Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Impact de l'asthme allergique et de l'infection par Trypanosoma brucei sur le contrôle de l'infection par Brucella melitensis chez la souris

MacHelart, Arnaud

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

UNIVERSITÉ DE NAMUR

RBM
Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes

Impact de l'asthme allergique et de l'infection par *Trypanosoma brucei* sur le contrôle de l'infection par *Brucella melitensis* chez la souris

Machelart Arnaud

Thèse présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Sciences

Jury : Pr Jean-Paul Coutelier (Université catholique de Louvain, Belgique)
Pr Laurent Gillet (Université de Liège, Belgique)
Pr Jacques Godfroid (University of Tromsoe, Norway)
Pr Guy Cornelis (Président, Université de Namur, Belgique)
Pr Jean-Jacques Letesson (Promoteur, Université de Namur, Belgique)
Pr Eric Muraille (Promoteur, Université Libre de Bruxelles, Belgique)

2016

« Les individus vivants, milliards d'hommes de mouches
ou de pissenlits, ne sont que des véhicules.
La vie se fait porter par eux à travers
Le temps et l'espace. »
René Barjavel

Impact de l'asthme allergique et de l'infection par *Trypanosoma brucei* sur le contrôle de l'infection par *Brucella melitensis* chez la souris

Arnaud Machelart

Résumé

Les pathologies immunitaires, infectieuses ou non, peuvent influencer de manière indirecte le statut immunologique de l'hôte et ses capacités à surmonter une nouvelle infection. Dans le cadre de cette thèse nous avons développé différents modèles de pathologies croisées pour déstabiliser la relation hôte/pathogène dans un modèle murin d'infection intra-nasale par la bactérie *Brucella melitensis*.

Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives responsables de la brucellose, l'une des plus importantes zoonoses mondiales. Bien que généralement non mortelle, la brucellose peut entrainer des complications graves et variées telles que des troubles articulaires, neurologiques, cardiaques et respiratoires.

L'asthme allergique est une pathologie inflammatoire chronique qui touche les voies respiratoires de nombreuses personnes. Nous avons observé que l'asthme, induit par administration répétée d'extraits de l'acarien *Dermathophagoides farinae* ou de la moisissure *Alternaria alernata,* augmentait considérablement la charge et la persistance de *Brucella* dans les poumons. Cette augmentation de la susceptibilité est dépendante des lymphocytes T $CD4^+$, de la voie de signalisation IL-4/STAT6 et de l'IL-10. Les sources principales d'IL-10 dans les poumons des souris asthmatiques infectées sont les lymphocytes T $CD4^+$.

L'infection par *Trypanosoma brucei* de souris préalablement infectées par *Brucella* induit une diminution drastique de la charge bactérienne dans la rate, le réservoir principal de l'infection chronique. L'élimination de la bactérie requiert la voie de signalisation IL-12/IFNγ et la présence de lymphocytes T $CD4^+$. La co-infection avec *Trypanosoma cruzi*, un autre protozoaire, entraine aussi une chute drastique de la charge bactérienne dans la rate. Cela suggère que le phénomène n'est pas lié à une réaction antigénique croisée.

Nous avons également analysé l'impact de l'infection par *Brucella* sur les populations de macrophages de la zone marginale dans la rate. L'infection entraine une diminution durable de ces populations associée à une réduction de la capacité de la rate à capturer des antigènes ou des particules fluorescentes. Cette réduction pourrait affecter la capacité de la rate à contrôler des infections systémiques par d'autres agents pathogènes.

Globalement, ces résultats démontrent l'importance du statut immunologique de l'hôte sur sa capacité à contrôler l'infection par *Brucella*. L'asthme augmente de plus de 3 log le nombre de *Brucella* dans les poumons, alors que l'infection systémique par *Trypanosoma brucei* réduit d'autant la charge bactérienne dans la rate. L'infection par *Brucella* peut elle-même modifier la capacité de l'hôte à contrôler une autre infection bactérienne systémique.

Une meilleure compréhension des facteurs influençant la résistance ou la susceptibilité d'un individu lors d'une infection permettrait de mieux lutter contre l'agent pathogène et réduire son impact sociétal.

« Tout l'monde me regarde, tout l'monde attend quelque chose de moi
Mais c'est toujours l'même homme que j'aperçois dans le miroir
Oui, j'ai honte, donc j'ai des lunettes sur le nez
Mais qui peut prétendre avoir l'innocence d'un nouveau-né ?
J'ai prêché le vrai comme le faux, je m'en excuse
Ne m'en voulez pas, on a tous un côté schizo'
Gandhi Djuna, petit enfant du pays
Reste toi-même, n'oublie pas qu'la thune embellit
J'aimerais tout reprendre à zéro
Mais je n'suis pas un super-héro
Je n'veux pas jouer tous les rôles
Désormais, je retiendrai mes mots
Comment vous expliquer tous mes choix ?
Toutes les décisions que j'ai prises ?
Être à la hauteur de mes valeurs
Mais, trop souvent, j'les contredis
Désolé mais je ne suis qu'un Homme
Et j'ai l'impression qu'on l'oublie
J'aimerais qu'on oublie aussi mes erreurs
Personne n'est infaillible. »
Gandhi Djuna

« Le succès n'est pas la clé du bonheur. Le bonheur est la clé du succès. Si vous aimez ce que vous faites, vous réussirez. »
Albert Schweitzer

Remerciements

La thèse de doctorat, l'occasion rêvée de grandir, s'épanouir et devenir. De s'instruire et d'instruire. Quatre courtes années qui rendent l'homme un peu plus fou, fou de tout ! L'objectif, chercher ! Et avec de la chance, il pourra même trouver. Cela ne se résume pas aux quelques pages de résultats présentées dans ce manuscrit. Durant ces quatre dernières années, j'ai cherché la réponse à de nombreuses questions, personnelles et impersonnelles, pour préparer au mieux mon entrée dans le monde de l'humanité. Ces quelques lignes sont l'occasion de remercier les personnes qui m'ont aidé à répondre à ces questions. Celles qui m'ont soutenu au cours de ces belles années et qui ont, avec une implication plus ou moins grande, participé à la construction de la personne que je suis aujourd'hui.

« Aucun de nous en agissant seul, ne peut atteindre le succès. »
Nelson Mandela

Mes premiers remerciements vont à mes promoteurs de thèse. **Jean-Jacques**, **Eric**, merci ! Y a-t-il un meilleur moyen d'étudier la relation entre l'hôte et un agent pathogène qu'en étant encadré à la fois par un microbiologiste et un immunologiste ?! Jean-Jacques, merci pour vos conseils, votre recul et votre philosophie. Votre personnalité donne de la vie à la recherche. Eric, merci pour ta disponibilité et ta réflexion. Ta manière de « penser la recherche » est un atout pour avancer. Je suis content d'avoir travaillé pour et avec vous.

