for 5 min at room temperature.
13. Resuspend the bacterial pellet in 1 mL of RPMI-FBS.
14. Wait 5 min at room temperature to pellet clumped bacteria and use homogeneous supernatant for infection (see **Note 17**).
15. Calculate the bacterial concentration by measuring the optical density (O.D.) and the fluorescence (RFU) of the bacterial stock suspension using a spectrophotometer and the microplate fluorescence reader, respectively. Determine the bacterial concentration referring to the pre-established relationship, such as 1-unit O.D. is corresponding to 10^8 CFU/mL bacteria concentration, and the $CFU = f(RFU)$ linear relationship previously established for the used fluorescent bacterial stock (as described in Subheading 3.1).
16. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
17. In dedicated wells for cell infection: add 50 μ L per well of pHrodo-labelled bacteria at a MOI of 2 in RPMI-FBS (see **Note 18**).
18. In dedicated empty wells (without cells) for positive controls (intracellular pH indicator controls): add first 50 μ L per well of CO_2 -independent Medium to a pH range from 4 to 10, and then 5 μ L of the previously diluted pHrodo-labelled bacteria in RPMI-FBS to reach a MOI of 2 (see **Note 18**), to determine a pHrodo standard curve relative intensity per bacteria.
19. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min at room temperature.
20. Incubate plates for 24 h at $37^\circ C$ with 5% CO_2 .
21. Remove the breathable sealing films.

22. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
23. Wash cells three times with 50 μ L per well of DPBS using a multichannel pipette.
24. Add 50 μ L per well of RPMI-FBS containing 10 μ g/mL Hoechst.
25. Incubate plates for 30 min at 37°C with 5% CO₂.
26. Repeat **steps 22 and 23** three times with RPMI-FBS.
27. Immediately proceed to image the cells in 50 μ L per well of RPMI-FBS, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 60 \times magnification. Plates cannot be stored.

3.20. Phagosomal vacuole rupture assay

M. tuberculosis translocates from the phagosome to the cytosol in macrophages, involving the rupture of the enclosing phagosomal membrane and coinciding with cell death by necrosis. The CCF4-AM dye (Invitrogen) is cell permeable, β -lactamase substrate displaying a fluorescence resonance energy transfer (FRET) property. In the presence of β -lactamase enzymatic activity in the cell cytoplasm, the CCF4-AM substrate is rapidly converted into its negatively charged metabolite CCF4, which corresponds to a shift in the emission wavelength from green to blue. As *M. tuberculosis* expresses membrane-associated β -lactamase BlaC, this dye can be used to characterize the ability of mycobacteria to escape their phagosomal vacuoles and reach the cytoplasm. The green intensity (CCF4-AM) decreases while the blue intensity (CCF4) increases in cells infected with live-mycobacteria, whereas cells infected with heat-killed mycobacteria do not show such changes.

1. Seed 4×10^4 cells THP-1 macrophages (see Subheading 3.3) in 30 μ L per well of RPMI-FBS in 384-well plates.
2. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO₂.
3. One hour before infection, in dedicated infected and non-infected wells for positive controls (vacuole rupture): remove medium and add 50 μ L per well of 20 nM Bafilomycin in RPMI-FBS (see **Note 12**).
4. Remove the supernatant from all wells of the plates using a multichannel pipette.
5. In dedicated non-infected wells for negative controls (no vacuolar rupture): add 50 μ L per well of heat-killed H37Rv-RFP bacteria at a MOI of 2.
6. In dedicated wells for cell infection: add 50 μ L per well of H37Rv-RFP bacteria at a MOI of 2 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).

7. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min at room temperature.
8. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO_2 .
9. Remove the breathable sealing films.
10. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
11. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
12. Add 50 μL per well of RPMI-FBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
13. Incubate plates for 1 h at 37°C with 5% CO_2 .
14. Repeat twice **steps 10 and 11**.
15. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO_2 .
16. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
17. Add 25 μL per well of the substrate loading solution containing 8 μM CCF4-AM in EM buffer-2.5 μM Probenecid.
18. Incubate plates for 2 h at room temperature in the dark (cover the plate to protect from light and evaporation).
19. Repeat **steps 10 and 11** three times with 50 μL per well of EM buffer-2.5 μM Probenecid.
20. Add 50 μL per well of 4% formaldehyde solution.
21. Incubate for 30 min at room temperature.
22. Repeat twice **steps 10 and 11** with DPBS-FBS.
23. Immediately proceed to image the cells in 50 μL per well of DPBS-FBS, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use $60\times$ magnification. Plates cannot be stored.

3.21. Oxidative stress assays using Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

Reactive Oxygen Species (ROS) have long been known to be a component of the killing response of immune cells to microbial invasion and are highly toxic to bacteria, as they can either directly destroy DNA, protein, and lipids or indirectly damage nucleic acids via oxidation of the nucleotide pool. *M.*

tuberculosis infection triggers the generation of reactive oxygen species by host phagocytic cells (primarily macrophages). However, the survival rate of *M. tuberculosis* is highly concentration-dependent of ROS produced by the host immune cells. Exposure of *M. tuberculosis* to a low concentration of ROS had no effect on the bacterial cell viability, then the pathogen continued to survive and to replicate in the host, whereas high concentrations of ROS could be lethal to *M. tuberculosis* bacilli.

