

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2018

THESE 2018/TOU3/2049

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Marion PAVLOVIC

**PERSPECTIVES D'UTILISATION DES LYMPHOCYTES MAIT
EN IMMUNOTHERAPIE ANTI-INFECTIEUSE**

Le 21 Septembre 2018

Directeur de thèse : Dr TREINER Emmanuel

JURY

Président : Pr. AYYOUB Maha
1er assesseur : Dr. TREINER Emmanuel
2ème assesseur : Dr. COLACIOS Céline
3ème assesseur : Dr. DEBIN Arnaud

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 08
janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie – Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie – Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLA NA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie – Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme JUILLARD-CONDA T B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDA L A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. Olichon A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Remerciements

J'adresse mes sincères et chaleureux remerciements :

A Madame AYYOUB qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse et qui, spontanément, malgré un emploi du temps chargé et de nombreuses sollicitations, a répondu positivement à ma demande.

A Monsieur TREINER, qui m'a accueillie en stage de MASTER, IMMUNOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES, qui m'a fait confiance tout au long de ce stage, qui m'a guidée dans la réalisation des tâches confiées et qui a accepté de diriger ma thèse.

A Madame COLACIOS qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse et qui m'a fait bénéficier de ses conseils quant aux questions d'organisation pratique de la thèse et qui s'est montrée très disponible à mon égard.

A Monsieur DEBIN qui, à la demande de Monsieur TREINER, a accepté spontanément d'être membre de mon jury de thèse en tant que professionnel de l'industrie.

A Monsieur PASQUIER, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Toulouse, qui m'a reçue et qui a autorisé mon inscription en 6^{ème} année de Pharmacie me permettant ainsi de présenter ma thèse.

A l'ensemble des enseignants du MASTER IMMUNOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES et en particulier à Monsieur Van MEERWIJK pour avoir accepté ma candidature en deuxième année.

A l'ensemble des enseignants de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon, pour leur enseignement tout au long de mon parcours en Pharmacie.

A tous mes amis du MASTER IMMUNOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES, en particulier Arantxa, Emeline, et Chloé pour leur soutien indéfectible, pour leurs encouragements dans les moments de doute, et leur présence chaleureuse qui m'ont été précieux.

A tous mes amis de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Besançon, en particulier Nathalie, Audrey, Mélissa, Faouzi, Julien, et François pour leur présence à mes côtés, pour tous les moments partagés de travail et de détente.

Et enfin, j'adresse mes remerciements affectueux à mes parents et à ma sœur Audrey, qui ont suivi mon parcours avec attention et intérêt et qui, tout au long de mon cursus universitaire, ont su être à mon écoute et m'encourager avec constance.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières	4
Liste des figures	8
Liste des abréviations	9
Introduction.....	11
Partie 1 : Réponse immunitaire anti-infectieuse.....	15
1. Réponse immunitaire innée.....	15
1.1. Barrières anatomiques	15
1.2. Système du complément.....	16
1.3. Cellules de l'immunité innée.....	16
1.3.1. Phagocytes	17
1.3.2. Cellules cytotoxiques	18
2. Réponse immunitaire adaptative	18
2.1. Immunité cellulaire	18
2.2. Immunité humorale.....	21
3. Effecteurs immunitaires à l'interface entre les réponses innées et adaptatives.....	23
3.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$ (2).....	23
3.2. Lymphocytes NKT (3)(4)	24
3.3. Lymphocytes MAIT.....	24
4. Réponse immunitaire aux bactéries à multiplication extracellulaire	25
5. Réponse immunitaire aux bactéries à multiplication intracellulaire.....	26
6. Réponse immunitaire antivirale	26
7. Réponse immunitaire antiparasitaire.....	27
8. Réponse immunitaire antifongique.....	27
9. Conclusion.....	28
Partie 2 : Immunothérapie anti-infectieuse	29
A. Historique et expérimentations de l'immunothérapie anti-infectieuse	29
1. Définition.....	29
2. Sérothérapie	29
3. Immunothérapie basée sur les anticorps.....	30
3.1. Immunoglobulines polyvalentes et spécifiques	31
3.2. Anticorps monoclonaux.....	32
3.2.1. Cocktails d'anticorps monoclonaux.....	33

3.2.2. Super-anticorps.....	33
4. Immunothérapie active : vaccination.....	35
5. Immunothérapie basée sur les cytokines et facteurs de croissance.....	37
6. Immunothérapie basée sur les inhibiteurs de checkpoints immunitaires PD-1 et CTLA-4	38
7. Agonistes de TLR	39
8. Immunothérapie adoptive.....	40
8.1. Transfert adoptif de lymphocytes T	40
8.1.1. LT helper.....	40
8.1.2. CTL.....	41
8.1.3. LT à récepteur antigénique chimérique (CAR).....	42
8.2. Transfusion de granulocytes	43
8.3. Transfert adoptif de cellules NK	44
8.4. Transfert adoptif de DC	44
8.5. Transfert adoptif de LB.....	44
9. Conclusion.....	45
B. Immunothérapie antibactérienne : exemple de la tuberculose.....	46
1. Généralités sur la tuberculose	46
1.1. Définition et épidémiologie	46
1.2. Description de l'agent pathogène.....	47
1.3. Clinique et physiopathologie	47
2. Prise en charge de la tuberculose	48
3. Réponse immunitaire à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (39)(40)(Figure 4)	49
3.1. Réponse immunitaire innée.....	50
3.1.1. Reconnaissance de Mtb	50
3.1.2. Activation intracellulaire	51
3.1.2.1. Macrophages alvéolaires (42)	51
3.1.2.2. Polynucléaires neutrophiles.....	52
3.2. Délai d'initiation de la réponse immunitaire adaptative.....	52
3.3. Réponse immunitaire adaptative.....	53
3.3.1. Lymphocytes T CD4 ⁺	53
3.3.2. Lymphocytes T CD8 ⁺	54
3.3.2.1. Lymphocytes T CD8 ⁺ non conventionnels à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative	54
3.3.2.1.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$	54
3.3.2.1.2. Lymphocytes MAIT	55
3.3.3. Lymphocytes B	56

3.4. Progression de la tuberculose latente vers la tuberculose maladie : réactivation.....	58
4. Thérapies préventives et immunothérapies de la tuberculose	60
4.1. Vaccination.....	60
4.1.1. Vaccin préventif : BCG.....	60
4.1.1.1. Généralités	60
4.1.1.2. Réponse immunitaire innée au BCG (53).....	62
4.1.1.3. Réponse immunitaire adaptative au BCG (53)	63
4.1.2. Vaccins en cours d'essais.....	64
4.1.2.1. Vaccins en cours d'essais cliniques	65
4.1.2.1.1. Vaccins à germe entier	66
4.1.2.1.2. Vaccins sous-unitaires : vecteurs viraux	67
4.1.2.1.3. Vaccins sous-unitaires : protéines de fusion et adjuvants.....	68
4.1.2.1.4. Vaccin thérapeutique RUTI (phase IIa)	69
4.1.2.2. Vaccins en essais précliniques.....	70
4.1.3. Nouvelles approches de conception des vaccins.....	71
4.1.3.1. Identification de nouvelles cibles antigéniques.....	71
4.1.3.2. Utilisation de nouveaux adjuvants	72
4.1.3.3. Manipulation de la réponse humorale	72
4.1.3.4. Autres voies d'administration.....	73
4.1.3.5. Nouveaux modèles d'expérimentation.....	73
4.2. Immunothérapie	74
4.2.1. Immunothérapie basée sur les anticorps	74
4.2.2. Immunothérapie basée sur les cytokines et inhibiteurs de cytokines....	75
4.2.2.1. IL-2	75
4.2.2.2. Aérosol d'IFN γ	76
4.2.2.3. IL-12	76
4.2.2.4. IL-24	77
4.2.2.5. IFN de type I.....	77
4.2.2.6. Anticorps anti-IL-4	78
4.2.2.7. Anticorps anti-TGF β	78
4.2.3. Modulateurs de la voie PD-1/PD-L1.....	78
4.2.4. Thérapie cellulaire.....	79
4.2.5. Thérapie génique	79
4.2.5.1. Adénovirus codant pour le GM-CSF.....	79
4.2.5.2. Adénovirus codant pour TNF α , β -défensine 3, ou LL-37 (86)	79

4.2.6. Immunothérapie basée sur les peptides antimicrobiens	80
4.2.7. Hormones	80
4.2.8. Modulation de l'autophagie	81
4.2.9. Vitamine D	81
4.2.10. Autres stratégies en immunothérapie	81
5. Conclusion	83
Partie 3 : Travail de recherche au laboratoire : Rôle de l'IFNα dans l'activation des lymphocytes MAIT	84
Introduction	84
Matériels et méthodes	91
Obtention des PBMC.....	91
Congélation et décongélation des PBMC	91
Stimulation des PBMC pour une analyse fonctionnelle	91
Marquages membranaires et intracellulaires.....	91
Analyse cytométrique de l'expression de pSTAT4 (Phosphoflow)	92
Tri cellulaire	92
Cytométrie	93
Analyse de la translocation nucléaire de pSTAT4	93
RT-PCR semi-quantitative (qRT-PCR)	94
Statistiques.....	95
Résultats	95
Stratégie d'analyse des MAIT au sein des PBMC	95
Les MAIT répondent directement à la costimulation par l'IFN α	99
Expression des gènes d'IFNAR1/2 dans les MAIT et les LT CD8 ⁺ mémoires CD161 ⁻	100
La stimulation des MAIT par l'IFN α active une voie de signalisation intracellulaire dépendante de STAT4 et activant sa phosphorylation	100
pSTAT4 est localisé dans le noyau des lymphocytes CD8 ⁺ CD161 ⁺ et CD161 ⁻ après stimulation par l'IFN α	102
Expression de gènes régulés par l'IFN α et l'IL-12 dans des MAIT stimulés par l'IFN α	103
Discussion et perspectives	105
Conclusion	108
Bibliographie.....	110

Liste des figures

Figure 1. Polarisation des LT CD4 ⁺	20
Figure 2. Représentation schématique du TCR endogène et du D-CAR composé d'une région variable à chaîne simple (d'après (30)).....	43
Figure 3. Structure d'un granulome (d'après (51))	57
Figure 4. Réponse immunitaire à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (d'après (52))	60
Figure 5. Vaccins en cours d'essais cliniques au 28/03/2018.....	66
Figure 6. Différents protocoles de vaccination au cours de la réponse immunitaire à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (d'après (59))	70
Figure 7. Interactions entre les CPA et les MAIT en présence d'une bactérie (d'après (48))	85
Figure 8. Interactions entre les CPA et les MAIT en présence d'une particule virale (d'après (48)).....	87
Figure 9. Stratégie d'analyse des MAIT au sein des PBMC.....	96
Figure 10. L'IFN α agit synergiquement avec les anti-CD3 pour stimuler les LT CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD161 ⁺	98
Figure 11. Les MAIT répondent directement à la costimulation par l'IFN α	99
Figure 12. Expression des gènes d'IFNAR 1 et 2 dans les lymphocytes MAIT et les LT CD8 ⁺ CD161 ⁻ mémoires	100
Figure 13. La stimulation des MAIT par l'IFN α active une voie de signalisation intracellulaire dépendante de STAT4 et activant sa phosphorylation.....	101
Figure 14. Localisation de pSTAT4 dans les LT CD8 ⁺ CD161 ⁺ et CD161 ⁻ après stimulation par l'IFN α	103
Figure 15. Expression de gènes régulés par l'IFN et l'IL-12 dans des MAIT stimulés par l'IFN α	104

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Acm	Anticorps monoclonal
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN	Acide desoxyribonucléique
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	Acide ribonucléique
ARV	Antirétroviral
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCR	B-cell receptor
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CRAMP	Cathelicidin-related antimicrobial peptide
CSM	Cellules stromales mésenchymateuses
CTL	Cytotoxique T lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DC	Cellule dendritique
DHEA	Déhydroépiandrostérone
EBV	Epstein-Barr virus
ESAT-6	Early secreted antigenic target of 6kDa
ESX-1	ESAT-6 secretion system-1
Fab	Antigen-binding fragment
Fc	Crystallizable fragment
FDA	Food and drug administration
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor
Grz	Granzyme
HCV	Virus de l'hépatite C
HDT	Host-directed therapies
HPV	Papillomavirus humain
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgIV	Immunoglobuline intraveineuse
IL	Interleukine
INH	Isoniazide
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LB	Lymphocyte B
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LT _{FH}	LT follicular helper
LTh	LT helper
LTreg	LT régulateur
MA	Macrophage alvéolaire
MAIT	Lymphocytes T invariants associés aux muqueuses
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
MICA/B	MHC class I-related chain A/B
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NFκB	Nuclear factor-kappa B

NK	Natural killer
NKG2D	Natural-killer receptor group 2 member D
NO	Nitric oxide
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-1	Programmed cell death-1
PD-L1	Programmed cell death-1 ligand
PNN	Polynucléaire neutrophile
PRR	Pattern recognition receptor
RIF	Rifampicine
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SIV	Simian immunodeficiency virus
TCR	T-cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VRS	Virus respiratoire syncytial
WT	Wild type

Introduction

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a recensé, en 2016, plus de 10 millions de décès par maladies infectieuses. Elles représentent alors la première cause de mortalité mondiale.

Elles sont causées par des microorganismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons qui pénètrent et se multiplient dans l'organisme. Elles peuvent se transmettre directement ou indirectement d'un organisme à un autre organisme et être à l'origine d'épidémies et de pandémies.

Dès la mise en évidence des micro-organismes, des techniques et substances capables de les tuer ou de stopper leur prolifération ont été recherchées.

Pour traiter les infections bactériennes, les antibiotiques sont utilisés en première intention. Ils constituent une classe thérapeutique originale qui cible, à concentration minimale, l'agent infectieux. Leur avantage principal repose sur leur toxicité faible et sélective. Ils ciblent les bactéries en agissant sur des composés qui leur sont spécifiques. En effet, les bactéries sont des procaryotes délimités par une paroi, une membrane cytoplasmique, et possédant un patrimoine génétique et des enzymes nécessaires à la synthèse protéique. Ainsi, les quatre cibles principales des antibiotiques sont la paroi (inhibition de sa synthèse), la membrane plasmique, l'ADN bactérien (inhibition de sa synthèse), et les ribosomes (inhibition de la synthèse protéique).

En France, dans les années 1960, un arsenal thérapeutique antibactérien était disponible. Dans les années 1980 on a observé un essoufflement de la recherche dans ce domaine, tandis que des résistances apparaissaient.

La résistance bactérienne, à l'origine d'un échec thérapeutique, peut être naturelle c'est-à-dire préexistante à la mise à disposition de l'antibiotique. Elle peut aussi être acquise par quelques souches d'une même espèce bactérienne après mutation ponctuelle d'un gène. Le matériel génétique est porté par des chromosomes, des plasmides ou des transposons ce qui a pour conséquence sa transmission de bactérie à bactérie et la sélection des bactéries résistantes. Quatre grands mécanismes de résistance acquise sont décrits : un mécanisme enzymatique (sécrétion d'enzyme détruisant l'antibiotique), ou une résistance par modification de

la cible (baisse d'affinité), par imperméabilité (défaut de pénétration de l'antibiotique), ou par efflux. Alors les bactéries sont classées en différentes catégories selon leur sensibilité aux antibiotiques.

De plus, la résistance a pour conséquences une augmentation de la morbidité et de la mortalité face à l'inadaptation thérapeutique, l'apparition de maladies nosocomiales avec prolongation des séjours hospitaliers et augmentation du coût économique, et un impact écologique de par l'utilisation d'antibiotiques à large spectre à l'origine de nouvelles résistances et de nouvelles souches bactériennes contre lesquelles aucun antibiotique n'est disponible. Ces bactéries multi-résistantes développées à l'hôpital se propagent de plus en plus en ville. Et depuis 20 ans, on observe une modification de l'épidémiologie des infections bactériennes avec une importante augmentation de la résistance des pathogènes dits « classiques » (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), et l'émergence de bactéries opportunistes.

Depuis les années 2000, face à l'importance de la résistance bactérienne, des plans nationaux de préservation des antibiotiques sont mis en place selon des recommandations institutionnelles avec une médiatisation importante. La décision de prescription et le choix d'un antibiotique doivent tenir compte de son spectre d'action, de sa pharmacocinétique, des risques d'effets indésirables et de toxicité, de son coût et de son impact écologique. Afin de préserver la sensibilité des antibiotiques les plus récents, la prise d'antibiotiques les plus anciens et de bonne sensibilité doit être systématique. La maîtrise des résistances consiste aussi à mettre à l'écart certains antibiotiques durant une période définie. Enfin, l'association d'antibiotiques permet de prévenir l'émergence de résistances.

Grâce à ces dispositions, on observe une diminution de 11,4 % de la consommation d'antibiotiques entre 2000 et 2015 (rapport ANSM 2017). Cependant, depuis 2010 on constate une augmentation de leur consommation de 5,4 %. De plus, on observe une augmentation du nombre de spécialités mais une baisse du nombre de molécules (diminution de plus de 20 % entre 2000 et 2015) à l'origine d'un appauvrissement progressif de l'offre et d'une baisse de l'éventail thérapeutique. On parle de désert des antibiotiques.

Le délai minimum d'apparition de nouvelles molécules antibiotiques est estimé à 15 ans, d'autres options thérapeutiques sont donc nécessaires et font l'objet de recherches.

Pour lutter contre les infections virales chroniques, les antiviraux sont utilisés à but curatif depuis les années 1980. Chaque étape du cycle de multiplication virale constitue une cible potentielle. Ainsi, les antiviraux agissent sur les phases initiales d'attachement, pénétration et décapsidation du virus dans les cellules infectées. Ils ciblent aussi les enzymes virales (polymérase, intégrase, transcriptase inverse...) en mimant, par leur structure, le substrat reconnu par ces enzymes ce qui conduit à leur dysfonctionnement. Ils inhibent alors la réplication et la synthèse des acides nucléiques viraux. Enfin, ils agissent sur la phase terminale du cycle viral en inhibant la maturation et la libération des virions. Cependant, les virus développent des mécanismes de résistance aux antiviraux en modifiant leur cible, ou en métabolisant des prodrogues d'antiviraux.

La résistance des agents pathogènes aux antibiotiques et aux antiviraux amène à reconsidérer d'anciennes thérapies et à développer la recherche afin d'envisager l'éradication du VIH/sida, du paludisme et de la tuberculose qui représentent les trois enjeux majeurs de santé publique désignés par l'OMS parmi les maladies infectieuses.

Actuellement, la recherche se base en partie sur l'immunothérapie dont le principe est de stimuler ou de renforcer la réponse immunitaire. En effet, face à toute agression antigénique l'organisme répond par l'activation du système immunitaire. Celui-ci a deux fonctions principales : la défense de l'organisme contre les dangers, ou la lutte contre les infections et le maintien de l'intégrité de l'organisme par le contrôle ou le rejet des cellules étrangères. Il se définit comme un ensemble de tissus, de cellules, et de molécules qui coopèrent pour fournir une réponse coordonnée. L'immunothérapie, en ciblant ces différents partenaires de l'immunité, permet de s'affranchir de la résistance des agents infectieux ; ceux-ci ne constituent pas la cible du traitement, il s'agit de l'hôte lui-même.

L'objectif de cette thèse est d'étudier la potentialité d'utilisation d'une sous-population lymphocytaire non conventionnelle, les lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT), en immunothérapie anti-infectieuse.

Cette thèse s'articulera en trois parties. Nous aborderons tout d'abord les bases de la réponse immunitaire anti-infectieuse. Puis, nous établirons un état des lieux des immunothérapies anti-infectieuses actuelles, et en cours d'essais. Pour cela nous nous appuierons dans un troisième temps sur l'exemple de la tuberculose. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus au laboratoire portant sur la capacité des interférons (IFN) de type I à costimuler les fonctions effectrices des MAIT.

Partie 1 : Réponse immunitaire anti-infectieuse

Une infection est le résultat de l'invasion d'un organisme vivant par des micro-organismes pathogènes : bactéries, virus, parasites, champignons. Elle provoque des altérations anatomiques et fonctionnelles qui résultent d'un déséquilibre entre la virulence de l'agent pathogène et les capacités du système immunitaire de l'hôte à la combattre.

Pour être efficace, l'immunité anti-infectieuse doit mettre en place des mécanismes permettant d'activer rapidement des réponses coordonnées et complémentaires qui assurent une protection contre des pathogènes d'une grande diversité. L'immunité anti-infectieuse fait intervenir des effecteurs variés lors de plusieurs phases consécutives. Un agent infectieux est confronté aux barrières anatomiques de l'hôte, puis aux défenses biochimiques incluant les facteurs solubles du système du complément et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, et enfin aux cellules spécialisées, phagocytaires (macrophages et polynucléaires neutrophiles PNN) et les cellules natural killer (NK) effectrices de la cytotoxicité, communiquant par l'intermédiaire de médiateurs cytokiniques. Si la réponse innée est inefficace pour contrôler l'infection et éliminer l'agent pathogène, elle alerte l'immunité adaptative qui déclenche une réponse cellulaire par l'intermédiaire des lymphocytes T (LT) et une réponse humorale via les lymphocytes B (LB), les plasmocytes et les anticorps (Ac) aboutissant dans la majorité des cas à l'éradication de l'infection.

1. Réponse immunitaire innée

1.1. Barrières anatomiques

Les agents pathogènes pénètrent dans l'organisme par voies cutanée, ou muqueuse. Les cellules épithéliales à jonctions serrées et/ou la sécrétion de mucus s'opposent à leur entrée. Les barrières chimiques correspondent à des sécrétions contenant des peptides et protéines à activité lytiques dont les défensines et le lysozyme. La flore commensale constitue une barrière microbiologique.

Si le pathogène franchit ces barrières, il est confronté dans les tissus aux défenses biochimiques de l'hôte et à l'activité des cellules résidentes et circulantes de l'immunité innée.

1.2. Système du complément

Le système du complément est composé d'une trentaine de protéines solubles ou membranaires activées en cascade qui interagissent entre elles et avec des membranes biologiques. Il peut être activé par trois voies différentes : la voie classique déclenchée par la liaison du complexe C1 à des immunoglobulines (Ig) ou à des ligands endogènes, la voie des lectines activée par la fixation d'un complexe MBL-MASP (mannan binding protein-mannan binding serine protease) à des résidus mannose à la surface des bactéries, et la voie alterne. Elles conduisent à la formation d'une C3 convertase clivée en C3a (anaphylatoxine) et C3b, puis d'une C5 convertase qui initie l'assemblage et la formation du complexe d'attaque membranaire. Il s'insère dans les membranes où il forme un pore entraînant la lyse du pathogène.

La fraction C3b a aussi une activité d'opsonisation de la cible en la recouvrant ce qui facilite la phagocytose par les cellules exprimant un récepteur de C3b. L'activation du système du complément conduit à la phagocytose des pathogènes, et à la neutralisation des virus.

1.3. Cellules de l'immunité innée

La réponse innée fait aussi intervenir des cellules spécialisées (cellules épithéliales, mastocytes, macrophages, DC). Elles reconnaissent des signaux de danger d'origine pathogénique, PAMP (pathogen-associated molecular pattern), grâce à des récepteurs hautement conservés PRR (pattern recognition receptor) membranaires ou cytoplasmiques. Les PRR exprimés par toutes les cellules de l'immunité innée regroupent plusieurs familles de récepteurs qui discernent le soi du non soi. Ils peuvent être divisés en trois groupes, les PRR solubles, les PRR d'endocytose et les PRR de signalisation dont les TLR (toll-like receptor) impliqués dans des processus d'activation des cellules du système immunitaire inné (DC, cellules NK, PNN), avec production de cytokines pro-inflammatoires et immunostimulantes. L'interaction entre

les PRR et leur ligand (LPS bactérien et TLR4, ARN viral et TLR7, résidus sucrés fongiques et récepteur aux mannoses...) initie des voies de signalisation intracellulaire ce qui déclenche la phagocytose et active les cellules qui mettent en place leurs fonctions effectrices.

1.3.1. Phagocytes

Les phagocytes sont les effecteurs de la phagocytose. Ils sont capables de déformer leur membrane et d'englober les complexes PRR/ligand dans un phagosome qui fusionne avec des lysosomes et forme un phagolysosome contenant des protéases et hydrolases lysosomales dirigées contre le pathogène avec un pH acide et des radicaux oxygénés. Les phagocytes sont des monocytes/macrophages, DC, et PNN.

Pendant la réponse innée, la fonction principale des macrophages est la phagocytose via l'expression de récepteurs aux fractions du complément, et récepteur au mannose. L'activation des TLR induit la voie de signalisation intracellulaire MyD88 et le facteur de transcription NF- κ B entraînant la production rapide de cytokines inflammatoires dont l'IL-12 qui active les cellules NK produisant de l'IFN γ qui favorise les effets bactéricides des macrophages, l'IL-1 qui stimule le recrutement des PNN, le TNF α qui active les PNN et qui stimule avec l'IL-6 la synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

Les PNN sont recrutés sur le site de l'infection par la fraction C5a du complément et l'IL-8 sécrétée par les macrophages. Ils quittent la circulation sanguine suite à la diminution du flux sanguin et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Ils sont responsables de la phagocytose, possèdent des activités bactéricides via des systèmes dépendant de l'oxygène et libèrent des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs lipidiques. Ils produisent des pièges extracellulaires (NETs neutrophils extracellular traps) constitués de longs fragments d'ADN recouverts de peptides antimicrobiens qui tuent les pathogènes extracellulaires.

Les DC tissulaires immatures captent les signaux de danger exogènes via leurs PRR. Elles sont capables de phagocytose. Une deuxième population de DC, les DC plasmacytoïdes (pDC) sécrètent de fortes quantités d'IFN α , cytokine à activité antivirale.

1.3.2. Cellules cytotoxiques

Les cellules NK sont activées par l'IL-12 et secrètent des cytokines dont l'IFN γ qui active les macrophages. Elles répondent aux pathogènes intracellulaires en lysant par cytotoxicité les cellules infectées via la production de granules cytotoxiques contenant de la perforine et du granzyme (Grz). La perforine crée des pores dans la membrane des cellules cibles, tandis que le Grz pénètre dans les cellules cibles par ces pores et active la voie des caspases conduisant à la mort des cellules cibles par apoptose.

La réponse innée est efficace dans la grande majorité des infections et permet d'éliminer les agents infectieux. Cependant ces derniers développent des mécanismes de résistance et s'adaptent aux réponses. Le système inné alerte alors le système adaptatif, ils communiquent par des échanges bidirectionnels afin d'éradiquer l'infection.

2. Réponse immunitaire adaptative

Elle se définit comme la réponse dirigée spécifiquement contre un antigène défini avec pour objectif la destruction de celui-ci. Elle fait intervenir les LT CD4⁺ et CD8⁺ à l'origine de l'immunité cellulaire et les LB, plasmocytes et anticorps à l'origine de l'immunité humorale. Leur spécificité est définie par les récepteurs TCR et BCR générés par recombinaison somatique ce qui engendre une diversité et une richesse de répertoire.

2.1. Immunité cellulaire

Le passage de l'immunité innée à l'immunité adaptative se fait par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les monocytes/macrophages, les LB et les cellules dendritiques. Ces dernières sont des CPA professionnelles qui ont la capacité d'activer les LT naïfs qui circulent constamment dans les organes lymphoïdes secondaires.

Dans les tissus, les DC conventionnelles immatures captent des antigènes peptidiques via des PRR, puis migrent par la lymphe jusqu'aux ganglions drainants.

Pendant leur migration, elles perdent leur capacité d'endocytose et acquièrent des fonctions de présentation par expression de molécules de costimulation et de molécules polymorphiques du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité).

Après avoir internalisé les antigènes peptidiques, les DC conventionnelles les appréhendent en les dégradant par protéolyse via des enzymes lysosomales puis en les exprimant à la membrane chargés sur les molécules du CMH pour une présentation aux LT.

Les DC qui reconnaissent des peptides exogènes provenant de pathogènes extracellulaires les chargent sur des molécules du CMH de classe II et les présentent aux LT CD4⁺ auxiliaires. Quand elles reconnaissent des peptides endogènes présents dans des cellules déjà infectées ou qui pénètrent dans le cytoplasme à partir de pathogènes phagocytés, elles les chargent sur des molécules du CMH de classe I pour une présentation aux LT CD8⁺. Des DC présentent des antigènes exogènes sous forme peptidique par des molécules du CMH de classe I aux LT CD4⁺, elles sont capables de présentation croisée.

L'activation du TCR par le complexe CMH/peptide active le TCR et engage le CD3 ce qui constitue un premier signal d'activation spécifique de l'antigène à l'origine d'une synapse immunologique par rapprochement des molécules membranaires.

Le deuxième signal d'activation est un signal de costimulation non spécifique de l'antigène. Il correspond à l'interaction entre la molécule CD28 des LT avec des membres de la famille B7 exprimés à la surface des CPA.

Le troisième signal d'immunomodulation est déclenché par les cytokines sécrétées par les DC. Selon le PAMP reconnu et le PRR activé, les DC produisent des cytokines qui à l'origine de la polarisation des LT CD4⁺ naïfs en LTh effecteurs (Th1, Th2, Th17, T_{FH}, Treg) et LT mémoires (Figure 1).

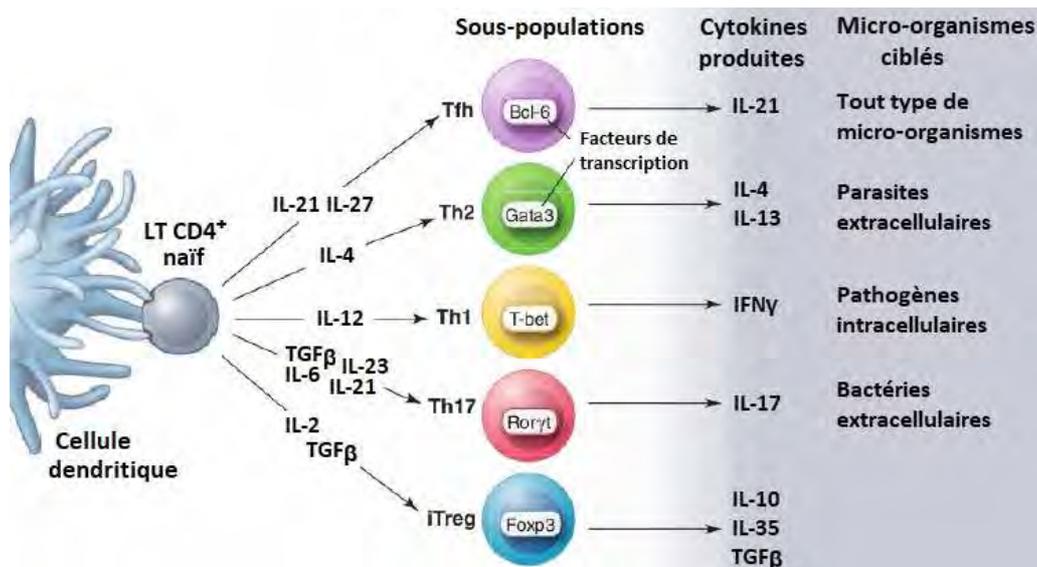


Figure 1. Polarisation des LT CD4⁺

Les Th1 sont spécialisés dans le contrôle et la destruction des pathogènes à multiplication intracellulaire. Ils sécrètent principalement de l'IFN γ qui active les macrophages, DC et LB, de l'IL-12 qui renforce la cytotoxicité des cellules NK et contribue la différenciation des CD8⁺ en CTL. Les Th1 influencent la production d'IgG.

Les Th2 organisent une barrière immunitaire contre les invasions pathogènes afin d'empêcher la prolifération des parasites. Ils sécrètent principalement de l'IL-4 et de l'IL-13. Ils recrutent, activent et assurent la survie des éosinophiles, basophiles et influence la production d'IgE.

Les Th17 sont spécialisés dans la lutte contre les agressions des muqueuses par les bactéries à multiplication extracellulaire et les agents fongiques. Ils sécrètent de l'IL-17 qui joue un rôle dans le recrutement, l'activation et la migration des PNN, stimule de nombreuses cellules afin qu'elles libèrent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le GM-CSF).

Les T_{FH} sont impliqués dans la formation des centres germinatifs et transmettent des signaux de survie aux LB. Ils induisent la maturation et la différenciation des LB.

Les Treg contrôlent les réponses anti-infectieuses par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF β) pour limiter les dommages tissulaires. L'IL-10 agit sur les monocytes/macrophages, les DC et les PNN en inhibant la production de cytokines et chimiokines, il inhibe l'expression des molécules du CMH II et des molécules de costimulation à la surface des DC. Le TGF β induit la différenciation

des Treg, inhibe les fonctions des DC, et macrophages, inhibe l'activation des LT et LB.

Les trois signaux activent les LT CD4⁺ et déclenchent des voies de signalisation intracellulaire à l'origine de la sécrétion de cytokines spécifiques du lignage T qui exercent leurs fonctions effectrices.

Les LT CD8⁺ activés ont des propriétés cytotoxiques. Ils activent les macrophages et tuent les cellules cibles directement en délivrant le contenu de leurs granules (perforine et protéases) ou par l'intermédiaire de cytokines qu'ils secrètent par activation de la voie des caspases. Les LT CD4⁺ et CD8⁺ coopèrent, les CD4⁺ peuvent stimuler la différenciation des LT CD8⁺ en CTL (LT cytotoxique) via la sécrétion de cytokines dont l'IL-12. Les LT quittent le ganglion et migrent jusqu'au site de l'infection grâce à des interactions avec des chimiokines. Ils exercent alors leurs activités effectrices et communiquent avec les cellules de l'immunité innée par l'intermédiaire des cytokines, et interagissent aussi avec les CPA.

Afin de réguler la réponse immunitaire anti-infectieuse, deux voies faisant intervenir les checkpoints immunitaires sont activées. La voie PD-1/PD-L1 et la molécule CTLA-4, qui se fixe sur les molécules de la famille B7 avec une affinité supérieure au CD28, exercent une activité inhibitrice du signal de costimulation, et entraînent l'anergie des LT. De plus l'activation d'une voie Fas/FasL entraîne la mort des LT par apoptose. Ils ne restent qu'une petite population de lymphocytes mémoires à longue durée de vie, qui recirculent pendant des années et initient des réponses secondaires rapides. Ils sont à l'origine de la mémoire immunologique.