Je remercie aussi l'équipe immuno. Ensemble, la manière dont la souris contrôle l'infection par *Brucella* à de moins en moins de secrets pour nous. Un tout petit mot pour **Richard** qui déjà en bac 3 (il y à 7 ans) m'a donné goût à la thématique. Dans la chronologie, merci à **Marie-Alice** et **Delphine** pour votre encadrement pendant mon mémoire. Sans vous je n'aurais pas fait cette thèse de la même manière. Il est temps maintenant de consacrer un peu de temps à ceux qui m'ont rejoint pendant la thèse. J'ai pris beaucoup de plaisir à encadrer cinq étudiants pendant ces années et c'est à mon tour de vous remercier. J'ai appris beaucoup de choses grâce à vous. Les nombreuses heures passées sous les hottes ou entre les cages de souris étaient une partie de plaisir. Je souhaite à tout le monde de se lever pour aller travailler pour rire et sourire. **Aurore** L (Aurore 1), je n'aurai pas eu ta reconnaissance éternelle (en tout cas pas encore) mais ta bonne humeur et ta manière de relativiser m'ont inspiré pour la suite. Tu as réussi à montrer à ceux qui en doutaient que tu avais toutes les cartes pour réussir. **Georges**, ta motivation et ta réflexion sont tes forces. Tu étais là pour poser les bonnes questions et égayer ma curiosité. Bonne chance pour la thèse et n'oublie pas qui si on va plus vite tout seul, en groupe on va plus loin. **Aurore** D (Aurore 2), simplement merci. Merci pour ta bonne humeur et ton sourire, même dans les moments plus difficiles. J'ai beaucoup d'admiration pour la personne que tu es. Tu es la première à rendre service et avec le sourire en plus. Je suis content de t'avoir comme amie. Je te souhaite toute la joie que tu mérites pour la suite. Pense à toi ! **Manon**, ta personnalité est ta plus grande qualité. Ne change pas ! Ton rire et ta répartie font du bien dans un groupe. J'ai perdu une voisine pour gagner une amie.

Tes qualités te feront avancer vite et loin ! **Margaux**, j'ai eu malgré moi la chance de te connaître à l'intérieur et en dehors du laboratoire. Je vais attendre avant de te lancer des fleurs, mais tes qualités font et feront de toi une personne remarquable. Collègues la journée et amis certains soirs et matins, merci pour les bons moments. A tous, merci pour nos discussions, nos rires et mon bonheur ! S'il me reste un conseil à vous donner ou à vous redonner, c'est de vous amuser à chaque instant ! Merci **Abir**, grâce à toi j'ai compris que pour y arriver dans la vie il faut avoir envie. **Maxime**, merci pour ton aide et ton implication dans les manips. Je te souhaite la chance que tu mérites pour la suite.

« Tout le monde est un génie. Mais si vous jugez un poisson rouge sur ses capacités à grimper à un arbre, il passera sa vie à croire qu'il est stupide. »
Albert Einstein

Sans chronologie, j'aimerais remercier les gens partis trop tôt. Ceux qui ont quitté le labo trop vite, dont j'aurais aimé profiter un peu plus. **Anne-Michèle**, merci pour nos nombreux bons moments, nos longues discussions, dans ton bureau, à ta paillasse et dans le train. Tout le monde te l'a déjà dit, tu es une belle personne ! Je suis toujours très content d'avoir de tes nouvelles. Au plaisir de ragoter avec toi ! **Mira**, merci pour tes conseils et ton écoute. Je suis toujours très content de te recroiser pour discuter. **Mike**, tu fais partie des gens qui m'on fait comprendre que l'on pouvait travailler en s'amusant, et en mangeant de la soupe. Un exemple à suivre… **Matthieu**, je suis content de te croiser pour rigoler un peu. Tu verras, un jour Charleroi sera champion de Belgique et un belge gagnera encore le tour de France. **Thib**, grâce à toi, la gestation n'est plus une phobie, je trouve ça moins trash. Plus sérieusement, merci pour nos discussions souvent enrichissantes. Partis plus récemment, merci à **Emeline** pour ta bonne humeur, nos discussions et nos fous rires. Merci **Nayla**, ta rigueur au travail et en dehors font de toi une personne sincère et respectable (Hub à de la chance). **Lionel**, ton humour me manque souvent, j'ai justement un exemple en tête que je ne pourrais répéter ici… C'est avec grand plaisir que j'aime refaire la fête avec vous.

Simon, tu es arrivé à l'improviste au labo ! C'est peut-être comme cela que l'on fait les plus belles rencontres. Il n'a pas fallu longtemps pour que l'on devienne amis. Merci d'être et d'avoir été là ! D'avoir supporté mes coups de gueule, d'avoir partagé tes origines, d'être fan de foot. Tu as souvent de bonnes idées, tu fais passer les autres avant toi, tu fais rire. Ton seul défaut c'est de ne pas boire de bière ! J'espère qu'on pourra fêter une victoire belge à la coupe du monde et/ou encore profiter du soleil oriental ensemble ! **Kévin**, tu fais aussi partie des belles rencontres de ces dernières années. Encore plus cette dernière année, qu'on avait prédit magique, et qui tient ses promesses. Merci pour nos discussions, nos tranches de rire et ton aide dans les manips. Il faut toujours que l'on aille rouler ensemble ! **Quentin**, tout était fait pour que l'on passe un jour du bon temps ensemble ! Déjà plus jeunes sur les terrains de foot ou en première année de bac, nos destins se croisaient mais sans nous rapprocher. Il a fallu que tu prennes gout à la microbiologie pour y arriver. Depuis, on se marre à chaque fois que l'on se croise. Le matin, la journée ou le soir, autour d'un bon verre ou d'un barbecue, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi. Avec vous trois, je me sens adulte et mature mais tellement jeune et con à la foi ! Merci les mecs !

Merci à celle qui depuis quelques mois chamboule mes sentiments ! Change ma vision de la vie et du partage. Merci **Agnès** pour ton écoute et ton soutien durant la rédaction. Merci pour nos rires et ton sourire. Merci pour ta compagnie et ta folie ! Les bons moments ne cessent de s'additionner. Puissent-ils continuer de s'accumuler et s'intensifier. Merci d'être toi, je suis très heureux. Tu fais partie des surprises de la thèse ! Des choses auxquelles on ne s'attend pas mais qui donnent tellement de bonheur…

Merci à tous les autres, du labo et de l'université. Merci **Julie**, **Severin** (grosse couille), **Kenny**, **Clément** (Constant), je nous vois encore préparer la thèse dans le même bureau ! Quatre ans plus tard nous voilà au bout ! Merci **Elodie**, **Valérie** et **Emilie**. Je suis toujours content de vous croiser pour discuter un peu. Merci **Jérôme**, tu es toujours là pour nous faire rire. Tu étais là le matin pour accompagner mon café et discuter des résultats (sportifs) de la veille. Ne change pas. Merci **Francesco**, j'aime beaucoup discuter avec toi ! De sciences, de foot et de filles ! Merci **Katy**, si tu t'ennuies le soir, tu as toujours mon numéro… Et plus sérieusement merci pour les moments de divertissement. **Phuong**, je veux encore une démonstration de Kung Fu. Continue de faire rimer la vie avec le rire. Merci **Dounia**, si un jour tu te coupes les cheveux, je veux bien une mèche dans une enveloppe. J'en ferais bon usage ! Merci **Olivier** (Popo), il y a rire avec les gens, mais rire avec toi c'est souvent mieux ! Merci à tous les autres. Merci **Vicky** (Merci pour ton sourire et ta rigueur, ma bich), merci **Mathilde** (wesh wesh), **Fréderic**, **Mélanie**, **Katrin**, **Carlos**, **Sébastien** (Bruce), **Aurélie**, **Gwen**, **Pierre**, **Hubert**, **Charlotte**, **Nicolas**, **Rosa, Jean-François..**. L'URBM a réussi à enfiler de belles perles à son collier ! Merci aussi à **Françoise**, **Mathieu**, **Christian** et **Philippe**. Merci **Patricia** pour ta bonne humeur. C'est grâce à vous que tout avance beaucoup plus vite. Merci **Xavier De Bolle** pour tes conseils scientifiques et tes anecdotes personnelles qui n'en finissent de nous faire rire. Merci à **Jean-Yves Matroule** et **Guy Cornelis** pour les discussions, les échanges et les idées que vous avez partagés notamment durant les meetings.