1. Seed 2×10^4 BMDM (see Subheading 3.8) in 30 μL per well of RPMI-FBS supplemented with M-CSF in 384-well plates.
2. Incubate plates for 12 h at 37°C with 5% CO_2 .
3. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
4. In dedicated wells for cell infection: add 50 μL per well of bacteria at a MOI of 1 or 2 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
5. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min at room temperature.
6. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO_2 .
7. Remove the breathable sealing films.
8. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
9. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
10. Add 50 μL per well of RPMI-FBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
11. Incubate plates for 1 h at 37°C with 5% CO_2 .
12. Repeat twice **steps 8 and 9**.
13. Add 50 μL per well of RPMI-FBS supplemented with M-CSF.
14. In dedicated wells for positive control (oxidative stress positive): add 50 μL per well of RPMI-FBS supplemented with M-CSF and containing 100 ng/mL LPS and 20 ng/mL $\text{IFN}\gamma$.
15. Incubate plates for up to 24 h at 37°C with 5% CO_2 .
16. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
17. Add 50 μL per well of 5 μM CellROX[®] Reagent in RPMI-FBS.

18. Incubate plates for 30 min at 37°C.
19. Repeat **steps 8 and 9** three times with RPMI-FBS.
20. Add 50 µL per well of 10 µg/mL Hoechst 33342 solution.
21. Incubate for 30 min at 37°C with 5% CO₂ (steps 17 and 20 can be performed simultaneously).
22. Repeat twice **steps 8 and 9** with DPBS.
23. Add 50 µL per well of 4% formaldehyde solution used as fixative solution.
24. Incubate plates for 15 min at room temperature.
25. Repeat twice **steps 8 and 9** with DPBS.
26. Proceed to image the cells in 50 µL per well of DPBS-FBS within 24 h for the CellROX® Green Reagent and within 2 h for the CellROX® Deep Red Reagent, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use a 60× magnification. Plates cannot be stored.

3.22. Oxidative stress assays using intracellular nitric oxide (NO) detection assay

Among all the ROS, production of free radical nitric oxide (NO) is one anti-bacterial strategy deployed by macrophages to limit the proliferation of intracellular pathogens, such as *M. tuberculosis*. It was previously shown that *M. tuberculosis* regulates the amount of NO through a mechanism involving STAT proteins. *M. tuberculosis*-infected human macrophages had a low production of NO compared to others pathogens. In addition, there is no NO produced by uninfected human macrophages.

1. Seed and infect cells in 384-well plates and incubate plates for up to 24 h at 37°C with 5% CO₂ (see Subheading 3.21, **steps 1 to 15**).
2. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
3. Add 40 µL per well of pre-warmed (37°C) RPMI-FBS containing 1:400-diluted ROS-ID® NO Detection Reagent and Hoechst 0.5 µg/mL.
4. In dedicated wells for negative controls (NO inhibition): add 10 µL per well of a 0.4 mM NO Scavenger suspension, directly into the pre-diluted ROS-ID® NO Detection Reagent (to obtain the recommended final concentration of 80 µM).
5. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO₂.

6. For the last 15-30 min of incubation, in dedicated wells for positive controls (NO inducer): add 10 μL per well of RPMI-FBS containing 5 mM of NO Inducer (L-Arginine) to have a final concentration of 1 mM.
7. After 2 h total incubation, wash cells twice with 50 μL per well of 1 \times Wash Buffer (supplied).
8. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
9. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette
10. Immediately proceed to image the cells in 50 μL per well of RPMI without red phenol-FBS, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 60 \times magnification. Plates cannot be stored.

3.23. Zinc poisoning assay

This assay can be used in conjunction either with siRNAs or with small molecule screening to determine effectors involved in the trafficking of zinc within *M. tuberculosis*-containing phagosomes. The accumulation of zinc and copper inside phagosomal compartments is a component of the host defense against pathogens. However, virulent mycobacteria can resist this metal-mediated defense mechanism through the expression of various metal efflux pumps and transporters. In negative control conditions, the endogenous zinc is evenly located in the cytoplasm and the intensity of FluoZin-3 is minimal. Regions of zinc accumulation (metal deposits) can be predominantly observed in infected cells, co-localizing with the presence of *M. tuberculosis* and with a higher specificity of this zinc accumulation in bacteria-containing phagosomes than in infected cell cytoplasm.

1. Seed 2×10^4 Differentiated CD14⁺ hPBMCs (see Subheading 3.10) in 40 μL per well of RPMI-FBS supplemented with 50 ng/mL hM-CSF in 384-well plates (see **Note 22**).
2. Incubate plates overnight at 37°C with 5% CO₂.
3. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
4. Infect cells with 50 μL per well of H37Rv-RFP at an MOI of 1 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
5. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge 220 $\times g$ for 1 min at room temperature.
6. Incubate plates for 4 h at 37°C with 5% CO₂.
7. Remove the breathable sealing films.

8. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
9. Wash cells three times with 50 μL per well of DPBS using a multichannel pipette.
10. Add 50 μL per well of 4% formaldehyde fixative solution.
11. Incubate for 30 min at room temperature.
12. Repeat twice **steps 8 and 9** with DPBS.
13. Add 25 μL per well of the 2 μM FluoZin-3 staining solution in DPBS.
14. In dedicated wells for positive controls (intracellular Zinc indicator controls): add 10 μL per well indicator salt suspensions ranging from 10 to 100 μM (or directly into the 2 μM FluoZin-3 staining solution to obtain the recommended final concentration of 10-100 μM).
15. Incubate plates for 50 min at room temperature in the dark (cover the plate to protect from light and evaporation).
16. Add 25 μL per well of a nucleus staining solution, corresponding to a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI solution to have a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
17. Incubate for 10 min at room temperature.
18. Repeat twice **steps 8 and 9** with DPBS-FBS.
19. Immediately proceed to image the cells in 50 μL per well of DPBS-FBS, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 60 \times magnification. Plates cannot be stored.