2.2. Immunité humorale

La réponse humorale fait intervenir les cellules effectrices LB et plasmocytes et les anticorps qui neutralisent et éliminent les microbes extracellulaires et les toxines bactériennes.

Après activation, ils produisent des Ac spécifiques aux fonctions d'opsonisation, ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et neutralisation. Un Ac donné est produit par un plasmocyte donné et reconnaît un antigène. Il s'agit de molécules

bifonctionnelles formées d'une partie variable (Fab) qui reconnaît spécifiquement l'antigène et d'une partie constante (Fc) qui se fixe aux cellules exprimant des récepteurs Fc dont les phagocytes et les cellules cytotoxiques et active le système du complément. Leur fonction principale est l'opsonisation, ils recouvrent les antigènes et facilitent leur capture par les phagocytes. Ils entraînent aussi l'ADCC par les cellules NK qui portent le marqueur CD16 fixant récepteur Fc.

Il existe cinq classes d'Ac. Les IgM sont les Ig précoces, elles participent à la réponse primaire et sont fixées sur les LB naïfs. Elles activent la voie classique du complément. Les IgD sont exprimées à la surface des LB coexprimées avec les IgM.

Les IgG constituent la classe principale et sont les Ac de la réponse secondaire. Ils représentent la première ligne de défense contre les bactéries et antigènes extracellulaires. Ils favorisent la phagocytose et active la voie classique du complément. Plusieurs récepteurs reconnaissent les Fc des IgG, les FcγRI (sur les macrophages), II (sur les macrophages, les PNN et les LB), III (sur les macrophages, PNN, cellules NK et certains LT).

Les IgA sont retrouvées dans les sécrétions séro-muqueuses, elles inhibent l'adhérence des bactéries aux muqueuses après une première infection. Elles activent la voie alterne du complément. Les IgE se fixent à la membrane des basophiles et mastocytes et entraînent leur dégranulation et l'ADCC.

Les IgE ont une affinité pour les mastocytes et les éosinophiles. Elles sont importantes dans l'immunité antiparasitaire en synergie avec les mastocytes.

Il existe différents types de réponse humorale. La première est dépendante des LT et concerne les antigènes protéiques. Un LB qui a capté un antigène par son BCR le présente chargé dans des molécules du CMH de classe II à des LT CD4⁺ auxiliaires préalablement activés par des DC. Le signal de costimulation est initié par les interactions entre CD40 à la surface des LB et CD40L à la surface des LT. Les LT libèrent des cytokines spécifiques à leur lignage activant les LB qui se multiplient dans les centres germinatifs et subissent la commutation isotypique (réarrangement des Fc à l'origine des différentes Ig) et maturation d'affinité. En cas d'activation par l'IFN γ , les LB produisent des IgG activant le complément et les macrophages. En cas d'activation par l'IL-4, les LB produisent des IgE à l'origine de la dégranulation

des mastocytes. Dans les centres germinatifs, les LB se différencient en plasmocytes à courte durée de vie et en LB mémoires.

La deuxième réponse humorale est indépendante des LT et concerne les antigènes non protéiques. Les LB sont activés directement et produisent des IgM avec peu de commutation isotypique. L'antigène peut aussi activer les plasmocytes induisant une production d'IgM qui active le système du complément.

Le fragment du complément C3d joue aussi un rôle dans l'immunité humorale. Il constitue un second signal pour activer les LB. Les agents pathogènes activent le complément en se liant au produit de dégradation du complément C3d. Les LB reconnaissent simultanément l'antigène, fixé sur C3d, par leur récepteur CR2 fixé à un complexe de protéines CD19 et CD81 qui transmettent des signaux d'activation aux LB. Les LB activés prolifèrent et sécrètent des IgM.

3. Effecteurs immunitaires à l'interface entre les réponses innées et adaptatives

Des populations, conservées chez les mammifères, de LT CD8⁺ non conventionnels à répertoire restreint ont été mises en évidence (1). Elles sont dites « à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative » car elles possèdent des caractéristiques propres à chacune de ces réponses immunitaires. Elles portent des TCR activés par des molécules apparentées au CMH puis prolifèrent, et exercent leurs fonctions effectrices. Elles se comportent aussi comme des cellules de l'immunité innée par leur réponse rapide à des antigènes conservés.

Les lymphocytes non conventionnels incluent les LT $\gamma\delta$, les lymphocytes NKT, et les lymphocytes MAIT.

3.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$ (2)

Les LT $\gamma\delta$ représentent 1 à 5 % des lymphocytes circulant chez l'homme. La population L V γ 9V δ 2 est majoritaire chez l'homme (50 à 90 % des LT $\gamma\delta$). Ils sont abondants dans les épithéliums, et prolifèrent rapidement en cas d'infections parasitaire et bactérienne (leur proportion est rapidement supérieure à 5 % en cas d'infection à mycobactéries). De nombreux ligands ont été identifiés (phosphoantigènes, des molécules associées au CMH (MICA et MICB), CD1d-

sulphatide...) mais aucun motif spécifique au TCR $\gamma\delta$ n'a été mis en évidence. Ils ont la capacité de cibler les cellules infectées par des bactéries intracellulaires, ils secrètent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IFN, TNF) et surexpriment le récepteur de l'IL2. Ils expriment aussi des récepteurs spécifiques des cellules NK de l'immunité innée (NKG2D, DNAM-1), et possèdent des propriétés de type NK. Ils se différencient en cellules cytotoxiques, libèrent de la perforine, du Grz et peuvent induire l'ADCC, lysant ainsi les cellules cibles infectées. Ils jouent probablement un rôle plus important que les cellules exprimant le TCR $\alpha\beta$ dans l'éradication des bactéries à multiplication intracellulaire.

3.2. Lymphocytes NKT (3)(4)

Les NKT sont retrouvés en abondance chez la souris (1 à 3 % des LT et jusqu'à 30 % dans le foie) et en plus faible proportion chez l'homme (100 fois plus faible). Ils portent un TCR $\alpha\beta$ à chaîne α invariante V α 24.J α 18 et un répertoire TCR β restreint. Ils répondent rapidement après la reconnaissance des glycolipides endogènes ou exogènes présentés par la molécule CD1d apparentée aux molécules du CMH I. Leur activation dépend de trois signaux, le signal 1 correspond à l'engagement du TCR, et le signal 2 est composé de deux signaux de costimulation CD28/B7 et CD40/CD40L. Le signal un et le signal de costimulation CD28/B7 induisent la production d'IL-4 et IFN γ par les NKT. Le signal de costimulation CD40/CD40L entraîne la production par l'APC d'IL-12 qui se fixe sur son récepteur à la surface des NKT et induit la production l'IFN γ . Dans les tissus, ils participent à l'immunité innée afin d'empêcher la prolifération des agents infectieux avant la mise en place de la réponse adaptative. Ils peuvent activer les cellules NK, macrophages et granulocytes ou attaquer directement les cellules cibles. En cas d'infection virale, les NKT renforcent les réponses CD8⁺.

3.3. Lymphocytes MAIT

Les MAIT (CD161^{high}) sont peu abondants chez la souris, mais représentent 0.5 à 10 % des lymphocytes circulant chez l'homme (4). Ils sont dits « associés aux muqueuses » car ils sont retrouvés, chez l'homme, en quantité importante dans l'intestin, les poumons, et représentent 10 % des lymphocytes à ces sites. Ils sont

retrouvés abondamment dans le foie où ils représentent plus de 50 % des lymphocytes hépatiques. Ils portent un TCR à chaîne α invariante V α 7.2-J α 33 restreint par une molécule non classique du CMH de classe Ib appelée MR1 (MHC-related protein 1) (5). Le ligand de MR1 correspond à des résidus bactériens issus du métabolisme intermédiaire de la vitamine B2 (riboflavine) produites par des bactéries et levures pathogènes et commensales (5).

Les MAIT sont recrutés dans les tissus lors d'infections, et après activation, induisent des réponses de type Th1 en sécrétant de l'IFN γ et du TNF α , et ils présentent une activité cytotoxique par libération de Grz, et perforine.

Les MAIT sont activés par la voie du TCR mais aussi par une voie indépendante de l'engagement du TCR qui fait intervenir des cytokines dont l'IL-18, l'IL-12, l'IL-7, l'IL-15. Alors, ils exercent aussi leurs activités dans des pathologies où les ligands ne sont pas apparents, comme les infections virales, les virus ne générant pas de voie de métabolisme impliquant la vitamine B2.

Les propriétés anti-infectieuses des MAIT seront développées dans la partie 3.

4. Réponse immunitaire aux bactéries à multiplication extracellulaire

Les bactéries entrent en contact avec les protéines du complément et activent la voie alterne et la voie des lectines.

L'activation du complément conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire qui peut détruire les bactéries Gram $^-$. Les anaphylatoxines C3a et C5a induisent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire, et C5a est chimio-attracteur pour les PNN. C3b joue un rôle majeur dans l'opsonisation des bactéries Gram $^+$ et Gram $^-$ en se déposant à leur surface et en se liant à leurs récepteurs exprimés par les PNN (CR1 et CR3) facilitant la phagocytose des bactéries.

De plus, les PNN reconnaissent leur cible par l'intermédiaire de PRR, et englobent l'agent infectieux dans une vacuole de phagocytose. Dans un deuxième temps, les monocytes/macrophages arrivent au site infectieux et assurent l'élimination des PNN apoptotiques et des débris cellulaires et microbiens.

La réponse humorale est la principale réponse adaptative efficace contre les pathogènes extracellulaires. Les Ac bloquent la liaison des bactéries à l'épithélium des muqueuses ou inhibent le site de fixation des toxines bactériennes aux

membranes cellulaires. Les Ac exercent leur fonction d'opsonisation par reconnaissance des épitopes bactériens via leur Fab, et fixation de leur Fc à leurs récepteurs à la surface des phagocytes. Cette activité se fait en coopération avec C3b de la voie classique du complément qui facilite la phagocytose.

5. Réponse immunitaire aux bactéries à multiplication intracellulaire

Elles sont phagocytées par les macrophages, y survivent et s'y multiplient possiblement en inhibant les fonctions lytiques des macrophages. Les macrophages réagissent puis sont activés par les cellules NK via la sécrétion d'IFN γ .

La réponse adaptative mise en place fait intervenir les LT CD4⁺ Th1 sécréteurs d'IL-2 qui favorise la prolifération des LT et des CTL, augmente l'expression d'IL-1, de l'IFN γ , du TNF α , et la phagocytose. Une réponse de type Th2 plus faible apparait aussi. Elle réduit les réponses inflammatoires délétères induites par les réponses Th1.

Les LT CD8⁺ jouent un rôle moins important dans l'éradication des bactéries.

Les Ac peuvent inhiber la transmission des bactéries d'une cellule à l'autre et favoriser l'opsonisation et la phagocytose. Les LB peuvent internaliser les pathogènes via leurs Ig membranaires et les présenter efficacement aux LT CD4⁺.

6. Réponse immunitaire antivirale

Les virus se développent dans les cellules de l'hôte qu'ils infectent et dont ils détournent le métabolisme à leur profit. Les phases initiales des réponses immunitaires antivirales sont similaires à celles dirigées contre les bactéries à multiplication intracellulaire.

De plus les virus déclenchent une forte production d'IFN α qui est sécrété par les cellules infectées. Il inhibe la réplication virale, active les macrophages et cellules NK, stimule les réponses Th1, et augmente l'expression des molécules du CMH I stimulant les CTL. La réponse adaptative fait donc intervenir les Th1 sécrétant de l'IFN γ et du TNF α qui augmente l'expression des molécules du CMH et active les cellules NK.

Les LT CD4⁺ coopèrent avec les LB induisant leur différenciation en plasmocytes, et avec les CD8⁺ qui se différencient en CTL. L'action cytotoxique induit la libération de

particules virales dans le milieu extracellulaire qui détruisent les cellules de l'hôte. L'activité des Ac neutralisant permet de contrer ce phénomène.

7. Réponse immunitaire antiparasitaire

L'immunité antiparasitaire fait principalement intervenir les Th2. Elle est associée à la production d'IgE qui induit la dégranulation des mastocytes, éosinophiles et l'activation et le recrutement des lymphocytes. La réponse Th2 est souvent associée à une activation des Treg avec suppression des réponses innée et adaptative chez l'hôte. Ils peuvent aussi activer les macrophages sur le site de l'infection et favoriser leur fonction anti-inflammatoire. Ces phénomènes sont étudiés dans les cas d'infections à nématodes. Un mécanisme Th1 peut aussi se mettre en place entraînant lyse des larves.

Les parasites intracellulaires qui se développent dans les globules rouges déclenchent une réponse humorale avec production d'Ac neutralisants, et qui induisent l'opsonisation avec activation des macrophages. Les parasites qui se développent dans les macrophages induisent l'activation des macrophages et des CTL.

8. Réponse immunitaire antifongique

L'immunité innée contrôle la majorité des infections fongiques. Les barrières physiques et chimiques, la phagocytose par les PNN, et l'activation des voies alterne et lectines du système du complément sont essentielles et suffisantes. L'équilibre de la flore commensale joue un rôle important pour limiter la croissance de champignons opportunistes comme *Candida albicans* qui peuvent émerger lors de traitements antibiotiques au long cours. Les patients immunodéprimés, VIH⁺, atteints de déficit immunitaire primitif, ou traités par immunosuppresseurs, développent des infections fongiques ce qui indique un rôle de l'immunité adaptative et notamment des LT dans le contrôle des infections fongiques.

9. Conclusion

L'approfondissement des connaissances en immunité anti-infectieuse permet d'envisager des méthodes ciblant les principaux effecteurs des réponses innées et adaptatives, et les voies qu'ils induisent, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses et de perfectionner les immunothérapies utilisées par le passé mais délaissées avec la découverte des antibiotiques.

Partie 2 : Immunothérapie anti-infectieuse

A. Historique et expérimentations de l'immunothérapie anti-infectieuse

1. Définition

L'immunothérapie anti-infectieuse correspond à la modulation du système immunitaire par administration de molécules qui stimulent et renforcent les défenses immunitaires de l'organisme afin de lutter contre les maladies infectieuses. Elle regroupe des stratégies thérapeutiques variées qui consistent à apporter aux patients des effecteurs venant d'un autre organisme (immunothérapie passive), ou à mobiliser et renforcer leurs propres défenses immunitaires (immunothérapie active).

Avant 1940, l'immunothérapie, par l'intermédiaire de la sérothérapie, constituait l'unique option thérapeutique disponible pour lutter contre les infections (6). Dès 1940, la découverte des antibiotiques a révolutionné leur prise en charge. De par leur activité puissante et efficace, ils ont suppléé l'immunothérapie.

Depuis une dizaine d'années, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour faire face aux résistances microbiennes, à l'épuisement des agents anti-infectieux, et à l'absence d'antiviraux à large spectre (7). Les progrès majeurs dans la compréhension de la réponse immunitaire anti-infectieuse ont permis de poursuivre les recherches qui avaient été freinées en immunothérapie. Au début des années 1960, des greffes de cellules souches issues de moelle osseuse ont été pratiquées, puis dans les années 1970, les immunoglobulines et les Ac polyclonaux ont été mis en évidence et développés. Aujourd'hui l'immunothérapie regroupe des approches thérapeutiques basées sur les Ac monoclonaux (Acm), la vaccination, les cytokines et la thérapie cellulaire (6). Les chercheurs étudient leur efficacité thérapeutique et leur innocuité en monothérapie ou en tant qu'adjuvants aux anti-infectieux conventionnels.

2. Sérothérapie

Cette thérapie a été introduite pour la première fois dans les années 1890, quand les chercheurs ont mis en évidence un traitement contre les infections graves dont la

pathogénicité est due aux effets de toxines bactériennes. Des animaux de laboratoire immunisés avec des toxines bactériennes de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium difficile* partiellement inactivées, étaient protégés en cas d'administration ultérieure de ces toxines (7)(8). Les chercheurs ont généré des sérums contenant des anticorps capables de neutraliser les toxines bactériennes, et pouvant être transférés à des animaux, leur assurant alors une protection. Ainsi, la sérothérapie se définit comme le transfert de sérums sanguins purifiés provenant de patients ou d'animaux immunisés et contenant des Ac dirigés contre une toxine donnée afin d'aider un organisme déjà infecté à neutraliser cette toxine. Elle est à l'origine de progrès décisifs dans la lutte contre les infections.

Après l'arrivée des antibiotiques et des vaccins préventifs, son utilisation s'est raréfiée. Cependant, elle est encore utilisée dans la prise en charge de certaines infections dont la diphtérie et le tétanos qui repose encore sur des injections de sérums antidiphthériques ou antitétaniques, primordiaux pour neutraliser les toxines bactériennes. La sérothérapie administrée dans de brefs délais est alors suivie d'une antibiothérapie.

La meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire et notamment le rôle des LB dont les clones produisent un seul et unique type d'Ac, et la mise en évidence des cinq classes d'immunoglobulines et de leur structure ont conduit au développement de nouvelles approches en immunothérapie.

3. Immunothérapie basée sur les anticorps

L'immunothérapie basée sur les anticorps consiste à utiliser des immunoglobulines (Ig) comme agent thérapeutique. Il existe plusieurs classes d'Ig selon qu'elles soient extraites de plasmas humains (Ig polyvalentes et Ig spécifiques), issues d'une autre espèce que l'homme (Ig hétérologues spécifiques), ou d'origine cellulaire (Acm).

Elles sont utilisées dans le but de tuer ou neutraliser directement les agents infectieux, lyser les cellules infectées, ou moduler le système immunitaire pour activer les cellules effectrices afin qu'elles contribuent à l'élimination de l'agent infectieux.

3.1. Immunoglobulines polyvalentes et spécifiques

Les Ig polyvalentes et spécifiques ont été développées dans un but de substitution en cas d'immunodépression, puis leur activité immunorégulatrice a été étudiée dans le cadre des maladies infectieuses (9).

Les IgIV sont des préparations thérapeutiques d'IgG humaines polyvalentes obtenues à partir de mélanges de plasmas provenant de milliers de donneurs sains. Chaque donneur présente des antécédents particuliers à l'origine d'un répertoire divers d'Ig, permettant d'obtenir des préparations d'IgIV à spectre antibactérien et antiviral étendu. Ainsi, elles protègent contre une large gamme de pathogènes et d'antigènes. Les virus et bactéries sont opsonisés, ce qui entraîne l'activation du système du complément et leur phagocytose par les macrophages. Actuellement en France, neuf préparations à base d'IgIV sont disponibles en tant que molécules anti-infectieuses. Elles sont indiquées dans la prise en charge des infections aiguës ou chroniques par le parvovirus B19 chez les patients immunodéprimés, et des infections bactériennes récidivantes chez les enfants VIH⁺.

Peu d'essais cliniques avec des IVIg sont mis en œuvre, mais, par le passé, des études *in vivo* et *in vitro* ont permis de mettre en évidence leur activité prometteuse dans le traitement des maladies infectieuses. En 1980, à partir d'une expérimentation menée chez le rat, les chercheurs ont observé que l'administration parentérale d'IVIg humaines contenant une grande quantité d'anticorps neutralisant le VRS réduisait significativement la réplication du virus *in vivo* dans la muqueuse nasale et les poumons des rats (10). Cet effet n'a pas été retrouvé chez l'homme. Cependant, lors d'un essai clinique prophylactique, des injections mensuelles d'IgIV VRS chez des enfants à risque ont entraîné une diminution de la sévérité de l'infection lorsqu'ils l'ont développée (11). Ces résultats ont amené à considérer un traitement de l'infection à VRS par des Ig.

Les Ig spécifiques sont obtenues à partir du plasma d'individus sélectionnés en fonction de leur taux d'Ac sanguins spécifiques d'un antigène donné. Cinq spécialités sont disponibles, elles sont utilisées dans le traitement ou la prévention de l'hépatite B, de la rage humaine, et du tétanos.

Cependant, des difficultés d'administration et le coût important de production ont conduit à la recherche de nouvelles formes thérapeutiques et à la synthèse d'anticorps monoclonaux.

3.2. Anticorps monoclonaux

Un anticorps monoclonal correspond à un seul type d'Ig dirigée contre une cible spécifique. Aujourd'hui ils sont utilisés en oncologie et en rhumatologie mais très peu en infectiologie depuis l'avènement des antibiotiques et leur avantage économique. Un seul Acm neutralisant anti-infectieux est commercialisé, palivizumab (Synagis®)(8). Il a été développé rapidement après l'obtention des résultats concluants des essais cliniques basés sur l'utilisation des IgIV VRS (10). Il lie la protéine F d'enveloppe du VRS et bloque son entrée dans les cellules. Il est indiqué dans la prévention des infections respiratoires basses dues au VRS nécessitant une hospitalisation chez les enfants à haut risque. Après collection de données, une étude publiée en 2008 a montré une réduction du nombre d'hospitalisations des enfants à risque en cas de traitement par palivizumab (12). Son utilisation est étudiée en association avec la transplantation de cellules souches dans le traitement de la pneumonie à VRS.

Le progrès dans la production des Acm et la génération d'Acm totalement humains injectables de haute affinité contre un éventail de cibles moléculaires et dont les fonctions effectrices et les temps de demi-vies peuvent être modulés, rendent cette approche thérapeutique attrayante en infectiologie. Elle est principalement étudiée pour le traitement des infections virales, mais des avancées sont observées dans la prise en charge des infections fongiques et bactériennes (8).

Un seul Acm est commercialisé mais beaucoup d'essais précliniques et cliniques sont mis en place et montrent une efficacité. Une étude clinique de deux Acm humains dirigés contre les toxines A et B de *C. difficile* a été réalisée (13). Les chercheurs ont observé un taux de récurrence de l'infection chez les individus malades plus faible quand le traitement associait les Acm aux antibiotiques qu'en cas de monothérapie antibiotique.

Cependant, jusqu'à présent, les essais de phase I et II ne sont pas poursuivis par des essais de phase III pour une autorisation de mise sur le marché. La faible production d'Acm s'explique par le prix élevé de leur fabrication, et par le fait qu'ils présentent principalement une activité prophylactique déjà assurée efficacement par la vaccination. De plus un obstacle majeur à leur utilisation est la capacité des pathogènes à muter, modifier leurs antigènes membranaires et contrer la réponse humorale.

C'est pourquoi aujourd'hui, la recherche se focalise sur le développement d'Acm ciblant des épitopes conservés de pathogènes importants responsables d'infections chroniques pour lesquelles la prise en charge est complexe (VIH) ou qui peuvent être à l'origine d'épidémies (virus Ebola). Pour échapper aux mutations et neutraliser efficacement plusieurs épitopes ou plusieurs toxines, les chercheurs étudient l'efficacité de cocktails d'Acm, et des « super-anticorps ».

3.2.1. Cocktails d'anticorps monoclonaux

L'épidémie d'Ebola en 2014-2015 en Afrique de l'Ouest a mis en évidence la nécessité urgente de développer une thérapie pour prendre en charge les individus infectés par le virus. ZMapp, un cocktail de trois Acm chimériques humain-souris (c13C6, c2G4, c4G7) ciblant des glycoprotéines de surface de la souche Zaïre d'Ebola (EBOV), a été administré à six PNH infectés par une dose létale d'EBOV. Tous les PNH ont survécu après injection de ZMapp jusqu'à cinq jours post-infection. La guérison était complète avec disparition de la virémie (14). De plus, la virémie des quelques individus infectés, ayant reçu ZMapp pendant l'épidémie de 2014, a diminué et ils ont survécu. Le potentiel thérapeutique de ZMapp est évalué actuellement dans un essai clinique en Afrique de l'Ouest (clinicaltrials.gov).

3.2.2. Super-anticorps

Des Ac retrouvés très rarement lors d'infections virales, ont été isolés chez des individus infectés. Ils apparaissent dans l'organisme après un délai de quelques années en réaction aux mutations des virus, et ils ont la particularité de lyser les cellules infectées. Ils constituent une nouvelle classe d'Acm humains à haut potentiel et généralement à activité croisée dits «super-anticorps» ou «Ac neutralisant à large spectre». Ils offrent des possibilités thérapeutiques contre des virus à forte variabilité antigénique, émergents, ou à potentiel pandémique (15). Une douzaine de super-anticorps a été mise en évidence contre le VIH, et des super-anticorps rares ont été identifiés chez des individus infectés par les virus Influenza, RSV, Zika, Ebola, Lassa, RABV (virus de la rage) et HMPV (métapneumovirus humain). Les chercheurs sont maintenant capables d'isoler des super-anticorps et d'en générer à partir de LB humains ou de méthodes d'immunisation et humanisation.

Un super-anticorps, C05, mis en évidence en 2011, neutralise des sous-types du virus Influenza A dont H1, H2 et H3. Il reconnaît et lie des motifs conservés sur les hémagglutinines de surface du virus (16).

3BNC117 découvert en 2011 est un super-anticorps qui neutralise spécifiquement le VIH-1 en ciblant le site de liaison des LT CD4⁺ aux spicules de l'enveloppe virale (17). *In vitro*, 3BNC117 neutralise de nombreuses souches du VIH/SIV. Il empêche l'acquisition du VIH-1 dans des modèles animaux lorsqu'il est utilisé en prophylaxie en pré-exposition. Il réduit la virémie associée au VIH-1 en induisant un effet thérapeutique post-exposition. Il empêche l'établissement de réservoirs du VIH latent (18). Des essais de phases I et IIa ont montré son innocuité et son efficacité thérapeutique chez des patients infectés par le VIH-1 (17). Cependant, des souches VIH-1 résistantes et des d'Ac anti-3BNC117 ont été mises en évidence. Des stratégies sont étudiées afin d'optimiser l'activité de 3BNC117. Un intérêt est porté à des associations thérapeutiques de 3BNC117 avec des antiviraux ou d'autres Ac.

En 2017, des chercheurs ont expérimenté l'association de 3BNC117 avec 10-1074, un super-anticorps qui cible un épitope de l'enveloppe virale du VIH, en les administrant à des primates. Ils ont mis en évidence l'efficacité de cette association contre SIV *in vivo*, et sa capacité à induire les réponses immunitaires à la fois humorales et cellulaires (19).

Plusieurs super-anticorps sont évalués chez l'homme dans des essais cliniques de phase I, II, et III d'infections établies par le VIH (15). Face aux variabilités importantes de VIH *in vivo*, il est évident que des combinaisons thérapeutiques de plusieurs super-anticorps ou avec des antiviraux seront nécessaires pour le combattre et garantir une efficacité antivirale puissante.

Le développement des Ac comme agents thérapeutiques anti-infectieux a progressé par étapes au cours des années avec l'amélioration de l'efficacité des molécules administrées. L'immunothérapie passive a débuté avec la sérothérapie il y a un siècle, elle a progressé avec les Ac polyclonaux, puis les Acm, et enfin aujourd'hui les super-anticorps. Grâce à la recherche menée, dans un premier temps, en oncologie, les biotechnologies ont évolué permettant d'augmenter les fonctions des Ac *in vivo*.

L'apport des super-anticorps dans l'arsenal thérapeutique dépendra :

- de la rapidité de leur production,
- de l'efficacité réelle du traitement incluant leur fabrication, durée d'action, et voie d'administration,
- des résultats d'essais cliniques sur des individus atteints d'infections établies et traités par les meilleurs super-anticorps identifiés et disponibles.

En effet, les vaccins prophylactiques classiques restent les substances les moins coûteuses et les plus efficaces, mais certains agents infectieux représentent des défis majeurs notamment les virus capables de muter (VIH), et les parasites aux cycles de réplication complexes.

4. Immunothérapie active : vaccination

Le principe de la vaccination a été découvert parallèlement à la sérothérapie, à la fin du 19^e siècle, il se base sur la mémoire immunitaire. La vaccination consiste à stimuler le système immunitaire en l'exposant à un antigène vaccinal mimant un agent pathogène afin qu'il déclenche une réponse adaptative et produise lui-même des effecteurs protecteurs. Les antigènes vaccinaux sont captés par les CPA directement au site d'injection. Elles migrent vers les ganglions lymphatiques les plus proches et présentent les peptides antigéniques aux LT CD4⁺ qui s'activent et, à leur tour, activent les LT CD8⁺ cytotoxiques, les LB et les plasmocytes entraînant l'élimination des antigènes en trois à cinq jours. Des LT, LB mémoires et des Ig spécifiques persistent dans l'organisme vacciné. A chaque rappel, la fréquence des LB mémoires spécifiques de l'antigène augmente, ils prolifèrent et se différencient plus rapidement. Ils sont à l'origine d'une réponse secondaire rapide avec production majoritaire d'IgG dont l'affinité pour l'antigène est supérieure à la réponse primaire et dont un taux résiduel perdure des dizaines d'années.

Trois types de vaccins sont produits. Les vaccins vivants atténués, très immunogènes, contiennent des agents pathogènes vivants dont la virulence est atténuée par des conditions de culture déterminées. Les vaccins inactivés contiennent des germes entiers tués par traitements chimiques ou physiques. Plus récemment, les vaccins sous unitaires sont développés. Ils sont composés de protéines recombinantes, de peptides viraux synthétisés chimiquement, d'ADN viral

nu, de fractions d'antigènes, ou de conjugués bactériens (anatoxines). Ils ne présentent pas de risques infectieux et sont bien tolérés mais peu immunogènes.

Les vaccins peu immunogènes sont combinés à des adjuvants qui stimulent le système immunitaire pour la mise en place d'une réponse adaptative suffisante. Les adjuvants les plus communs sont les sels d'aluminium mais de nouvelles substances sont développées comme des cytokines, des ligands de TLR, ou des liposomes. La formulation du vaccin joue un rôle majeur, elle permet d'orienter les réponses immunitaires (réponse Th2 par les sels d'aluminium, réponse spécifique selon la cytokine ou le ligand de TLR utilisés).

Il existe deux stratégies de vaccination : la vaccination prophylactique (90 %) faite avant l'exposition à l'antigène, et la vaccination thérapeutique considérée comme une immunothérapie (10 %). Un vaccin thérapeutique est administré après que le patient a acquis une infection chronique (HPV, HCV, VIH). Son objectif est de stimuler la réponse immunitaire afin de lutter contre les infections chroniques, d'éliminer les infections présentes, et/ou d'empêcher une rechute.

La recherche actuelle porte principalement sur des vaccins thérapeutiques contre le VIH afin de maintenir durablement la charge virale à un niveau le plus bas possible tout en stimulant le système immunitaire contre les cellules qui hébergent le virus.

En 1986, une souche dite VIH Oyi a été isolée chez des femmes séropositives qui ont connu une rétro-séroconversion puis elle a été clonée. VIH Oyi porte des protéines d'enveloppe similaires aux autres souches du VIH-1. Cependant, Tat Oyi est très immunogène contrairement aux Tat des autres souches du VIH-1. Celles-ci possèdent une surface très conservée tandis que sur Tat Oyi, des mutations spécifiques transforment cette surface en un épitope 3D. Celui-ci génère des Ac neutralisants contre des variants de Tat de la plupart des sous-types du VIH-1.

Des chercheurs ont étudié le potentiel d'un vaccin thérapeutique Tat Oyi dans un essai clinique de phase I/II (20). Des protéines Tat Oyi synthétiques dans un tampon et sans adjuvant ont été administrées par voie intradermique à des volontaires infectés par le VIH-1 dont la charge virale était supprimée par un traitement antirétroviral depuis au moins un an. Cet essai a mis en évidence l'innocuité du vaccin Tat Oyi, une diminution du rebond de l'ARN du VIH après interruption du traitement antirétroviral, une diminution de l'ADN du VIH et potentiellement du nombre de cellules infectées par le VIH dans le sang périphérique. Une association

entre le vaccin Tat Oyi et le traitement antirétroviral peut représenter une stratégie efficace pour contrôler l'infection due au VIH.

Malgré ces progrès importants, les enjeux principaux de la vaccination restent la réduction du temps et du coût de fabrication. Afin d'améliorer et d'accélérer les procédés de fabrication, il est nécessaire de prédire les immunogènes les plus pertinents à incorporer dans la préparation vaccinale et de les combiner avec des adjuvants afin d'obtenir une réponse immunitaire efficace, protectrice et inoffensive.

5. Immunothérapie basée sur les cytokines et facteurs de croissance

Les cytokines sont des messagers qui jouent un rôle dans la communication entre les cellules du système immunitaire dans le but de générer une réponse coordonnée, forte et spontanément résolutive pour cibler un antigène. Elles interviennent dans les processus immunomodulateurs et inflammatoires. Le statut d'une infection chez un patient peut notamment être déterminé par son profil cytokinique. Ainsi, leur utilisation en immunothérapie a pour objectif d'exploiter les vastes réseaux de signalisation auxquels elles participent afin d'orienter les réponses immunitaires en fonction de l'antigène à éliminer. Des Acn qui ciblent les cytokines permettent aussi de stopper les cascades de signalisation intracellulaires et le développement de réponses immunitaires inappropriées.

Dans le début des années 2000, de nombreuses associations entre des cytokines et des anti-infectieux ont été expérimentées dans des essais cliniques, comme les combinaisons entre le fluconazole et l'IL-12 dans le traitement des infections à *Candida albicans*, entre la chloroquine et l'IL-12 dans celui du paludisme, ou entre l'amphotéricine B et l'IFN γ dans celui des méningites à *Cryptococcus neoformans* (21).

Les cytokines de la famille des IFN jouent un rôle crucial dans le contrôle des pathogènes intracellulaires par induction d'une réponse de type Th1. Un traitement par l'antifongique amphotéricine B seul est efficace dans la prise en charge des méningites à *C. neoformans*, mais la mortalité reste élevée. Des chercheurs ont évalué les effets d'injections sous-cutanées d'IFN γ -1b (une forme recombinante de l'IFN γ endogène) en association avec l'amphotéricine B à des adultes VIH⁺ présentant un premier épisode de méningite à *C. neoformans* et dont un traitement

par ARV était débuté deux à quatre semaines après l'administration d'amphotéricine B seule ou associée à l'IFN γ -1b recombinant (22). Les chercheurs ont observé une augmentation significative du taux de clairance de l'agent infectieux dans le LCR (liquide céphalo-rachidien) en cas d'addition d'IFN γ -1b dans la prise en charge des patients. Le rôle de cette cytokine est à explorer dans le traitement des infections nécessitant une réponse Th1 solide.