Je remercie aussi ma famille et mes amis, sans vous tout aurait été plus difficile. **Maman**, **Papa**, **Aurélie**, **Lionel** et **Amandine**, on ne choisit malheureusement pas sa famille mais je souhaite à tout le monde de tomber dans une famille comme la nôtre ! Merci pour tout. Merci Mamy, Tonton, Tati et Noémie pour votre soutien. Je profite de l'occasion pour remercier ceux qui sont partis trop vite, avec une pensée particulière pour Papy, on aurait tous aimé faire ta rencontre ! Si l'on ne choisit pas sa famille, on choisit ses amis. Merci particulièrement à **Stéphane**, **Olivier** et **Arnaud**. On en aura des choses a se remémorer quand les rides feront leur apparition et que les jeunes d'aujourd'hui ne seront plus ce qu'ils étaient avant.

Je me dois de consacrer une partie de ces remerciements à des personnes qui respirent la lavande, le pastis et les olives. Merci pour votre soutien durant les premières années de la thèse. Merci pour votre accueil et tout ce que vous avez fait pour moi. J'en suis extrêmement reconnaissant. Merci **Noélie** de m'avoir accompagné ces trois premières années, je garderais de beaux souvenirs de ce bout de chemin parcouru avec toi.

Je remercie aussi mon cher et tendre **BL3** ! Tu m'as hébergé, réchauffé l'hiver et rafraichi

l'été. Après mon lit c'est entre tes murs que j'ai dû passer le plus de temps. Merci pour ta fidélité et ta protection. Merci pour tous les bons moments. Tu connais beaucoup de mes secrets, tu étais mon confident !

« La souris est un animal qui, tué en quantité suffisante et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat. »
Woody Allen

Je remercie aussi les différents collaborateurs qui ont apporté de la valeur au travail effectué. Merci **Carl De Trez** (VUB) pour ton aide dans les différents sujets étudiés et en particulier la partie MZ. Merci à **Giresse**, **Pauline**, **Marta Romano** et **Olivier Denis** de l'Insitut de Santé Publique (Bruxelles). Merci à **Catherine** (ULg), **Laurie** (ULB) et **Stanislas Goriely** (ULB) pour votre aide, vos idées et votre travail.

J'aimerais également remercier les personnes qui m'ont accompagné au cours de mon cursus. Depuis le Collège PieX, où j'ai pris goût à la science et la biologie. Une pensée particulière pour mon professeur de sciences madame Pirotte. Merci à ceux qui ont égayé mes premières années aux facultés Universitaires Notre Dame de la Paix et en particulier **Meriton**, **Fiona**, **Aurélie**, **Guillaume**, **Céline**…

Finalement je tiens à remercier les membres de mon comité d'accompagnement les Professeurs **Fabrice Bureau** et **Kris Huygen**. Merci pour votre temps, votre intérêt pour le sujet et vos conseils tout au long de la thèse. Je remercie aussi les membres du jury les Professeurs **Guy Cornelis**, **Jacques Godfroid**, **Jean-Paul Coutelier** et **Laurent Gillet**. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et merci pour le temps consacré à la lecture et la relecture du manuscrit. Merci pour vos conseils et vos suggestions.

« Je vous souhaite des rêves à n'en plus finir,
Et l'envie furieuse d'en réaliser quelques-uns.
Je vous souhaite d'aimer ce qu'il faut aimer,
Et d'oublier ce qu'il faut oublier.
Je vous souhaite des passions.
Je vous souhaite des silences.
Je vous souhaite de résister à l'enlisement.
Je vous souhaite surtout d'être vous. »
Jacques Brel

Table des matières

I. Avant-propos : de la symbiose à l'infection 20
II. Variabilité individuelle face à l'infection 22
1. Causes de la variabilité individuelle face à l'infection 26
A Implication du régime alimentaire sur le contrôle des infections 28
B Implication du système nerveux sur la réponse immunitaire 28
C Impact du microbiote sur le contrôle des infections 30
D Impact du passé immunologique de l'hôte et effets non spécifiques de la vaccination sur ses capacités à contrôler une infection 30
E Influence des pathologies croisées (infections et pathologies immunitaires) sur les capacités de l'hôte à contrôler une infection 33
a Modification de l'architecture tissulaire 33
b Inhibition de la réponse immunitaire protectrice (immunosuppression) 33
c Activation de la réponse immune protectrice 34
d Modification du métabolisme de la cellule hôte 34
2. La co-infection et ses applications thérapeutiques 35
A La « Malaria thérapie » 35
B La thérapie helminthique 35
C Inoculation croisée chez le moustique *Aedes aegypti* 36
3. Aspect multifactoriel de la variabilité individuelle 37
4. Intérêt des pathologies croisées et l'étude de leur impact sur le statut immunologique de l'hôte 39
III. *Brucella*-brucellose : L'histoire d'un agent pathogène devenu furtif pour établir sa chronicité chez l'hôte 40
1. *Brucella* : l'agent de la brucellose 40
A Symptômes et transmission de la pathologie 43
B Historique et découverte de la brucellose 43
C Diagnostic de la pathologie 44
D Traitement et vaccination 45
2. Trafic intracellulaire 47
3. Les modèles d'étude *in vivo* de la relation entre l'hôte et *Brucella* 49
A Les différents modèles existants 49
B Les différentes voies d'inoculation de *Brucella* chez la souris 50
4. Brucellose : une relation hôte/agent pathogène dynamique 54
A La réponse immune innée 54
B Rôle des populations cellulaires de l'immunité adaptative dans le contrôle de *Brucella* 58
C Le granulome, une forteresse immunitaire 64
D Contrôle d'une infection secondaire par *Brucella* 66
5. Phénotype des cellules infectées par *Brucella* 67
6. La brucellose et les pathologies croisées 69

IV. Objectifs 72
V. Impact de la réaction asthmatique sur les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *Brucella melitensis*. 74
1. L'asthme : une pathologie qui progresse 74
A Développement de l'asthme allergique 75
B Etude de l'asthme allergique chez la souris 77
A Le modèle utilisant *D. farinae* 77
B Le modèle utilisant *A. alternaria* 78
2. Intérêt du modèle de pathologies croisées 79
3. L'interaction asthme / *Brucella* 83
4. Publication : L'asthme allergique modifie la croissance et la persistance bactérienne dans les poumons par différents mécanismes. 84
VI. Impact de l'infection par *Trypanosoma brucei* sur les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *Brucella melitensis*. 122
1. Trypanosomiase Africaine humaine : Agent infectieux et épidémiologie 122
A Trypanosomiase animale et réservoir biologique 129
B Réponse immune innée et adaptative lors de l'infection par *T. brucei* 129
C Changer de manteau antigénique pour échapper à la pression immunitaire 130
D Modèle d'étude de la trypanosomiase chez la souris. 130
2. Impact de l'infection par *Trypanosoma brucei* sur les capacités de la souris à contrôler la brucellose. 131
3. Précédentes études de l'interaction entre *Brucella* et *Trypanosoma* 132
4. Publication : L'infection par *Trypanosoma* améliore l'élimination de *Brucella* par la voie IL-12/IFN-γ 134
VII. Impact de l'infection par *Brucella melitensis* sur la microarchitecture splénique et sa capacité à filtrer le sang. 166
1. Publication : L'inflammation à bas niveau de type Th1 induite par l'infection par *Brucella melitensis* induit une alteration de la zone marginale de la rate chez la souris. 168
VIII. Discussion et perspectives 200
5. Rappel de la problématique 200
6. L'asthme exacerbe l'infection par *Brucella* 201
7. La co-infection par *T. brucei* favorise l'élimination de *Brucella* 204
8. Relevance des deux modèles étudiés 207
9. La brucellose altère aussi le statut immunologique de l'hôte 211
10. En guise de conclusion 212
IX. Bibliographie personnelle 214
1. Publications comme premier ou co-premier auteur 214
2. Associations à d'autres publications 214
X. Références 216