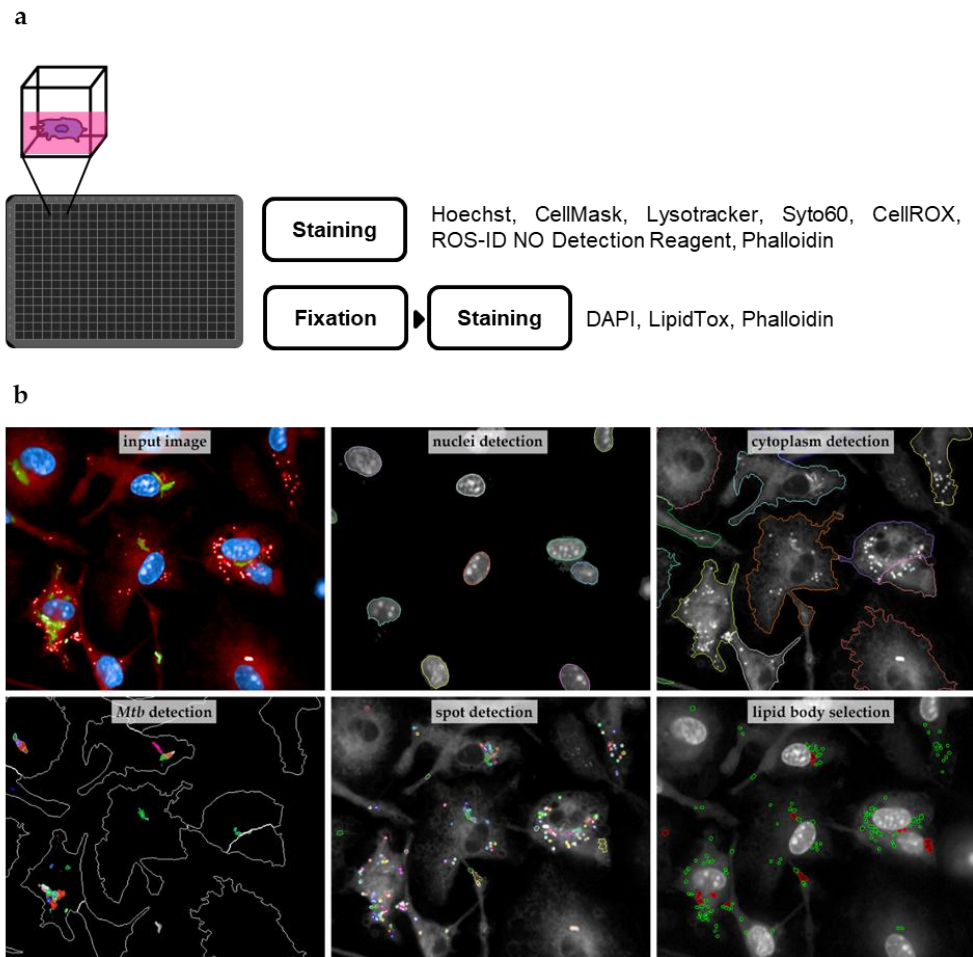
3.24. Lipid body accumulation assay

The occurrence of lipid body-loaded host cells during *M. tuberculosis* infection, also called foamy macrophages, has been observed *in vivo* within human granulomas and *in vitro* using macrophages subjected to various stimuli. The accumulation of cytoplasmic lipid bodies (LBs) was detected using the LipidTox dye (Invitrogen), which labels neutral lipids. Following *M. tuberculosis* infection, the number of lipid droplets per cell increases. This assay is dedicated to the study of LB accumulation and could lead to the identification of potential druggable targets.

1. Seed 2×10^4 BMDM or 4×10^4 BMDC (see Subheadings 3.8 and 3.9) in 40 μL per well of RPMI-FBS supplemented with 10% M-CSF or GM-CSF in 384-well plates.
2. Incubate overnight at 37°C with 5% CO_2 .

3. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
4. In dedicated infected wells: add 50 μL per well of bacteria at an MOI of 1 or 2 in RPMI-FBS (see Subheading 3.1 and **Note 18**).
5. Seal plates using breathable sealing films and centrifuge $220 \times g$ for 1 min at room temperature.
6. Incubate plates for 2 h at 37°C with 5% CO_2 .
7. Remove the breathable sealing films.
8. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
9. Wash cells with 50 μL per well of RPMI-FBS using a multichannel pipette.
10. Add 50 μL per well of RPMI-FBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amikacin.
11. Incubate plates for 1 h at 37°C with 5% CO_2 .
12. Repeat twice **steps 9 and 10**.
13. Add 50 μL per well of RPMI-FBS supplemented with M-CSF or GM-CSF in 384-well plates.
14. In dedicated wells for positive controls (lipid droplet accumulation): add 50 μL per well of RPMI-FBS, supplemented with M-CSF or GM-CSF and containing 100 ng/mL LPS and 20 ng/mL IFN-gamma, or 60 μM Oleic acid, for BMDM or BMDC, respectively.
15. Incubate plates at 37°C with 5% CO_2 for 2 h up to 4 days.
16. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette.
17. Add 50 μL per well of a nucleus staining/cell fixative solution, corresponding to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 solution diluted in 4% formaldehyde solution.
18. Incubate for 30 min at room temperature.
19. Repeat twice **steps 9 and 10** with DPBS.
20. Add 25 μL per well of 0.5 \times LipidTOX neutral lipid stain, corresponding to the 1000X LipidTOX neutral lipid stain diluted 1:2000 in DPBS.
21. RECOMMENDED: Seal the plates with opaque plate-sealing film.

22. Incubate the plates at room temperature for at least 15 min.
23. Proceed to image the cells without washing the LipidTOX stain solution, using the high-content confocal microscope (see Subheading 3.25). Use 60× magnification.



Plates cannot be stored and images should be acquired the same day.