Beaucoup d'autres cytokines et des facteurs de croissance sont expérimentés dans des essais cliniques évaluant principalement leur potentiel antifongique en tant qu'adjuvant ou en monothérapie (23), c'est le cas notamment du G-CSF, du GM-CSF, de l'IL-12, de l'IL-18, et du TNF α qui joue un rôle protecteur par induction de l'activité antifongique des granulocytes contre *A. fumigatus* ou *C. albicans*.

Deux spécialités contenant de l'IFN α -2a et de l'IFN α -2b sont commercialisées et indiquées dans la prise en charge des hépatites chroniques à VHB et VHC en association à des antiviraux (ribavirine). Ils sont moins utilisés aujourd'hui devant leur manque d'efficacité pendant la phase de tolérance immune, les progrès de la recherche à l'origine de nouveaux antiviraux, et les expérimentations en immunothérapie dont les vaccins thérapeutiques, les inhibiteurs de check-points et les agonistes de TLR.

6. Immunothérapie basée sur les inhibiteurs de checkpoints immunitaires PD-1 et CTLA-4

La liaison de PD-1 à son ligand PD-L1 inhibe le signal de costimulation des LT. CTLA-4 partage les mêmes ligands que CD28 et inhibent aussi le signal de costimulation. Leur induction et expression à la surface des LT entraînent l'inhibition de la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les LT. Ils sont exprimés dans certaines conditions telles que les infections persistantes par stimulation antigénique chronique. Leur activation aboutit à un état d'anergie des LT qui deviennent non fonctionnels, ce qui contribue à la chronicité des infections. Le blocage des checkpoints immunitaires par des Acm permet de restaurer les réponses effectrices anti-infectieuses.

Des chercheurs ont évalué le potentiel des anti-PD-1 et anti-CTLA-4 dans la prise en charge de sepsis dus à des infections fongiques dont la mortalité ne diminue pas malgré des thérapeutiques anti-infectieuses (24). L'augmentation de l'expression de

PD-1 à la surface des LT entraînant un état d'anergie des LT est une des défaillances du système immunitaire à l'origine du sepsis. Dans deux modèles murins d'infection par *C. albicans*, les Acm anti-PD-1 et anti-PD-L1 ont été administrés 24 à 48 heures post-infection. Les chercheurs ont observé une augmentation de la survie des souris, de la production d'IFN γ par les LT et de l'expression des molécules du CMH II à la surface des CPA dans les deux modèles murins. Ils ont retrouvé ces résultats en utilisant un anticorps anti-CTLA-4. Le potentiel anti-infectieux de ces Acm, qui ont montré des activités fonctionnelles et inoffensives lors d'essais cliniques en cancérologie, est envisageable et à évaluer dans des essais cliniques sur des individus atteints d'une infection.

7. Agonistes de TLR

Les TLR sont des composants essentiels du système immunitaire par leur capacité à reconnaître des PAMPs et à établir un lien entre les réponses innées et adaptatives. Ils constituent une cible pour le traitement des maladies infectieuses par l'intermédiaire d'agonistes qui activent les signaux TLR et dirigent la réponse immunitaire.

Le GS-9620 (vesatolimod) est un agoniste de TLR7 qui a montré des propriétés antivirales lors d'essais précliniques sur des chimpanzés atteints d'hépatite B chronique. Les réponses immunitaires innées stimulées par l'engagement du TLR7 à la surface des pDC favorisent la présentation croisée et augmentent la production d'IFN α qui active la transcription des gènes codant pour les IFN à activité antivirale et qui module les fonctions des cellules NK. La stimulation de TLR7 favorise aussi la présentation antigénique par les pDC et ainsi les réponses T. Des chercheurs ont évalué la capacité de GS-9620 à améliorer et accélérer la réponse immunitaire protectrice chez des patients atteints d'hépatite B chronique traitée par des analogues nucléotiques ou nucléosidiques (NUCs) (25). Ils ont observé que l'ajout de GS-9620 est insuffisant pour provoquer une séroconversion mais son rôle immunomodulateur renforce les réponses antivirales et il pourrait être inclus dans une stratégie thérapeutique afin d'augmenter la réponse immunitaire à HBV.

Un agoniste de TLR7, l'imiquimod (Aldara[®] crème), est commercialisé et indiqué dans le traitement des verrues génitales induites par HPV (papillomavirus humain).

8. Immunothérapie adoptive

Le transfert adoptif de cellules est une stratégie utilisée en cas d'infection chronique et qui représente une alternative thérapeutique pour la prise en charge des infections survenant après des greffes de CSH associées à une morbidité et une mortalité importantes du fait de l'absence de reconstitution immunitaire spécifique concomitante. Des cellules autologues, après isolation chez un donneur, sont stimulées *in vitro* par des antigènes ou modifiées par insertion d'un gène codant un récepteur spécifique, puis, après multiplication en grande quantité sont perfusées chez un receveur.

8.1. Transfert adoptif de lymphocytes T

Le transfert adoptif de LT permet de restaurer une immunité adaptative efficace. Cette stratégie est prometteuse dans le traitement des infections virales et fongiques (26).

8.1.1. LT helper

Les Th1 jouent un rôle anti-infectieux central en induisant des réponses significativement protectrices principalement via la production d'IFN γ . Afin de transférer au receveur des Th1 spécifiques d'un agent pathogène, il est nécessaire de mettre en évidence des antigènes capables d'induire ce type de réponse *in vitro*. L'induction d'une immunité antifongique Th1 est une stratégie envisagée pour combattre les infections sévères causées par *Aspergillus* après greffes de CSH. Cependant les antigènes d'*Aspergillus* capables d'induire une réponse Th1 protectrice *in vitro* n'ont pas encore été mis en évidence.

Des chercheurs ont trié des LT spécifiquement retrouvés lors d'infections fongiques, en se basant sur l'expression de CD154 ou de CD137. Ces marqueurs ont été identifiés, grâce à des modèles précliniques et cliniques, comme des marqueurs exprimés à la surface des LT CD4⁺ pour CD154, et de populations cellulaires plus variées dont de nombreux LT $\gamma\delta$ et cellules NK pour CD137 après activation par des antigènes fongiques (27).

Les chercheurs ont étudié, *in vitro*, les réponses des LT CD154⁺ ou CD137⁺, triés chez des individus sains et des patients ayant subi une greffe de CSH, à différentes protéines d'*A. fumigatus* (27). Ils ont identifié des protéines d'*A. fumigatus*, Crf1, Gel1 et Pmp20, immunogènes, et capables d'induire une réponse Th1 déterminée par la production d'IFN γ chez des individus sains et des patients ayant subi une greffe de CSH. De plus, le nombre de LT spécifiques de Pmp20 augmente dans le sang périphérique de patients atteints d'aspergillose active invasive, indiquant leur contribution au contrôle de l'infection.

Les Th1 spécifiques exprimant CD154⁺ ou CD137⁺ sont obtenus à partir de PBMC de donneurs sains stimulées par Crf1, Gel1 et Pmp20. Ils reconnaissent les antigènes d'*A. fumigatus* apprêtés par des DC. De plus, les LT CD154⁺ sélectionnés peuvent reconnaître plusieurs espèces d'*Aspergillus*, de *Mucorales* et *C. albicans*.

Ces résultats peuvent constituer une base pour envisager un traitement ou une prophylaxie par transfert adoptif de LT chez les patients atteints d'infections fongiques sévères.

En plus du rôle majeur des Th1 dans la défense de l'hôte contre les infections fongiques et virales, des découvertes récentes mettent en évidence les fonctions effectrices des LT CD8⁺ contre ces pathogènes, et amènent à étudier un transfert adoptif de CTL notamment dans les cas où l'hôte présente une déplétion progressive des LT CD4⁺ et un haut risque d'infections.

8.1.2. CTL

Les CTL représentent les cellules principales dans la défense contre les virus. Deux grandes méthodes d'obtention des CTL spécifiques antiviraux ont été développées, elles reposent sur l'isolement et l'amplification des CTL anti-infectieux pendant quatre à six semaines de culture cellulaire *in vitro*, ou sur la sélection rapide des CTL circulant chez un donneur. Cette méthode implique que les lymphocytes du donneur contiennent des CTL spécifiques des virus fréquemment retrouvés comme les herpesvirus EBV et CMV (28).

Une équipe de chercheurs a généré des CTL spécifiques du CMV par stimulation de lymphocytes issus de donneurs sains avec des mélanges de peptides synthétiques proches des peptides pp65 et IE1 du CMV (29). Ils ont obtenu des CTL spécifiques

du CMV chez tous les donneurs inclus dans l'essai clinique. Ils ont perfusé ces CTL à des patients présentant des infections persistantes ou résistantes aux antiviraux après greffe de CSH allogéniques. Chez cinq des sept patients recevant ce traitement, une nouvelle activité spécifique anti-CMV a été détectée quatre à six semaines post-infection. Aucune réaction GvH (greffon contre l'hôte) due à ce traitement n'a été observée. Les chercheurs ont donc montré qu'il est possible de reconstituer l'immunité spécifique contre le CMV en cas de greffe de CSH sans aggraver la réaction GvH.

Une autre équipe a réalisé un transfert autogénique de LT spécifiques du CMV reperfusés directement après transplantation de CSH allogéniques. L'efficacité de cette stratégie a permis de réduire le traitement pharmacologique conventionnel.

Cependant l'efficacité de ces méthodes n'est pas toujours constante, et pour l'améliorer il est nécessaire de les mettre en œuvre précocement alors même que la charge virale n'est pas très élevée et que les signes cliniques ne sont pas encore visibles. Le développement de banques de CTL allogéniques et l'évolution des techniques de production améliorent la vitesse d'instauration de cette thérapie après greffe de CSH.

8.1.3. LT à récepteur antigénique chimérique (CAR)

Cette stratégie a pour objectif de rediriger la spécificité des LT afin qu'ils ciblent un antigène particulier. Les LT sont modifiés génétiquement *in vitro* afin qu'ils expriment un récepteur chimérique synthétique (CAR) spécifique de l'antigène à cibler, les rendant plus efficaces dans leurs fonctions effectrices anti-infectieuses.

Des auteurs ont fabriqué un CAR (Dectine-1 CAR, D-CAR) qui cible le β -glucane, une molécule sucrée retrouvée à la surface des parois des champignons (30). Ils ont utilisé le domaine extracellulaire du récepteur Dectine-1 liant spécifiquement les résidus β -glucanes, qu'ils ont associé à des domaines de signalisation intracellulaire dérivés des molécules de costimulation CD28 et CD3 ζ (Figure 2).

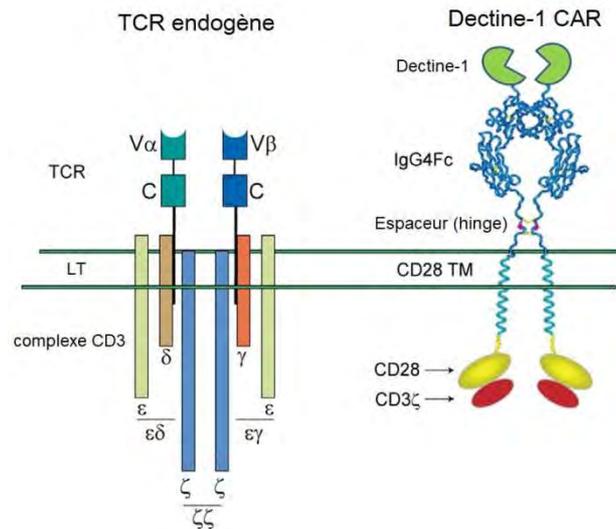


Figure 2. Représentation schématique du TCR endogène et du D-CAR composé d'une région variable à chaîne simple (d'après (30))

L'administration de LT D-CAR⁺ à des souris infectées par *Aspergillus* entraîne une inhibition de la croissance des hyphes du champignon et leur dégradation, à la fois dans des modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces résultats sont encourageants pour mettre en œuvre des essais cliniques sur des patients atteints d'infections fongiques opportunistes. De plus, récemment une thérapie par LT CAR a été approuvée dans le traitement des tumeurs malignes à LB (31), ces avancées en cancérologie soutiennent l'approfondissement des recherches en infectiologie.

8.2. Transfusion de granulocytes

Cette stratégie est réservée aux infections dues à des neutropénies prolongées, elle a été expérimentée comme immunothérapie adjuvante par le passé, et les résultats obtenus étaient controversés (32). Les preuves d'une efficacité clinique anti-infectieuse manquent, ce qui n'encourage pas les chercheurs à envisager cette stratégie. De futures expérimentations et essais cliniques, dans le cadre d'infections fongiques incontrôlées notamment, permettront de préciser leur place dans la prise en charge des infections par rapport aux anti-infectieux conventionnels.

8.3. Transfert adoptif de cellules NK

Les cellules NK ont des activités anti-infectieuses. Des chercheurs ont étudié leur potentiel antifongique contre des infections invasives à *A. fumigatus* dues à une neutropénie. Une étude montre qu'elles lysent les hyphes d'*A. fumigatus* directement ou indirectement via la production d'IFN γ . Le transfert de cellules NK activées provenant de souris WT à des souris atteintes d'aspergillose invasive neutropénique WT ou déficientes en IFN γ entraîne une clairance pulmonaire d'*A. fumigatus* plus rapide dans les deux modèles (33). Le transfert adoptif de cellules NK représente une alternative potentielle en immunothérapie adoptive, utilisées seules ou en associations avec les antifongiques.

8.4. Transfert adoptif de DC

Du fait de leur rôle central dans la surveillance et l'initiation des réponses immunitaires, les DC représentent une cible idéale en immunothérapie pour renforcer les réponses anti-infectieuses.

Un modèle d'infection chronique par VHB conduit à l'expression de protéines d'enveloppe de VHB par les souris transgéniques, et permet de développer des stratégies thérapeutiques d'immunisation. Les souris transgéniques VHB ont été immunisées avec des DC pulsées *in vitro* avec un peptide synthétique composé d'un épitope du tétanos toxoïde associé à un épitope immunodominant de HBsAg. L'immunisation a induit l'activation de LT CD8⁺ à activité cytotoxique et les auteurs ont observé une diminution de l'ADN viral et des HBsAg sériques (34).

Des résultats similaires ont été observés en cas de transfert adoptif de DC pulsées avec des protéines de *C. albicans* ou d'*Aspergillus* ou de *Cryptococcus* (23).

Les DC pulsées induisent des réponses anti-infectieuses efficaces, et cette stratégie est aussi explorée dans le but de développer des vaccins.

8.5. Transfert adoptif de LB

Le rôle majeur des Ac a conduit les chercheurs à explorer des stratégies d'immunothérapie les utilisant, et peu d'intérêt a été porté à une stratégie par transfert adoptif des LB qui les sécrètent. Cependant des études récentes montrent

que leur activité est obligatoire pendant la réponse immunitaire anti-infectieuse. Dans un modèle d'infection létale par le virus *ectromelia* de souris déficientes en LB, les chercheurs ont montré que le transfert de LB permet d'obtenir une clairance virale et une récupération clinique complète. Les fonctions des LB sont obligatoires pour la clairance complète du virus malgré la génération de CTL. Les LB et les Ac participent donc à la clairance virale (35).

Le transfert adoptif de LB représente une alternative à étudier.

9. Conclusion

Devant l'appauvrissement progressif des anti-infectieux conventionnels et les échecs dans la prise en charge thérapeutique des maladies infectieuses chroniques, la recherche en immunothérapie est en plein essor grâce à une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire, et au développement d'outils plus poussés pour la recherche et la production de molécules thérapeutiques.

Les stratégies d'immunothérapie anti-infectieuse sont variées et reposent principalement sur la modulation du système immunitaire par les Ac, les cytokines et le transfert adoptif de LT.

L'immunothérapie est appelée à jouer un rôle central dans la prise en charge des maladies infectieuses comme l'indiquent les résultats des essais cliniques en cours sur des patients VIH⁺ ou atteints de tuberculose. De nouveaux horizons sont envisagés avec le développement d'outils puissants dont les super anticorps et les vaccins thérapeutiques.

B. Immunothérapie antibactérienne : exemple de la tuberculose

1. Généralités sur la tuberculose

1.1. Définition et épidémiologie

La tuberculose est une maladie infectieuse qui touche principalement les voies respiratoires. C'est une maladie de la pauvreté, les pays en voie de développement sont les plus touchés. Elle est liée à un contexte économique et social bas et est favorisée par des conditions de vie précaires, un affaiblissement du système immunitaire (VIH, corticoïdes...), ou encore un séjour dans un pays de forte endémie (Asie du Sud-Est, Afrique).

Elle est causée par le bacille de Koch (BK), un pathogène strict dont l'Homme est à la fois le réservoir, l'agent de transmission et de dissémination. Elle est contagieuse par transmission interhumaine par les sécrétions respiratoires (gouttelettes de Pflügge), par des aérosols contaminés, ou au contact de malades porteurs de lésions excavées et ouvertes. C'est une maladie endémique, tous les porteurs sains constituent des réservoirs. Un tiers de la population mondiale serait infecté.

En 2016, sur le plan mondial, l'incidence était de 10,4 millions (dont un million dû au VIH) et une mortalité de 1,6 million (rapport OMS 2017). Il s'agit de la neuvième cause de mortalité mondiale, et la principale cause de décès due à un agent infectieux unique (devant le VIH/sida). Elle est la première cause de décès chez les patients VIH⁺. En 2016, 45 % des cas incidents sont retrouvés dans la région OMS de l'Asie du Sud-Est, 25 % dans la région OMS africaine, et 3 % dans la région OMS européenne.

La Stratégie OMS a été mise en place pour mettre fin à la tuberculose. Parmi ses objectifs figurent une réduction de 90 % du nombre de décès imputables à la tuberculose et une réduction de 80 % de son incidence d'ici à 2030, par rapport à 2015. Ces dernières années, son taux de mortalité mondial diminue de 3 % par an et son taux d'incidence de 2 % par an.

1.2. Description de l'agent pathogène.

L'agent infectieux responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a été isolé en 1882 par Koch. Les bactéries de l'ordre Actinomycétale sont des petits BAAR (bacille acido-alcool-résistant) immobiles, aérobies strict, non capsulés, non sporulés à croissance intracellulaire majoritairement dans les macrophages. Leur paroi est très épaisse, peu perméable, et riche en lipides notamment en acides mycoliques. Elle leur assure une résistance aux agents exogènes.

1.3. Clinique et physiopathologie

La tuberculose est une infection chronique à physiopathologie en deux temps. Une primo-infection apparaît dans les espaces alvéolaires, puis une deuxième phase de dissémination par voie bronchique et hématogène peut se développer.

L'incubation dure un à trois mois, elle est le plus souvent asymptomatique ou accompagnée de fièvre, d'un affaiblissement de l'état général ou d'un érythème noueux.

Les cavités pulmonaires forment un environnement aérobie favorable à la croissance rapide des bacilles. Et le poumon devient le siège d'une lésion granulomateuse avec nécrose caséuse centrale qui induit une hypersensibilité tissulaire.

Un très faible pourcentage de la population est capable de calcifier la lésion pulmonaire, d'éliminer totalement le bacille et de guérir spontanément.

La grande majorité de la population infectée (90-95 %) est capable de contenir l'infection à un stade latent asymptomatique, et n'est pas contagieuse.

Dans 5 à 10 % des cas, la primo-infection évolue en tuberculose latente puis en tuberculose maladie. Ces cas sont porteurs de facteurs de risque (immunodépression, VIH...) qui induisent une réactivation endogène du bacille. La tuberculose maladie se développe le plus souvent dans les deux ans suivant la primo-infection. Elle peut se présenter sous des formes cliniques différentes.

La dissémination du bacille par voie bronchique entraîne une tuberculose pulmonaire commune avec une toux durant plus de trois semaines, des douleurs thoraciques, une dyspnée, de la fièvre et des sueurs nocturnes. Le sujet est considéré comme contagieux, il s'agit de la seule forme de transmission de la tuberculose.

La dissémination hématogène du bacille aboutit à une tuberculose extra-pulmonaire ou une forme gravissime, la tuberculose miliaire. La tuberculose extra-pulmonaire est la moins fréquente, le bacille se localise dans d'autres tissus vascularisés. Ainsi, elle peut être ganglionnaire, ostéo-articulaire, péricarde, neuroméningée, génito-urinaire, surrénale. La tuberculose miliaire se développe en cas de dissémination pulmonaire et extra-pulmonaire. Une pneumopathie interstitielle et une septicémie tuberculeuse avec formation de multiples granulomes de la taille d'un grain de mil sont observables.

2. Prise en charge de la tuberculose

Le traitement standard, de première intention, de la tuberculose est de six mois et associe plusieurs antibiotiques pour limiter l'émergence de résistances. Il repose d'abord sur une quadrithérapie de deux mois associant les antituberculeux isoniazide (INH), rifampicine (RIF), éthambutol (ETB), et pyrazinamide (PZN). Puis le traitement est prolongé par une bithérapie associant isoniazide et rifampicine pendant quatre mois afin d'atteindre les différentes formes bacillaires (extra- et intracellulaires). La bithérapie peut être prolongée pour une durée de traitement totale de neuf à douze mois en cas de forme extra-pulmonaire.

La primo-infection asymptomatique et la tuberculose latente peuvent être prises en charge par chimioprophylaxie afin d'empêcher une infection dans l'entourage lors d'un contact avec un sujet porteur, ou empêcher une évolution vers la tuberculose maladie notamment chez des sujets immunodéprimés ou porteurs du VIH. La prophylaxie repose sur une bithérapie isoniazide et rifampicine pendant 3 mois ou une monothérapie par isoniazide pendant 9 mois.

L'isoniazide et l'éthambutol ont une activité bactériostatique et/ou bactéricide sur les mycobactéries et principalement sur les formes en croissance. Ils ciblent des enzymes mycobactériennes responsables de la synthèse de la paroi.

La rifampicine a une activité bactéricide à la fois sur les formes en multiplication et les formes quiescentes. Elle inhibe la synthèse de tous les ARNs et peut aussi induire la formation de radicaux hydroxyl. Le pyrazinamide, dérivé du nicotinamide, a une activité bactéricide sur les mycobactéries intracellulaires quiescentes.

Ces antibiotiques sont responsables d'effets indésirables graves, et notamment d'une hépatotoxicité.

De plus, Mtb a développé des résistances. Elles correspondent le plus souvent à un changement épigénétique dans l'expression des gènes et à une modification des protéines cibles causant une tolérance aux antibiotiques.

Des mycobactéries sont résistantes à la rifampicine, antituberculeux le plus puissant, on parle de RR-TB. En 2016, au niveau mondial, 600 000 nouveaux cas de RR-TB ont été recensés, augmentant la susceptibilité à la maladie. D'autres mycobactéries sont résistantes à l'association isoniazide et rifampicine qui est la forme la plus grave de la résistance (tuberculose multi-résistante MDR-TB et XDR-TB en cas de résistance supplémentaire). On estime qu'en 2016, au niveau mondial, 4,1 % des nouveaux cas et 19 % des cas déjà traités étaient des cas de MDR-TB ou de RR-TB.

En 2016, sur le plan mondial, 490 000 cas incidents de MDR-TB ont été recensés (36). Parmi ces cas, seulement 153 000 ont été détectés et 130 000 ont débuté un traitement de MDR-TB. Au total, les MDR et RR-TB ont causé 240 000 morts en 2016, la plupart en Asie (37).

L'OMS recommande de nouvelles stratégies thérapeutiques notamment l'utilisation de spécialités qui avaient été mises à l'écart (clofazimine, linézolide), ou de nouvelles molécules (bédaquiline, délamanide), mais dans tous les cas, des résistances se développent et se répandent. Et, en dépit de leur nombre, ces spécialités sont souvent indisponibles ou mal utilisées dans les pays endémiques. Et la plupart des personnes éligibles pour un traitement préventif n'y ont pas accès. Alors, la tuberculose continue d'avoir un impact néfaste sur la santé publique mondiale. Il est urgent de rechercher d'autres solutions thérapeutiques, dont fait partie l'immunothérapie. Pour la développer, il est nécessaire de bien connaître et comprendre la réponse immunitaire induite par Mtb et les interactions entre les effecteurs du système immunitaire et Mtb.

3. Réponse immunitaire à *Mycobacterium tuberculosis* (38)(39)(Figure 4)

Le bacille tuberculeux a su s'adapter à différents sites anatomiques de l'hôte au cours du temps, et à co-évoluer avec lui. Il ne possède pas de facteurs de virulence, mais emploie un ensemble de protéines effectrices pour leurrer le système immunitaire de l'hôte et survivre dans le compartiment intracellulaire (40). Chez les immunocompétents, il est maîtrisé sous forme quiescente dans des structures complexes organisées par les cellules immunitaires, les granulomes (Figure 3), où il persiste pendant une longue période de latence sans causer de dommages ou de transmission, jusqu'à ce que le système immunitaire subisse un affaiblissement. Mtb interagit avec les réponses innée et adaptative, cellulaire et humorale du système immunitaire de l'hôte, pour survivre et demeurer en phase de latence. Ces mécanismes d'adaptation de Mtb sont de plus en plus étudiés afin de les manipuler et d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.1. Réponse immunitaire innée

3.1.1. Reconnaissance de Mtb

Après inhalation, et son trajet dans les voies respiratoires hautes, Mtb parvient aux alvéoles pulmonaires et envahit presque exclusivement les cellules phagocytaires pulmonaires : macrophages alvéolaires (MA), neutrophiles, DC, et monocytes qui s'accumulent progressivement dans les poumons et forment des granulomes primaires. Des études récentes montrent que Mtb peut aussi adhérer et infester des cellules épithéliales, des fibroblastes, des adipocytes et des neurones, ce qui explique sa pathogénicité extra-pulmonaire. Contrairement à un grand nombre d'agents infectieux pour lesquels le recrutement des cellules immunitaires entraîne leur élimination, Mtb manipule ces cellules pour s'y multiplier.

Un grand nombre de PRRs exprimés par les cellules phagocytaires reconnaît des antigènes de Mtb. Les PRR identifiés sont des récepteurs aux mannoses, des récepteurs aux fractions du complément (CR4), des récepteurs Fc, des récepteurs lectines de type C (DC-SIGN), des TLR (TLR2 reconnaît des lipoprotéines de la paroi de Mtb ; TLR9 reconnaît l'ADN bactérien). Au contraire, peu d'antigènes spécifiques de Mtb (lipoprotéines, glycolipides, carbohydrates) pouvant être reconnus par ces PRRs et favorisant la phagocytose ont été identifiés. HBHA (heparin-binding hemagglutinin adhesion) est la première adhésine décrite chez Mtb qui joue un rôle

crucial dans sa dissémination extra-pulmonaire. En effet, la perte de HBHA entraîne une diminution de l'adhésion et de l'invasion des cellules épithéliales. Récemment les pili de Mtb ont été décrits comme déclencheurs de l'adhésion et de l'invasion des macrophages alvéolaires. La famille de protéines Mce (mammalian cell entry) représente un autre groupe de molécules exposées à la surface de Mtb et associées à sa phagocytose.

3.1.2. Activation intracellulaire

Le système immunitaire active des cascades de signalisation, et met en place une variété de mécanismes comme la phagocytose, l'autophagie, l'apoptose et l'assemblage d'inflammasome pour contrôler Mtb. Cependant tous ces mécanismes sont manipulés par Mtb à son propre avantage.

Les PRRs cytosoliques NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain protein 2), et NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3) reconnaissent respectivement une sous-unité du peptidoglycane de Mtb et des substrats sécrétés par ESX-1 (secretion system) comme ESAT6 (early secretory antigenic target 6). La stimulation de ces PRRs induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IFN de type I), de chimiokines et de récepteurs d'adhérence cellulaire qui contribuent à la mobilisation et à l'activation des cellules immunitaires localement et à distance. Cependant leur arrivée est aussi profitable à Mtb, lui fournissant de nouvelles niches pour se multiplier.

3.1.2.1. Macrophages alvéolaires (41)

Mtb est capable de moduler le trafic intracellulaire et de bloquer l'acidification et la maturation des phagosomes. Ainsi il échappe aux fonctions de dégradation des lysosomes et survit dans les MA. Il induit un profil de macrophages à activité antimicrobienne pro-inflammatoire accompagnée d'une sécrétion importante de TNF α qui induit la mort de la cellule infectée par apoptose puis efferocytose. Cependant Mtb possède des mécanismes d'inhibition de l'apoptose qui lui confèrent une survie prolongée et une croissance et accumulation avant d'être libéré. Par l'intermédiaire d'ESX-1, il induit la mort par nécrose des cellules infectées, et le

recrutement de macrophages. Mtb est libéré puis phagocyté par les macrophages récemment recrutés. Il optimise ainsi sa diffusion cellulaire et son expansion

3.1.2.2. Polynucléaires neutrophiles

Le rôle des neutrophiles est aussi étudié. Leur taux serait inversement proportionnel au risque d'infection à Mtb. Leur fonction principale est de libérer des peptides antimicrobiens dont HNP1 à 3 (human neutropeptides), LL-37 et la lipocaline 2 et ainsi de tuer Mtb. Ils capturent aussi les mycobactéries dans des NETs constitués d'ADN recouvert de peptides antimicrobiens. De plus, une des chimiokines les plus exprimées par les MA infectés, CXCL8, recrute les neutrophiles et peut se lier directement à Mtb. Alors, la phagocytose de Mtb par les neutrophiles est améliorée.

Grâce à des mécanismes de manipulation et d'adaptation au système immunitaire, Mtb domine la réponse immunitaire innée. Elle joue un rôle immédiat, mais est rapidement contournée par Mtb qui s'entoure de cellules pour former un granulome primaire. La fonction principale de cette réponse est d'établir un environnement qui permet la mise en place de la réponse adaptative.

3.2. Délai d'initiation de la réponse immunitaire adaptative

Une des caractéristiques principales de la réponse immunitaire à Mtb est le long délai qui sépare la réponse innée et la mise en place de la réponse adaptative. Chez la souris, la réponse T spécifique est observée après un délai de dix à quatorze jours post-infection par aérosol avec un pic à trois semaines. Les mécanismes impliqués dans ce délai ne sont pas encore totalement élucidés mais certains ont été mis en évidence :

- Mtb limite ou inhibe la migration des DC des poumons vers les ganglions lymphatiques en réponse aux ligands de CCR7 pour activer les LT naïfs.
- Les DC ont des caractéristiques différentes selon leur localisation dans les voies respiratoires hautes ou dans les alvéoles pulmonaires. Le tissu alvéolaire est un environnement régulé où elles sont entourées de protéines du surfactant qui limitent leur capacité à migrer vers les ganglions lymphatiques. Elles ne migrent pas aussi rapidement qu'elles le font à partir des voies respiratoires hautes. En effet,

cette résistance à la migration est cruciale pour maintenir l'espace alvéolaire comme une surface d'échanges gazeux et non un site inflammatoire.

- Les cellules infectées par Mtb ne peuvent pas migrer immédiatement vers les ganglions lymphatiques.
- Mtb inhibe l'apoptose des neutrophiles importante pour déclencher les réponses LT CD4⁺ et CD8⁺.
- Les LTreg se développent dès le début de l'infection et exercent un effet anti-inflammatoire par la sécrétion d'IL-10 et TGFβ.

3.3. Réponse immunitaire adaptative

Après ce délai, la réponse immunitaire adaptative se met en place. Elle fait intervenir principalement les LT conventionnels et non conventionnels, et les LB qui viennent entourer le granulome primaire.

3.3.1. Lymphocytes T CD4⁺

Le rôle des LT CD4⁺ est le mieux caractérisé. Les cellules phagocytaires et principalement les DC et macrophages présentent par les molécules du CMH II exprimées à leur surface, des antigènes de Mtb (ESAT6, CFP-10, Ag85A et B) aux LT CD4⁺. Ils s'activent et se différencient majoritairement en lymphocytes Th1 en réponse à une stimulation par l'IL-12 produite par les phagocytes activés. Les LTh1 sécrètent alors de l'IFNγ et aussi du TNF et de l'IL-2. Ces cytokines sont importantes pour une immunité protectrice contre les mycobactéries (augmentation des fonctions de phagocytose des macrophages, recrutement des macrophages sur le site de l'infection, différenciation des LT naïfs en Th1 plutôt que T_{FH} et augmentation des CTL, respectivement).

Cependant une réponse inflammatoire incontrôlée peut induire des dommages tissulaires importants et une régulation par une réponse Th2 se met en place plus tardivement. Il existe une balance entre les réponses Th1/Th2 dans les granulomes, contrôlée par des mécanismes régulateurs qui font l'objet de recherches. Les cytokines sécrétées par les Th1 et Th2 influent aussi sur le phénotype des macrophages composant les granulomes. Les Th1 par l'intermédiaire d'IFNγ induisent un phénotype de macrophages produisant des agents antibactériens

(ROS, NO) et des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , IL-6). Tandis que les lymphocytes Th2 par l'intermédiaire d'IL-4 et IL-13 induisent un phénotype anti-inflammatoire avec libération d'IL-10.

Une différenciation des LT naïfs en Th17 est aussi observée. Ils sécrètent de l'IL-17 qui a rôle dans la formation des granulomes, et des cytokines de la famille de l'IL-10 (IL-24, l'IL-22, IL-10) qui inhibent la croissance intracellulaire de Mtb.

Les Treg, présents tout au long de l'infection et activés par l'IL-2 sécrétée par les Th1, contrôlent la réponse pro-inflammatoire par sécrétion d'IL-10 et TGF β . Des recherches actuelles portent sur le rôle de l'IL-10 dans la réponse immunitaire à Mtb. Il existe des polymorphismes du gène codant pour l'IL-10 associés à une augmentation du risque de tuberculose.

3.3.2. Lymphocytes T CD8⁺

Une contribution des LT CD8⁺ a aussi été mise en évidence, mais elle est encore peu décrite. Ils ont un rôle protecteur par la sécrétion de granules contenant des molécules cytotoxiques (perforine, Grz, granulysine) qui peuvent lyser les cellules infectées par Mtb, notamment la granulysine qui a une action directe sur Mtb.