Liste des abréviations

A. aegypti	*Aedes aegypty*
A. alternata	*Alternaria alternata*
ADN	Acide Desoxyribonucléique
AID	Activation induced desaminase
Alta	Allergène de *Alternaria alternata*
Alum	Hydroxyde d'aluminim
APC	Antigen presenting cell
Arg1	Arginase 1
ARN	Acide ribonucléique
B.	*Brucella*
BALT	Bronchus associated lymphoid tissues
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCR	B cell receptor
BCV	*Brucella* containing vaccuole
Btp1 et Btp2	*Brucella* tir-containing protein
C.	*Coxiella*
CCL	C-C motif Chemokine Ligand
CCR	Récepteur aux chemokines
CD1	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming units
CODA-CERVA	Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimique
CXCL	C-X-C motif Chemokine Ligand
D.	*Dermatophagoides*
DC	Dendritic Cell
Derf	Allergène de *Dermatophagoides farinae*
dLN	Drainind lymph node
DTC	Vaccin diphtérie-tétanos-coqueluche
E.	*Escherichia*
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FIZZ1	Resistin-like molecule-α/found in inflammatory zone 1
H.	*Helicobacter*

HDL	High density lipoprotein
HDM	House dust mite
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Inductible nitric oxide synthase
L.	*Listeria*
LCMV	Lymphocytic choriomeningitidis virus
LPS	Lipopolysaccharide
M.	*Mycobacterium*
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MARCO	Macrophage receptor
MHC	Major histocompatibility complex
MMM	Marginal metallophilic macrophage
Mrc1	Macrophages mannose receptor
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MZM	Marginal zone macrophage
N.	*Neisseria*
NK cell	Natural Killer cell
NK T cell	Natural Killer T cell
NLR	NOD-like receptor
NO	Nitric Oxyde
NOD	Nucleotide oligomerization domain
OIE	World organisation for animal health
Omp	Outer menbrane protein
OMS	Organisation mondiale de la santé
OVA	Ovalbumine
P.	*Plasmodium*
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PAR	Protease-activated receptor
pH	Potentiel hydrogène
PNEC	Pulmonary Neuroendocrine Cell

PRR	Pattern recognition receptor
RAG1	Recombinaison-activating gene
RE	Réticulum endoplasmique
S. typhimurium	*Salmonella typhimurium*
S. pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*
SIGN-R1	Specific intercellular adhesion molecule 3
SNC	Système nerveux central
sVSG	VSG soluble
T.	*Trichuris*
T4SS	Système de sécrétion de type 4
TAH	Trypanosomiase africaine humaine
Tfh	Follicular Helper Cell
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TIR	Toll/interleukin receptors
TLR	Tool-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
URBM	Unité de recherche en biologie des micro-organismes
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VirB	Opéron de virulence
VSG	Variant surface glycoprotein
YM1	Chitinase like-3

Manuscrit

I. Avant-propos : de la symbiose à l'infection

L'entrée à l'université nous confronte à de nouvelles expériences relationnelles comme celle de la colocation. Les raisons qui nous y poussent sont nombreuses et visent à rendre plus agréable notre rythme de vie. Cela nous permet de faire des économies en se partageant le prix de la location et certains peuvent être chargés de faire la cuisine lorsque d'autres s'occupent du nettoyage. La vie en colocation nous apporte différents avantages tout en prenant le risque que la relation puisse se dégrader et dégénérer pour finalement nous être délétère. Les relations entre notre corps et les micro-organismes présentent des similitudes. La symbiose (du grec σύν sýn, ensemble et βίος bíos vivre) est une association durable entre deux organismes d'espèces différentes (concept introduit en 1879 par le biologiste Heinrich Anton de Bary). Interagir avec un autre organisme peut être (comme pour les colocataires) bénéfique, nuisible ou sans effet. On parlera de mutualisme, commensalisme et parasitisme.

- Le mutualisme fait référence aux relations qui seront bénéfiques pour l'ensemble des organismes en interaction. Une partie des bactéries qui forme notre flore intestinale bénéficie d'un environnement favorable à leur multiplication et riche en nutriments qui sont apportés par notre nourriture. En échange, ces bactéries vont, entre autres, faciliter notre digestion et nous protéger de certains agents pathogènes opportunistes.
- Le commensalisme regroupe les relations qui seront bénéfiques pour certains organismes et sans effet pour les autres. Par exemple, les balanes, ces petits crustacés qui vivent fixés sur le dos des baleines et des tortues. Les baleines vont servir de moyen de locomotion pour les balanes sans qu'elles ne soient positivement ou négativement affectées par leur présence.
- Le parasitisme est une relation qui sera bénéfique pour certains organismes au détriment des autres. Un organisme va coloniser son hôte et l'utiliser comme niche de survie et de multiplication entrainant la dégradation et la perte de fonction de certains organes et/ou une diminution des nutriments disponibles pour l'hôte. On parlera alors d'infection. Un agent pathogène (du grec ancien *pathos* et *gennan* qui signifient respectivement « souffrance » et « générer ») est, par définition, un organisme qui va générer des dégâts en colonisant son hôte.

Il est important de noter que ces trois catégories ne sont pas exclusives. Certaines relations entre organismes peuvent rapidement basculer d'une catégorie à l'autre. Par exemple, une relation commensale peut rapidement devenir parasitaire.

-Les crabes Pinnothères vont coloniser les moules pour se nourrir de leurs excréments (commensalisme) mais, lorsque la nourriture manque, ils vont manger les branchies de leur hôte (parasitisme) et devenir délétères pour celui-ci.

- Certains micro-organismes commensaux qui composent la flore microbienne peuvent devenir pathogènes pour l'hôte lors d'un déséquilibre du microbiote, on parle alors d'organismes pathobiontes.

Si la notion d'agent pathogène fait référence à sa capacité à infliger des dégâts, il est important de tenir compte que l'environnement et la réponse immunitaire de l'hôte influencent le contrôle de l'agent infectieux. La capacité d'un micro-organisme à induire des dégâts, et donc à se comporter en agent pathogène, va être largement orientée par ses possibilités d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. On peut alors considérer qu'un organisme ne sera pas pathogène pour l'ensemble d'une population mais uniquement pour les individus incapables de contrôler l'infection. Il est donc sous-entendu que chaque individu présentera un degré de susceptibilité variable lors d'une épidémie.

II. Variabilité individuelle face à l'infection

Dans le monde du vivant, la variabilité individuelle est un élément clé qui va contribuer à assurer le maintien d'une espèce dans son environnement au cours du temps. Chaque individu va répondre différemment à un stress et présentera une capacité variable à s'y adapter. Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à un stress particulier, l'infection. Au cours de sa vie, un individu va régulièrement être en contact avec des agents pathogènes et les contrôlera avec plus ou moins de succès.