Fig. 5. (a) Workflow of the staining process for all dyes listed in this chapter. (b) Workflow of the image analysis process. Cells, nuclei and membranes (cellular populations) are first segmented from the blue channel. Bacteria and lipid bodies (spots) are then segmented from the green and red channel, respectively. Finally, labelled cells, labelled bacteria and infected cells are deduced by combining populations together: spots with cells, spots with bacteria and bacteria with cells, respectively. The scale bar represents 20 μm .

3.25. Image acquisition

1. Choose the objective from the microscope. For the determination of the ratio of infected cells, host cell viability or bacterial load, a 4×, 10× or 20× magnification should be used, as it allows the recording of a larger number of cells. For the study of bacterial intracellular trafficking, a higher magnification is required and a 60× magnification should be used.
2. Define wells to be read and the number of fields to acquire from each well. Typically, 4 up to 6 fields are sufficient to allow the detection of about 1,000 cells with a 20× magnification, while 10 fields are sufficient to allow the detection of about 100 cells at a 60× magnification.
3. Set the exposure parameters and acquisition time. Refer to **Table 2** for excitation and emission wavelengths of common dyes. Cell nuclei and cytoplasm are detected using the blue channel (DAPI, Hoechst, CellMask Blue Stain) or the far-red channel (SYTO 60 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain). Plasma membranes are detected using the deep-red channel (CellMask Deep Red Plasma Membrane stain). Bacteria are detected using the green or red channel, obtained through the GFP or RFP fluorescence, respectively. Organelle labelling (“spots”) are detected using the green (LipidTox Green Neutral Lipid Stain, LysoTracker Green Dye), red (LysoTracker Red Dye) or far-red (LipidTox Far-Red Neutral Lipid Stain, Alexa Fluor 660 Phalloidin Stain) channels (**Fig. 5A**). Bacterial escape can be observed using simultaneously the green (CCF4-AM) and the blue channel (CCF4). Molecules or pH change involved in host defense can be detected using the green channel (CellROX[®] Green Oxidative Stress Reagent, FluoZin[™]-3 AM cell permeant) or red channel (Amine-reactive pHrodo[™] Red NHS Ester) or far-red channel (CellROX[®] Deep Red Oxidative Stress Reagent, ROS-ID[®] Red NO Detection Reagent).
4. Proceed with plate reading and collecting the images.

3.26. Image-based analysis for cell detection and *M. tuberculosis* intracellular replication

These read-outs can be used for compound screening to identify bacteriostatic activities of intracellular active anti-TB compounds, as well as to determine their range of active concentrations by dose-response. We show the effect of several concentrations of rifampicin on *M. tuberculosis* growth within RAW264.7 after 5 days infection (**Fig. 6**). Moreover, compound cytotoxic effects can be quantified simultaneously determined by the number of detected cells (**Fig. 6a**). For screening purposes, the total number of infected cells, the total area of bacteria in infected cells (expressed in pixels) and the ratio of infected cells (**Fig. 6a-b**) are the most useful parameters to determine the extent of infection. In typical kinetics of *M. tuberculosis* infection, the increase in the percentage of infected cells and the expansion of the average bacterial area per infected cell can be monitored over time.

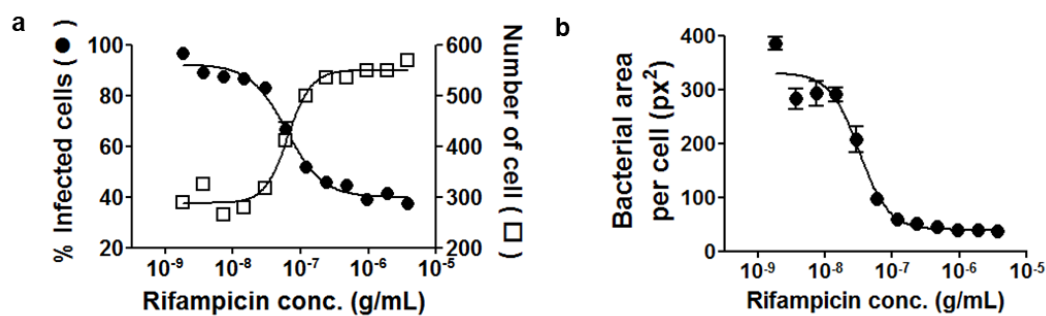


Fig. 6. Examples of dose-response curves, obtained using two-folds dilutions of various chemical modulators, on (a) the percentage of infected RAW264.7 cells and the cellular viability, determined by the number of cells and (b) on the bacterial growth, determined by the bacteria area (in pixel) of intracellular *M. tuberculosis*. All graphs represent the average of 3 experiments \pm SD. Fitting were obtained by least squares regression of a sigmoidal dose-response (variable slope) equation, using the GraphPad Prism software.

1. Set first the intensity threshold that will be used for cell/nucleus/membrane detection, using the associated fluorescent channel to yield the best detection in your staining condition (see **Note 23**). This could be achieved by manually checking that the cells/nuclei/membranes are correctly segmented, using 2-3 representative pictures.
2. Define host cells from the association of up to three populations: a population of nuclei, a population of cytoplasm and a population of membranes.
3. Use the different cellular populations to calculate all host-related parameters. The total cellular area (expressed in pixels) and the total number of cells are the most useful parameters to determine the cellular viability (**Fig. 6a**).
4. Segment mycobacteria images using a “spot” detection algorithm. Define threshold intensity, *i.e.* pixels with intensity above the threshold, as small objects considered as mycobacteria with high intensities compared to the background, and identify as objects within the cytoplasm region (**Fig. 5b**). Remove the background and normalize pixel intensities between images.
5. Cluster remaining adjacent pixels together to generate a list of objects. Calculate the area of each object (see **Note 24**).
6. Step through the list of identified cellular objects to determine which bacterium is located within each object. Store the data in arrays or lists.