3.3.2.1. Lymphocytes T CD8⁺ non conventionnels à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

Les LT CD8⁺ non conventionnels résident dans les muqueuses des voies respiratoires et peuvent être mobilisés et agir rapidement en cas d'infection à Mtb. Les chercheurs étudient les réponses induites par ces LT dans le cadre de la tuberculose.

3.3.2.1.1. Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ V γ 2V δ 2 sont présents uniquement chez les primates et leur TCR reconnaît des phosphoantigènes de certains pathogènes dont Mtb. Leur fonction *in vivo*, dans la tuberculose, n'est pas encore mise en évidence.

Un groupe de macaques infectés par Mtb a reçu, par voie intramusculaire, un phosphoantigène chimique (Picostim) reconnu spécifiquement par le TCR des LT V γ 2V δ 2 deux à trois jours post-infection (42). Un deuxième groupe a été co-traité par Picostim et de l'IL-2 recombinante administrée par des injections intramusculaires les cinq jours suivant l'injection de Picostim. Trois groupes contrôles ont reçu respectivement de l'IL-2 seule, ou du BSA, ou une solution saline pendant cinq jours. Les auteurs ont observé que l'administration de Picostim et d'IL-2 induit la croissance et l'accumulation pulmonaire de LT V γ 2V δ 2. Ils sont à l'origine d'une diminution significative de la charge de Mtb et des lésions tuberculeuses pulmonaires. Ils produisent des cytokines antituberculeuses (IFN γ) ainsi que de la perforine et de la granulysine. Ces deux dernières, dans le tissu pulmonaire, limitent la croissance intracellulaire de Mtb, et la granulysine activée lyse Mtb. L'augmentation des LT effecteurs V γ 2V δ 2 favorise les réponses immunitaires pulmonaires induites par les LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques des peptides de Mtb en produisant notamment de l'IL-12. Ces cellules jouent un rôle protecteur antituberculeux à approfondir.

3.3.2.1.2. Lymphocytes MAIT

En cas de tuberculose chez l'homme, la fréquence des MAIT dans le sang circulant est diminuée (43). Ils s'accumulent dans les tissus infectés, ce qui suggère leur recrutement du compartiment sanguin aux tissus pulmonaires (44). De plus, la fréquence des cellules CD161⁺ dans le sang circulant est significativement plus faible pendant la tuberculose active que pendant la tuberculose latente. Leur fréquence augmente chez des sujets atteints de tuberculose en phase latente par rapport à des contrôles sains alors qu'elle ne varie pas en cas de tuberculose maladie (45).

Lors de son trajet jusqu'aux alvéoles pulmonaires, Mtb interagit avec l'épithélium de revêtement des voies respiratoires supérieures. Il envahit les cellules épithéliales pulmonaires et y demeure dans une vacuole intracellulaire. Les cellules épithéliales peuvent exprimer à leur surface la molécule MR1, qui présente des antigènes de la paroi de Mtb aux MAIT résidents dans la muqueuse pulmonaire. Les MAIT sont activés et sécrètent de l'IFN γ (46)(44). A partir d'une co-culture de cellules épithéliales pulmonaires infectées par Mtb avec des clones de LT restreints par

MR1, il a été montré que les cellules épithéliales peuvent stimuler la production d'IFN γ par les MAIT (47).

Selon le protocole d'étude des MAIT *in vitro*, les chercheurs obtiennent des résultats contrastés quant à la production des cytokines et particulièrement de l'IFN γ dans le sang périphérique en cas d'infection à Mtb. Certaines montrent une augmentation de cette sécrétion (48) et d'autres ne montrent pas de variation par rapport à des contrôles sains (49).

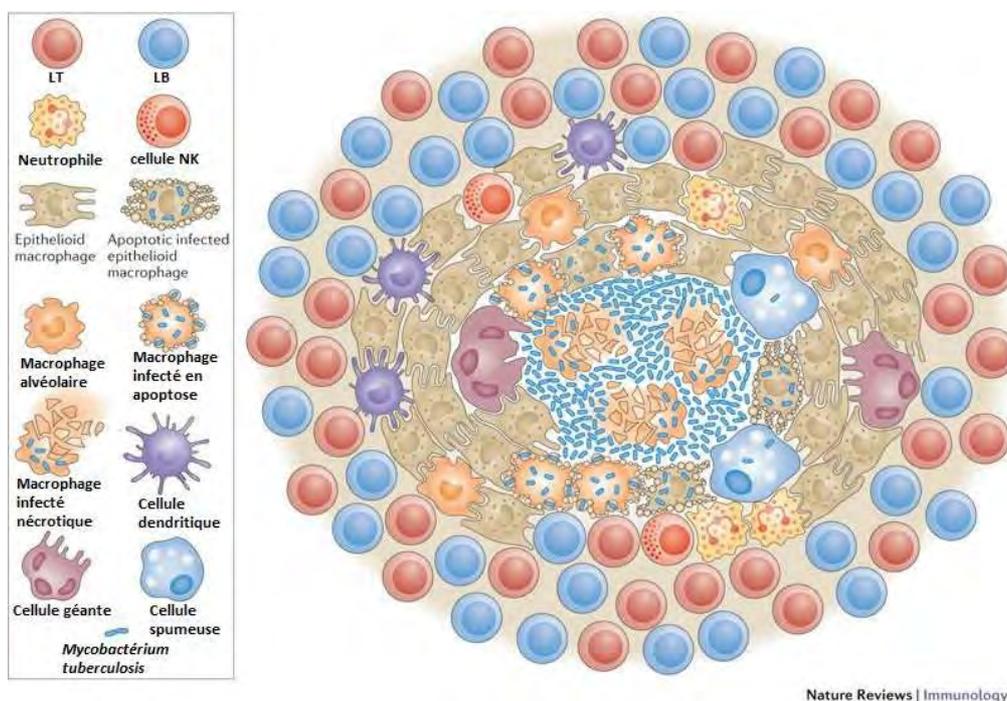
Récemment une étude épidémiologique a obtenu des données soutenant un rôle protecteur des MAIT dans la tuberculose : un polymorphisme sur un intron du gène de MR1 est associé à un risque plus élevé de tuberculose (47).

Les MAIT semblent donc contribuer à la réponse immunitaire contre Mtb, ils limiteraient le développement de la tuberculose ou sa progression. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de le démontrer.

3.3.3. Lymphocytes B

Le rôle des LB est moins décrit. Ils sont des constituants majeurs du granulome et peuvent apprêter et présenter des antigènes de Mtb aux LT, sécréter des immunoglobulines et moduler l'inflammation en produisant de l'IL-10. Des anticorps dirigés contre un grand nombre d'antigènes de Mtb sont sécrétés. Des IgG, IgA et IgM sont retrouvées à un niveau d'expression variable. De plus, les réponses humorales sont distinctes selon la phase de la tuberculose. En phase latente, les Ac favorisent la maturation des phagolysosomes, et l'activation des inflammasomes et ainsi améliorent la capacité des macrophages à tuer Mtb. Des études sont nécessaires afin de mettre en évidence les mécanismes de reconnaissance de cibles spécifiques à Mtb par les Ac, et la lyse de Mtb intracellulaire par les Ac.

La réponse adaptative, avec accumulation de LT CD4⁺ et CD8⁺ dans les poumons, coïncide avec un arrêt de la croissance bactérienne. La plupart des individus infectés deviennent asymptomatiques et sont considérés comme atteints de tuberculose latente. Pour survivre dans l'environnement hypoxique et échapper aux réponses immunitaires, Mtb demeure sous une forme quiescente à l'intérieur des granulomes. En effet, lorsque la réponse adaptative est finalement mise en place, les LT spécifiques infiltrent les granulomes induisant la formation de granulomes plus importants et organisés (Figure 3). Les MA infectés se situent au centre, certains se différencient en cellules épithéloïdes ou polynucléées après fusionnement. Ils sont entourés de plusieurs couches constituées de cellules recrutées (macrophages, neutrophiles, DC, cellules NK). Enfin, les LT et les LB forment des couches en périphérie. Les granulomes sont très divers dans leur structure, taille, et composition cellulaire. Les macrophages, notamment, ont des phénotypes variés et régulent l'homéostasie au sein des granulomes selon leur profil pro- ou anti-inflammatoire. Les granulomes forment donc une barrière physique et empêchent la diffusion de Mtb. Cependant, Mtb y est difficile d'accès à la fois pour les cellules de l'immunité adaptative, et pour les thérapeutiques.



La réponse immunitaire adaptative n'est pas suffisante pour éliminer complètement Mtb. Il limite la réponse adaptative par différents mécanismes dont certains ont été mis en évidence (40) :

- inhibition de l'apprêtement et perturbation de la présentation des antigènes par les molécules du CMH II aux LT CD4⁺ dans les granulomes, et limitation majeure de l'activation des LT CD4⁺,

- induction de médiateurs anti-inflammatoires,

- restriction de la réponse par les Treg,

- diminution de l'expression des gènes codant les antigènes de Mtb normalement reconnus par les LT, entraînant un échec à induire une réponse spécifique.

Durant la phase latente, la grande majorité de la population de Mtb reste quiescente mais une petite sous-population continue à se répliquer et Mtb acquière des mutations. Ainsi, la tuberculose latente se définit comme un état d'équilibre dynamique entre le système immunitaire et la bactérie, qui y contribue par des mécanismes régulant son état métabolique et sa croissance.

3.4. Progression de la tuberculose latente vers la tuberculose maladie : réactivation

La réactivation de la tuberculose latente provoque sa progression en tuberculose maladie (39). Celle-ci peut se déclencher des dizaines d'années après la primo-infection. Elle est la conséquence d'une défaillance de la réponse immunitaire à Mtb. Un déséquilibre au sein des granulomes provoque l'activation de Mtb, il se réplique et la nécrose des macrophages infectés entraîne sa libération et sa propagation à d'autres tissus.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une défaillance immunitaire et d'une réactivation de la tuberculose. Parmi ces facteurs, les plus pertinents sont l'infection par le VIH et le traitement par les anti-TNF. Cependant, les mécanismes immunitaires impliqués ne sont pas précisément déterminés.

Le VIH est capable d'infecter et de détruire les LT CD4⁺. De plus, il a été montré qu'il cible et détruit plus fréquemment les LT CD4⁺ spécifiques des antigènes de Mtb

que les LT CD4⁺ spécifiques d'autres antigènes. Ce mécanisme explique aussi le risque élevé de développer rapidement la tuberculose chez les personnes VIH⁺.

La neutralisation du TNF par des anticorps thérapeutiques monoclonaux provoque une diminution de l'activité des macrophages et de leur élimination ultérieure. Les anti-TNF favorisent aussi le développement de lymphocytes Treg, et réduisent l'activité antimycobactérienne des LT CD8⁺.

Ces deux facteurs de réactivation suggèrent que les LT CD4⁺ et le TNF sont les éléments essentiels à l'immunité protectrice contre la tuberculose.

D'autres conditions d'affaiblissement du système immunitaire réactivant Mtb ont été identifiées. Le diabète de type 2 s'accompagne d'une augmentation et d'une hyperréactivité des lymphocytes Th1 et Th17, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6), et d'une diminution des lymphocytes Treg. De plus une altération de la métabolisation du glucose induite par la tuberculose peut provoquer un diabète de type 2.

Un autre facteur de réactivation est la malnutrition amenant à une carence en vitamines D. La vitamine D a deux modes d'action différents. Elle s'active rapidement, en liant son récepteur membranaire VDR, et entraîne une augmentation de la production de ROS, d'oxyde nitrique et une fusion des phagolysosomes. Elle peut aussi se lier à son récepteur VDR nucléaire. Elle forme alors un complexe de facteurs de transcription qui cible de nombreux promoteurs et induit notamment l'expression de la cathélicidine (clivée en LL-37) qui a des effets directs antimicrobiens et induit l'autophagie. La vitamine D favorise aussi la production d'IL-10 et la différenciation en lymphocytes Treg. Son apport peut être intéressant pour limiter l'inflammation pathologique. Cependant au cours de la phase initiale de la tuberculose, son action anti-inflammatoire favorise la croissance de Mtb.

Donc, le contrôle de la tuberculose demande un équilibre entre une réponse immunitaire suffisante pour contenir l'infection et une inflammation excessive dommageable. Afin de moduler la réponse immunitaire à Mtb en immunothérapie, il est nécessaire de cibler un mécanisme précis de cette réponse à un temps donné.

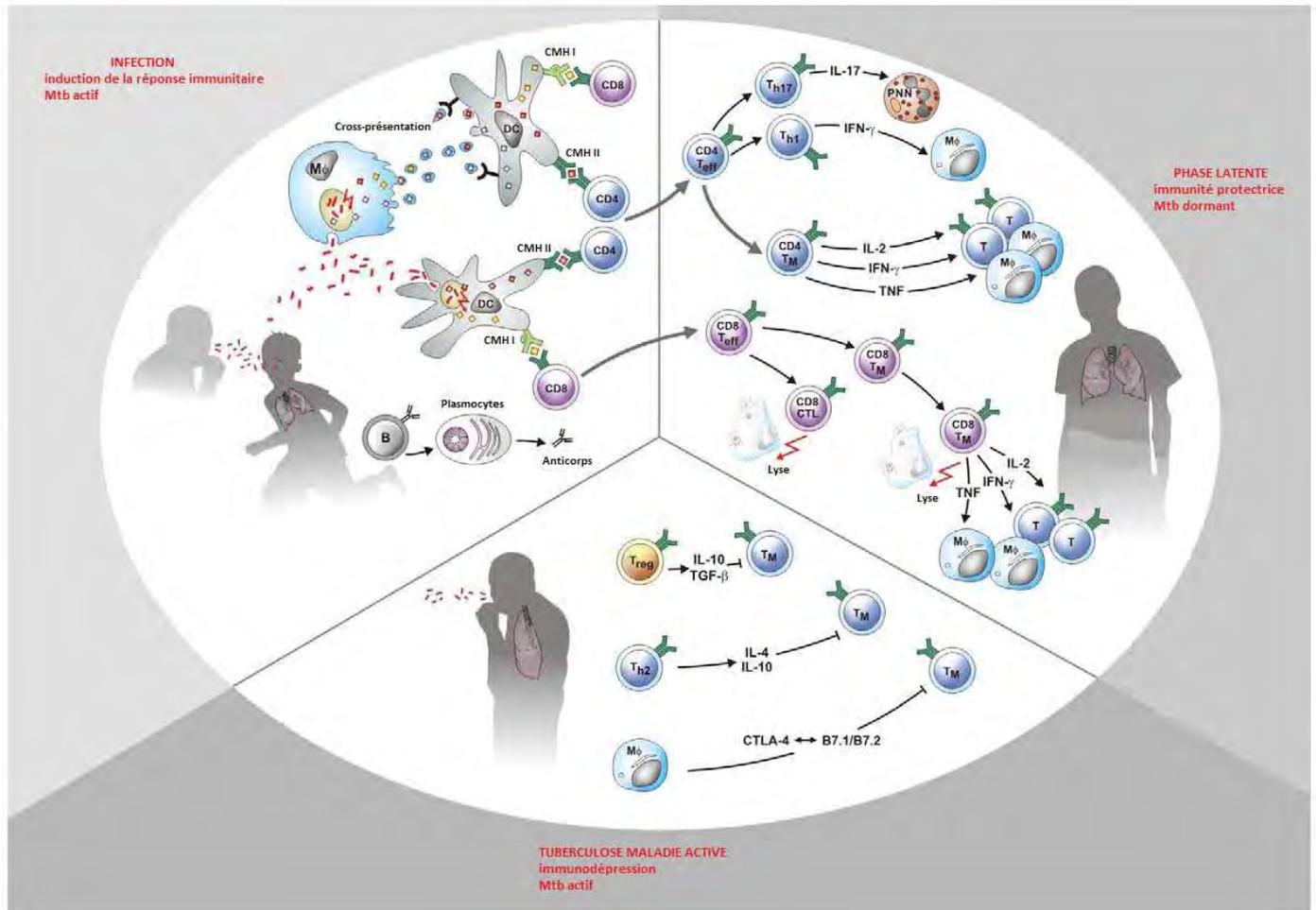


Figure 4. Réponse immunitaire à *Mycobacterium tuberculosis* (d'après (51))

4. Thérapies préventives et immunothérapies de la tuberculose

4.1. Vaccination

4.1.1. Vaccin préventif : BCG

4.1.1.1. Généralités

Le BCG (bacille de Calmette et Guérin) est le vaccin le plus administré dans le monde (4 milliards de d'individus). Cette bactérie vivante atténuée a été obtenue il y a plus de 100 ans, par multiples passages de la souche *Mycobacterium bovis* sur un milieu de culture spécifique. Par cette technique, la mycobactérie perd de sa virulence mais demeure immunogène. Le BCG a été développé pour son potentiel à empêcher la tuberculose et non l'infection à Mtb.

Il est utilisé actuellement car il reste le seul vaccin disponible contre la tuberculose mais son efficacité est contestée. Elle est au mieux de 60 % contre le développement de la tuberculose chez l'adulte, et diminue avec l'âge.

Le BCG induit le développement de LT mémoires spécifiques d'antigènes de mycobactéries qui agissent rapidement en cas d'infection ultérieure. De plus, il entraîne une sécrétion d'anticorps qui peuvent contribuer à la réponse immunitaire protectrice par l'opsonisation des mycobactéries pour une capture ultérieure par les phagocytes.

Par ces mécanismes immunitaires, il empêche la dissémination de la mycobactérie. Son intérêt réside alors dans sa protection contre la méningite tuberculeuse, la tuberculose disséminée extra-pulmonaire et miliaire. En effet, après vaccination, la réponse immunitaire protectrice obtenue n'est pas maintenue. C'est pourquoi il ne protège pas contre la primo-infection, la réactivation et la tuberculose pulmonaire commune. Les mécanismes à l'origine de ces échecs sont encore mal compris.

Son inefficacité peut être due à des différences génétiques entre *M. bovis* atténué et *M. bovis* virulent, à des co-infections par des virus ou parasites, ou à la situation géographique et aux facteurs socio-économiques et nutritionnels des individus vaccinés. De part sa faible virulence, il induit un niveau modeste d'anticorps spécifiques qui ne sont pas toujours détectables, l'exposition aux mycobactéries environnementales étant à l'origine d'un titre d'anticorps préexistant déjà élevé.

Avant 2007, en France, les recommandations préconisaient une vaccination obligatoire chez l'enfant, avant six ans, entrant en collectivité. En 2007, il a été supprimé du calendrier vaccinal en tant que vaccin obligatoire. L'obligation vaccinale est remplacée par des recommandations fortes dans les premiers mois de la vie, chez les enfants à risque élevé de développer une tuberculose selon leur origine de naissance et celle de leurs parents.

Donc la vaccination par BCG n'empêche pas la maladie mais permet de réduire sa gravité et l'incidence des formes sévères. Il est largement administré chez les enfants dans les pays endémiques. L'exploration des réponses immunitaires innée et adaptative mises en place après vaccination par le BCG permet de mieux comprendre sa difficulté à maintenir une immunité protectrice et offre des perspectives pour l'améliorer ou le remplacer par des molécules plus efficaces.

4.1.1.2. Réponse immunitaire innée au BCG (52)

Les premières cellules activées par le BCG sont les macrophages résidant dans l'épiderme, le vaccin étant injecté par voie intradermique. Ils sont activés via leurs PRRs, alors les mécanismes de réponses immunitaires mis en place correspondent à ceux déclenchés par Mtb. Cependant, l'expression des PRRs à la surface des macrophages de l'épiderme et les réponses qui en dépendent sont différentes de celles des MA. Une stimulation antigénique prolongée de TLR2 à la surface des macrophages de l'épiderme diminue l'expression des molécules du CMH II ainsi que la présentation aux LT (53). Les voies de signalisation intracellulaire, l'apprêtement de l'antigène et sa présentation aux LT CD4⁺ sont différents, ce qui peut expliquer l'échec d'une immunité prolongée.

Les DC impliquées dans la réponse au BCG sont celles de l'épiderme. Elles le reconnaissent par leurs PRRs et migrent du site d'injection vers les ganglions lymphatiques en acquérant un phénotype particulier qui dépend d'une voie impliquant l'IL-1R et myd88. Puis elles initient la réponse immunitaire adaptative. La stimulation des DC par le BCG aboutit à une augmentation de l'expression des marqueurs de surface CMH II, CD40, CD44, CD54 et CD80/86 impliqués dans l'activation des DC, leur maturation, migration, et présentation des antigènes aux LT CD4⁺. Donc le BCG est plus efficace que Mtb à induire une réponse adaptative efficiente. Cependant des expériences *in vivo* chez la souris ont montré une saturation de cette réponse avec l'incapacité à maintenir la stimulation du système immunitaire adaptatif. La sécrétion des cytokines TNF, IL-1 β , IL-6, IL-4 et IL-10 est augmentée tandis que celle de l'IL-12 ne l'est pas et reste faible. Ainsi des expériences *in vivo* chez la souris ont montré l'importance du TNF dans la réponse immunitaire générée par le BCG, et la présence d'une balance entre l'expression de l'IL-10 et celle de l'IL-12 qui augmente chez des souris IL-10^{-/-} (54). Or, l'IL-10 diminue la migration, la maturation, l'activation des LT et leur prolifération. Les interactions DC-BCG doivent être explorées dans le poumon afin de développer des mécanismes améliorant l'efficacité du BCG.

Il interagit aussi avec les neutrophiles, ce qui entraîne une augmentation de l'expression des marqueurs d'adhésion CD11b, CD18, Fc γ RII et III et stimule l'expression des cytokines IL-1 β , TGF β , et des chimiokines CCL2 CCL3. Leur rôle n'est pas encore bien défini. Les neutrophiles peuvent transporter le BCG jusqu'aux

ganglions et communiquer avec les DC. Ils émettent des signaux de maturation, et favorisent la capacité de présentation des DC. Ils peuvent aussi activer directement les LT. Cependant, ils empêchent le développement d'une immunité prolongée et durable. Ils sont à l'origine d'une forte réponse inflammatoire avec destruction des tissus et dissémination bactérienne. En réponse au BCG les neutrophiles ont plusieurs rôles bénéfiques mais aussi délétères nécessitant une exploration plus approfondie.

4.1.1.3. Réponse immunitaire adaptative au BCG (52)

A la suite de leurs interactions avec les CPA, les LT CD4⁺ se différencient en deux populations principales Th1 et Th17 sécrétant respectivement de l'IFN γ et de l'IL-17A. Une population de Th2 peut aussi être retrouvée en cas de forte sécrétion d'IL-4. Le BCG active plus faiblement les Treg pouvant diminuer son efficacité, les LT restreints par la molécule CD-1, et les LT CD8⁺.

Les LT CD4⁺ sont les effecteurs majeurs de la réponse immunitaire qui se déroule dans les poumons. Les LT CD8⁺ s'opposent plus particulièrement à la dissémination et au développement des tuberculoses extra-pulmonaire et miliaire. Donc, le BCG induit une réponse immunitaire adaptative protectrice en activant les LT. Cependant l'immunité induite par le BCG n'est pas maintenue et diminue avec l'âge. Une exploration des mécanismes qui se mettent en place et garantissent une protection pendant les premières années post-vaccination apportera des solutions pour prolonger l'activité du BCG.

Les Th17 ont des rôles protecteurs et délétères dans l'immunité induite par le BCG de part une forte sécrétion d'IL-17A à l'origine d'une inflammation contrôlée ou excessive en lien avec la sécrétion d'IL-10. De plus les réponses mémoires Th1 dans les poumons de souris vaccinées dépendent de l'IL-17A et de l'IL-23 sécrétées par les Th17 mémoires spécifiques des antigènes et les LT résidents mémoires (55). Les LT CD8⁺ restreints par CD1 sont activés par la reconnaissance de lipides de la paroi des mycobactéries. Les individus vaccinés ont un pool de LT CD8⁺ cytotoxiques restreints par CD1 qui reconnaît les DC infectées par BCG.

Le BCG est aussi un fort inducteur de l'immunité humorale associée à une forte production d'anticorps. Cependant, Mtb étant un pathogène intracellulaire cet aspect de la réponse au BCG a été longtemps ignoré. Le BCG induit une réponse mémoire

durable par l'intermédiaire des LB dont le rôle reste à explorer. Une forte production d'IgA, Ig les plus abondantes dans la muqueuse pulmonaire, favorise la phagocytose et agit en synergie avec les IgG pour renforcer l'activité cytotoxique des LT.

Le manque d'efficacité du BCG et la difficulté à obtenir une réponse immunitaire protectrice prolongée peuvent s'expliquer par son action vaste sur de nombreux mécanismes de l'immunité innée et adaptative, cellulaire et humorale. En effet, il est difficile d'agir sur une réponse spécifique du système immunitaire et de générer une immunité efficace et prolongée empêchant à la fois l'infection à Mtb et le développement de la tuberculose.

4.1.2. Vaccins en cours d'essais

Une des priorités majeures de la recherche dans le cadre de la tuberculose est de développer des vaccins plus efficaces que le BCG, afin de diminuer l'incidence et la mortalité de la maladie (56)(57). Le meilleur contrôle de la tuberculose repose sur des vaccins qui protègent les individus de l'infection initiale, préviennent une progression de la tuberculose latente vers la tuberculose maladie, et diminuent la transmission interhumaine.

Une stratégie a été mise en place en 2012 par deux organisations, AERAS et TBVI. Pour faire progresser la recherche, sélectionner et évaluer des candidats vaccins prometteurs, elles ont préconisé :

- un approfondissement des mécanismes immunopathologiques de la tuberculose et des techniques de fabrication pour de nouvelles approches de production des vaccins,
- des modèles animaux plus pertinents pour prédire l'efficacité du candidat vaccin chez l'homme, et standardiser les recherches
- de nouveaux biomarqueurs pour préjuger de l'efficacité du candidat vaccin, et pour indiquer la progression de l'infection latente à la tuberculose, et prévenir les risques de réactivation et fournir des critères précis pour les essais cliniques,
- des essais cliniques harmonisés.

Il est possible de développer des vaccins en employant différents antigènes, adjuvants et techniques de fabrication.

Actuellement, les antigènes qui induisent des réponses immunitaires Th1 à l'origine d'une production d'IFN γ et de TNF par les LT CD4⁺ sont les plus utilisés.

Les adjuvants sont des molécules synthétiques qui miment les processus cellulaires naturels pour une délivrance plus efficace des composants du vaccin aux cellules. L'adjuvant peut diriger la réponse immunitaire vers les sous-populations Th1, Th2, ou Th17.

Les modèles animaux sont essentiels pour démontrer l'efficacité contre Mtb, l'innocuité et l'immunogénicité à toutes les étapes de développement du vaccin. Ainsi ils permettent une sélection précoce d'un candidat vaccin pertinent pour des essais cliniques. Les souris, les « guinea pigs » et les primates non humains sont les espèces les plus utilisées pour tester les candidats vaccins contre la tuberculose. Les expérimentations diffèrent selon les espèces utilisées, et le type de vaccin testé, et même si les conditions mises en place se rapprochent du modèle humain, il est compliqué d'obtenir des données objectives. Il y a nécessité de comparer et acquérir plus de données afin d'affirmer qu'un certain niveau de protection chez l'animal est prédictif d'une efficacité chez l'homme.

Jusqu'à aujourd'hui, les essais cliniques reposent sur des études de sécurité et d'immunogénicité dans des populations diverses, dont des adultes et enfants sains n'ayant pas été exposés à la tuberculose, des individus infectés en phase latente, des adultes VIH+, et des malades traités pour la tuberculose. Ils se font en grande majorité chez l'adulte dans des pays en développement avec une forte prévalence de la tuberculose.

4.1.2.1. Vaccins en cours d'essais cliniques

Quatorze vaccins sont actuellement en développement clinique (Figure 5). Ils peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils agissent en pré- ou en post-exposition à Mtb. Dans les deux cas, les objectifs de la vaccination sont d'établir une réponse immunitaire capable d'éradiquer Mtb, ou de contrôler l'infection et prévenir le développement ou la réactivation de la tuberculose maladie. Certains sont utilisés en remplacement du BCG et doivent alors induire une réponse immunitaire plus longue et plus efficace. L'amélioration du BCG repose sur l'expression recombinante d'antigènes et l'atténuation suffisante de Mtb pour ne pas causer la maladie et induire une réponse protectrice. D'autres sont utilisés dans une stratégie de

« prime/boost », en rappel pour améliorer l'immunité induite au préalable par le BCG ou une souche recombinante du BCG. En phases d'essais cliniques sont retrouvés des vaccins composés de mycobactéries entières ou de sous-unités bactériennes. Ces derniers sont composés d'antigènes mycobactériens immunostimulants délivrés par un virus (vecteur viral) ou couplés à une protéine adjuvante. Les antigènes utilisés sont ceux sécrétés par Mtb durant sa phase de réplication active, Ag85A, Ag85B, ESAT6 et CFP10. Ils sont très immunogènes et protecteurs dans des modèles animaux, et sont délétés dans le BCG. Leur expression permet d'obtenir des candidats vaccins plus efficaces et immunogènes que le BCG (Figure 6).

Global Clinical Pipeline

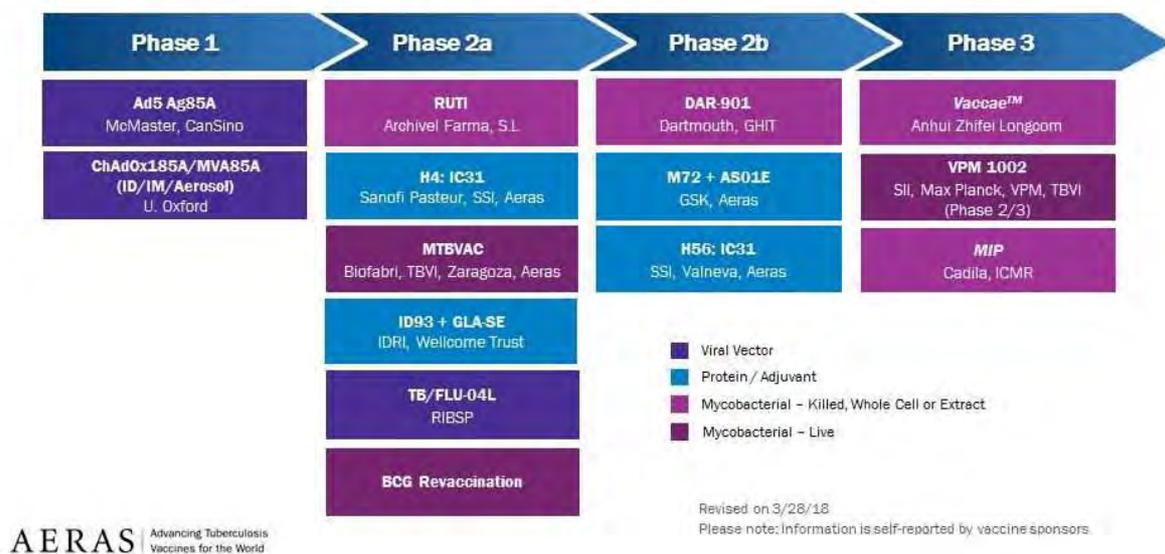


Figure 5. Vaccins en cours d'essais cliniques au 28/03/2018

4.1.2.1.1. Vaccins à germe entier

Ils induisent une réponse immunitaire plus large que les vaccins sous-unitaires, à la fois cellulaire et humorale dirigée contre un grand nombre de protéines, lipides et glycolipides de Mtb.

- *Vaccae*TM (phase III)

Ce vaccin contient une mycobactérie atypique tuée, *M. vaccae*. Il induit une réponse Th1 avec production d'IFN γ , d'IL-2 et d'IL-12 et une forte réponse IL-10. Il est disponible en Chine en tant qu'adjuvant pour le traitement de la tuberculose maladie.

- VPM 1002 (phase III)

Il est le seul BCG recombinant en essai clinique. Il est plus immunogène que le BCG par l'insertion dans l'ADN de BCG d'un gène codant pour la listériolysine (protéine qui peut fragiliser les phagosomes) et par la délétion du gène codant pour l'uréase. Il est développé pour remplacer le BCG chez l'enfant en pré-exposition.

- MIP (essai de phase III) et DAR-901 (phase IIb)

Ils sont composés des souches *Mycobacterium indicus pranii* et *Mycobacterium obuense* respectivement, inactivées et génétiquement proches de Mtb. Ils sont développés comme « booster » du BCG en pré-exposition à Mtb.

- MTBVAC (phase IIa)

Il est le seul vaccin recombinant vivant fondé sur l'atténuation de Mtb en essai. C'est un mutant de Mtb recombinant qui porte une double délétion. Il est déficient en facteurs de transcription PhoP qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la virulence et la persistance de Mtb, et Fad26, une enzyme cruciale pour la synthèse de la paroi glycolipidique. Leur délétion assure l'innocuité du vaccin. Il inclut les antigènes ESAT6, CFP10 délétés dans le BCG. Il est développé en tant que vaccin préventif chez le nouveau-né en remplacement du BCG ou chez des adultes et adolescents vaccinés par le BCG à la naissance en pré-exposition à Mtb.

4.1.2.1.2. Vaccins sous-unitaires : vecteurs viraux

- Ad5 Ag85A et ChAdOx185A/MVA85A (phase I), TB/FLU-04L (phase IIa)

Les vecteurs viraux sont très prometteurs car leur production est simple et les coûts de fabrication peu élevés. Ils expriment tous l'Ag85A de Mtb, une enzyme (mycolyl transférase) importante pour la synthèse de la paroi et l'accumulation et le stockage

de lipides, conservée chez les mycobactéries dont Mtb, BCG et des mycobactéries environnementales. Ils induisent une forte réponse Th1. Chez les individus ayant déjà été vaccinés par le BCG ou en contact avec des mycobactéries environnementales, ces vaccins induisent un fort taux de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de Ag85A. TB/FLU-04L exprime aussi ESAT6.

4.1.2.1.3. Vaccins sous-unitaires : protéines de fusion et adjuvants

Ces vaccins sont conçus par biotechnologie pour induire principalement des réponses de type Th1.