« *Un mal qui répand la terreur,*
Mal que le Ciel en sa fureur
Inventa pour punir les crimes de la terre,
La Peste [puisqu'il faut l'appeler par son nom]
Capable d'enrichir en un jour l'Achéron,
Faisait aux animaux la guerre.
Ils ne mouraient pas tous, mais tous étaient frappés. »

Extrait de : Les animaux malades de la peste
Jean de La Fontaine
Les fables – Recueil II, livre VII

Jean de La Fontaine le faisait remarquer dans sa fable de 1678. Pour la majorité des pathologies, même celles responsables des épidémies les plus meurtrières, une partie des personnes infectées est naturellement capable de contrôler l'agent pathogène (Burnet and White, 1972). On pourrait représenter les capacités d'une population à surmonter une infection par une courbe de « type gaussienne ». Lors d'une épidémie les individus présenteront des degrés de susceptibilité différents à l'infection.

- Par exemple, le parasite *Plasmodium* responsable de la malaria va mettre en danger la vie de seulement 1 enfant sur 1000 (Trampuz *et al.*, 2003).
- Moins de 10 % des individus infectés par *Mycobacterium tuberculosis,* l'agent de la tuberculose, développeront la pathologie au cours de leur vie (Esmail *et al*., 2014). Certaines études suggèrent même que la tuberculose pourrait être bénéfique pour la santé de certains individus (Page *et al.,* 2005).
- Les pandémies grippales les plus meurtrières de l'histoire, comme celle de 1918, ont tué 1 à 10 % des individus infectés avec le virus (Taubenberger and Morens, 2010).
- Le virus Ebola tue la majorité des personnes qu'il infecte mais il y a néanmoins des individus naturellement résistants (De La Vega *et al.*, 2015).

Identifier les facteurs impliqués dans la susceptibilité des individus lors d'une infection permettrait d'identifier les personnes à risque lors d'une épidémie et de minimiser les risques de mortalité et de transmission de l'agent pathogène (notion de super-disséminateur, voir **Box 1;** notion du R_0, voir **Box 2**). À l'inverse, identifier comment certains individus sont naturellement résistants aux agents pathogènes permettra d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Différents éléments sont connus pour moduler les capacités de l'hôte à contrôler une infection. La suite du manuscrit vise à illustrer certains de ces éléments par quelques exemples récents, loin d'être représentatifs du nombre de données existantes.

Box 1 : Notion de « super-disséminateur »

Une notion importante liée à l'hétérogénéité des individus à faire face à une infection est celle des « super-disséminateurs » (ou *superspreaders*). Cette notion se base sur les travaux de l'équipe de Woolhouse qui a été la première à suggérer que seulement 20 % des hôtes infectés étaient responsables de 80 % de la dissémination ; on parle de la règle 80/20 (Woolhouse *et al.*, 1997). Ces individus sont appelés les *superspreaders*. Par exemple, l'analyse des troupeaux de bovins infectés par la souche *Escherichia coli* O157:H7 a démontré que les individus à haute excrétion (8 à 20% du troupeau infecté) sont responsables de la majorité de la transmission de l'agent pathogène aux individus non infectés (Chase-Topping *et al.*, 2007). Mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'établissement des *superspreaders* permettrait de mieux cibler les personnes à risque et donc minimiser la transmission de l'agent pathogène aux individus non infectés (**Figure 1**).

Il a été montré que la tolérance à l'infection pouvait être associée à un phénotype *superspreaders* (Gopinath *et al.*, 2014). Un hôte infecté peut combattre une infection de deux manières différentes : la résistance ou la tolérance. La résistance se base sur différents mécanismes chez l'hôte qui contrôleront l'entrée et la réplication de l'agent pathogène. A l'inverse, la tolérance comprend différents mécanismes qui vont aider l'organisme à tolérer les dommages causés par l'infection et la réponse immunitaire dans le but de maintenir l'hôte en bonne santé. Lors d'une infection orale par *Salmonella enterica* typhimurium chez la souris, 30 % des individus infectés propagent l'agent pathogène à haut niveau (10^8 *Salmonella* par gramme de *fèces*). Ces individus *superspeaders* présentent un statut immunitaire différent des autres et sont capables d'infecter des souris naïves qui partagent la même cage.

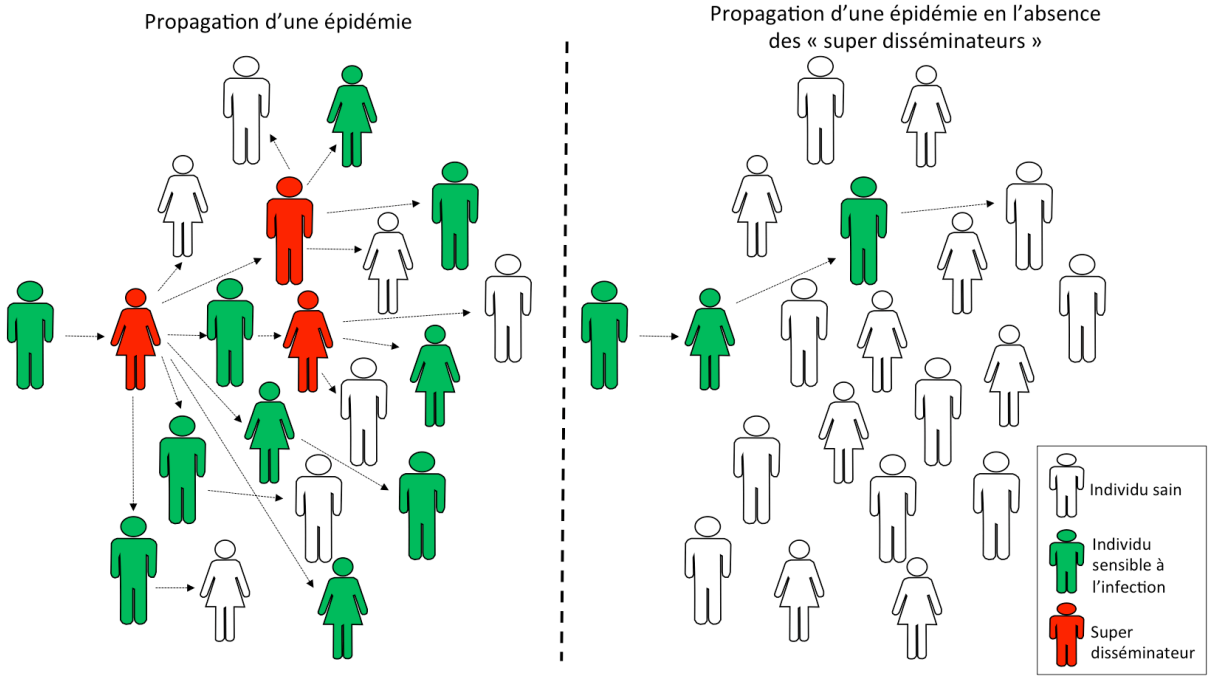


Figure 1: Impact des « super-disséminateurs » sur la propagation d'une infection dans une population cible

Box 2 : notion du R_0

Le R_0 est le rapport de reproduction de base ou le nombre de reproduction de base (*The basic reproductive ratio or the basic reproductive number*) d'un agent infectieux. Il s'agit d'un concept important en épidémiologie qui vise à estimer le potentiel de transmission d'une infection dans une population donnée. Lorsque le R_0 est supérieur à 1, cela signifie qu'un individu transmettra l'agent infectieux à un nombre d'individus supérieur à 1. L'épidémie va donc se propager. À l'inverse, si le R_0 est inférieur à 1, un individu infecté ne transmettra pas l'infection à un seul autre individu et donc la propagation de l'épidémie ira en décroissance. Différents exemples de R_0 sont repris dans la **figure 2** (reviewed in Li *et al.,* 2011).