7. Calculate the total area (expressed in pixels) of intracellular bacteria labelled (**Fig. 5b**).
8. Calculate all infection-related parameters. Define “infected” and “non-infected” populations by using the area of mycobacteria detected within cells as reference criteria. Calculate the percentage of infected cells.

3.27. Image-based analysis for quantification of phagosomal acidification using LysoTracker reagent (Song et al., 2017)

1. Proceed first to cell and mycobacteria detection and quantification (see **steps 1 to 8** in Subheading 3.26).
2. Segment acidified vacuoles using a “spot” detection algorithm similar to the one used for mycobacteria. Use “LysoTracker negative” (non-infected cells) and “LysoTracker positive” (heat-killed bacteria) controls to set intensity thresholds.
3. Define four distinct cellular populations, “infected” and “non-infected” cells, with or without acidic compartments.
4. Calculate subsequently the co-localization between mycobacteria and acidic vacuoles in infected cells as to define two mycobacterial populations, “LysoTracker positive” (overlapping acidic region) and “negative” (no overlap).

3.28. Image-based analysis for quantification of phagosomal acidification using pHrodo reagent (Queval et al., 2017)

1. Proceed first to cell and mycobacteria detection (see **steps 1 to 4** in Subheading 3.26).
2. Extend the size of GFP-bacteria spots by 4 pixels of each spot leading to define “bacterial phagosome region” as region of interest (ROI).
3. Detect pHrodo fluorescence intensity (in the red channel) in previously defined ROI.
4. Plot data as mean relative pHrodo intensity per phagosome.
5. Image and use the same analysis parameters to detect labelled bacteria incubated in CO₂ independent medium at various pH (pH10 to pH4).
6. Measure pHrodo mean intensity in corresponding detected bacteria (at least n=100).
7. Plot intensity as a median pHrodo intensity per bacterium to obtain standard curve representing pHrodo relative intensity per bacterium in function of pH.

8. Estimate the relative phagosomal pH obtained by converting pHrodo relative intensity per phagosome in pH value according to the standard curve.

3.28. Image-based analysis for quantification of phagosomal vacuole rupture (Song et al., 2017)

1. Segment first cells, using the combined green (CCF4-AM) and blue (CCF4) channels, in order to get an exhaustive cell detection. (Some cells are not properly loaded with CCF4-AM but displayed a significant CCF4 staining). Use “no vacuole rupture” (heat-killed bacteria) and “vacuole rupture” (Bafilomycin) controls to set intensity thresholds.
2. Define the “cell region” as region of interest (ROI).
3. Measure the green and blue mean intensities for each cellular object detected and calculate the ratio of blue (CCF4)/green (CCF4-AM) intensities.
4. Segment spot on the red channel to detect the RFP-labeled mycobacteria using a “spot” detection algorithm. Define threshold intensity, *i.e.* pixels with intensity above the threshold, and identify as objects within the previously defined ROI.
5. Calculate all host-related parameters. Define “infected” and “non-infected” cell populations and mean ratio of intensities of CCF4/CCF4-AM for the two distinct cellular populations.

3.29. Image-based analysis for quantification of oxidative stress by Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

1. Proceed first to cell and mycobacteria detection and quantification (see **steps 1 to 8** in Subheading 3.26).
2. Define a manual threshold corresponding to the basal level of ROS, using “non-infected” cell population and positive control for oxidative stress positive (LPS+IFN γ) to set intensity thresholds.
3. Detect and segment spot on the ROS detection channel in the cytoplasm as region of interest (ROI), using a “spot” detection algorithm similar to the one used for mycobacteria.
4. Measure intensity properties (Mean, Max, Sum) and ROS area (in pixels) for each ROS spot detected.
5. Calculate all host-related parameters for all cells. Define “infected” and “non-infected” cell populations and (i) number of ROS spots and (ii) ROS area per cell for the two distinct cellular populations.

3.30. Image-based analysis for quantification of oxidative stress by intracellular Nitric Oxides (NO) detection (Queval et al., 2016)

1. Proceed first to cell and mycobacteria detection and quantification (see **steps 1 to 8** in Subheading 3.26).
2. Define a manual threshold corresponding to the basal level of NO, using “non-infected” cell population, “NO inhibitor” and “NO inducer” controls to set intensity thresholds.
3. Detect and segment round shaped spots with a given maximum radius on the NO detection channel in the cytoplasm as region of interest (ROI), using a “spot” detection algorithm similar to the one used for mycobacteria.
4. Measure intensity properties (Mean, Max, Sum) and NO area (in pixels) for each NO spot detected.
5. Calculate all host-related parameters for all cells (corresponding to single cell analysis). Define “infected” and “non-infected” cell populations and (i) number of NO spots and (ii) NO area per cell for the two distinct cellular populations.

3.31. Image-based analysis for quantification of zinc poisoning (Song et al., 2017)

1. Proceed first to cell and mycobacteria detection and quantification (see **steps 1 to 8** in Subheading 3.26).
2. Define a manual threshold corresponding to the basal level of zinc, using “non-infected” cell population, “non-infected cell” and “infected cell” controls to set intensity thresholds.
3. Detect and segment metal deposits, similarly to the bacteria segmentation, using a “spot” detection algorithm.
4. Calculate the co-localization between bacteria and metal deposits using the Mander’s Coefficient, yielding “FluoZin-3 positive” and “negative” bacterial populations.
5. Calculate all host-related parameters. Define “infected” and “non-infected” cell populations and further cluster according to the presence of FluoZin-3 deposits (FluoZin-3 positive *versus* negative mycobacteria).
6. Image and use the same analysis parameters to detect intracellular Zinc indicator controls (range from 10 to 100 μ M).
7. Measure FluoZin-3 mean intensity in corresponding indicator salt concentration.