- M72 + AS01E (phase IIb)

M72 est une protéine de fusion immunogène contenant deux antigènes de Mtb (MTB32A et MTB39A) et associée à l'adjuvant AS01E contenant un ligand de TLR4. La combinaison M72+AS01E est particulière car elle induit une petite quantité de LT CD8⁺ et des niveaux élevés de LT CD4⁺ (sécrétion d'IFN γ , IL-2, TNF, et augmentation d'IL-17) spécifiques de M72 chez l'homme. Il peut être administré en pré- et en post-exposition. Il est conçu pour prévenir l'infection, et le développement de la tuberculose maladie chez les individus infectés.

- H56: IC31 (phase IIb)

H56 est une protéine de fusion contenant trois antigènes de Mtb (Ag85B, ESAT6, Rv2660c) associée à l'adjuvant IC31. L'antigène Rv2660c est exprimé par Mtb dans des conditions de stress, il est contenu dans le BCG mais n'y est pas immunogène. Il est conçu pour prévenir l'infection en pré-expositions et la tuberculose en post-exposition chez les adolescents et les adultes. Deux essais de phase II sont prévus en 2018, le premier concerne la prévention de l'apparition de l'infection, et le deuxième concerne la prévention de la réapparition de l'infection.

- H4: IC31 (phase IIa)

H4 est une protéine de fusion contenant les antigènes Ag85B et TB10.4 de Mtb combinée à l'adjuvant IC31 contenant un ligand de TLR9. Dans des modèles animaux, ce candidat vaccin est immunogène protecteur en pré- et post-exposition à

Mtb. Il est conçu pour prévenir une infection à Mtb chez des individus qui ont un risque élevé de la contracter.

Il peut être combiné à une protéine de fusion H1 contenant les antigènes ESAT6 et Ag85B.

- ID93 + GLA-SE (phase IIa)

ID93 est une protéine de fusion contenant quatre antigènes de Mtb (Rv2608, Rv3619, Rv3620, Rv1813) associée à l'adjuvant GLA-SE un agoniste de TLR4. L'antigène Rv1813 est exprimé par Mtb dans des conditions de stress. Il est conçu pour prévenir un développement en tuberculose en post-exposition chez les adolescents et adultes.

4.1.2.1.4. Vaccin thérapeutique RUTI (phase IIa)

Les vaccins thérapeutiques ciblent les individus qui sont atteints de formes sévères de la tuberculose notamment en cas de tuberculose résistante ou de co-infection avec le VIH.

RUTI se compose de fragments cellulaires détoxifiés de Mtb contenus dans des liposomes, et comprend de nombreux antigènes protéiques, lipidiques et glycolipidiques. Mtb est mis en culture dans des conditions mimant celles du granulome. RUTI est utilisé comme adjuvant et est administré avec les thérapies conventionnelles, dans le but d'augmenter l'efficacité et de réduire la durée du traitement, chez des individus atteints de tuberculose maladie (58). Dans des modèles murins, il a montré un potentiel en prophylaxie et en immunothérapie en générant une réponse Th1 produisant une grande quantité d'IFN γ . Chez des volontaires sains, des essais de phases I et II ont montré une bonne tolérance et une immunogénicité.

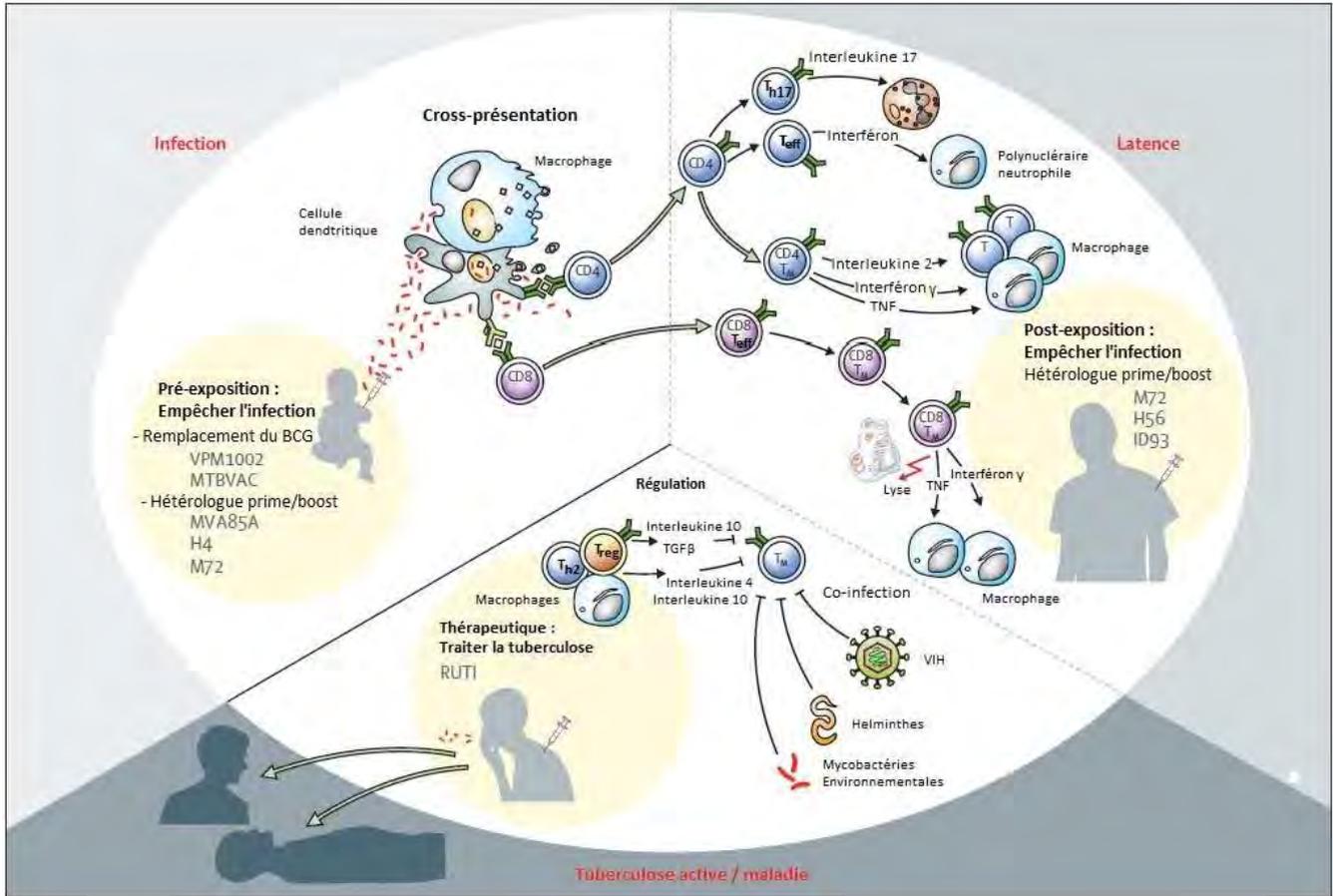


Figure 6. Différents protocoles de vaccination au cours de la réponse immunitaire à *Mycobacterium tuberculosis* (d'après (59))

4.1.2.2. Vaccins en essais précliniques

Les technologies actuelles permettent d'aborder de nouvelles approches de production de vaccins. Des nombreux modèles expérimentaux sont autorisés pour le développement de la recherche clinique afin de s'assurer solidement de l'efficacité et de l'innocuité des candidats vaccins.

- ChAd63 est un adenovirus simien de sérotype 63 utilisé comme vecteur viral délivrant des antigènes. Ce vaccin est actuellement étudié pour son efficacité et son immunogénicité.
- PIV (human parainfluenza virus) est un vecteur viral déficient pour la réplication et qui délivre des antigènes. Sa capacité à libérer des antigènes et son innocuité sont prometteuses.

- MVA (modified vaccinia ankara) est un vecteur viral défectif pour la réplication qui est efficace pour libérer un nombre important d'antigènes tuberculeux. Il est conçu pour une administration pré-exposition chez l'enfant ou post-exposition chez l'adulte.

- rCMV (cytomégalovirus recombinant) est aussi un vecteur viral vivant atténué libérant de multiples antigènes de Mtb. L'ingénierie de ce vecteur conduit à un niveau bas et constant de réplication virale donnant une expression d'antigène maintenue et une immunité à long terme. Il est conçu pour prévenir la tuberculose et le VIH car il peut induire un niveau élevé de LT effecteurs de façon prolongée dans les muqueuses.

4.1.3. Nouvelles approches de conception des vaccins

4.1.3.1. Identification de nouvelles cibles antigéniques

Les vaccins en essais cliniques sont composés principalement des antigènes Ag85 A et B, ESAT6 et CFP-10 induisant des réponses cellulaires Th1. Il y a nécessité de mettre en évidence de nouveaux antigènes induisant des réponses immunitaires antituberculeuse.

Des méthodes récentes de vaccination inverse permettent, à l'aide d'outils informatiques, de prédire des épitopes immunogènes à partir de l'analyse du génome de Mtb (60). Cependant, il n'existe pas encore de modèles précliniques permettant la mise en évidence de l'antigène le plus pertinent.

Des études de criblage ont permis d'identifier des antigènes pouvant induire des réponses qui n'impliquent pas les LT CD4⁺ mais d'autres cellules et notamment les LT CD8⁺. Ces antigènes peuvent être utilisés en vaccination pour renforcer les réponses CD8⁺. En phase de latence, Mtb porte des antigènes différents de ceux exprimés durant la phase active, notamment dans le régulon DosR. Ils offrent la possibilité de concevoir des vaccins ciblant spécifiquement cette phase.

La grande majorité des tuberculoses étant pulmonaires, un intérêt récent est porté aux LT non conventionnels présents en quantité importante dans les muqueuses. Aujourd'hui, l'objectif de la production des vaccins sous-unitaires est d'induire des réponses par les LT conventionnels contre des antigènes protéiques de Mtb

présentés par des molécules du CMH I ou II. Cependant les cellules non-conventionnelles portent des TCR qui reconnaissent et sont activées par des antigènes particuliers exprimés par Mtb. Les chercheurs étudient les réponses induites par leur activation dans le cadre de la vaccination antituberculeuse.

Dans une publication de juillet 2017 (61), les auteurs ont mis en évidence un antigène reconnu par des LT CD8⁺ restreints par les molécules non classiques du CMH I, HLA-E, et isolés chez un individu infecté par Mtb en phase latente. Ce peptide est décrit comme un peptide glycosylé issu de la protéine Mtb MPT32. Après reconnaissance du peptide, les LT CD8⁺ produisent des cytokines de type Th1 ou Th2. L'incorporation de cet antigène dans des candidats vaccins pourrait être étudiée.

Des expériences utilisant les MAIT dans le cadre de la vaccination seront détaillées dans la partie 3.

4.1.3.2. Utilisation de nouveaux adjuvants

Les liposomes constituent une nouvelle classe d'adjuvants étudiée actuellement.

Un vaccin sous-unitaire contenant les antigènes de Mtb Ag85A, ESAT6 et HspX formulés avec un liposome constitué de lipooligosaccharide de-O-acétylé (dLOS) couplé au diméthyl dioctadécyl ammonium (DDA) entraîne une augmentation significative des réponses humorales et Th1. Il permet aussi de renforcer une réponse amorcée par une vaccination préalable avec du BCG. Ce vaccin montre aussi une efficacité *in vivo* et *in vitro* contre Mtb (62).

4.1.3.3. Manipulation de la réponse humorale

Il est aujourd'hui reconnu que les LB et les anticorps sont capables de moduler la réponse immunitaire à Mtb. L'exploitation des réponses humorales contre la tuberculose et contre la dissémination de Mtb est prometteuse dans des modèles animaux. Ainsi, la conception de vaccins stimulant les réponses humorales amorcées par le BCG est une des stratégies envisagées. Cependant la modulation de ces réponses nécessite de tenir compte des signaux activateurs ou inhibiteurs induits par l'engagement des récepteurs Fc, de l'avidité des anticorps, et de l'impact des anticorps préexistants induits par les mycobactéries environnementales.

Il est possible de favoriser la réponse humorale en utilisant des adjuvants spécifiques dans des vaccins sous-unitaires. Par exemple, l'adjuvant MF59 induit à la fois une réponse cellulaire Th1 et des anticorps.

Actuellement, aucun essai incluant des candidats vaccins conçus pour activer spécifiquement les LB ou une réponse humorale n'est mis en œuvre, bien que les vaccins à mycobactérie entière comme VPM1002 induisent un large spectre de réponses immunitaires.

4.1.3.4. Autres voies d'administration

L'immunisation de souris *in vivo* par AdAg85A par voie intra-nasale induit un plus grand nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'antigène, capables de produire de l'IFN γ et d'exercer leur activité cytotoxique dans les voies respiratoires qu'une immunisation par voie parentérale. Quand les LT des voies aériennes activés par immunisation intra-nasale sont transférés dans les poumons de souris SCID par voie intra-trachéale, ils protègent seuls contre Mtb administré par aérosol contrairement aux LT des voies respiratoires activés par immunisation parentérale (63).

Il est montré, chez le primate non humain, que la voie d'administration muqueuse procure une meilleure protection que la voie parentérale du fait de l'induction plus importante de LT mémoires et de LT effecteurs Th17 (64). De plus, la vaccination muqueuse par voie intra-nasale chez la souris, induit une protection muqueuse plus efficace que la vaccination systémique (65). L'utilisation d'adénovirus sous forme d'aérosol, seuls ou en combinaison avec MVA, est expérimentée et prometteuse dans des modèles précliniques (66).

4.1.3.5. Nouveaux modèles d'expérimentation

Il est indispensable d'élaborer des modèles spécifiques pour refléter les cas complexes et les différentes populations touchées par la tuberculose, notamment des modèles pour expérimenter des vaccins néonataux. Pour des avancées rapides, il sera aussi nécessaire d'élaborer, à partir de Mtb, une construction inoffensive, qui pourra être utilisée chez l'homme en recherche clinique.

Donc, il est important de continuer à élaborer et expérimenter une grande variété de candidats vaccins afin d'identifier le type de réponse immunitaire qui protégera les individus de façon optimale. Chaque expérience amorcée offre une opportunité sans précédent d'appliquer les connaissances afin d'optimiser le développement de vaccins contre la tuberculose.

4.2. Immunothérapie

Dans le contexte de la tuberculose, l'immunothérapie permet de renforcer l'immunité contre l'infection ou la maladie induite par Mtb. La plupart des stratégies ont été expérimentées et sont utilisées dans le traitement d'autres pathologies, principalement en cancérologie, mais leurs mécanismes d'action rendent leur utilisation appropriée pour traiter la tuberculose.

La recherche se porte sur des HDT utilisées pour donner les moyens aux cellules hôtes de tuer efficacement Mtb, pour réduire la durée des traitements antibiotiques en offrant des stratégies adjuvantes, et/ou pour diminuer le développement de MDR- et XDR-TB. Les approches sont principalement focalisées sur les réponses cellulaires, innées et adaptatives, mais d'autres options sont étudiées dont des thérapies à bases de peptides antimicrobiens ou d'anticorps.

4.2.1. Immunothérapie basée sur les anticorps

Les anticorps ont des effets thérapeutiques dans des modèles animaux de tuberculose et sont envisagés comme une alternative possible en tant qu'adjuvant dans la prise en charge de la tuberculose sensible ou résistante. Après soixante jours d'infection par H37rv (souche virulente de Mtb), des souris traitées par IVIg seules ou en combinaison avec des antibiotiques ont une plus faible charge bactérienne pulmonaire et moins de dommages pulmonaires que les contrôles (67). De plus l'association avec les antibiotiques est synergique. Ces résultats sont retrouvés dans le cas de MDR-TB. *In vitro*, elles sont à l'origine d'une opsonisation efficace de Mtb qui favorise sa phagocytose, ce mécanisme expliquerait les effets observés *in vivo*.

4.2.2. Immunothérapie basée sur les cytokines et inhibiteurs de cytokines

Il s'agit des premières molécules expérimentées, elles sont beaucoup utilisées en oncologie. Dans le cadre de la tuberculose, leur rôle est d'augmenter la réponse Th1 principalement chez les individus atteints de MDR-TB ou XDR-TB. Actuellement, peu d'essais cliniques sont entrepris, et le potentiel de cette thérapie dans la tuberculose est encore indéterminé. Son efficacité est variable selon le moment d'administration, la dose, et le mode d'administration (par inhalation, voie sous-cutanée ou voie intramusculaire).

4.2.2.1. IL-2

Par le passé des essais cliniques ont montré des résultats contradictoires. Dans un essai de 1997, des patients atteints de MDR-TB traités par les thérapies conventionnelles ont reçu de l'IL-2 recombinante ou un placebo en association. Cette combinaison montrait une élimination importante de Mtb et une amélioration radiologique par rapport aux contrôles (68). Cependant, en 2002, un essai incluant des patients atteints de tuberculose récemment diagnostiquée a voulu évaluer la négativité des cultures de leurs expectorations après injection d'IL-2 recombinante ou d'un placebo en combinaison avec les thérapies conventionnelles. Les injections d'IL-2 n'ont pas eu d'effet significatif par rapport au placebo (69). Devant ces résultats contrastés, cette stratégie à base d'IL-2 a été abandonnée pendant une dizaine d'années.

En 2012, des auteurs ont évalué l'association IL-2 et GM-CSF administrée avec INH et RIF à des souris infectées par des souches de Mtb sensible et résistante. Ils ont observé une diminution du nombre de bacilles dans les poumons et un taux de survie supérieur par rapport aux souris traitées uniquement par antibiotiques (70).

Un essai clinique de 2015 a évalué l'innocuité d'une nouvelle IL-2 recombinante a été réalisé sur des patients atteints de MDR-TB. Les patients ont reçu des injections de rhIL-2 en combinaison avec l'antibiothérapie un taux supérieur de négativité des expectorations mise en culture que ceux ne recevant pas d'IL-2 (71).

Un essai clinique en Chine a été réalisé entre 2009 et 2016 selon le même protocole avec un suivi de 24 mois (72). Les auteurs ont constaté chez les patients recevant

rhIL-2, une élimination plus importante de Mtb observée par négativité des expectorations, une augmentation des Th1 et une diminution des Th17 et Treg. L'action de l'IL-2 sur les Treg est contrastée. Dans le cadre de la tuberculose, la charge bactérienne favorise la prolifération des Treg. Cependant au cours du traitement, l'élimination progressive de la charge bactérienne entraîne une diminution du nombre de Treg. Cette activité surpasse l'augmentation des Treg induite par l'IL-2 elle-même. Selon la dose injectée l'IL-2 sera plus ou moins efficace.

Les auteurs ont conclu que l'adjonction de rhIL-2 entraîne une meilleure efficacité du traitement dans un délai plus court, favorise les réponses immunitaires Th1/Th17 sans effets indésirables. D'autres essais sont nécessaires pour évaluer la dose optimale, la durée du traitement et les patients éligibles à ce traitement.

4.2.2.2. Aérosol d'IFN γ

Cette stratégie a été envisagée très tôt, à la fin des années 1990, du fait de son rôle majeur dans la réponse immunitaire à Mtb, crucial pour l'activation des macrophages et l'inflammation tissulaire. L'utilisation d'aérosols d'IFN γ en thérapie adjuvante lors d'essais incluant des patients atteints de MDR-TB a montré une innocuité et des améliorations cliniques et microbiologiques (73). Cependant dans un essai, ces effets bénéfiques étaient transitoires, les expectorations se positivaient après six mois de traitement (74). L'administration par aérosols conduit à ces effets bénéfiques contrairement aux voies intramusculaire et sous-cutanée qui sont inefficaces.

4.2.2.3. IL-12

La stratégie à base d'IL-12 est envisagée de par son rôle inducteur d'IFN γ . Un seul essai clinique est décrit, il inclut un patient atteint de tuberculose pulmonaire progressive et traité par les thérapies conventionnelles. L'IL-12 était administrée par voie sous-cutanée comme adjuvant pendant trois mois et a amélioré de façon transitoire les conditions cliniques du patient (75).

4.2.2.4. IL-24

La concentration en IL-24 diminue dans le sérum de patients atteints de TB, ce qui fait de cette cytokine une cible potentielle. Dans un modèle de souris infectées par la souche virulente de Mtb (H37rv), l'IL-24 active les LT CD8⁺ en se liant à son récepteur spécifique, ceux-ci produisent alors de l'IFN γ . Elle empêche le développement de la tuberculose (76).

4.2.2.5. IFN de type I

Ils ont un rôle contrasté dans la tuberculose et au cours de la maladie. Ils seraient bénéfiques pendant la phase initiale de l'infection et délétères pendant la tuberculose maladie (77)(78). Des injections intramusculaires d'IFN α après vaccination sous-cutanée par BCG de souris infectées par des aérosols de Mtb provoquent une augmentation de la sécrétion de cytokines spécifiques de la réponse Th1 (IFN γ , IL-12, TNF α et IL-17, IL-1 β) et une diminution de la charge bactérienne plus importantes que lors d'une vaccination par BCG seul. Les auteurs ont obtenu les mêmes résultats après mise en culture de macrophages issus de PBMC de donneurs sains avec de l'IFN α associé au BCG (79).

In vitro chez la souris les IFN de type I ont un rôle protecteur, et ils participent à certains aspects de la défense de l'hôte (77). Leur surproduction est associée à une tuberculose exacerbée chez la souris et chez l'homme. Les mécanismes par lesquels ils favorisent la maladie ne sont pas encore compris.

Cependant un essai clinique avec administration d'IFN α/β recombinant a mis en évidence leur rôle bénéfique en association avec les thérapies conventionnelles (80). Leur administration par aérosol est la plus efficace et entraîne une amélioration clinique et microbiologique. D'autres expérimentations sont nécessaires afin de comprendre si ces effets dépendent du statut immunitaire, ou s'ils favorisent la réplication des mycobactéries les rendant plus sensibles aux antibiotiques. La mise en évidence d'un rôle bénéfique ou délétère à un moment donné de l'infection aux mycobactéries permettra d'évaluer leur potentiel en immunothérapie.

Les effets transitoires observés avec la plupart des thérapies basées sur les cytokines sont attendus car celles-ci sont produites de façon constitutive chez l'hôte en réponse à Mtb et leur concentration diminue avec la progression de la maladie. Tant que les effets sous-jacents au défaut de la réponse immunitaire sont présents, les cytokines favorisant la réponse Th1 sont inefficaces.

4.2.2.6. Anticorps anti-IL-4

Administré dans un modèle d'infection de souris par H37rv, cet anticorps provoque une diminution de la charge bactérienne pulmonaire (81). Son potentiel comme adjuvant des thérapies conventionnelles doit être étudié. Un essai clinique en cours porte sur l'innocuité et l'efficacité du blocage de l'IL-4 par le pascolizumab chez des patients atteints de tuberculose pulmonaire traitée par thérapie standard.

4.2.2.7. Anticorps anti-TGF β

L'association entre un anticorps anti-TGF β et un inhibiteur de synthèse de la PGE2 administrée pendant la phase chronique de la tuberculose dans un modèle murin entraîne l'augmentation des réponses Th1 et d'iNOS, la diminution des réponses Th2, de l'inflammation et de la charge bactérienne. Cette association améliore les effets du traitement conventionnel (82).

4.2.3. Modulateurs de la voie PD-1/PD-L1

Un essai clinique a montré que l'expression de PD-1 à la surface des LT CD4⁺ et LB est augmentée en cas de tuberculose active (83). A partir de PBMC de sujets atteints de tuberculose active, des LT bloqués par des Ac anti-PD-1 sont mis en culture seuls ou en co-culture avec des monocytes bloqués par des Ac anti-PD-L1 en présence de Mtb. Le blocage de PD-1 ou de l'interaction PD-1-PD-L1 entraîne la stimulation sélective des lymphocytes CD3⁺ producteurs d'IFN γ , et l'activation de la réponse protectrice Th1. PD-1 régule la réponse immunitaire aux antigènes de Mtb chez les patients atteints de tuberculose active et son inhibition constitue une stratégie thérapeutique à envisager.

4.2.4. Thérapie cellulaire

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSMs) autologues sont impliquées dans la réparation des dommages tissulaires et modulent les réponses immunitaires. Le peu de connaissances sur la biologie des CSMs les rend difficiles à exploiter en thérapie. Un essai clinique de phase I a montré qu'une perfusion de CSMs autologues est bien tolérée chez des patients atteints de MDR- et XDR-TB (84). De plus, l'association avec un traitement conventionnel améliore les fonctions pulmonaires et les réponses cellulaires spécifiques des antigènes de Mtb.

Une expérimentation *in vitro* a montré que les CSMs peuvent internaliser Mtb qui est incapable de s'y répliquer (85). Elles contrôlent Mtb intrinsèquement en induisant l'autophagie. Elles secrètent du NO qui restreint la multiplication de Mtb. Elles sont facilement amplifiables *ex vivo* et reperfusées chez des patients MDR-TB. Un essai clinique de phase II est en cours, il permettra de déterminer les effets des CSMs sur les réponses immunitaires, et les conséquences cliniques et microbiologiques.

4.2.5. Thérapie génique

4.2.5.1. Adénovirus codant pour le GM-CSF

Le GM-CSF entraîne la différenciation et l'activation des précurseurs myéloïdes et non myéloïdes induisant la libération de cytokines protectrice de type Th1. Un adénovirus recombinant codant pour le GM-CSF (AdGM-CSF) est administré dans un modèle murin de tuberculose progressive (86). En cas d'administration d'une dose après 60 jours d'infection par Mtb virulent ou non, il provoque une diminution significative de la charge bactérienne. Son utilisation en association aux antibiotiques conventionnels, l'élimination des bactéries est plus rapide qu'en cas d'antibiothérapie seule. Son rôle est prometteur pour réduire la durée du traitement.

4.2.5.2. Adénovirus codant pour TNF α , β -défensine 3, ou LL-37 (87)

Des souris sont infectées par voie intra-trachéale par Mtb H37rv afin de développer une infection chronique. Sept mois post-infection, une dose d'adénovirus recombinants est administrée. En comparaison avec les souris servant de contrôle,

les souris traitées présentent une diminution de la charge bactérienne et de la pneumonie, les adénovirus les plus efficaces étant AdTNF α et AdLL-37. Les adénovirus codant pour des cytokines ou des AMP peuvent être utilisés pour empêcher la réactivation d'une tuberculose latente.

4.2.6. Immunothérapie basée sur les peptides antimicrobiens

Les cellules épithéliales, neutrophiles et macrophages des voies respiratoires en présence de Mtb libèrent des défensines et de la cathélicidine (LL-37). En immunothérapie, des peptides sont synthétisés à l'aide de la bioinformatique à partir de peptides antimicrobiens naturels qui peuvent être modifiés afin d'augmenter leur activité antimicrobienne. Ils présentent un fort potentiel thérapeutique.

Des modèles murins d'infections pulmonaires par des souches de Mtb sensibles et résistantes ont permis de mettre en évidence une diminution de la charge bactérienne après administration d'AMP naturels LL-37 (homme), CRAMP (murin) ou synthétiques E2, E6 et CP26 *in vivo* et *in vitro* (88).

Des chercheurs ont mis au point un nanogel d'acide hyaluronique contenant un AMP exogène capable de tuer efficacement les mycobacéries (LLKKK18 dérivé de LL-37) (89). Il est internalisé par les macrophages et colocalisé avec Mtb. *In vitro* l'infection par Mtb de macrophages ayant internalisé le nanogel entraîne une diminution de la charge bactérienne intracellulaire et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α). Dans un modèle murin, l'administration du nanogel diminue le degré d'infection.

4.2.7. Hormones

Une hormone stéroïde synthétique HE2000 (analogue de DHEA), administrée soixante jours post-infection à des souris infectées par Mtb (H37rv), déclenche une diminution de la prolifération bactérienne et de l'expression de l'IL-4, et augmente l'expression de TNF α , IFN γ , iNOS. Elle rétablit la réponse Th1. Lorsqu'elle est administrée comme adjuvant du traitement antibiotique, elle favorise l'élimination de Mtb et permet de réduire la durée du traitement.

4.2.8. Modulation de l'autophagie

Des inducteurs de l'autophagie comme la metformine (antidiabétique) et les statines (hypolipémiants) jouent un rôle protecteur dans le traitement de la tuberculose mis en évidence dans des expérimentations *in vitro* et *in vivo* chez la souris et/ou des essais cliniques chez l'homme (90).

L'autophagie est régulée par de nombreuses voies intracellulaires dont certaines sont dépendantes de mTOR, et l'inhibition de ce master régulateur augmente l'activité autophagique. Des auteurs suggèrent qu'une combinaison associant everolimus (inhibiteur de mTOR) et les thérapies conventionnelles est prometteuse en cas de MDR-TB (91). Selon la dose administrée, everolimus a une activité immunosuppressive pouvant réactiver Mtb ou immunomodulatrice recherchée. Des études expérimentales d'efficacité, et toxicité sont nécessaires.

4.2.9. Vitamine D

La vitamine D est un micronutriment immunomodulateur à activité anti-inflammatoire et antimycobactérienne *in vitro*, dont le faible taux est associé à un risque plus élevé de développer une tuberculose active. La supplémentation en vitamine D a été considérée comme adjuvant des thérapies conventionnelles. Dans un essai clinique, l'apport en vitamine D n'a pas amélioré les effets bénéfiques du traitement antibiotique dans les cas de tuberculose sensible. Cependant, dans un sous-groupe rassemblant les cas de MDR-TB, les expectorations devenaient plus rapidement négatives en cas d'apport en vitamine D (92). Actuellement les essais cliniques portent sur la supplémentation en vitamine D et son potentiel à prévenir l'infection ou empêcher la réactivation d'une infection latente.

4.2.10. Autres stratégies en immunothérapie

- L'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé dans le traitement de la LMC. Les TK jouent un rôle dans la régulation du pH lysosomal des macrophages. Leur inhibition diminue le pH et augmente les capacités des macrophages à tuer Mtb. Seul ou en combinaison avec une antibiothérapie standard, l'imatinib diminue la charge bactérienne pulmonaire de souris infectées par Mtb (93).

- Les anti-inflammatoires, comme l'ibuprofène, diminuent la taille et le nombre de lésions pulmonaires et diminuent la charge bactérienne. L'ibuprofène augmente la survie de souris infectées. Il favorise l'action de la pyrazinamide dans les premières phases de l'infection (94).

- Le denileukin diftotox (DD) est une protéine de fusion (IL-2 / toxine diphtérique) utilisée dans le traitement des lymphomes cutanés qui cible les LT CD25⁺ et particulièrement les LTreg. Dans un modèle murin d'infection par Mtb H37rv *in vivo*, ce traitement par voie IV ou intrapéritonéale provoque la diminution des Treg, et de la charge bactérienne pulmonaire qu'il soit administré en monothérapie ou en combinaison avec les AB conventionnels (95).

- *In vitro* des chercheurs évaluent le potentiel thérapeutique des liposomes, vésicules sphériques composées de bicouches lipidiques. Pour améliorer la réponse antibactérienne, ils veulent cibler la phagocytose, mécanisme central de l'immunité innée. Une des étapes de la phagocytose est la maturation des phagosomes via l'intervention coordonnée de lipides. Elle peut être altérée durant une infection bactérienne. Dans l'objectif de stimuler la maturation de phagosomes, les auteurs ont fabriqué des liposomes exprimant la phosphatidylsérine sur la couche lipidique externe. Ils ont alors une structure de corps apoptotiques (ABL) et peuvent être phagocytés par les macrophages. Leurs ABL transportent et délivrent sélectivement des lipides bioactifs comme l'acide phosphatidique, PIP3 ou PIP5. *In vitro*, la stimulation de macrophages infectés par le BCG avec les ABL augmente la lyse intracellulaire de BCG par acidification du phagosome et génération de ROS. Les ABL qui délivrent des lipides bioactifs augmentent la réponse antimicrobienne dépendant de la maturation du phagosome (96). Ils représentent une option thérapeutique prometteuse. Il est nécessaire, à présent, de développer des modèles animaux et évaluer *in vivo* le dosage à utiliser pour pouvoir mettre en place des essais cliniques.

- Un essai clinique débuté le 1^{er} juin 2018 repose sur l'administration par voie intraveineuse de LT $\gamma\delta$ de donneurs sains à des sujets atteints de MDR-TB traitée par thérapie conventionnelle. L'innocuité et l'efficacité de ce transfert sont étudiées (clinicaltrials.gov).

5. Conclusion

Depuis dix ans, la recherche de nouvelles thérapeutiques antituberculeuses progresse significativement. L'avancement des connaissances sur la réponse immunitaire à Mtb et notamment la structure des granulomes le maîtrisant attestent de la contribution majeure de cytokines (IFN γ , TNF α) et fait apparaître comme essentielles des cellules (LT CD8⁺ non conventionnels) et molécules (PD-1). Ces avancées amènent à la production et l'expérimentation d'immunothérapies qui permettent de réduire la durée des traitements conventionnels et d'éradiquer les souches résistantes notamment par induction ou surexpression d'AMP et de cytokines.

De nos jours, le traitement de la tuberculose résistante par modulation de l'immunité cellulaire via les cytokines ou la thérapie cellulaire est presque une réalité. Bien que des recherches complémentaires soient nécessaires, l'efficacité et l'innocuité de ces deux stratégies dans des cas de MDR- et XDR-TB sont documentées. Dans un futur proche, la manipulation de l'immunité cellulaire peut devenir la stratégie prédominante dans le traitement de la tuberculose pulmonaire.

De nombreuses autres alternatives thérapeutiques modulant le système immunitaire sont considérées, et conduisent à des expérimentations précliniques prometteuses, mais peu d'essais cliniques sont entrepris.

Partie 3 : Travail de recherche au laboratoire : Rôle de l'IFN α dans l'activation des lymphocytes MAIT

Introduction

Les MAIT sont des LT non conventionnels CD8⁺ CD161⁺⁺. Chez l'adulte sain, ils se développent dans le thymus et, à leur sortie, se multiplient et présentent progressivement un phénotype de cellules mémoires (CD45RA⁻ CCR7^{low}).

Ils portent un TCR semi-invariant à chaîne α invariante (V α 7.2.J α 33) restreint par la molécule non classique du CMH de classe Ib, MR1 qui reconnaît des résidus bactériens issus du métabolisme de la vitamine B2.