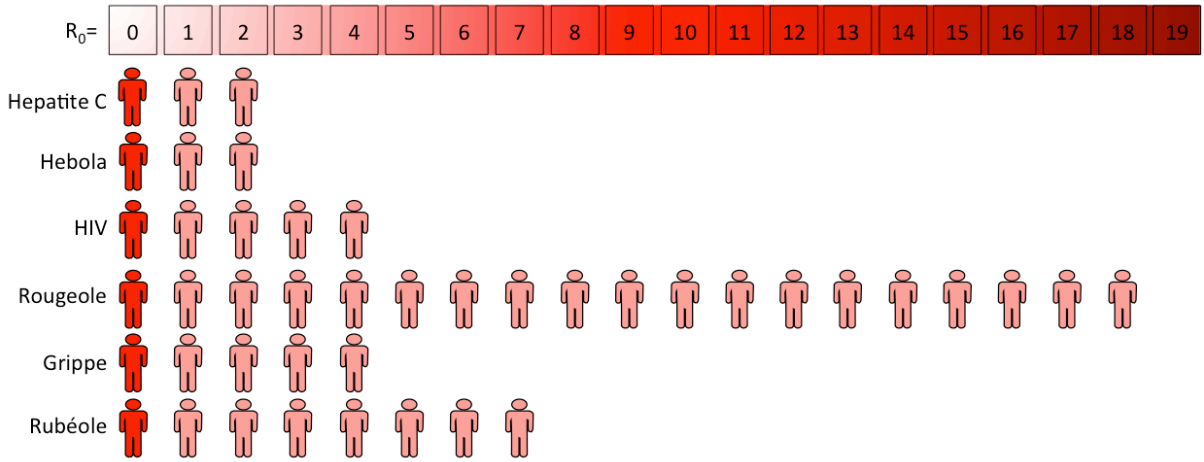


Figure 2 : valeurs de R_0 pour quelques exemples de pathologies infectieuses

1. Causes de la variabilité individuelle face à l'infection

Les paramètres influençant les capacités de l'hôte à contrôler une infection sont variés et parfois mal décrits. L'explication la plus triviale est la variabilité génétique des individus déterminant leurs capacités à développer une réponse immunitaire efficace lors d'une infection. Dans la littérature, de nombreux exemples le démontrent (voir **Tableau 1**):

- Plus d'une vingtaine de mutations génétiques sont connues pour moduler la réponse de l'hôte contre l'hépatite C (Deshpande *et al.*, 1997). Il a été montré qu'une différence d'un seul nucléotide dans le gène de l'Interleukine (IL)-28B influençait les capacités de l'hôte à résister à l'infection par le virus de l'hépatite C (Thomas *et al.*, 2009).
- La variation du gène codant pour le récepteur aux chemokines 5 (CCR5) sur les leucocytes détermine la résistance à l'infection par le HIV (Human Immunodeficiency Virus) (McLaren and Carrington, 2015).
- Chez les rongeurs, la variation génétique de cytokines clés de la réponse immunitaire modifie la résistance à différents agents pathogènes (Turner *et al.*, 2011). Par exemple, des mutations ponctuelles du gène de l'IL-1 et l'IL-2 modifient le contrôle de l'infection par *Bartonella*.

Indépendamment du fond génétique de l'hôte, de nombreux facteurs vont influencer ses capacités à contrôler une infection. On sait par exemple que son régime alimentaire, son microbiote, et son état psychique peuvent impacter le contrôle d'une infection. D'autres éléments comme le passé immunitaire de l'hôte, les pathologies immunitaires et les infections croisées vont aussi moduler les capacités d'un individu à contrôler une infection.

Tableau 1: Exemples de gènes humains impliqués dans la variation de susceptibilité lors d'une infection (adapté de Weatherall and Clegg, 2002)

Infection	**Gène(s)**
Malaria	Globin-α, globine-β, TNF, ICAM-1, Glycophorine A
Tuberculose	Récepteur à la vitamine D, IFN-γR
HIV	CCR5, CCR2, IL-10
Hépatite B	IL-10
Infections bactériennes aiguës	*Mannose binding lectin*, récepteur des fragments constants des immunoglobulines

A Implication du régime alimentaire sur le contrôle des infections

Le régime alimentaire influence la physiologie de l'individu et sa capacité à se défendre lors d'infections. La difficulté à produire les anticorps, la diminution de la formation du complément et la chute du nombre de lymphocytes circulant sont certaines conséquences de la malnutrition qui influencent la résistance de l'hôte lors d'une infection (Scrimshaw and SanGiovanni, 1997).

- Chez la souris le régime alimentaire influence largement les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *M. tuberculosis* (Dubos, 1955). Un régime riche en vitamine A augmente la survie de l'animal alors qu'un régime trop pauvre ou trop riche en protéines diminuera ses chances de survie suite à l'infection.

-D'autres études ont montré que l'obésité était un facteur de risque pour les maladies infectieuses. Ainsi, lors de l'épidémie de grippe en 2009, l'obésité, en plus d'autres facteurs, était associée à un plus grand nombre d'hospitalisation et de mort suite à l'infection virale. Chez la souris, la charge virale lors d'une infection avec le virus de la grippe augmente significativement chez des souris obèses (Zhang *et al.*, 2013).

- Un régime riche en acide gras augmente la susceptibilité de la souris lors de l'infection par *Listeria monocytogenes* (Puertollano *et al.*, 2004; Puertollano *et al.*, 2005). Ces études suggèrent que les réponses immunitaires impliquées dans la lutte contre les agents pathogènes sont défaillantes empêchant le contrôle de l'infection.

B Implication du système nerveux sur la réponse immunitaire

De nombreuses études démontrent qu'il existe une interaction fine et complexe entre le système nerveux et le système immunitaire (pour exemple, Sternberg, 2006). Lors d'une infection, les médiateurs immunitaires et les cytokines produites par les cellules de l'immunité vont notamment stimuler le système nerveux central qui va libérer des neuromédiateurs pour amplifier l'inflammation locale et faciliter l'élimination de l'agent pathogène (**Tableau 2**). Quelques exemples récents suggèrent que le système nerveux influence les capacités de l'hôte à contrôler une infection.

- Le macrophage est une cellule clé de l'immunité impliquée dans la lutte contre les agents pathogènes. Dans l'organisme, le macrophage présente différents statuts métaboliques plus ou moins efficaces pour l'élimination des agents infectieux (pour plus de détails, voir la Box 6 et la figure 9 sur la polarisation des macrophages). Il a été montré que la norépinephrine libérée par les neurones influence le statut

métabolique des macrophages à proximité et donc la capacité du système immunitaire à faire face à une infection (Gabanyi *et al.*, 2016).

- Les *pulmonary neuroendocrine cells* (PNECs) sont les seules cellules innervées connues dans les poumons. Ces cellules produisent des neuropeptides en réponse aux fluctuations d'oxygène dans les tissus et vont avoir un impact sur l'infiltration des cellules immunitaires comme les macrophages pulmonaires (Bordon, 2016).