8. Plot intensity as median FluoZin-3 intensity to obtain standard curve representing FluoZin-3 relative intensity in function of Zinc concentration.
9. Estimate the relative Zinc concentration obtained for infected cells by converting FluoZin-3 relative intensity per intracellular bacteria in relative Zinc concentration according to the standard curve.

3.32. Image-based analysis for quantification of lipid body accumulation (Eik Hoffmann et al., 2019)

1. Segment host cells, using Hoechst signal and LipidTox intensities to detect nuclei and cell borders, respectively.
2. Detect bacteria using bacteria fluorescence and a “spot” detection algorithm. Define threshold intensity, *i.e.* pixels with intensity above the threshold, as small objects considered as mycobacteria with high intensities compared to the background, and identify as objects within the cytoplasm region. Remove the background and normalize pixel intensities between images.
3. Detect lipid droplets (LDs) using LipidTox dye signal intensities.
4. Select specifically LDs by filtering and refinement using the algorithm “Find Micronuclei” from Columbus software and based on size-to-signal intensity and area of LD candidates. Separate them from out-of-focus and background signal intensities.
5. Quantify intracellular bacteria as intracellular *Mtb* area with number of pixels.
6. Calculate the total area (expressed in pixels) of intracellular bacteria labelled.
7. Calculate all infection-related parameters. Define “infected” and “non-infected” populations by using the area of mycobacteria detected within cells as reference criteria. Calculate (i) the percentage of “LD-positive” cells and (ii) the average LD number per cell.

4. Notes

1. For antibiotic selection: *M. tuberculosis* H37Rv-GFP and *M. tuberculosis* H37Ra-GFP are recombinant strains bearing an integrative plasmid (based on Ms6) carrying a GFP gene constitutively expressed from the pBlaF promoter (Christophe et al., 2009) and conferring resistance to hygromycin B. Others strains can be used: *M. tuberculosis* H37Rv-RFP is a recombinant strain bearing a replicative plasmid (based on pMV261) carrying a pDSRed1-1 (Clontech) gene under the Hsp60 promoter and conferring resistance to kanamycin. *M.*

tuberculosis Beijing GC1237-mCherry are recombinant strains bearing the pCherry10 plasmid (Carroll et al., 2010), conferring resistance to hygromycin B.

2. Routinely, we used either PerkinElmer CellCarrier-384 (Optically Clear Bottom, tissue culture treated, black, sterile with lid;) or Greiner Bio-one, Cat 781091 (384-well polystyrene cell culture microplates, Flat Bottom, μ Clear, black, sterile with lid).
3. Cells can be stored in liquid nitrogen for long-term storage. Typically, 1 mL aliquots containing 5×10^6 RAW264.7, THP-1, A549, L929 or J558 cells in FBS containing 10% DMSO are prepared during cell isolation. After thawing the aliquot and 10-fold dilution into pre-warmed (37°C) RPMI-FBS, cells are pelleted by centrifugation for 5 min at $240 \times g$ at room temperature to remove DMSO and resuspended in fresh, pre-warmed RPMI-FBS.
4. Fetal bovine serum (FBS) can interfere with the cell phenotypes. Perform infection assays with your new FBS stock in comparison with the previous one to compare the bacterial growth.
5. Macrophage and dendritic progenitor cells can be stored in liquid nitrogen for longer term storage.
6. Before using a new batch of growth factor-enriched supernatant, the percentage of L929-derived M-CSF conditioned medium needs to be determined to obtain good differentiation of isolated monocytes into macrophages. We test different percentages of M-CSF on monocytes and follow the described protocol for murine primary macrophage culture (see **Subheading 3.8**). Cell suspensions are then incubated with either specific antibodies of macrophage surface markers (detection of F4/80, CD11b and MHC-I) and specific antibodies to cell surface markers, which should be absent in BMDM (e.g. CD11c). We select the percentage, which shows the best differentiation rate using fluorescence-activated cell sorting (FACS).
7. Before using a new batch of growth factor-enriched supernatant, the percentage of J558-derived GM-CSF conditioned medium needs to be determined to obtain good differentiation of hematopoietic stem cells into dendritic cells. We usually test different percentages of GM-CSF on hematopoietic stem cells and follow the described protocol for murine primary dendritic cell culture (see **Subheading 3.9**). Cell suspensions are then incubated with either specific antibodies of dendritic cell surface markers (detection of F4/80, CD11c and MHC-II) and specific antibodies to cell surface markers, which should be absent in immature BMDC (e.g. increased expression of MHC-I). We select the batch concentration, which shows the best differentiation rate using fluorescence-activated cell sorting (FACS). GM-CSF concentration in the supernatant can also be determined using an Elisa kit (R&D Systems).