Ils peuvent induire des réponses de type Th1 sécrétant de l'IFN γ et du TNF α après activation. Ils expriment le facteur de transcription ROR γ t et peuvent présenter un phénotype de type Th17, produisant de l'IL-17, dans certaines localisations tissulaires selon les stimuli et les conditions inflammatoires. Ils sécrètent aussi de l'IL-2, IL-10 et IL-22 ce qui démontre la plasticité de ces cellules et leur capacité à s'adapter aux réponses immunitaires (4).

Les MAIT sont aussi des cellules cytotoxiques. Après activation, ils dégranulent et expriment CD107a (LAMP-1) à leur surface. Ils libèrent des Grz A et K de façon constitutive et du Grz B induit par des stimuli dépendant du TCR ou par certaines cytokines. Ils sécrètent de la perforine, souvent co-exprimée avec les Grz, et de la granulysine chez certains individus. Ils expriment des récepteurs associés aux cellules cytotoxiques dont CD16, médiateur de l'ADCC, et NKG2D (naturel killer group 2, member D) un récepteur activateur dont les ligands sont exprimés en cas de stress cellulaire ce qui suggère un rôle anti-infectieux des MAIT (97).

Ces lymphocytes sont extrêmement dépendants de la costimulation pour une activation optimale en réponse à la stimulation antigénique. Activés uniquement par la signalisation TCR, ils produisent peu d'IFN γ et présentent une activité cytotoxique faible. Plusieurs travaux *in vitro* ont montré l'importance des cytokines produites par les cellules immunitaires innées. En effet, les MAIT portent des récepteurs aux cytokines dont ceux de l'IL-7, IL-12, IL-18 et IL-23. La combinaison entre l'IL-12 et

l'IL-18 présente un effet synergique majeur sur la production d'IFN γ par les MAIT, en lien avec leur expression constitutive de l'IL-18R α et l'IL-12R β 1 (98). L'IL-7 régule l'activation des MAIT en augmentant l'expression du TCR et des récepteurs aux IL-12 et 18, et la production d'IFN γ , d'IL-17 et de molécules cytotoxiques (99)(100). Enfin, l'IL-15 favorise également l'activation des MAIT. Cet effet semble cependant indirect, via la potentialisation de la production d'IL-18 par des monocytes au sein des PBMC (101).

La faible réponse des MAIT aux signaux dépendants du TCR amplifiée par les cytokines est singulière. Elle laisse supposer que ce contrôle est important pour la régulation de leur activation, possiblement dans le contexte de la tolérance envers les antigènes dérivés de la flore bactérienne commensale (102).

De par leur conservation entre espèces, leur localisation stratégique à l'interface hôte/pathogène, leur spécificité antigénique, et leur recrutement dans les tissus lors d'infections, les MAIT semblent être nécessaires dans l'immunité anti-infectieuse.

Des expérimentations ont été menées par des équipes de chercheurs afin d'étudier le rôle des MAIT dans les infections bactériennes, virales, et fongiques.

Ils ont étudié les capacités des MAIT à lyser les cellules infectées par des bactéries (Figure 7).

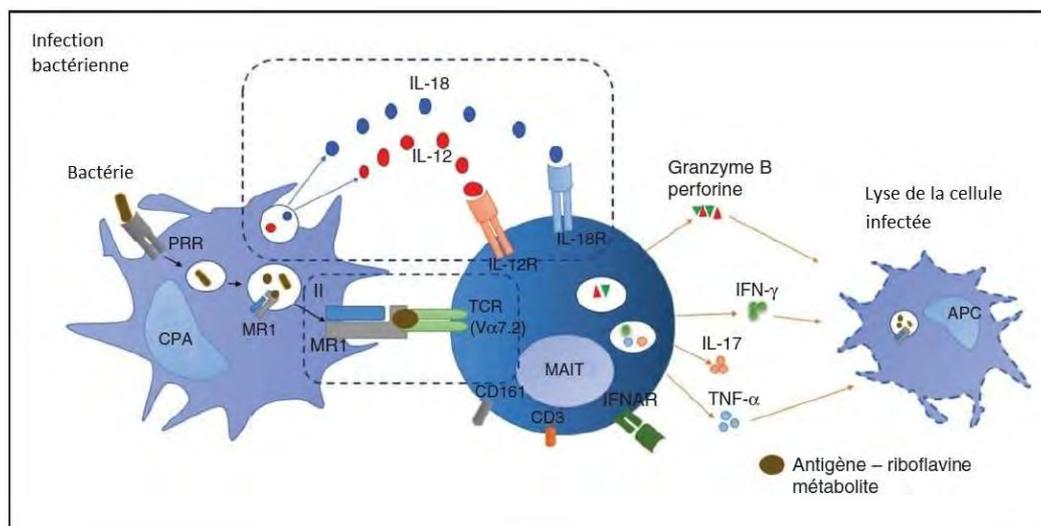


Figure 7. Interactions entre les CPA et les MAIT en présence d'une bactérie (d'après (47))

En réponse à une bactérie entière, les MAIT montrent une forte activation. Et certaines évidences basées sur des modèles murins suggèrent que les MAIT activés induisent la maturation des DC et le recrutement des LT CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels au site infecté (103). Les chercheurs ont mis en évidence les capacités de reconnaissance et de lyse des bactéries *E. coli*, *H. influenzae*, *M. smegmatis* (97).

Les MAIT ont un rôle dans le contrôle de *M. bovis*. Des analyses *in vitro* montrent que leur activation repose sur la voie IL-12 plutôt que sur celle du TCR. Ils ne dépendent pas d'une expansion clonale et peuvent répondre rapidement aux signaux de danger. Ils activent les macrophages en sécrétant de l'IFN γ en réponse à une stimulation par l'IL-12 libérée par les MA infectés par *M. bovis* (104).

In vivo, des souris MR1^{-/-} infectées par *M. bovis* ont une charge bactérienne pulmonaire à J10 plus importante que les souris MR1^{+/+}, cependant à J30, elle est la même dans les deux modèles (104). Les MAIT jouent donc un rôle sur la croissance bactérienne et ils agissent précocement pendant la réponse immunitaire innée.

Une co-culture de MAIT et de macrophages infectés par *M. bovis*, a mis en évidence la capacité des MAIT à sécréter de l'IL-17 en réponse à l'infection (104). Par cet intermédiaire ils peuvent recruter des cellules de l'immunité innée et activer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α , IL-1 β).

Les MAIT supportent les réponses innées et adaptatives en cas d'infections mycobactériennes. A la fois chez la souris et chez l'homme, les mécanismes protecteurs des MAIT sont liés à leur pouvoir cytotoxique direct sur les cellules infectées, et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires d'IFN γ , et d'IL-17.

Le modèle d'infection pulmonaire de souris C57BL/6 par *Francisella tularensis*, bactérie pouvant survivre et se multiplier dans les macrophages, permet aussi d'étudier les MAIT. Après déplétion des LT conventionnels, les souris WT développent une infection chronique contrôlée alors que les souris MR1^{-/-} ont une charge bactérienne beaucoup plus importante et meurent (105).

Une étude récente, *in vitro*, montre que les MAIT sont activés par la voie TCR et par l'IL-12 produite par les macrophages en cas d'infection pulmonaire par *F. tularensis*. Les MAIT sécrètent très tôt du GM-CSF qui induit la différenciation des monocytes inflammatoires en moDC capables de présenter les antigènes de *F. tularensis* aux

LT CD4⁺, de les recruter rapidement et de les faire proliférer. Chez les souris MR1^{-/-}, la production de GM-CSF dans les poumons est retardée et par conséquent le recrutement des LT CD4⁺ est retardé. Chez les souris GM-CSF^{-/-}, un défaut de différenciation des monocytes en moDC est retrouvé, similaire aux souris MR1^{-/-}. Les MAIT ont donc un rôle dans le recrutement des LT CD4⁺ vers les poumons via la sécrétion de GM-CSF (103). Ils assurent un lien entre les réponses innées et adaptatives.

Les souris MR1^{-/-} ont aussi une clairance plus faible de *Klebsiella pneumoniae*, et une mortalité supérieure aux souris MR1^{+/+}, associées à une diminution de la production d'IL-1β, de TNFα et d'IL-6 (104).

Ces études suggèrent un rôle protecteur antibactérien des MAIT.

Les MAIT peuvent être activés par la voie du TCR et par la voie cytokinique indépendamment de l'engagement du TCR. Ils exercent donc leur activité dans des pathologies où les ligands ne sont pas apparents comme les infections virales, les virus ne générant pas de voie de métabolisme impliquant la vitamine B2 (Figure 8).

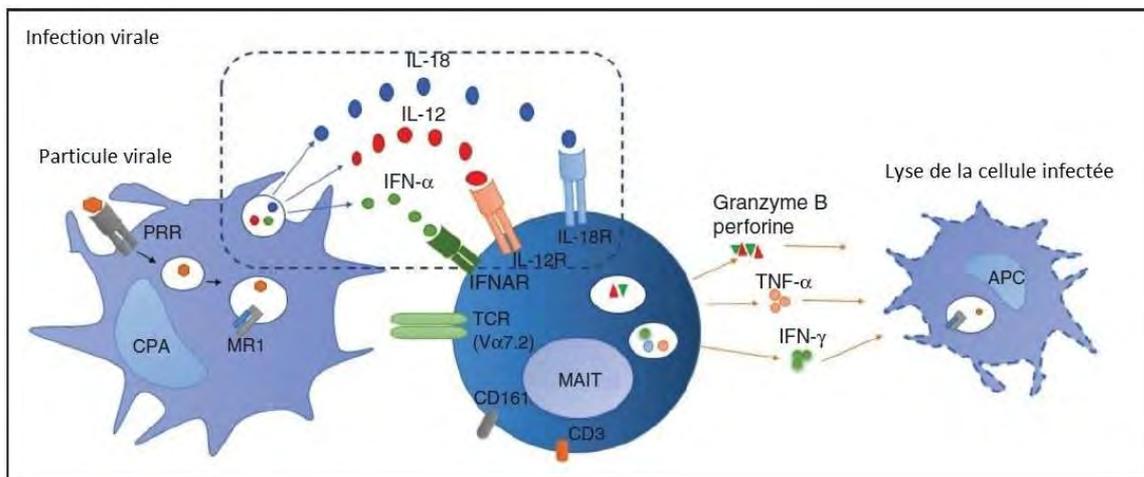


Figure 8. Interactions entre les CPA et les MAIT en présence d'une particule virale (d'après (47))

Des chercheurs ont étudié l'activité des MAIT lors d'infections par le virus Influenza A (IAV) (97)(106). *In vitro* à partir de cocultures de PBMC humains avec des cellules épithéliales pulmonaires infectées par des souches d'IAV, les chercheurs ont montré que les MAIT produisent rapidement du Grz B et de l'IFNγ. La synthèse d'IFNγ dépend dans ces conditions de l'IL-18 et non de l'activation de MR1 ou de l'IL-12.

Des MAIT purifiés et enrichis sont mis en culture avec des PBMC et des cellules épithéliales infectées par IAV ou des macrophages exposés à IAV. L'activation des MAIT dépend de la sécrétion d'IL-18, et plus faiblement de celle d'IL-12 par les monocytes/macrophages. Ces cytokines sont libérées par les monocytes après stimulation de leur TLR7 et TLR8 par le virus. L'IL-15 semble aussi stimuler les monocytes CD14⁺ afin qu'ils sécrètent de l'IL-18, tandis que les IFN de type I exercent un effet synergique avec l'IL-18 et l'IL-12 pour activer les MAIT. Il sera intéressant, dans d'autres modèles d'infection, d'explorer les réponses des MAIT induites par le signal des IFN de type I.

Les MAIT semblent aussi impliqués dans les réponses au VHC. Leur fréquence diminue dans le sang périphérique de patients atteints d'hépatite chronique à VHC. Le nombre de MAIT sanguins est corrélé négativement avec le niveau de fibrose intra-hépatique suggérant un rôle dans la maladie ou une réduction induite par les LT conventionnels spécifiques du virus (106).

Des études importantes ont porté sur les MAIT lors d'infections au VIH. L'infection due au VIH est associée très tôt à une déplétion en MAIT dans le sang périphérique par rapport aux individus sains, en grande partie irréversible, même après un traitement par HAART (highly active antiretroviral therapy). Le mécanisme à l'origine de cette déplétion n'est pas connu et ne semble pas dirigé par l'infection virale. La réduction de la fréquence des MAIT, l'altération de leurs fonctions et de leur distribution pourraient jouer un rôle dans la susceptibilité aux infections bactériennes et fongiques qui apparaissent rapidement et au cours de l'infection par le VIH.

Il est encore inconnu si les MAIT contribuent à limiter les infections virales. Des modèles animaux pertinents sont nécessaires pour identifier *in vivo* l'implication des MAIT dans la lutte contre les infections virales, ainsi que les médiateurs impliqués.

Devant ces observations, l'utilisation des MAIT en immunothérapie anti-infectieuse est envisagée et étudiée. Actuellement des recherches, facilitées par le développement de nouveaux modèles animaux, sont menées afin de mettre en évidence des antigènes capables d'activer spécifiquement les MAIT, et pouvant être incorporés dans des candidats vaccins.

Les expérimentations portant sur le mécanisme d'action des MAIT dans la réponse immunitaire contre Mtb apportent des résultats encourageants pour leur manipulation en immunothérapie (partie 2B). Ces résultats, en plus du phénotype mémoire des MAIT, font de ces cellules une cible de choix pour la recherche de nouveaux vaccins antituberculeux.

La vaccination de primates non humains par le BCG entraîne l'activation spécifique des MAIT à 14 et 21 jours post-vaccination, contrairement aux LT CD8⁺ non MAIT. Au site d'injection (pectoral), les MAIT prolifèrent plus, s'activent et produisent plus de Grz B qu'à un site distal (inguinal). Par contraste, les LT CD8⁺ non MAIT sont plus actifs au site distal. De plus, les MAIT se réactivent après revaccination (107).

Dans des vaccins classiques, le remplacement des adjuvants conventionnels par des antigènes reconnus par les MAIT (métabolites de la vitamine B2), ou des molécules les ciblant, pourrait être mis en place pour favoriser leurs fonctions effectrices et optimiser l'ampleur et la durée de la réponse adaptative.

Les expériences menées précédemment au laboratoire se sont intéressées au rôle des interférons de type I, en particulier l'IFN α 2b, dans la voie TCR-dépendante d'activation des MAIT. Les IFN de type I sont produits par toutes les cellules de l'organisme en réponse à la reconnaissance de certains PAMP, en particulier d'origine virale mais également bactérienne (108). Toutes les cellules de l'organisme expriment les récepteurs aux IFN de type I, engageant des réponses spécifiques en fonction des voies de signalisation activées en aval de ces récepteurs.

Dans le cas des LT CD8⁺, les IFN de type I sont principalement impliqués dans la réponse primaire antivirale et anti-tumorale. Ils augmentent la présentation croisée par les cellules dendritiques. Ils favorisent directement la différenciation vers la voie Th1, productrice d'IFN γ , et jouent un rôle majeur dans la génération des cellules mémoires (109).

Dans le cas des LT CD8⁺ mémoires, ils augmentent significativement leurs fonctions effectrices, mais présentent également un effet inhibiteur, principalement antiprolifératif, dont le but serait de favoriser l'activation des LT CD8⁺ naïfs lors d'une réponse secondaire (110)(111).

Les expériences réalisées au laboratoire montrent que les agonistes de TLR7/8 stimulent indirectement les fonctions des MAIT possiblement via la production d'IFN de type I par les DC plasmacytoïdes. La costimulation des PBMC par l'IFN α 2b

potentialise de façon remarquable l'activation des MAIT par le TCR, en particulier l'induction des molécules cytotoxiques (perforine/granzyme) et la production d'IFN γ . Ces observations suggèrent que les MAIT sont impliqués dans les réponses immunitaires caractérisées par de fortes productions d'IFN α . Elles suggèrent également que l'induction d'une réponse aux IFN de type I serait un moyen de mobiliser les fonctions effectrices des MAIT et de les manipuler dans un objectif prophylactique ou thérapeutique.

Le projet vise à mieux caractériser la réponse des MAIT à l'IFN α 2b, et en particulier à aborder les questions suivantes :

- L'effet de l'IFN α 2b sur les MAIT est-il direct ou indirect ?
- La réponse des MAIT à l'IFN α 2b est-elle différente de celle des LT CD8⁺ conventionnels ?
- Quelles sont les bases mécanistiques de la réponse des MAIT à l'IFN α ?

Matériels et méthodes

Obtention des PBMC

Les PBMC sont isolées à partir de buffy coat (couches leucocytaires) de donneurs sains fournies par l'EFS. Elles sont obtenues par séparation sur un gradient de Ficoll. Pour cela, le sang est tout d'abord dilué au 1/3 dans du PBS, puis déposé délicatement sur du Pancoll (PAN biotech) à raison de 2/1 (volume/volume). Après 20 min de centrifugation à 2 000 rpm, l'anneau leucocytaire est prélevé à l'interface Pancoll/plasma, déposé dans un nouveau tube et dilué dans du PBS. Après une dernière centrifugation de 10 min à 1 500 rpm, le culot cellulaire est re-suspendu dans du RPMI1640 (Gibco life technologies) complétement avec 10 % de SVF et 1 % d'un mélange pénicilline/streptomycine. La concentration cellulaire est ensuite réalisée au microscope en présence d'un colorant vital, le bleu trypan (Gibco life technologies).

Congélation et décongélation des PBMC

La congélation s'effectue dans un mélange RPMI complet/DMSO 10 % à froid, suivi d'un stockage à -80°C pour une durée n'excédant pas 3 mois. La décongélation s'effectue sous agitation dans un bain-marie à 37°C, suivi d'un lavage en RPMI complet et numération au bleu trypan.

Stimulation des PBMC pour une analyse fonctionnelle

La plupart des expériences sont réalisées sur des cellules décongelées. La concentration cellulaire est ajustée à 5 millions de cellules/mL. Les PBMC sont ensuite distribuées dans des plaques de 96 puits à fond plat dans un volume final de 200 µL, soit 10⁶ cellules/puits. Les différents stimulants sont ajoutés à la concentration appropriée, seuls ou en combinaison : IFNα (IFNα2b recombinant : IntronA (Roche) 10⁴ UI/ml), OKT3 (anti-CD3 (Orthoclone OKT3 Janssen-Cilag) 10ng/ml). Après addition de brefeldine A (10 µg/mL), les cellules sont incubées pendant 16h à +37°C 5 % CO2 sous atmosphère humide.

Marquages membranaires et intracellulaires

Pour l'identification du phénotype et les essais fonctionnels, les anticorps conjugués (Miltenyi Biotec) suivants sont utilisés : anti-CD5 APC Vio 770, CD8 VioBlue,

CD45RA VioGreen, CD161 PE Vio 770, IFN γ FITC, CCL4 APC, V α 7.2 PE, TNF PE. Le marquage membranaire est réalisé après centrifugation et re-suspension des cellules dans du PBS/SVF 1 %. Les anticorps sont ajoutés à la concentration appropriée, suivi d'une incubation de 15 min sur la glace à l'abri de la lumière. Après lavage en PBS/SVF, la fixation est réalisée par incubation pendant 20 min à température ambiante dans un réactif contenant du paraformaldéhyde (Cytotfix, BD Bioscience). La perméabilisation est ensuite effectuée par addition d'un tampon contenant de la saponine (Cytoperm, BD Bioscience). Les cellules sont lavées deux fois en présence de Cytoperm, puis les anticorps dirigés contre les protéines intracellulaires sont ajoutés à la concentration appropriée dans le même tampon. Après 1h d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées une dernière fois dans le tampon de perméabilisation, puis re-suspendues dans du PBS/SVF pour l'analyse en cytométrie.

Analyse cytométrique de l'expression de pSTAT4 (Phosphoflow)

Ces expériences sont réalisées exclusivement sur des cellules fraîchement isolées. Les PBMC sont incubées pendant 15 min à 37°C 5 % CO₂ en absence ou en présence d'IFN α à 10 000 UI/mL. Un marquage membranaire avec un anticorps anti-CD161 APC dilué au 1/10 est d'abord réalisé. Après lavage, le marquage intranucléaire est effectué après fixation à l'aide du Max Buffer 5X BD Phosflow, suivi d'une perméabilisation avec du Perm Buffer III 1X BD Phosflow. Les cellules sont ensuite marquées par un mélange contenant des anticorps anti-CD8 Vioblue, anti-CD45RA-Viogreen et un anticorps anti-pSTAT4 –P(Tyr693) (BD Biosciences) ou un contrôle isotypique (IgG2a, BD Biosciences), tous deux conjugués à l'AF448. Après 1h d'incubation et deux lavages, Les cellules sont re-suspendues dans du PBS/SVF avant analyse en cytométrie.

Tri cellulaire

L'isolement des MAIT et des LT CD8⁺ mémoires conventionnels est réalisé en deux étapes. La première étape consiste en un enrichissement des lymphocytes exprimant la chaîne TCR V α 7.2 utilisée par les MAIT.

Pour cela, des PBMC fraîches sont incubées pendant 15 min sur la glace avec un anticorps anti-TCR V α 7.2 -PE au 1/100. Après deux lavages dans un tampon PBS/SVF/EDTA (2 mM), les cellules sont incubées 15 min sur la glace avec des

microbilles anti-PE au 1/10 (Miltenyi Biotec), lavées deux fois dans du PBS/SVF/EDTA avant d'être reprises dans un volume de 3 mL du même tampon. La séparation magnétique des lymphocytes TCRV α 7.2⁺ est réalisée par sélection positive à l'aide de l'autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). Les cellules d'intérêt marquées sont retenues sur les colonnes, éluées et collectées comme fraction positive. Le programme Posselds est utilisé : programme à double colonne pour isoler des cellules représentant moins de 5 % de l'ensemble des PBMC. La pureté est systématiquement supérieure à 95 %.

Les cellules TCRV α 7.2⁺ enrichies sont, dans une deuxième étape, marquées avec une combinaison d'anticorps membranaires anti-CD5, CD8, CD161 et CD45RA. Après une incubation de 15 min dans la glace et deux lavages dans du PBS/SVF, les cellules CD5⁺ CD8⁺ CD161⁺⁺ CD45RA⁻ TCRV α 7.2⁺ (MAIT) et CD5⁺ CD8⁺ CD161⁻ CD45RA⁻ TCRV α 7.2⁺ (LT CD8⁺ mémoires conventionnels) sont isolées séparément avec un trieur FACSARIA-SORP.

Cytométrie

L'acquisition des données est effectuée sur un cytomètre MACSQuant Analyser 10 (Miltenyi Biotec). L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo. (Tree Star Inc.).

Analyse de la translocation nucléaire de pSTAT4

Un enrichissement en LT CD8⁺ est d'abord effectué par sélection négative sur billes magnétiques (CD8 T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec). Les PBMC sont dans un premier temps marquées par un cocktail d'anticorps conjugués à la biotine (anti-CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , et CD235a) puis par un cocktail de microbilles magnétiques conjuguées à des anticorps anti-CD14, anti-CD61 et anti-biotine dans un tampon PBS/SVF/EDTA (2 mM). La déplétion est réalisée sur des colonnes LS. La fraction négative de LT CD8⁺ éluée est conservée. La pureté est supérieure à 80 %.

Les cellules sont marquées pour visualiser l'expression intracellulaire de pSTAT4.

Les images sont acquises automatiquement en utilisant le cytomètre en flux Image Stream (Amnis). Des contrôles par monomarquages avec des anticorps anti-CD161 APC, pSTAT4 AF488 et DAPI sont utilisés pour calculer une matrice de compensation des signaux parasites. Cette matrice est appliquée dans le but d'isoler

les images sur trois canaux uniques : DAPI, pSTAT4 AF488 et CD161 APC. Les résultats à partir des images compensées sont analysés avec le logiciel IDEAS version 6.2. Pour mesurer la translocation nucléaire de pSTAT4, l'analyse est fondée sur la similarité, mesurée en comparant deux images d'une même cellule pixel par pixel. Le score de similarité est établi par le coefficient de corrélation de Pearson. Il indique le degré de relation entre l'intensité des pixels des images obtenues à partir du canal DAPI, représentant l'image du noyau, et du canal pSTAT4. Si pSTAT4 est nucléaire, les deux images sont similaires, superposées, et le score est positif.

RT-PCR semi-quantitative (RT-qPCR)

Les ARNm sont isolés à l'aide du kit RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). L'hybridation avec les hexamères et la synthèse du brin d'ADNc sont réalisées selon le protocole Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Les ADNc sont conservés congelés à -20°C.

Les amorces permettant l'amplification de chaque gène sont choisies de façon à encadrer un intron, afin de minimiser le risque d'amplification d'ADN génomique résiduel. Les caractéristiques principales des amorces sont les suivantes :

Gènes	Amorce 5' → 3'	Amorce 3' → 5'	Tm	%GC
GAPDH	ATCTTCTTTTTCGTCGCCAG	ACGACCAAATCCGTTGACTCC	68/71	50/52
Stat1	TCACATTCACATGGGTGGAG	CAAAGGCATGGTCTTTGTCA	68/66	50/45
Stat4	GGCAATTGGAGAACTAGAGG	AGGGTGGGTGGCATAACAT	69/68	48/53
IFNAR1	ACAAGCTTTCCTACTTCCTCC	AGCTTTTCATCCATGGTGTGT	69/67	48/43
IFNAR2	TGGCTATTCACAGGTGCAGT	GCACGCTTGTAATCCCAGCT	68/70	50/55
CD40L	ACATACAACCAAACCTTCTCCC	AGATGTTGTTTTACTGCTGGC	67/67	43/43
ISG15	GAGAGGCAGCGAACTCATCT	CTTCAGCTCTGACACCGACA	70/70	55/55
OAS-1A	GTGTGTCCAAGGTGGTAAAGG	CTGCTCAAACCTTCACGGAA	71/65	52/47
IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAG	CTCTTCGACCTCGAAACAGC	66/70	45/55

45 cycles de PCR sont réalisés avec une température d'hybridation de 58°C, à l'aide du Light Cycler 480 Roche. Les résultats sont normalisés avec l'expression d'un gène de ménage (GAPDH) et la quantification relative est évaluée par la formule $2^{-\Delta(\Delta C_p \text{ GAPDH} - \Delta C_p \text{ gène})}$.

Statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPad Prism version 5. Des tests t appariés et le test wilcoxon sont effectués pour comparer deux populations. Les valeurs $p < 0.05$ sont considérées significatives.

Résultats

Stratégie d'analyse des MAIT au sein des PBMC

Les effets d'une stimulation par l'IFN α sur les fonctions effectrices des MAIT et des LT CD8⁺ mémoires conventionnelles ont d'abord été étudiés au sein des PBMC. Une stratégie d'analyse par cytométrie en flux est mise en place (Figure 9). Elle est basée sur l'identification des lymphocytes par leur taille et granularité, puis sur leurs caractéristiques membranaires. Les MAIT sont définis d'après le phénotype CD5⁺CD8^{+/faible}CD45RA⁻CD161⁺. Le marqueur CD5 est choisi car son expression n'est pas modulée par la stimulation antigénique, au contraire du marqueur CD3. Après identification, cette population est comparée aux LT CD8⁺ mémoires conventionnels n'exprimant pas CD161 (CD161⁻) ou ayant un niveau d'expression de CD161 intermédiaire (CD161^{int}). Les marquages intracellulaires des cytokines IFN γ , CCL4, TNF α ou Grz B permettent d'évaluer la proportion de LT CD8⁺ mémoires capables de produire ces molécules sous différentes conditions de stimulation (Figure 9 et Figure 10).

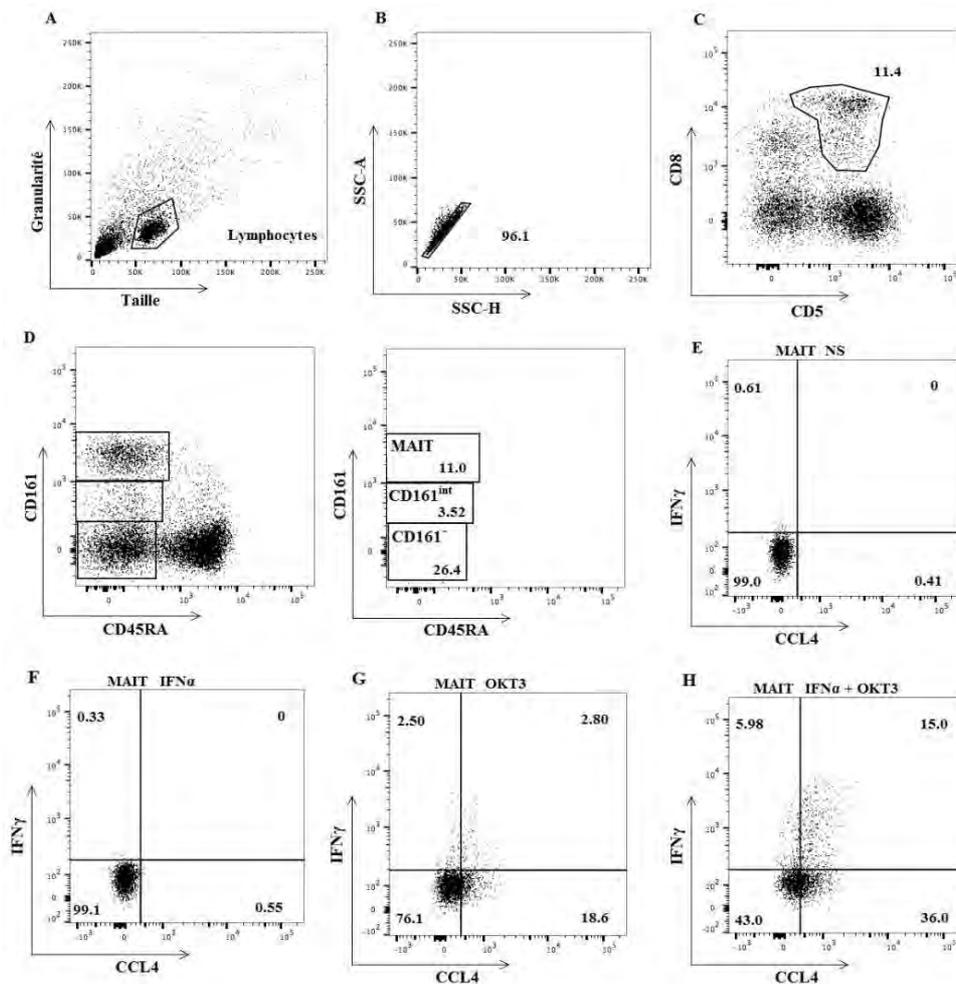


Figure 9. Stratégie d'analyse des MAIT au sein des PBMC. Exemple représentatif. (A) Identification des lymphocytes selon leur taille et leur granularité parmi les PBMC. (B) Elimination des doublets de cellules. (C) Identification des lymphocytes $CD5^+CD8^+$. (D) Identification des trois populations de lymphocytes $CD8^+$ mémoires selon leur phénotype CD161. Analyse des lymphocytes MAIT $CD8^+CD161^+CD45RA^-$ exprimant les cytokines $IFN\gamma$ et/ou CCL4 intracellulaires en absence de stimulation (E) ou après stimulation par l' $IFN\alpha$ (F), l' $OKT3$ (G) ou l'association $IFN\alpha + OKT3$ (H).

L' $IFN\alpha$ agit synergiquement avec les anti-CD3 pour stimuler les LT $CD8^+CD45RA^-CD161^+$

Une condition de non stimulation est utilisée comme référence. La deuxième condition testée est une stimulation par l' $IFN\alpha$ seul (15h). Les résultats ne montrent pas de différence significative par rapport à l'absence de stimulation sur la libération de cytokines pour chaque population de LT $CD8^+$ mémoires étudiée. La troisième condition testée est une stimulation par un anticorps monoclonal agoniste anti-CD3, l' $OKT3$. Cette stimulation a pour effet de mimer une réponse antigénique. La dernière condition testée est une costimulation par $IFN\alpha$ et $OKT3$. Les résultats montrent que l' $IFN\alpha$ seul n'a aucun effet sur les paramètres étudiés dans chaque sous-population de LT $CD8^+$ mémoires (Figure 10). La stimulation par $OKT3$ seul

induit une expression importante des cytokines étudiées par les T CD8⁺ mémoires CD161⁻ et CD161^{int} (25.8 ± 5.3 % de CD161^{int} IFN γ ⁺; 21.0 ± 5.0 % de CD161⁻ IFN γ ⁺; 26.3 ± 7.0 % de CD161^{int} CCL4⁺; 17.9 ± 6.3 % de CD161⁻ CCL4⁺; 39.0 ± 10 % de CD161^{int} TNF α ⁺; 21.0 ± 3.2 % de CD161⁻ TNF α ⁺). A contrario, les MAIT produisent peu d'IFN γ intracellulaires dans ces conditions (7.4 ± 2.5 %), tandis que CCL4 et TNF α sont produits à des niveaux comparables aux autres sous-populations (18.6 ± 5.0 % de MAIT CCL4⁺; 19.4 ± 6.1 % de MAIT TNF α ⁺). La présence d'IFN α augmente significativement la production de chaque cytokine par toutes les sous-populations, mais avec un effet plus prononcé sur les MAIT (facteur de multiplication par rapport à OKT3 seul : 3.27 pour l'IFN γ , 1.71 pour le CCL4 et 1.45 pour le TNF α dans les MAIT ; 1.5 pour l'IFN γ , 1.12 pour le CCL4, et 1.45 pour le TNF α dans les CD161⁻). Enfin, les MAIT n'expriment pas spontanément de Grz B, à l'inverse des autres sous-populations de T CD8⁺ mémoires. L'IFN α seul induit très légèrement l'expression du Grz B (6.3 ± 3.4 %) dans les MAIT, et l'association OKT3 + IFN α présente un effet synergique majeur (facteur de multiplication par rapport à OKT3 seul : 10.0) (à noter l'absence de significativité statistique en raison d'un faible nombre d'échantillons analysés). A l'opposé, ni l'IFN α , ni l'OKT3, n'ont d'effet sur l'expression du Grz B dans les LT CD8⁺ mémoires CD161⁻. La situation dans les cellules CD161^{int} semble encore différente, avec un effet de l'IFN α seul qui n'est pas augmenté par l'OKT3 : cependant, cette expérience n'a pas été reproduite suffisamment pour conclure définitivement. Ces résultats montrent une réactivité des MAIT à l'IFN α dans le contexte d'une stimulation par OKT3, qui se manifeste par une expression très augmentée de l'IFN γ et du Grz B, par rapport aux autres sous-populations de LT CD8⁺ mémoires.