Tableau 2: Exemples d'interactions de facteurs neurologiques et neuroendocriniens avec des éléments de la réponse immunitaire (adapté de Sternberg, 2006)

Facteurs	**Interaction**
Glucocorticoïdes	*Toll-like receptors*
Noradrénaline	Macrophages
Acétylcholine	Cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, TNF)
Substance P	Cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, TNF)
Calcitonin gene-related peptide	NK cells
Oestrogènes	Cellules dendritiques
Progestérone	Chémokines (CCL2 et CXCL8)

C Impact du microbiote sur le contrôle des infections

Les micro-organismes colonisent l'hôte mammifère dès la naissance, formant une communauté microbienne résidente, incluant des bactéries, des virus et des champignons, nommée le microbiote. Celui-ci module la réponse immunitaire et influence l'habilité de l'hôte à surmonter une infection (Kitano and Oda, 2006; Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010). D'ailleurs, les souris « *germ-free* » (caractérisées par l'absence de microbiote) sont plus sensibles aux infections suggérant que ce microbiote est nécessaire à la maturation du système immunitaire et qu'il contribue à l'élimination des agents pathogènes (Buffie and Pamer, 2013).

Le microbiote protège notamment des infections par compétition avec les agents pathogènes. Les micro-organismes du microbiote vont entrer en compétition pour les nutriments, produire des composés toxiques pour l'agent pathogène ou encore rendre moins accessibles les structures facilitant l'adhérence de l'agent pathogène à l'épithélium. Le microbiote peut aussi protéger des infections en induisant une réponse immunitaire « cross-réactive » qui facilitera l'élimination des agents infectieux (Zeng *et al.*, 2016).

- Certaines bactéries du microbiote intestinal expriment des antigènes similaires à ceux présents en surface du parasite *Plasmodium falciparum*. La colonisation de l'intestin par ces bactéries induit la production d'anticorps spécifiques qui protègeront l'hôte contre une éventuelle infection avec le parasite (Yilmaz *et al.*, 2014).
- Le microbiote intestinal induit une production d'IL-25 qui recrute des éosinophiles dans l'intestin qui protègent l'hôte des infections par *Clostridium difficile* (Buonomo *et al.*, 2016).
- Les bactéries *Staphylococcus epidermidis* et *Propionibacterium acnes*, commensales de la peau, produisent des éléments anti-microbiens qui renforcent le système immunitaire inné et la lutte contre les agents pathogènes (Christensen and Bruggemann, 2014).

D Impact du passé immunologique de l'hôte et effets non spécifiques de la vaccination sur ses capacités à contrôler une infection

De nombreuses données épidémiologiques et expérimentales ont montré que la vaccination ou l'exposition à une infection allait modifier le statut immunologique de l'hôte pour le rendre plus résistant à d'autres infections, même lorsque l'hôte se sera débarrassé de la souche

infectieuse. On parle d'immunité hétérologue (notion de protection croisée dans la **Box 3**) (Welsh and Selin, 2002).

- L'infection par le lymphocytic choriomeningitidis virus (LCMV) induit la formation d'une réponse mémoire protectrice non seulement contre le virus ciblé, mais aussi contre les infections par le pichinde virus et le vaccinia virus (Selin *et al.,* 1994).
- le vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) ne protège pas seulement contre la tuberculose mais aussi contre des infections secondaires comme *Listeria monocytogenes* (Blanden *et al.*, 1969), *Staphylococcus aureus* (Sher *et al.*, 1975) et *Plasmodium yoelii* (Matsumoto *et al.*, 2000).
- Les effets délétères de certains vaccins ont également été documentés. Le vaccin diphtérie-tétanos-coqueluche (DTC), qui protège contre les trois pathologies ciblées, est décrit pour rendre certains individus plus sensibles à d'autres infections (Aaby *et al.*, 2012).

Box 3 : les mécanismes de protection croisée

Lorsqu'on développe une réponse immunitaire (lors d'une infection ou d'une vaccination par exemple), il se peut que cette réponse nous protège contre une autre pathologie infectieuse. On parle de **protection croisée** (*cross-protection*) ou d'immunité acquise contre une pathologie infectieuse. Cette protection peut être dépendante d'une infection chronique (on parle d'effet Mackaness) ou de la réponse immunitaire mémoire acquise lors d'une précédente infection (reviewed in Muraille, 2016). Elle peut reposer sur une réaction antigénique croisée ou de la *trained immunity*.

On parle d'effet Mackaness lorsqu'un individu atteint par une infection chronique va développer une réponse immunitaire qui le protègera contre une seconde infection. La réponse immunitaire contre le premier agent infectieux va faciliter la lutte contre le second.

Un individu qui parvient à éradiquer une infection va développer une mémoire immunitaire spécifique de l'agent infectieux qui le protègera lors d'un nouveau contact avec celui-ci. Différents exemples montrent que cette réponse mémoire peut également protéger l'hôte contre un agent infectieux différent. Ce dernier peut activer les lymphocytes T et B mémoire parce qu'il présente des antigènes identiques (ou structurellement proches) de ceux exprimés par le premier agent infectieux contre lequel l'hôte à développé une réponse mémoire. On parlera de **protection antigénique croisée** et de poly-spécificité des lymphocytes B et T.

Ces dernières années une nouvelle forme de réponse immunitaire mémoire a été décrite sous le terme de ***trained immunity***. Il s'agit d'une réponse mémoire médiée par les cellules de l'immunité innée. Il a par exemple été montré que les macrophages ou les cellules Natural Killer peuvent acquérir suite à une infection de nouvelles propriétés leur permettant de plus rapidement contrôler une seconde infection avec le même pathogène. Cette forme de mémoire pourrait aussi être impliquée dans des mécanismes de protection croisée.

E Influence des pathologies croisées (infections et pathologies immunitaires) sur les capacités de l'hôte à contrôler une infection

En plus du passé immunologique de l'hôte, il est important de prendre en compte que lorsque l'on contracte une infection on peut être atteint, en parallèle, par une autre pathologie (infectieuse ou non) qui modulera nos capacités à contrôler cette infection. Par exemple, nous sommes quasi tous concernés par des infections latentes comme celles par les virus herpes. Ces « pathologies » croisées influencent le statut immunologique de l'hôte de différentes manières comme - l'altération tissulaire, - l'inhibition/activation de la réponse immunitaire protectrice et la modification du métabolisme de la cellule hôte.

a Modification de l'architecture tissulaire

- Le virus influenza présente une activité neuraminidase qui après clivage de l'acide sialique sur les surfaces glycoconjuguées, va entrainer l'apparition de nouveaux récepteurs qui augmenteront l'adhérence de *S. pneumoniae* et donc son infiltration dans les tissus (Peltola and McCullers, 2004).
- Les infections par les adénovirus augmentent aussi l'adhésion des pneumocoques en augmentant le nombre de récepteurs à la surface des cellules épithéliales respiratoires (Hakansson *et al.*, 1994).

b Inhibition de la réponse immunitaire protectrice (immunosuppression)

Une composante importante du système immunitaire est la réponse immunosuppressive ou régulatrice. Pour limiter les dommages tissulaires causés par une réponse immunitaire trop importante il existe un système de rétrocontrôle qui vise à inhiber la réponse pro-inflammatoire pour en limiter les dégâts et le coût énergétique. Il a été montré qu'une pathologie croisée peut influencer les capacités de l'hôte à surmonter une autre pathologie en stimulant cette réponse immunosuppressive.