8. Working in RNase-free conditions: always wear clean lab coat and gloves. Clean the workbench, the PSM and all equipment with RNase AWAY solution prior to the experiment. Use certified RNase-free tips, pipets, and Eppendorf tubes.
9. The use of a liquid handling, as Echo Acoustic Liquid Handling Technology (Labcyte), could be recommended at this step. This innovative technology allows to transfer smaller volumes than 250 nL of 10 μ M siRNA or compound to have for example a final concentration of 50 nM in a final volume of 50 μ L) and produces faster and more accurate results.
10. The use of an automatic plate washer/dispenser is recommended at this step, to ensure fast, reproducible and homogenous washing/distribution.
11. We recommended using borosilicate amber glass vials with hermetic polypropylene PVDF or PTFE-coated screw caps. Always work in a fume hood, wearing a lab coat and gloves. As DMSO is very hygroscopic, it is also advised to work under a light flow of nitrogen to avoid hydration of the solvent.
12. The LysoTracker protocol indicates that “the green LT variant (DND-26) does not allow pH-sensitive acidification measurements and can only be used to monitor phago-lysosomal fusion events. The rates of uptake into living cells can occur within seconds. Unfortunately, these lysosomal probes can exhibit an “alkalizing effect” on the lysosomes, such that longer incubation with this probe can induce an increase in lysosomal pH. This probe is useful as pH indicator only when it is incubated with cells for 1–5 min at 37°C.”
13. Bafilomycin is a specific inhibitor of vacuolar H⁺ ATPase and inhibits lysosomal acidification, it can be used to block bacterial escape.
14. The LipidTOX protocol given by the supplier recommends to dilute 1000X LipidTOX neutral lipid stain 1:1000 in DPBS to make a 1X solution. Routinely, we used LipidTOX neutral lipid stain 1:2000 diluted, as it is sufficient to stain the cells.
15. You can develop image analysis pipelines by yourself using any object-oriented computer language (C++, Java, Python, or similar), but it is advised to use a dedicated software featuring pre-defined detection algorithms. We used the Columbus system (version 2.3.1; Perkin Elmer) software to develop our own multi-parameter scripts with the best flexibility.
16. For the infection assays, it is recommended to maintain the bacterial culture for up to 14 days before being used, in order to reach the exponential phase of bacterial growth.

17. As the presence of aggregates in the mycobacterial inoculum could lead to a heterogeneous invasion process, it is important to carefully prepare the bacteria suspensions. To remove bacterial aggregates, centrifuge at $220 \times g$ for 2 min. You should see a well dispersed suspension without aggregates. You may repeat the centrifugation step if needed.
18. You can adapt the bacterial concentration to reach higher or lower multiplicity of infection (MOI), as required. The MOI of 2 is generally used with macrophage cell lines. A MOI of 1 is generally preferred with human and murine primary cells, but MOI of 5 up to 20 are recommended for the infection of A549 epithelial cells.
19. While monocytes can be stored in liquid nitrogen for several months, it is not recommended to freeze the isolated CD14⁺ fraction as it could strongly decrease the yield of the overall purification due to cell mortality.
20. An alternative way for infection is possible on adherent differentiated THP-1 macrophage cells. For this infection assay, 20×10^6 cells in suspension in 20 mL of pre-warmed RPMI-FBS is first differentiated with 50 ng/mL PMA in a 75 cm² flask and incubated for three days, as described in **steps 8 to 10** in Subheading 3.3. Remove the medium and add directly a bacteria suspension in pre-warmed RPMI-FBS on the cell monolayer to reach MOI ranged from 2 up to 5. Incubate for 2h at 37°C, 5% CO₂ to allow macrophage infection. Wash and detach the infected cells as described in **steps 11 to 17** in Subheading 3.3. Centrifuge at $220 \times g$ for 10 min and suspend the cell pellet in RPMI-FBS to adjust cell suspension to 5×10^5 cells/mL. Dispense 40 μ L of infected cells per well (corresponding to 2×10^4 THP-1 macrophages/well) and follow the **steps 16 to 21** in Subheading 3.12.
21. An alternative way for infection is possible: bacteria (20 μ L) and BMDM (30 μ L) could be seeded together on the day of experiment. 2 h are enough to allow macrophage adhesion.
22. An alternative assay is possible to identify new compounds possibly involved in impairing or inducing of zinc accumulation inside of phagosome in macrophage. For this assay, add directly 20 μ L compounds on 40 μ L cells on day one. Incubate assay plate at 37°C in 5% CO₂ for 4 h. Remove the supernatant from the plates using a multichannel pipette. Infect cells by adding 20 μ L per well of H37Rv-RFP to have a final MOI of 1 in RPMI-FBS (see **Subheading 3.1**). And follow the **steps 5 to 19** in Subheading 3.22.
23. The easiest algorithm for a fast cellular or organelle detection is the threshold-based method, similar to that used for bacteria detection. However, this method usually cannot yield a list of individualized objects, especially when objects are too close to each other, which generally

happens at low magnification (20×). In this case, a more precise algorithm based on contrast, shape and/or intensity has to be applied. The use of already available algorithms is then recommended, as their *de novo* development can be time-consuming.

24. Due to the tendency of mycobacteria to form clumps, the bacterial area parameter is more reliable than the actual counting of the bacteria. The total bacterial area, expressed in pixels, is the most useful parameter to determine the extent of bacterial growth