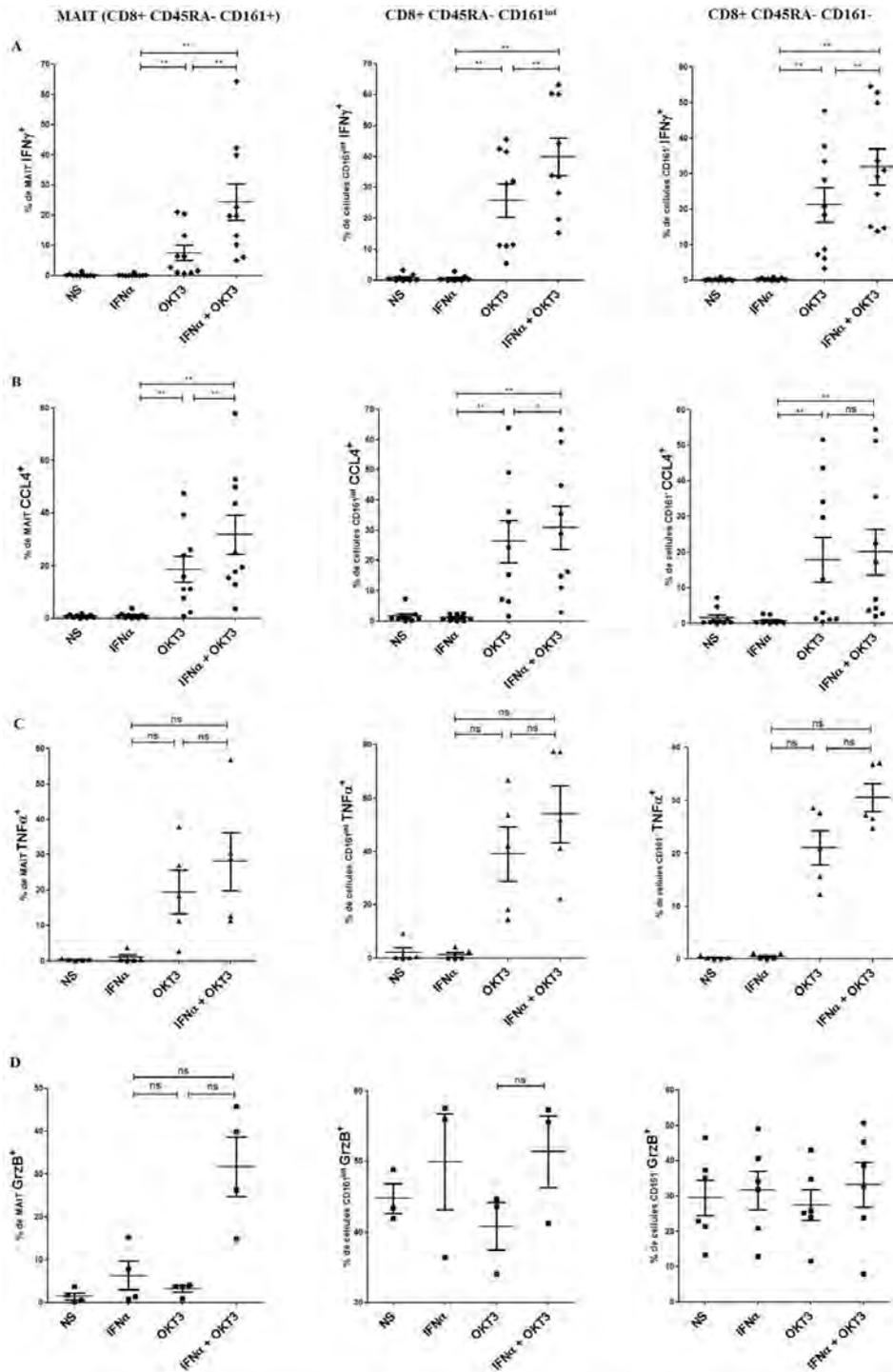


Figure 10. L'IFN α agit synergiquement avec les anti-CD3 pour stimuler les LT CD8 $^+$ CD45RA $^-$ CD161 $^+$. Les PBMC de donneurs sains ont été mises en culture non stimulées (NS), stimulées par l'IFN α (1000 UI/mL), par l'OKT3 (10 ng/mL) ou par l'association IFN α et OKT3 pendant 16-20 h. L'OKT3 a été ajouté 3 h après l'IFN α . Le pourcentage de cellules CD8 $^+$ mémoires CD161 $^{++}$ (MAIT), CD161 int , CD161 $^+$ libérant de l'IFN γ (A), du CCL4 (B), du TNF α (C) et du Grz B (D) a été analysé. La comparaison entre les différentes populations a été faite avec le test t apparié de Wilcoxon. Les expériences ont été répétées avec dix donneurs (A, B), cinq donneurs (C), et six donneurs (D), les moyennes + SEM sont représentées. *P < 0.05 ; **P < 0.005 ; ***P = 0.001.

Les MAIT répondent directement à la costimulation par l'IFN α

Nous avons ensuite souhaité vérifier si les effets observés avec l'IFN α pouvaient être reproduits sur des MAIT purifiés. Pour cela, les MAIT ont été triés sur la base de l'expression de la chaîne semi-invariante du TCR Va7.2, de la forte expression de CD161, et de l'absence de CD45RA parmi les T CD8 $^+$. Les résultats montrent une tendance similaire à celle observée avec les lymphocytes non triés provenant des mêmes donneurs (Figure 11). On observe ainsi une potentialisation de la capacité de sécrétion d'IFN γ et de CCL4 par l'association OKT3 + IFN α . Cela nous permet de conclure à un effet direct de l'IFN α 2b sur les MAIT.

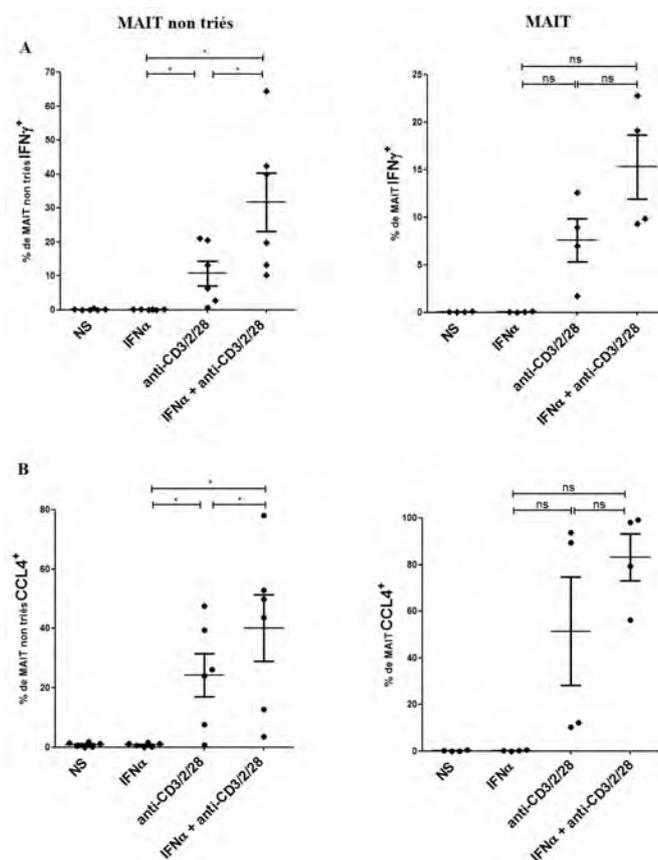


Figure 11. Les MAIT répondent directement à la costimulation par l'IFN α . Des PBMC CD8 $^+$ CD45RA $^-$ CD161 $^+$ de donneurs sains, et des MAIT triés selon l'expression de CD8 $^+$, TCR Va7.2 $^+$, CD161 $^+$ issus des mêmes donneurs sains ont été mis en culture non stimulés (NS), stimulés par l'IFN α (1000 UI/mL), stimulés par une combinaison d'anti-CD3/2/28, ou par l'association IFN α et anti-CD3/2/28 pendant 18h. L'anti-CD3/2/28 a été ajouté 15 h après l'IFN α . Le pourcentage de cellules CD8 $^+$ mémoires CD161 $^+$, ou de MAIT triés produisant de l'IFN γ (A), et du CCL4 (B) a été analysé. La comparaison entre les différentes populations a été faite avec le test t apparié de Wilcoxon, Les expériences ont été répétées avec six donneurs, les moyennes + SEM sont représentées. *P < 0.05.

Expression des gènes d'IFNAR1/2 dans les MAIT et les LT CD8⁺ mémoires CD161⁻

L'IFN α se fixe sur son récepteur transmembranaire formé de deux chaînes codées par les gènes *ifnar1* et *ifnar2*. Il est donc possible que la sensibilité apparente des MAIT à l'IFN α soit liée à une plus forte expression de son récepteur. Nous avons donc voulu explorer l'expression de chaque sous-unité du récepteur par des MAIT et LT CD161⁻ triés. Pour cela une RT-PCR quantitative après extraction de leur ARNm a été réalisée. La quantification relative a été normalisée avec l'expression du gène de ménage GAPDH. On n'observe pas de différences significatives entre les deux populations, mais les MAIT semblent exprimer une quantité plus faible d'ARNm des deux chaînes du récepteur par rapport aux cellules conventionnelles (Figure 12). Ces résultats suggèrent donc que la sensibilité des MAIT à l'IFN α ne serait pas liée à une plus forte expression du récepteur par rapport aux LT CD8⁺ mémoires conventionnels.

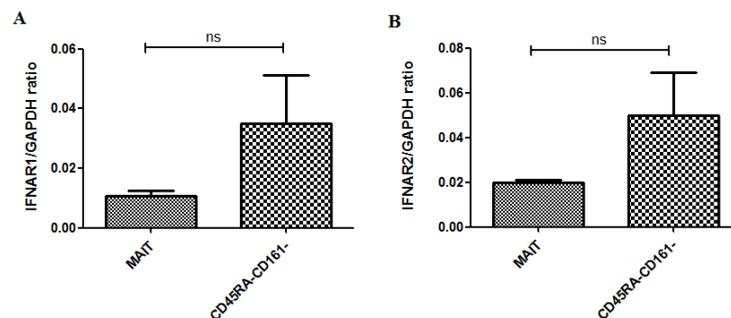


Figure 12. Expression des gènes d'IFNAR 1 et 2 dans les lymphocytes MAIT et les LT CD8⁺ CD161⁻ mémoires. La quantification relative de la transcription des gènes *ifnar1* (A) et *ifnar2* (B) a été réalisée par qRT-PCR avec la formule $2^{-\Delta\Delta C_p}$. Les ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm extraits de lymphocytes MAIT triés et de CD8⁺ mémoires CD161⁻ triés non stimulés. La normalisation a été faite en utilisant le gène de la GAPDH. La comparaison entre les deux populations a été faite avec le test t apparié de Wilcoxon. Cette expérience a été réalisée à partir de trois donneurs différents, les moyennes + SEM sont représentées. ns = non significatif.

La stimulation des MAIT par l'IFN α active une voie de signalisation intracellulaire dépendante de STAT4 et activant sa phosphorylation

Après interaction avec son récepteur, l'IFN α active une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir principalement les protéines STAT1/STAT2. Cependant, l'IFN α peut induire une signalisation dépendante d'autres protéines STAT, en particulier STAT4 (112). Des variations en concentration de ces deux protéines moduleraient l'expression des cytokines sécrétées. Afin de mettre en évidence les mécanismes de réponse des MAIT à l'IFN α , et la voie intracellulaire

activée, l'expression des gènes de STAT1 et STAT4 a été quantifiée par qRT-PCR. Une comparaison avec les LT CD8⁺ mémoires CD161⁻ a aussi été réalisée. Ces résultats montrent qu'à l'état basal STAT1 est plus exprimé dans les CD8⁺ mémoires CD161⁻ que dans les MAIT, au contraire de STAT4 qui a tendance à être plus exprimé dans les MAIT (Figure 13A). Ainsi, le ratio STAT4/STAT1 a tendance à être supérieur dans les MAIT (moy_{MAIT} = 6.23 ± 2.7 ; moy_{CD161⁻} = 1.28 ± 0.52) (Figure 13B).

Pour étudier directement l'activation de STAT4, l'intensité de fluorescence de sa forme phosphorylée pSTAT4 a été évaluée par cytométrie en flux après stimulation par IFN α (Figure 13C). L'intensité de fluorescence de pSTAT4 est significativement plus élevée dans les MAIT (MFI = 280.2 ± 62.9) que dans les LT CD8⁺ mémoires CD161⁻ (MFI = 167 ± 37.8) (Figure 13D).

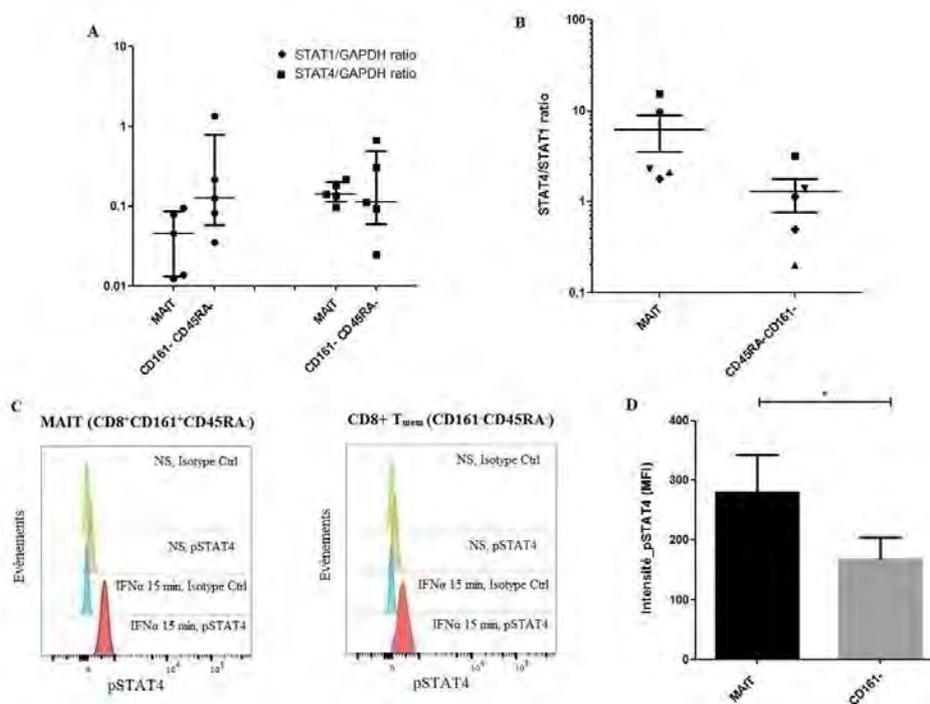


Figure 13. La stimulation des MAIT par l'IFN α active une voie de signalisation intracellulaire dépendante de STAT4 et activant sa phosphorylation. La quantification relative de la transcription des gènes stat1 et stat4 a été réalisée par qRT-PCR avec la formule ($2^{-\Delta\Delta C_p}$). Les ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm extraits de MAIT triés et de LT CD8⁺ mémoires CD161⁻ triés non stimulés provenant de 5 donneurs sains. La normalisation a été faite en utilisant le gène de la GAPDH. Les moyennes + SEM des ratios sont représentées en (A). Les médianes et interquartiles sont représentés en (B). Des PBMC de donneurs sains ont été mises en culture non stimulées, ou stimulées par IFN α (10 000 UI/ml) pendant 15 min. Elles ont été perméabilisées, fixées et marquées pour analyser les CD8⁺CD45RA⁺CD161⁺ et CD161⁻ exprimant pSTAT4 ou un isotype contrôle par cytométrie en flux. (C) montre les données obtenues à partir d'un seul donneur. L'expérience a été répétée à partir de PBMC de sept donneurs, les moyennes + SEM des MFI de pSTAT4 sont représentées en (D). La comparaison entre les deux populations a été faite avec le test t apparié de Wilcoxon. *P<0.05 ; NS = non stimulé.

pSTAT4 est localisé dans le noyau des lymphocytes CD8⁺CD161⁺ et CD161⁻ après stimulation par l'IFN α

Pour approfondir ces résultats, une expérience de cytométrie en images, couplant la cytométrie en flux et la microscopie, a été réalisée. Elle permet de visualiser, cellule par cellule, l'expression de pSTAT4 en se basant sur un enrichissement en LT CD8⁺, et un marquage CD161⁺ pour identifier les MAIT. L'utilisation du DAPI, colorant l'ADN, permet d'observer la localisation nucléaire. En absence de stimulation, pSTAT4 est indétectable ; après stimulation, pSTAT4 devient visible. Le score de similarité est établi avec le coefficient de corrélation de Pearson. Il indique le degré de relation entre l'intensité des pixels des images obtenues à partir des canaux DAPI, représentant l'image du noyau, et pSTAT4. Le score de similarité après stimulation est supérieur à 1, indiquant une forte similarité DAPI/pSTAT4 et une localisation de pSTAT4 au noyau (Figure 14A et B). Ces résultats sont retrouvés avec les LT CD8⁺ CD161⁻ mais avec une intensité de fluorescence de pSTAT4 plus faible. La valeur d'intensité est alors normalisée par le ratio d'intensité entre le noyau et la cellule totale. Ce ratio est proche de 1, affirmant la localisation de pSTAT4 au noyau. Il n'y a pas de différence significative entre les deux populations (Figure 14C). Ces résultats permettent de confirmer la translocation nucléaire de pSTAT4 dans les MAIT après stimulation par l'IFN α . Cette méthode confirme aussi les résultats obtenus par cytométrie en flux, un décalage du pic de fluorescence de p-STAT4 est retrouvé après stimulation.

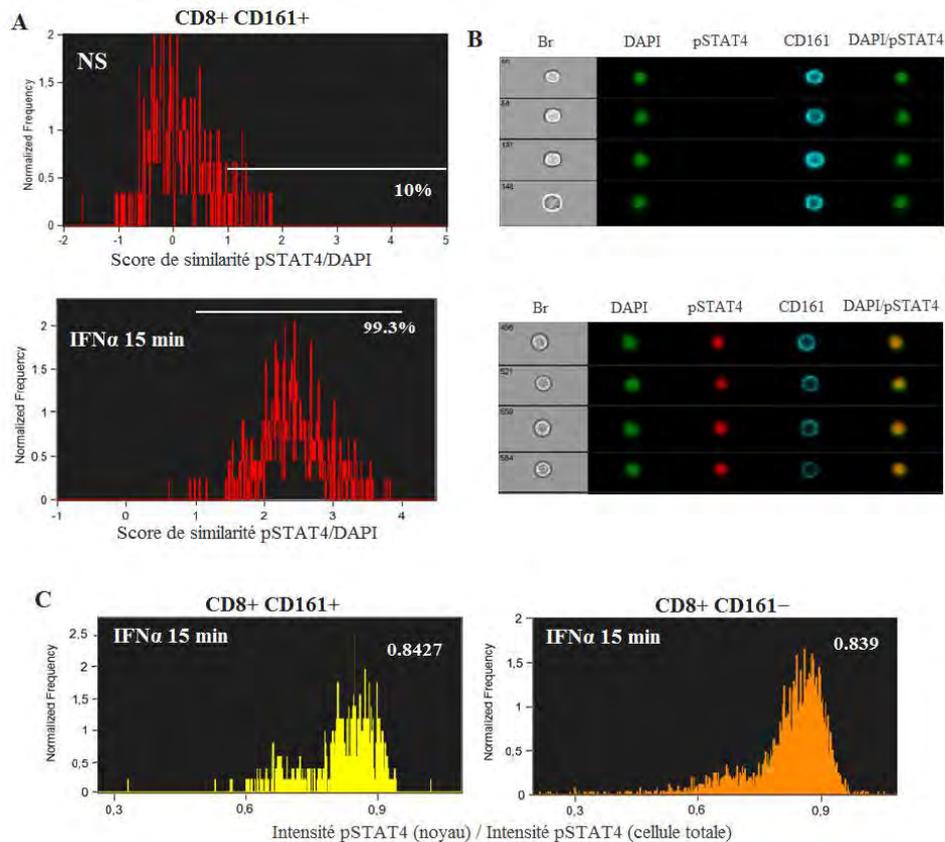


Figure 14. Localisation de pSTAT4 dans les LT CD8⁺ CD161⁺ et CD161⁻ après stimulation par l'IFN α . Les PBMC d'un donneur sain ont été mises en culture non stimulées, ou stimulées par l'IFN α pendant 15 minutes. Elles ont été enrichies en CD8⁺, fixées, perméabilisées et marquées par CD161, DAPI et pSTAT4. En (A), la localisation nucléaire de pSTAT4 dans les LT CD8⁺ CD161⁺ après stimulation est représentée à l'aide du paramètre « score de similarité » pSTAT4/DAPI. (Valeurs > 1, localisation nucléaire). Les galeries d'images correspondantes obtenues avec cinq canaux de détection (Lumière blanche, DAPI, pSTAT4, CD161 et superposition d'images DAPI/pSTAT4) sont représentées en (B). Les images sont acquises avec la cytométrie en images ImageStreamX. Br = brightfield. En (C), l'intensité de pSTAT4 après stimulation par IFN α est obtenue par normalisation entre son intensité dans le noyau et dans la cellule totale. Les médianes de fluorescence de pSTAT4 dans les populations CD8⁺CD161⁺ et CD161⁻ sont représentées. Cette expérience a été répétée avec quatre donneurs.

Expression de gènes régulés par l'IFN α et l'IL-12 dans des MAIT stimulés par l'IFN α

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la sensibilité des MAIT à l'IFN α pourrait être liée à l'utilisation préférentielle de STAT4 en réponse à l'IFN α , aboutissant à sa phosphorylation et sa translocation nucléaire, par opposition à la voie « canonique » utilisant préférentiellement STAT1.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons souhaité analyser le profil d'expression génique des MAIT en réponse à l'IFN α . Une publication a décrit la réponse spécifique des LT CD8⁺ à l'IFN α et à l'IL-12, et a permis d'identifier des gènes exprimés différemment dans ces deux conditions (113). Il est connu que la

signalisation du récepteur à l'IL-12 dans les LT, conduisant à la production d'IFN γ , est très dépendante de STAT4. Nous avons donc émis l'hypothèse que la réponse des MAIT à l'IFN α pourrait induire un profil d'expression génique similaire à celui observé en réponse à l'IL-12 dans les LT CD8 $^+$ conventionnels. Nous avons sélectionné deux gènes IFN α -spécifiques (ISG15 et OAS-L) et deux gènes IL-12 spécifiques (CD40L et IFN γ), et analysé leur expression après stimulation par qRT-PCR. Comme le montre la Figure 15, ISG15 et OAS-L sont induits par l'IFN α dans les MAIT et les LT CD8 $^+$ mémoires conventionnels, avec un niveau d'induction légèrement plus bas dans les MAIT. Par ailleurs, CD40L et IFN γ sont très faiblement induits dans les deux sous-populations. Cette expérience ne discrimine pas la réponse des MAIT et des LT CD8 $^+$ mémoires conventionnels, et ne nous permet donc pas de valider notre hypothèse de départ.

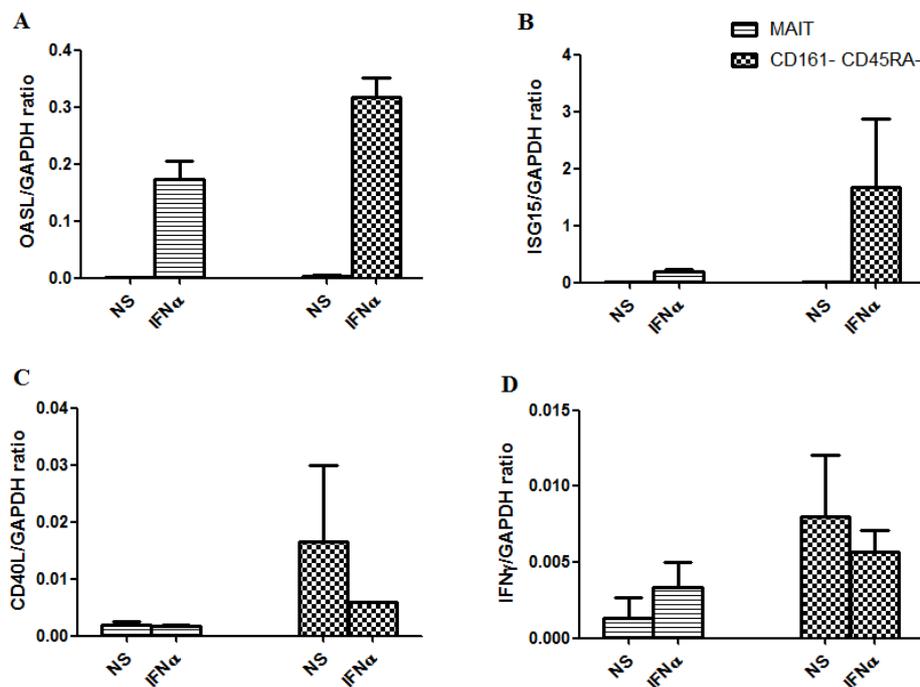


Figure 15. Expression de gènes régulés par l'IFN et l'IL-12 dans des MAIT stimulés par l'IFN α . Des MAIT triés selon l'expression de CD8 $^+$, CD45RA $^-$, CD161 $^+$, TCR V α 7.2 $^+$ et des LT CD8 $^+$ mémoires conventionnels issus de trois donneurs sains ont été mis en culture non stimulés ou stimulés par l'IFN α pendant 12 h. Après extraction des ARNm et synthèse des ADNc, des qRT-PCR ont été effectuées sur des gènes induits par l'IFN α : OASL (A) et ISG15 (B), et par l'IL-12 : CD40L (C) et IFN γ (D). La quantification relative de la transcription des gènes a été réalisée avec la formule ($2^{-\Delta\Delta C_p}$). La normalisation a été faite en utilisant le gène de la GAPDH. Cette expérience a été réalisée à partir de PBMC de trois donneurs sains, les moyennes + SEM sont représentées. NS = non stimulé.

Discussion et perspectives

Les MAIT présentent la capacité de répondre rapidement après la reconnaissance de ligands hautement conservés par de nombreuses espèces bactériennes, indépendamment de leur caractère pathogène. L'étude de cette réponse a mis en évidence une réaction dépendante de leur TCR semi-invariant suffisante pour induire leurs fonctions effectrices, mais restant limitée. Il a été montré que la costimulation par des signaux provenant des cellules immunitaires innées, en particulier certaines cytokines (IL-12, IL-18, IL-15, IL-7), est nécessaire à l'activation optimale de ces cellules (98)(102).

Nous nous sommes intéressés à une cytokine pro-inflammatoire : l'IFN α . Les IFN de type I, produits en grande quantité au cours des infections virales, mais également de nombreuses infections bactériennes, sont connus pour potentialiser l'activation des LT CD8⁺ naïfs et leur différenciation en cellules mémoire (109)(114). Concernant les LT CD8⁺ mémoires, ils augmentent significativement leurs fonctions effectrices mais présentent principalement un effet inhibiteur, en particulier sur leur prolifération (110)(111).

Nous avons observé les capacités de l'IFN α à costimuler les fonctions effectrices des MAIT, et l'effet majeur de l'IFN α sur leur activation TCR-dépendante, par comparaison aux LT CD8⁺ mémoires conventionnels CD161⁻. Par rapport aux LT CD8⁺ conventionnels, les MAIT n'expriment pas de Grz B et produisent peu d'IFN γ en réponse à la stimulation antigénique. L'IFN α induit l'expression du Grz B. Il potentialise de façon majeure la production d'IFN γ et l'expression du Grz B induite par OKT3 (115). Il augmente également la production de CCL4, de TNF, ainsi que l'expression de perforine et la dégranulation (résultats antérieurs du laboratoire).

Les effets de l'IFN α sur les LT CD8⁺ sont multiples et peuvent être indirects. Par exemple, l'IFN α induit la production d'IL-15 par les monocytes, cytokine qui possède elle-même des fonctions de stimulation des T CD8⁺ mémoires (101). Nous avons observé les mêmes effets lorsque nos expériences ont été réalisées à partir de PBMC totaux ou de MAIT purifiés, démontrant un probable effet direct de l'IFN α sur les MAIT. Cependant, ces résultats n'excluent pas non plus un effet indirect supplémentaire, par le biais d'une action sur les monocytes et/ou les cellules dendritiques.

Les mécanismes à l'origine de cette sensibilité particulière des MAIT à l'IFN α ne sont pas connus.

Des études réalisées à partir de lymphocytes NK et T CD8⁺ anti-viraux chez la souris suggèrent que le niveau d'expression différentiel de différentes protéines STAT dans ces cellules régulerait leur réponse à l'IFN α (112)(116).

Ainsi, de forts niveaux d'expression de STAT1 conduiraient à une activité principalement inhibitrice, tandis qu'une expression augmentée de STAT4 induirait la production d'IFN γ (117). Nos résultats vont dans ce sens, puisque les MAIT semblent présenter un ratio d'expression STAT4/STAT1 significativement supérieur à celui retrouvé dans les LT CD8⁺ mémoires conventionnels.

L'IFN α induit une forte expression de STAT4 phosphorylée, supérieure à celle observée dans les LT CD8⁺ mémoires conventionnels, et la translocation nucléaire de STAT4. Dans cette hypothèse, l'IFN α induirait un programme d'expression génique différent des LT CD8⁺ conventionnels, en lien avec l'utilisation préférentielle de STAT4 et non STAT1.

Toutefois, nous n'avons pas observé de signature d'expression génique spécifique des MAIT en réponse à la stimulation par l'IFN α .

Ainsi, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour démontrer le lien de causalité entre cette forte expression de STAT4 et les effets observés sur les MAIT. En particulier, une analyse transcriptomique globale de la réponse des MAIT à l'IFN α sera réalisée, et permettra sans doute de mettre en évidence cette signature spécifique (comme cela a été montré avec l'IL-12 et les LT CD8⁺ mémoires conventionnels) (113).

Les mécanismes à l'origine de la faible réponse des MAIT à la stimulation antigénique ne sont pas connus. Les LT MAIT expriment plusieurs facteurs de transcription importants dans la différenciation des LT CD8⁺ effecteurs/mémoires, tels que T-bet et Eomes, ainsi que de nombreux récepteurs aux cytokines, tels que l'IL-18R α et l'IL-12R β 1 (118). Il serait probablement intéressant d'analyser en détail la différenciation des MAIT naïfs vers le statut effecteur/mémoire. Cela pourrait être réalisé à partir de prélèvements de sang de cordon, dans lequel les LT sont tous naïfs (y compris les MAIT). Cependant, ces expériences peuvent être techniquement difficiles à réaliser, et il sera probablement plus aisé d'analyser ces phénomènes chez la souris.

Enfin, il est possible que la réponse faible des MAIT à la stimulation antigénique seule corresponde à un mécanisme de tolérance vis-à-vis des antigènes provenant de la flore bactérienne commensale (102). En effet, la localisation préférentielle de ces cellules aux niveaux intestinal et hépatique induit un risque d'activation inappropriée en absence d'infection pathogénique. L'IFN α pourrait ainsi correspondre à un signal de « danger » signalant une infection et permettant l'activation optimale des MAIT.

Conclusion

Cette étude a permis de comprendre les conditions d'activation des MAIT et leur réponse intracellulaire après stimulation par l'IFN de type I. L'IFN α a pour effet de potentialiser l'activation des MAIT afin qu'ils répondent de façon optimale et éliminent le pathogène en cas d'infections, activent et recrutent les cellules immunitaires des systèmes inné et adaptatif.

Il pourrait être bénéfique d'induire des réponses à l'IFN α dans la perspective de manipuler les MAIT en prophylaxie ou thérapie notamment anti-infectieuses.

Conclusion

Devant les mécanismes de résistance développés par les micro-organismes contre les anti-infectieux conventionnels (antibiotiques, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires), l'appauvrissement de l'offre thérapeutique, et les difficultés à développer de nouvelles molécules, l'avenir de la prise en charge des maladies infectieuses repose en partie sur l'immunothérapie. Elle correspond à la modulation du système immunitaire par administration d'effecteurs qui stimulent et renforcent les défenses immunitaires de l'organisme afin de lutter contre les maladies infectieuses. La recherche en immunothérapie anti-infectieuse connaît un essor depuis une quinzaine d'années. La sérothérapie et la vaccination prophylactique, stratégies thérapeutiques utilisées avant l'arrivée des antibiotiques (8), ont été développées afin d'augmenter leur efficacité. Les recherches ont abouti à la production d'IgIV (9), puis d'Acm (12), et à la découverte récente des super-anticorps (15). Ces derniers apparaissent dans l'organisme en réaction aux mutations des agents pathogènes. Ils offrent une possibilité additionnelle dans la prise en charge des infections dues à des micro-organismes capables de muter et/ou ayant un cycle de réplication complexe. Le développement de vaccins thérapeutiques (20) permet aussi d'envisager la prise en charge de ces infections.

D'autre part, en ce qui concerne la vaccination, la recherche vise à mettre en évidence des cibles antigéniques pertinentes, et des adjuvants moléculaires afin de formuler de nouveaux vaccins ou de renforcer l'activité de vaccins disponibles mais peu efficaces (BCG) (56).

Les deux autres principales stratégies utilisées en immunothérapie anti-infectieuse sont basées sur le transfert adoptif de cellules (particulièrement les LT (26) et CTL (29)) et sur l'apport de molécules comme les cytokines (22) ou les agonistes de PRR (25) permettant de manipuler et d'orienter la réponse immunitaire afin d'obtenir des effets anti-infectieux spécifiques à l'agent pathogène rencontré.

Récemment, des stratégies d'immunothérapie anti-infectieuse ciblant les LT non conventionnels, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, sont étudiées. Les expériences sur les MAIT décrites dans les différentes parties de cette thèse permettent d'envisager leur manipulation en immunothérapie antibactérienne et antivirale de par leur activité cytotoxique, et leur capacité d'activation des cellules

immunitaires innées et adaptatives et de recrutement des LT conventionnels (103)(106).

Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucune expérimentation chez l'homme n'a montré de corrélation entre un dysfonctionnement de l'activité des MAIT ou une diminution de leur fréquence et l'apparition de signes cliniques associés à la prévention ou à l'aggravation d'une infection. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de le démontrer et de décrire les fonctions spécifiques anti-infectieuses des MAIT par rapport à celles des LT conventionnels.

Une meilleure compréhension de leur activation et de leurs fonctions effectrices, dans des contextes infectieux, permettra de les cibler et de développer potentiellement des vaccins systémiques ou muqueux les activant spécifiquement. Nos résultats suggèrent que l'IFN α incorporé dans la formulation de vaccins pourrait jouer le rôle d'inducteur des fonctions effectrices des MAIT.

Ces dix dernières années, les essais précliniques et cliniques réalisés en immunothérapie anti-infectieuse concernent majoritairement les infections à Mtb et au VIH. Ils montrent des résultats prometteurs, qui encouragent à poursuivre les recherches afin de se projeter vers une prise en charge concrète des maladies infectieuses par immunothérapie, et de suivre les progrès obtenus en oncologie (approbation par la FDA en 2017 et 2018 de molécules LT-CAR pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens).

Bibliographie

1. Godfrey, D. I., A. P. Uldrich, J. McCluskey, J. Rossjohn, and D. B. Moody. 2015. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.* 16: 1114–1123.
2. Fisher, J., and J. Anderson. 2018. Engineering approaches in human gamma Delta T cells for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 9: 1–10.
3. Kumar, A., N. Suryadevara, T. M. Hill, J. S. Bezbradica, L. V. Van Kaer, and S. Joyce. 2017. Natural killer T cells: An ecological evolutionary developmental biology perspective. *Front. Immunol.* 8: 1–19.
4. Trottein, F., and C. Paget. 2018. Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Lung Infections. *Front. Immunol.* 9: 1–17.
5. Gold, M. C., and D. M. Lewinsohn. 2013. Co-dependents: MR1-restricted MAIT cells and their antimicrobial function. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 14–19.
6. Manohar, A., J. Ahuja, and J. K. Crane. 2015. Immunotherapy for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. *Immunol. Invest.* 44: 731–737.
7. Kak, V., V. Sundareshan, J. Modi, and N. M. Khardori. 2012. Immunotherapies in Infectious Diseases. *Med. Clin. North Am.* 96: 455–474.
8. Hey, A. 2015. History and Practice: Antibodies in Infectious Diseases. *Microbiol. Spectr.* 3: 1–15.
9. Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: Back to the pre-antibiotic and passive prophylaxis era? *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 306–310.
10. Hemming, V. A. L. G. 2001. Use of Intravenous Immunoglobulins for Prophylaxis or Treatment of Infectious Diseases. *Society* 8: 859–863.
11. Rodriguez, W. J., W. C. Gruber, J. R. Groothuis, E. A. F. Simoes, A. J. Rosas, M. Lepow, V. Hemming, and the RSV-IGIV Study Group. 1997. Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Treatment of RSV Lower Respiratory Tract Infection in Previously Healthy Children. *Pediatrics* 100: 937–942.
12. Frogel, M., C. Nerwen, M. Boron, A. Cohen, P. Vanveldhuisen, M. Harrington, and J. Groothuis. 2008. Improved outcomes with home-based administration of palivizumab: Results from the 2000-2004 palivizumab outcomes registry. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27: 870–873.
13. Israel Lowy, Deborah C. Molrine, Brett A. Leav, Barbra M. Blair, Roger Baxter, Dale N. Gerding, Geoffrey Nichol, William D. Thomas, Jr., Mark Leney, Susan Sloan, Catherine A. Hay, and Donna M. Ambrosino. 2011. Treatment with Monoclonal Antibodies against Clostridium difficile Toxins. *New England Journal.* 1757–1765.
14. Qiu, X., G. Wong, J. Audet, A. Bello, L. Fernando, J. B. Alimonti, H. Fausther-Bovendo, H. Wei, J. Aviles, E. Hiatt, A. Johnson, J. Morton, K. Swope, O. Bohorov, N. Bohorova, C. Goodman, D. Kim, M. H. Pauly, J. Velasco, J. Pettitt, G. G. Olinger, K. Whaley, B. Xu, J. E. Strong, L. Zeitlin, and G. P. Kobinger. 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* 514: 47–53.
15. Walker, L. M., and D. R. Burton. 2018. Passive immunotherapy of viral infections: “super-antibodies” enter the fray. *Nat. Rev. Immunol.* 18: 297–308.
16. Ekiert, D. C., A. K. Kashyap, J. Steel, A. Rubrum, G. Bhabha, R. Khayat, J. H. Lee, M. A. Dillon, R. E. O’Neil, A. M. Faynboym, M. Horowitz, L. Horowitz, A. B. Ward, P. Palese, R. Webby, R. A. Lerner, R. R. Bhatt, and I. A. Wilson. 2012. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 489: 526–532.
17. Liu, Z. J., J. Bai, F. L. Liu, X. Y. Zhang, and J. Z. Wang. 2017. Focus on the therapeutic efficacy of 3BNC117 against HIV-1: In vitro studies, in vivo studies, clinical trials and challenges. *Int. Immunopharmacol.* 52: 44–50.
18. Schoofs, T., F. Klein, M. Braunschweig, E. F. Kreider, A. Feldmann, L. Nogueira, T.

- Oliveira, J. C. C. Lorenzi, E. H. Parrish, G. H. Learn, A. P. West, P. J. Bjorkman, S. J. Schlesinger, M. S. Seaman, J. Czartoski, M. J. McElrath, N. Pfeifer, B. H. Hahn, M. Caskey, and M. C. Nussenzweig. 2016. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science (80-.)*. 352: 997–1001.
19. Nishimura, Y., R. Gautam, T. W. Chun, R. Sadjadpour, K. E. Foulds, M. Shingai, F. Klein, A. Gazumyan, J. Golijanin, M. Donaldson, O. K. Donau, R. J. Plishka, A. Buckler-White, M. S. Seaman, J. D. Lifson, R. A. Koup, A. S. Fauci, M. C. Nussenzweig, and M. A. Martin. 2017. Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature* 543: 559–563.
20. Loret, E. P., A. Darque, E. Jouve, E. A. Loret, C. Nicolino-Brunet, S. Morange, E. Castanier, J. Casanova, C. Caloustian, C. Bornet, J. Coussirou, J. Boussetta, V. Couallier, O. Blin, B. Dussol, and I. Ravaux. 2016. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cART interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology* 13: 1–11.
21. Hengel, H., and K. N. Masihi. 2003. Combinatorial immunotherapies for infectious diseases. *Int. Immunopharmacol.* 3: 1159–1167.
22. Jarvis, J. N., G. Meintjes, K. Rebe, G. N. Williams, T. Bicanic, A. Williams, C. Schutz, L. G. Bekker, R. Wood, and T. S. Harrison. 2012. Adjunctive interferon- γ immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: A randomized controlled trial. *Aids* 26: 1105–1113.
23. Posch, W., M. Steger, D. Wilflingseder, and C. Lass-Flörl. 2017. Promising immunotherapy against fungal diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17: 861–870.
24. Shindo, Y., J. S. McDonough, K. C. Chang, M. Ramachandra, P. G. Sasikumar, and R. S. Hotchkiss. 2017. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.* 208: 33–39.
25. Boni, C., A. Vecchi, M. Rossi, D. Laccabue, T. Giuberti, A. Alfieri, P. Lampertico, G. Grossi, F. Facchetti, M. R. Brunetto, B. Coco, D. Cavallone, A. Mangia, R. Santoro, V. Piazzolla, A. Lau, A. Gaggar, G. M. Subramanian, and C. Ferrari. 2018. TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus-Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos(T)ide Analogues. *Gastroenterology* 154: 1764–1777.e7.
26. Parida, S. K., T. Poiret, L. Zhenjiang, Q. Meng, J. Heyckendorf, C. Lange, A. S. Ambati, M. V. Rao, D. Valentini, G. Ferrara, E. Rangelova, E. Dodoo, A. Zumla, and M. Maeurer. 2015. T-Cell Therapy: Options for Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* 61: S217–S224.
27. Stuehler, C., J. Nowakowska, C. Bernardini, M. S. Topp, M. Battegay, J. Passweg, and N. Khanna. 2015. Multispecific aspergillus T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections. *J. Infect. Dis.* 211: 1251–1261.
28. Aïssi-rothé, L., Y. Wang, and V. Decot. 2012. Immunothérapie adoptive antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. 16.
29. Bao, L., M. Cowan, K. Dunham, and B. Horn. 2012. Lymphocytes for Stem Cell Transplant Patients with Refractory. *J. Immunother.* 35: 293–298.
30. Kumaresan, P. R., T. A. da Silva, and D. P. Kontoyiannis. 2018. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* 8: 1–14.
31. November 2017. FDA Approves Second CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* 8: 5–6.
32. Yoshihara, S., J. Ikemoto, and Y. Fujimori. 2016. Update on granulocyte transfusions: Accumulation of promising data, but still lack of decisive evidence. *Curr. Opin. Hematol.* 23: 55–60.
33. Park, S. J., M. A. Hughes, M. Burdick, R. M. Strieter, and B. Mehrad. 2009. Early NK

- Cell-Derived IFN- γ Is Essential to Host Defense in Neutropenic Invasive Aspergillosis. *J. Immunol.* 182: 4306–4312.
34. Jiang, W. Z., Y. Fan, X. Liu, Y. L. Zhang, J. J. Wen, W. L. Hao, and M. Qian. 2008. Therapeutic potential of dendritic cell-based immunization against HBV in transgenic mice. *Antiviral Res.* 77: 50–55.
35. Chaudhri, G., V. Panchanathan, H. Bluethmann, and G. Karupiah. 2006. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *J Virol* 80: 6339–6344.
36. 2016. WHO treatment guidelines for drug- resistant tuberculosis 2016. *World Heal. Organ.* .
37. Burden, Treatment, and T. Outcomes. 2017. TUBERCULOSIS (MDR-TB). 8–9.
38. Scriba, T. J., A. K. Coussens, and H. A. Fletcher. 2017. Human Immunology of Tuberculosis. *Tuberc. Tuber. Bacillus, Second Ed.* 213–237.
39. Ernst, J. D. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 581–591.
40. Chai, Q., Y. Zhang, and C. H. Liu. 2018. Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8: 1–15.
41. Xu, G., J. Wang, G. F. Gao, and C. H. Liu. 2014. Insights into battles between Mycobacterium tuberculosis and macrophages. *Protein Cell* 5: 728–736.
42. Chen, C. Y., S. Yao, D. Huang, H. Wei, H. Sicard, G. Zeng, H. Jomaa, M. H. Larsen, W. R. Jacobs, R. Wang, N. Letvin, Y. Shen, L. Qiu, L. Shen, and Z. W. Chen. 2013. Phosphoantigen/IL2 Expansion and Differentiation of V γ 2V δ 2 T Cells Increase Resistance to Tuberculosis in Nonhuman Primates. *PLoS Pathog.* 9.
43. Kwon, Y. S., Y. N. Cho, M. J. Kim, H. M. Jin, H. J. Jung, J. H. Kang, K. J. Park, T. J. Kim, H. J. Kee, N. Kim, S. J. Kee, and Y. W. Park. 2015. Mucosal-associated invariant T cells are numerically and functionally deficient in patients with mycobacterial infection and reflect disease activity. *Tuberculosis* 95: 267–274.
44. Gold, M. C., S. Cerri, S. Smyk-Pearson, M. E. Cansler, T. M. Vogt, J. Delepine, E. Winata, G. M. Swarbrick, W. J. Chua, Y. Y. L. Yu, O. Lantz, M. S. Cook, M. D. Null, D. B. Jacoby, M. J. Harriff, D. A. Lewinsohn, T. H. Hansen, and D. M. Lewinsohn. 2010. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* 8: 1–14.
45. Yang, Q., Q. Xu, Q. Chen, J. Li, M. Zhang, Y. Cai, H. Liu, Y. Zhou, G. Deng, Q. Deng, B. Zhou, H. Kornfeld, and X. Chen. 2015. Discriminating active tuberculosis from latent tuberculosis infection by flow cytometric measurement of CD161-expressing T cells. *Sci. Rep.* 5: 1–8.
46. Harriff, M. J., M. E. Cansler, K. G. Toren, E. T. Canfield, S. Kwak, M. C. Gold, and D. M. Lewinsohn. 2014. Human lung epithelial cells contain Mycobacterium tuberculosis in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8+ T Cells. *PLoS One* 9: 1–12.
47. Shey, M. S., A. Balfour, K. A. Wilkinson, and G. Meintjes. 2018. Contribution of APCs to mucosal-associated invariant T cell activation in infectious disease and cancer. *Innate Immun.* 24: 192–202.
48. Jiang, J., X. Wang, H. An, B. Yang, Z. Cao, Y. Liu, J. Su, F. Zhai, R. Wang, G. Zhang, and X. Cheng. 2014. Mucosal-associated invariant T-cell function is modulated by programmed death-1 signaling in patients with active tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190: 329–339.
49. Paquin-Proulx, D., P. R. Costa, C. G. Terrassani Silveira, M. P. Marmorato, N. B. Cerqueira, M. S. Sutton, S. L. O'Connor, K. I. Carvalho, D. F. Nixon, and E. G. Kallas. 2018. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Is Associated With a Higher Frequency of Mucosal-Associated Invariant T and Invariant Natural Killer T Cells. *Front.*

Immunol. 9.

50. Ramakrishnan, L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 352–366.
51. Ottenhoff, T. H. M., and S. H. E. Kaufmann. 2012. Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.* 8.
52. Moliva, J. I., J. Turner, and J. B. Torrelles. 2017. Immune responses to bacillus Calmette-Guérin vaccination: Why do they fail to protect against mycobacterium tuberculosis? *Front. Immunol.* 8.
53. Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom, and C. V. Harding. 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: 910–918.
54. Demangel, C., P. Bertolino, and W. J. Britton. 2002. Autocrine IL 10 impairs dendritic cell (DC) derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL 12 production. *Eur. J. Immunol.* 32: 994–1002.
55. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8: 369–377.
56. Voss, G., D. Casimiro, O. Neyrolles, A. Williams, S. H. E. Kaufmann, H. McShane, M. Hatherill, and H. A. Fletcher. 2018. Progress and challenges in TB vaccine development. *F1000Research* 7: 199.
57. Fletcher, H. A., and L. Schrager. 2016. TB vaccine development and the End TB Strategy: Importance and current status. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110: 212–218.
58. Nell, A. S., E. D’Lom, P. Bouic, M. Sabaté, R. Bosser, J. Picas, M. Amat, G. Churchyard, and P. J. Cardona. 2014. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: Randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One* 9: 1–10.
59. Kaufmann, S. H. E., C. Lange, M. Rao, K. N. Balaji, M. Lotze, M. Schito, A. I. Zumla, and M. Maeurer. 2014. Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies—a state of the art review. *Lancet Respir. Med.* 2: 301–320.
60. Sette, A. 2010. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. *Immunity* 33: 530–541.
61. Harriff, M. J., L. M. Wolfe, G. Swarbrick, M. Null, M. E. Cansler, E. T. Canfield, T. Vogt, K. G. Toren, W. Li, M. Jackson, D. A. Lewinsohn, K. M. Dobos, and D. M. Lewinsohn. 2017. HLA-E Presents Glycopeptides from the *Mycobacterium tuberculosis* Protein MPT32 to Human CD8+T cells. *Sci. Rep.* 7: 1–11.
62. Ko, A., S. R. Wui, J. I. Ryu, Y. J. Lee, D. T. T. Hien, I. Rhee, S. J. Shin, S. A. Park, K. S. Kim, Y. J. Cho, and N. G. Lee. 2018. Potentiation of Th1-type immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in mice by cationic liposomes combined with de-O-acylated lipooligosaccharide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 136–144.
63. Santosuosso, M., X. Zhang, S. McCormick, J. Wang, M. Hitt, and Z. Xing. 2005. Mechanisms of Mucosal and Parenteral Tuberculosis Vaccinations: Adenoviral-Based Mucosal Immunization Preferentially Elicits Sustained Accumulation of Immune Protective CD4 and CD8 T Cells within the Airway Lumen. *J. Immunol.* 174: 7986–7994.
64. Sharpe, S., A. White, C. Sarfas, L. Sibley, F. Gleeson, A. McIntyre, R. Basaraba, S. Clark, G. Hall, E. Rayner, A. Williams, P. D. Marsh, and M. Dennis. 2016. Alternative BCG delivery strategies improve protection against *Mycobacterium tuberculosis* in non-human primates: Protection associated with mycobacterial antigen-specific CD4 effector memory T-cell populations. *Tuberculosis* 101: 174–190.

65. Perdomo, C., U. Zedler, A. A. Kühl, L. Lozza, P. Saikali, L. E. Sander, A. Vogelzang, S. H. E. Kaufmann, and A. Kupz. 2016. Mucosal BCG vaccination induces protective lung-resident memory T cell populations against tuberculosis. *MBio* 7: 1–11.
66. McShane, H., and A. Williams. 2014. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis* 94: 105–110.
67. Olivares, N., Y. Rodriguez, Z. L. Zatarain-Barron, B. Marquina, D. Mata-Espinosa, J. Barrios-Payán, C. Parada, B. Moguel, C. Espitia-Pinzón, I. Estrada, and R. Hernandez-Pando. 2017. A significant therapeutic effect of immunoglobulins administered alone, or in combination with conventional chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains. *Pathog. Dis.* 75: 1–8.
68. Johnson, B. J., L.-G. Bekker, R. Rickman, S. Brown, M. Lesser, S. Ress, P. Willcox, L. Steyn, and G. Kaplan. 1997. rhIL-2 adjunctive therapy in multidrug resistant tuberculosis: A comparison of two treatment regimens and placebo. *Tuber. Lung Dis.* 78: 195–203.
69. Johnson, J. L., E. Ssekasanvu, A. Okwera, H. Mayanja, C. S. Hirsch, J. G. Nakibali, D. D. Jankus, K. D. Eisenach, W. H. Boom, J. J. Ellner, and R. D. Mugerwa. 2003. Randomized trial of adjunctive interleukin-2 in adults with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 185–191.
70. Zhang, Y., J. Liu, Y. Wang, Q. Xian, L. Shao, Z. Yang, and X. Wang. 2012. Immunotherapy using IL-2 and GM-CSF is a potential treatment for multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Sci. China Life Sci.* 55: 800–806.
71. Shen, H., R. Min, Q. Tan, W. Xie, H. Wang, H. Pan, L. Zhang, H. Xu, X. Zhang, and J. Dai. 2015. The beneficial effects of adjunctive recombinant human interleukin-2 for multidrug resistant tuberculosis. *Arch. Med. Sci.* 11: 584–590.
72. Tan, Q., R. Min, G. Dai, Y. Wang, L. Nan, Z. Yang, J. Xia, S. Pan, H. Mao, W. Xie, and H. Wang. 2017. Clinical and Immunological Effects of rhIL-2 Therapy in Eastern Chinese Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis. *Sci. Rep.* 7: 17854.
73. Condos, R., W. N. Rom, and N. W. Schluger. 1997. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 349: 1513–1515.
74. Koh, W. J., O. J. Kwon, G. Y. Suh, M. P. Chung, H. Kim, N. Y. Lee, T. S. Kim, and K. S. Lee. 2004. Six-month therapy with aerosolized interferon- γ for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J. Korean Med. Sci.* 19: 167–171.
75. Greinert, U., M. Ernst, M. Schlaak, and P. Entzian. 2001. Interleukin-12 as successful adjuvant in tuberculosis treatment. *Eur. Respir. J.* 17: 1049–1051.
76. Ma, Y., H. D. Chen, Y. Wang, Q. Wang, Y. Li, Y. Zhao, and X. L. Zhang. 2011. Interleukin 24 as a novel potential cytokine immunotherapy for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect.* 13: 1099–1110.
77. Donovan, M. L., T. E. Schultz, T. J. Duke, and A. Blumenthal. 2017. Type I interferons in the pathogenesis of tuberculosis: Molecular drivers and immunological consequences. *Front. Immunol.* 8.
78. Travar, M., M. Petkovic, and A. Verhaz. 2016. Type I, II, and III Interferons: Regulating Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 64: 19–31.
79. Rivas-Santiago, C. E., and G. G. Guerrero. 2017. IFN- α Boosting of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin-Vaccine Promoted Th1 Type Cellular Response and Protection against M. tuberculosis Infection. *Biomed Res. Int.* 2017.
80. Palmero, D., K. Eiguchi, P. Rendo, L. Castro Zorrilla, E. Abbate, and L. J. Gonzalez Montaner. 1999. Phase II trial of recombinant interferon-alpha2b in patients with advanced intractable multidrug-resistant pulmonary tuberculosis: long-term follow-up. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 214–218.
81. Roy, E., J. Brennan, S. Jolles, and D. B. Lowrie. 2008. Beneficial effect of anti-

- interleukin-4 antibody when administered in a murine model of tuberculosis infection. *Tuberculosis* 88: 197–202.
82. Hernández-Pando, R., H. Orozco-Esteves, H. A. Maldonado, D. Aguilar-León, M. M. Vilchis-Landeros, D. A. Mata-Espinosa, V. Mendoza, and F. López-Casillas. 2006. A combination of a transforming growth factor- β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 144: 264–272.
83. Shen, L., H. Shi, Y. Gao, Q. Ou, Q. Liu, Y. Liu, J. Wu, W. Zhang, L. Fan, and L. Shao. 2016. The characteristic profiles of PD-1 and PD-L1 expressions and dynamic changes during treatment in active tuberculosis. *Tuberculosis* 101: 146–150.
84. Joshi, L., L. K. Chelluri, and S. Gaddam. 2015. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in MDR/XDR Tuberculosis: A Concise Review. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 63: 427–433.
85. Khan, A., L. Mann, R. Papanna, M. A. Lyu, C. R. Singh, S. Olson, N. T. Eissa, J. Cirillo, G. Das, R. L. Hunter, and C. Jagannath. 2017. Mesenchymal stem cells internalize Mycobacterium tuberculosis through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Sci. Rep.* 7: 1–15.
86. Francisco-Cruz, A., D. Mata-Espinosa, O. Ramos-Espinosa, B. Marquina-Castillo, S. Estrada-Parra, Z. Xing, and R. Hernández-Pando. 2016. Efficacy of gene-therapy based on adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug-resistant experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 100: 5–14.
87. Ramos-Espinosa, O., S. Hernández-Bazán, A. Francisco-Cruz, D. Mata-Espinosa, J. Barrios-Payán, B. Marquina-Castillo, F. López-Casillas, M. Carretero, M. del Río, and R. Hernández-Pando. 2016. Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathog. Dis.* 74: 1–8.
88. Rivas-Santiago, B., C. E. Rivas Santiago, J. E. Castañeda-Delgado, J. C. León-Contreras, R. E. W. Hancock, and R. Hernandez-Pando. 2013. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41: 143–148.
89. Silva, J. P., C. Gonçalves, C. Costa, J. Sousa, R. Silva-Gomes, A. G. Castro, J. Pedrosa, R. Appelberg, and F. M. Gama. 2016. Delivery of LLKKK18 loaded into self-assembling hyaluronic acid nanogel for tuberculosis treatment. *J. Control. Release* 235: 112–124.
90. Singhal, A., L. Jie, P. Kumar, G. S. Hong, M. K. S. Leow, B. Paleja, L. Tsenova, N. Kurepina, J. Chen, F. Zolezzi, B. Kreiswirth, M. Poidinger, C. Chee, G. Kaplan, Y. T. Wang, and G. De Libero. 2014. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci. Transl. Med.* 6.
91. Singh, P., and S. Subbian. 2018. Harnessing the mTOR Pathway for Tuberculosis Treatment. *Front. Microbiol.* 9: 1–11.
92. Tukvadze, N., E. Sanikidze, M. Kipiani, G. Hebbbar, K. A. Easley, N. Shenvi, R. R. Kempker, J. K. Frediani, V. Mirskhulava, J. A. Alvarez, N. Lomtadze, L. Vashakidze, L. Hao, C. Del Rio, V. Tangpricha, H. M. Blumberg, T. R. Ziegler, C. Del Rio, V. Tangpricha, H. M. Blumberg, and T. R. Ziegler. 2015. High-dose vitamin D 3 in adults with pulmonary tuberculosis: A double-blind randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutrition* 102: 1059–1069.
93. Napier, R. J., W. Rafi, M. Cheruvu, K. R. Powell, M. A. Zaunbrecher, W. Bornmann, P. Salgame, T. M. Shinnick, and D. Kalman. 2011. Imatinib-Sensitive tyrosine kinases regulate mycobacterial pathogenesis and represent therapeutic targets against tuberculosis. *Cell Host Microbe* 10: 475–485.
94. Vilaplana, C., E. Marzo, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia, and P. J. Cardona. 2013.

Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 208: 199–202.

95. Gupta, S., L. Cheung, S. Pokkali, K. Winglee, H. Guo, J. R. Murphy, and W. R. Bishai. 2017. Suppressor Cell-Depleting Immunotherapy with Denileukin Difitox is an Effective Host-Directed Therapy for Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 215: 1883–1887.

96. Poerio, N., F. Bugli, F. Taus, M. B. Santucci, C. Rodolfo, F. Cecconi, R. Torelli, F. Varone, R. Inchingolo, F. Majo, V. Lucidi, S. Mariotti, R. Nisini, M. Sanguinetti, and M. Fraziano. 2017. Liposomes loaded with bioactive lipids enhance antibacterial innate immunity irrespective of drug resistance. *Sci. Rep.* 7: 1–14.

97. Rudak, P. T., J. Choi, and S. M. M. Haeryfar. 2018. MAIT cell-mediated cytotoxicity: Roles in host defense and therapeutic potentials in infectious diseases and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 1–14.

98. Ussher, J. E., M. Bilton, E. Attwod, J. Shadwell, R. Richardson, C. de Lara, E. Mettke, A. Kurioka, T. H. Hansen, P. Klenerman, and C. B. Willberg. 2014. CD161⁺⁺CD8⁺T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur. J. Immunol.* 44: 195–203.

99. Tang, X.-Z., J. Jo, A. T. Tan, E. Sandalova, A. Chia, K. C. Tan, K. H. Lee, A. J. Gehring, G. De Libero, and A. Bertoletti. 2013. IL-7 Licenses Activation of Human Liver Intrasinusoidal Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Immunol.* 190: 3142–3152.

100. Leeansyah, E., J. Svärd, J. Dias, M. Buggert, J. Nyström, M. F. Quigley, M. Moll, A. Sönnberg, P. Nowak, and J. K. Sandberg. 2015. Arming of MAIT Cell Cytolytic Antimicrobial Activity Is Induced by IL-7 and Defective in HIV-1 Infection. *PLoS Pathog.* 11: 1–23.

101. Sattler, A., C. Dang-Heine, P. Reinke, and N. Babel. 2015. IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *Eur. J. Immunol.* 45: 2286–2298.

102. Slichter, C. K., A. McDavid, H. W. Miller, G. Finak, B. J. Seymour, J. P. McNevin, G. Diaz, J. L. Czartoski, M. J. McElrath, R. Gottardo, and M. Prlic. 2016. Distinct activation thresholds of human conventional and innate-like memory T cells. *JCI Insight* 1: 1–16.

103. Meierovics, A. I., and S. C. Cowley. 2016. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. *J. Exp. Med.* 213: 2793–2809.

104. Chua, W. J., S. M. Truscott, C. S. Eickhoff, A. Blazevic, D. F. Hoft, and T. H. Hansen. 2012. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect. Immun.* 80: 3256–3267.

105. Meierovics, A., W.-J. C. Yankelevich, and S. C. Cowley. 2013. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: E3119–E3128.

106. Salou, M., K. Franciszkiewicz, and O. Lantz. 2017. MAIT cells in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 48: 7–14.

107. Greene, J. M., P. Dash, S. Roy, C. McMurtrey, W. Awad, J. S. Reed, K. B. Hammond, S. Abdulhaqq, H. L. Wu, B. J. Burwitz, B. F. Roth, D. W. Morrow, J. C. Ford, G. Xu, J. Y. Bae, H. Crank, A. W. Legasse, T. H. Dang, H. Y. Greenaway, M. Kurniawan, M. C. Gold, M. J. Harriff, D. A. Lewinsohn, B. S. Park, M. K. Axthelm, J. J. Stanton, S. G. Hansen, L. J. Picker, V. Venturi, W. Hildebrand, P. G. Thomas, D. M. Lewinsohn, E. J. Adams, and J. B. Sacha. 2017. MR1-restricted mucosal-associated invariant T (MAIT) cells respond to mycobacterial vaccination and infection in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 10: 802–813.

108. Boxx, G. M., and G. Cheng. 2016. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe* 19: 760–769.

109. Huber, J. P., and J. David Farrar. 2011. Regulation of effector and memory T-cell

functions by type I interferon. *Immunology* 132: 466–474.

110. Hervas-Stubbs, S., J. I. Riezu-Boj, I. Gonzalez, U. Mancheño, J. Dubrot, A. Azpilicueta, I. Gabari, A. Palazon, A. Aranguren, J. Ruiz, J. Prieto, E. Larrea, and I. Melero. 2010. Effects of IFN- α as a signal-3 cytokine on human naïve and antigen-experienced CD8⁺T cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 3389–3402.

111. Bahl, K., S.-K. Kim, C. Calcagno, D. Gherzi, R. Puzone, F. Celada, L. K. Selin, and R. M. Welsh. 2006. IFN-Induced Attrition of CD8 T Cells in the Presence or Absence of Cognate Antigen during the Early Stages of Viral Infections. *J. Immunol.* 176: 4284–4295.

112. Gil, M. P., M. J. Y. Ploquin, W. T. Watford, S. H. Lee, K. Kim, X. Wang, Y. Kanno, J. J. O’Shea, and C. A. Biron. 2012. Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: Changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood* 120: 3718–3728.

113. Chowdhury, F. Z., H. J. Ramos, L. S. Davis, J. Forman, J. D. Farrar, and W. Dc. 2011. IL-12 selectively programs effector pathways that are stably expressed in human CD8⁺ effector memory T cells in vivo. *J. Immunol.* 187: 3890–3900.

114. Kolumam, G. A., S. Thomas, L. J. Thompson, J. Sprent, and K. Murali-Krishna. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J. Exp. Med.* 202: 637–650.

115. Kurioka, A., J. E. Ussher, C. Cosgrove, C. Clough, J. R. Fergusson, K. Smith, Y. H. Kang, L. J. Walker, T. H. Hansen, C. B. Willberg, and P. Klenerman. 2015. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol.* 8: 429–440.

116. Kallal, L. E., and C. A. Biron. 2013. Changing partners at the dance. *Jak-Stat* 2: e23504.

117. Nguyen, K. B. 2002. Critical Role for STAT4 Activation by Type 1 Interferons in the Interferon-gamma Response to Viral Infection. *Science* (80-.). 297: 2063–2066.

118. Le Bourhis, L., Y. K. Mburu, and O. Lantz. 2013. MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: Development and functions. *Curr. Opin. Immunol.* 25: 174–180.

Prospects for the use of MAIT cells in immunotherapy of infectious diseases

ABSTRACT

The treatment of an infection generally consists of antimicrobial chemotherapy to kill the invading organism. In the absence of development of novel antimicrobial, and the increasing prevalence of antimicrobial resistance, modulation of a patient's immune system using immunotherapies has become necessary. Immunotherapy for infectious diseases is a promising approach which is mainly explored for better control of tuberculosis, and involves immunomodulating agents such as cytokines. We investigated the ability of interferon alfa (IFN α) to promote mucosal-associated invariant T cells (MAIT) stimulation. These unconventional CD8⁺ T cells express a semi-invariant T cell receptor (TCR) which recognize conserved antigens derived from bacterial vitamin B2. However, TCR signaling alone is insufficient for MAIT cells proliferation and for initiating optimal responses; co-stimulation with cytokines is required. We found that costimulation with IFN α promotes cytotoxic responses by MAIT cells, and induces increased release of cytokines including IFN γ which has significant roles in the antimicrobial activity. Thus, inducing IFN α responses will potentially allow the manipulation of MAIT cells for prophylactic and therapeutic treatment of infectious diseases.

AUTEUR : PAVLOVIC Marion

TITRE : Perspectives d'utilisation des lymphocytes MAIT en immunothérapie anti-infectieuse

DIRECTEUR DE THESE : Dr. TREINER Emmanuel

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse,
21 septembre 2018

RESUME

Devant l'appauvrissement de l'offre thérapeutique anti-infectieuse, l'avenir de la prise en charge des infections repose, en partie, sur l'immunothérapie. Elle correspond à la modulation du système immunitaire par administration d'effecteurs immunitaires, qui stimulent et renforcent les défenses de l'organisme, pour lutter contre les infections. Elle est principalement expérimentée dans le cadre de la tuberculose, et peut reposer sur l'utilisation de cytokines. Nous avons étudié la capacité de l'interféron alpha (IFN α), cytokine immunomodulatrice, à potentialiser la stimulation des lymphocytes T invariants associés aux muqueuses (MAIT). En effet, ces lymphocytes CD8⁺ non conventionnels, dont le TCR semi-invariant reconnaît des résidus bactériens conservés, nécessitent une costimulation par des cytokines pour induire une réponse optimale. Après costimulation des MAIT par l'IFN α , nous avons observé une augmentation de leur activité cytotoxique, et de leur production de cytokines dont l'IFN γ , à activité anti-infectieuse. Ainsi, il pourrait être bénéfique d'induire des réponses à l'IFN α dans la perspective de manipuler les MAIT en prophylaxie ou thérapie anti-infectieuses.

MOTS-CLES : Immunothérapie, Infections, Lymphocytes MAIT, Tuberculose

DISCIPLINE administrative : Pharmacie industrie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Université Paul Sabatier Toulouse III
Faculté des sciences pharmaceutiques
35, chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 9

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan
CHU Purpan – BP 3028
31024 Toulouse Cedex 3