References

1. Soldati T, Neyrolles O (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* 13 (8):1042-1052. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01358.x
2. Christophe T, Jackson M, Jeon HK, Fenistein D, Contreras-Dominguez M, Kim J, Genovesio A, Carralot JP, Ewann F, Kim EH, Lee SY, Kang S, Seo MJ, Park EJ, Skovierova H, Pham H, Riccardi G, Nam JY, Marsollier L, Kempf M, Joly-Guillou ML, Oh T, Shin WK, No Z, Nehrbass U, Brosch R, Cole ST, Brodin P (2009) High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS Pathog* 5 (10):e1000645. doi:10.1371/journal.ppat.1000645
3. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L (2014) Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159 (7):1497-1509. doi:10.1016/j.cell.2014.11.024
4. Simeone R, Sayes F, Song O, Groschel MI, Brodin P, Brosch R, Majlessi L (2015) Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* 11 (2):e1004650. doi:10.1371/journal.ppat.1004650
5. Philips JA, Ernst JD (2012) Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol* 7:353-384. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132458
6. Conrad C, Wunsche A, Tan TH, Bulkescher J, Sieckmann F, Verissimo F, Edelstein A, Walter T, Liebel U, Pepperkok R, Ellenberg J (2011) Micropilot: automation of fluorescence microscopy-based imaging for systems biology. *Nat Methods* 8 (3):246-249. doi:10.1038/nmeth.1558
7. Christophe T, Ewann F, Jeon HK, Cechetto J, Brodin P (2010) High-content imaging of *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages: an in vitro model for tuberculosis drug discovery. *Future Med Chem* 2 (8):1283-1293. doi:10.4155/fmc.10.223
8. Queval CJ, Song OR, Carralot JP, Saliou JM, Bongiovanni A, Deloison G, Deboosere N, Jouny S, Iantomasi R, Delorme V, Debie AS, Park SJ, Gouveia JC, Tomavo S, Brosch R, Yoshimura A, Yeramian E, Brodin P (2017) *Mycobacterium tuberculosis* Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep* 20 (13):3188-3198. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.101
9. Queval CJ, Song OR, Delorme V, Iantomasi R, Veyron-Churlet R, Deboosere N, Landry V, Baulard A, Brodin P (2014) A microscopic phenotypic assay for the quantification of intracellular mycobacteria adapted for high-throughput/high-content screening. *J Vis Exp* (83):e51114. doi:10.3791/51114
10. Song OR, Deboosere N, Delorme V, Queval CJ, Deloison G, Werkmeister E, Lafont F, Baulard A, Iantomasi R, Brodin P (2017) Phenotypic assays for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cytometry A* 91 (10):983-994. doi:10.1002/cyto.a.23129
11. Song OR, Queval CJ, Iantomasi R, Delorme V, Marion S, Veyron-Churlet R, Werkmeister E, Popoff M, Ricard I, Jouny S, Deboosere N, Lafont F, Baulard A, Yeramian E, Marsollier L, Hoffmann E, Brodin P (2018) ArfGAP1 restricts *Mycobacterium tuberculosis* entry by controlling the actin cytoskeleton. *EMBO Rep* 19 (1):29-42. doi:10.15252/embr.201744371
12. Stanley SA, Barczak AK, Silvis MR, Luo SS, Sogi K, Vokes M, Bray MA, Carpenter AE, Moore CB, Siddiqi N, Rubin EJ, Hung DT (2014) Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth. *PLoS Pathog* 10 (2):e1003946. doi:10.1371/journal.ppat.1003946
13. Guo M, Hartlova A, Dill BD, Prescott AR, Gierlinski M, Trost M (2015) High-resolution quantitative proteome analysis reveals substantial differences between phagosomes of RAW 264.7 and bone marrow derived macrophages. *Proteomics* 15 (18):3169-3174. doi:10.1002/pmic.201400431
14. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15 (1):261-267. doi:0092-8674(78)90101-0 [pii]

15. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26 (2):171-176
16. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 (5):1417-1423
17. Stanley ER, Heard PM (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* 252 (12):4305-4312
18. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P (1997) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185 (2):317-328. doi:10.1084/jem.185.2.317
19. Queval CJ, Song OR, Deboosere N, Delorme V, Debie AS, Iantomasi R, Veyron-Churlet R, Jouny S, Redhage K, Deloison G, Baulard A, Chamaillard M, Loch C, Brodin P (2016) STAT3 Represses Nitric Oxide Synthesis in Human Macrophages upon Mycobacterium tuberculosis Infection. *Sci Rep* 6:29297. doi:10.1038/srep29297
20. Hoffmann E, Machelart A, Belhaouane I, Deboosere N, Pauwels A-M, Saint-André J-P, Song O-R, Jouny S, Poncet A, Marion S, Beyaert R, Majlessi L, Brodin P (2019) IRG1 controls immunometabolic host response and restricts intracellular Mycobacterium tuberculosis infection. *bioRxiv*:761551. doi:10.1101/761551
21. Carroll P, Schreuder LJ, Muwanguzi-Karugaba J, Wiles S, Robertson BD, Ripoll J, Ward TH, Bancroft GJ, Schaible UE, Parish T (2010) Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PloS one* 5 (3):e9823. doi:10.1371/journal.pone.0009823

Tables

Table 1. Recommended conditions for siRNA transfection in 384-well microplate

Cell type	Transfection reagent name	Transfection reagent volume/well	DPBS volume/well	siRNA final concentration	Cells/well	Medium
RAW264.7	LTX	0.1 μ L	9.9 μ L	80 nM	2,000	40 μ L ^a
BMDC	LTX	0.1 μ L	9.9 μ L	50 nM	40,000	40 μ L ^b
PBMC CD14 ⁺	Hiperfect	0.9 μ L	9.1 μ L	80 nM	20,000	40 μ L ^c
A549	RNAiMax	0.1 μ L	9.9 μ L	20 nM	1,500	40 μ L ^a
THP-1	RNAiMax	0.1 μ L	9.9 μ L	50 nM	40,000	40 μ L ^a

^aComplete RPMI medium

^bComplete RPMI medium containing 40 ng/mL of murine GM-CSF.

^cComplete RPMI medium. Supplement with 40 ng/mL of *h*M-CSF 6 h after cell plating.

Table 2. Excitation and emission wavelength for common fluorophores

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)
DAPI	405	450
Hoechst 33342	405	450
HCS CellMask Blue Stain	405	450
CCF4-AM	405	450-540
GFP	488	540
LysoTracker Green DND-26 dye	488	540
CellROX [®] Green Oxidative Stress Reagent	488	540
FluoZin [™] -3, AM, cell permeant	488	540
HCS LipidTox Green Neutral Lipid Stain	488	540
RFP	561	600
LysoTracker Red DND-99 dye	561	600
pHrodo [™] Red succinimidyl (NHS) Ester	561	600
SYTO 60 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain	640	690
HCS CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain	640	690
Alexa Fluor 660 Phalloidin Stain	640	690
CellROX [®] Deep Red Oxidative Stress Reagent	640	690
ROS-ID [®] Red NO Detection Reagent	640	690
HCS LipidTox Far Red Neutral Lipid Stain	640	690