- Des études épidémiologiques menées en Centrafrique ont suggéré que les individus susceptibles à l'infection par *Salmonella* étaient associés à la malnutrition ou l'infection par *Plasmodium*, l'agent de la malaria (Feasey *et al.*, 2012). Chez la souris, l'infection par *P. falciparum* induit une forte réponse immunosuppressive (production d'IL-10) qui compromet les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *S. typhimurium* (Lokken *et al.*, 2014).
- La stimulation de la réponse immunosuppressive peut aussi avoir des effets bénéfiques sur le développement d'une pathologie croisée. L'infection de souris par *Helicobacter pylori*, une bactérie pathogène de l'estomac chez l'homme, entraine

l'infiltration massive de cellules à fonctions immunosuppressives dans le tissu pulmonaire qui inhibe le développement de l'asthme (Arnold *et al.*, 2011). Des observations épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre l'incidence de l'asthme et l'infection chronique par *H. pylori* chez l'homme (Zevit *et al.*, 2012).

c Activation de la réponse immune protectrice

La réponse immunitaire mise en place par l'hôte lors d'une infection peut avoir des effets protecteurs contre un autre micro-organisme qui colonise celui-ci (pour des notions sur la réponse immunitaire voir **Box 6, 7 et 8**).

- La malaria et la tuberculose sont deux pathologies endémiques dans plusieurs régions du monde. Les cas de co-infections sont donc fréquents. Il a été observé chez des souris co-infectées une diminution de la parasitémie et une augmentation de la survie par comparaison aux souris uniquement infectées avec le parasite *P. yoelii*. Cette protection est associée à une augmentation de réponse immune (T_H1) favorable au contrôle du parasite grâce à l'infection par *M. tuberculosis* (Page *et al.*, 2005).
- L'infection pulmonaire par *Mycoplasma pulmonis* entraine la formation d'une réponse immunitaire dont les acteurs sont favorables à l'élimination de *Listeria monocytogenes* (Sieve *et al.*, 2009).
- Les infections latentes par le virus Epstein-Barr et/ou le cytomégalovirus activent le niveau basal de l'immunité innée qui protège contre les infections par *L. monocytogenes*, *Yersinia pestis* et le virus influenza (Barton *et al.*, 2007; Furman *et al.*, 2015).

d Modification du métabolisme de la cellule hôte

Le macrophage est une cellule de l'immunité fréquemment infectée par les agents pathogènes. Chez l'hôte, le macrophage, en fonction de son état de différentiation, présente des fonctions diverses (on parle de polarisation des macrophages) allant de la lutte contre les agents pathogènes à la réparation tissulaire. La cellule exprimera des niveaux variables de mécanismes microbicides et verra sa résistance à l'infection modifiée.

- L'infection par *Nippostrongylus brasiliensis*, un helminthe, va modifier la polarisation des macrophages pulmonaires et les rendre moins efficaces contre l'infection par *M. tuberculosis* et faciliter la multiplication intracellulaire de la bactérie (Potian *et al.*, 2011).

2. La co-infection et ses applications thérapeutiques

Au cours du temps, différentes stratégies thérapeutiques inspirées des protections croisées ont été développées. Bien que souvent empiriques, différentes études ont montré que l'on pouvait combattre une pathologie humaine grâce à la co-infection.

A La « Malaria thérapie »

Julius Wagner-Jauregg, psychiatre autrichien, a reçu le prix Nobel de médecine en 1927 pour le développement de la « Malaria thérapie » pour traiter la neuro-syphilis. Dans les dernières étapes de la maladie, la syphilis est caractérisée par des dommages du système nerveux se manifestant par la démence et la psychose. Lorsque les symptômes se sont manifestés, il est souvent trop tard (débouchant généralement sur la mort du patient). Après la première guerre mondiale, entre 5 et 10 % des admissions psychiatriques étaient attribuées à la neuro-syphilis (Tsay, 2013).

En 1883 Julius Wagner-Jauregg avait observé qu'une femme avait guéri d'une psychose sévère après avoir contracté une infection bactérienne cutanée aiguë caractérisée par une forte fièvre. Il s'est donc demandé s'il était possible de soigner des patients atteints de neuro-syphilis en induisant une forte fièvre. Il a d'abord tenté d'injecter de la tuberculine, décrite pour induire une forte fièvre, mais sans effet notoire. C'est alors qu'il a reçu des patients atteints de la malaria dans son cabinet, une pathologie caractérisée par une forte fièvre. L'avantage de cette pathologie est qu'elle est facilement soignable par l'injection de quinine qui élimine rapidement les parasites (Freud *et al.*, 2013).

Le psychiatre autrichien a donc décidé d'injecter l'agent de la malaria à plus de 200 patients atteints de neuro-syphilis. Il a observé que plus de 25 % d'entre eux avaient récupéré significativement de la pathologie confortant son travail sur l'impact d'une forte fièvre sur l'atténuation de la démence.

B La thérapie helminthique

Plusieurs études ont montré un rôle protecteur des infections helminthiques contre de nombreuses pathologies dans différents modèles animaux (reviewed in Leonardi *et al.*, 2015). Les effets thérapeutiques dépendent de l'espèce, de son cycle infectieux et de la réponse immunitaire qui résulte de l'infection. Ces infections peuvent avoir des effets bénéfiques lors des allergies (Schnoeller *et al.*, 2008), du psoriasis (Atochina and Harn, 2006), du diabète

(Cooke *et al.*, 1999) et des hépatites (Nascimento *et al.*, 2014). Ces observations ont débouché sur quelques études cliniques en vue de développer des traitements sur base de la thérapie helminthique. Pour cela, il faudrait utiliser un helminthe faiblement infectieux pour l'homme mais qui déclencherait une réponse inflammatoire suffisamment forte. Il doit être incapable de terminer son cycle infectieux chez l'hôte humain pour limiter son potentiel infectieux et sa dissémination à d'autres hommes. Quelques études cliniques ont été réalisées avec l'administration d'œufs provenant de l'helminthe *Trichuris suis*, un agent pathogène chez le cochon. En 2003, quatre patients atteints de la maladie de Crohn et trois souffrants de colite ulcérative ont été traités avec une injection de 2500 œufs de *T. suis* (Summers *et al.*, 2003). Six des sept patients ont présenté une diminution significative des symptômes 8 semaines après l'injection. Les individus ont ensuite présenté des rechutes de la maladie suggérant qu'une administration répétée toutes les 3 semaines du composé serait plus efficace. La suite des études a montré le potentiel protecteur de l'administration de 2500 œufs toutes les 3 semaines chez d'autres patients montrant une efficacité significative du traitement (Summers *et al.*, 2005).

D'autres études cliniques sont nécessaires pour prouver l'efficacité de la thérapie helminthique car l'injection d'un agent biologique vivant peut s'avérer problématique. Cependant, cette stratégie pourrait déboucher sur la production de nouvelles molécules biologiques induisant les effets de l'infection helminthique.

C Inoculation croisée chez le moustique Aedes aegypti

Wolbachia est une bactérie intracellulaire retrouvée dans plus de 60 % des espèces d'insectes. On retrouve la bactérie dans la plupart des moustiques mais elle est absente chez la plupart des espèces responsables de la transmission d'agents pathogènes à l'homme. L'infection de moustiques vecteurs par *Wolbachia* diminue la capacité de nombreux agents pathogènes humains et animaux à se maintenir dans le moustique (Bian *et al.*, 2013). Par exemple, l'infection du moustique *A. aegypti* par *Wolbachia* diminue la présence des virus de la Dengue et du Chikungunya (Moreira *et al.*, 2009) et du parasite *Plasmodium* (Joubert *et al.*, 2016) chez l'insecte vecteur. Les mécanismes ne sont pas encore très clairs, mais il semblerait que la présence de la bactérie chez le moustique stimulerait une réponse immunitaire défavorable au maintien des agents pathogènes humains chez le moustique. Une autre hypothèse serait que *Wolbachia* diminuerait les ressources mises à disposition par l'insecte et

impliquées dans la multiplication et le maintien des agents pathogènes humains chez l'insecte vecteur.

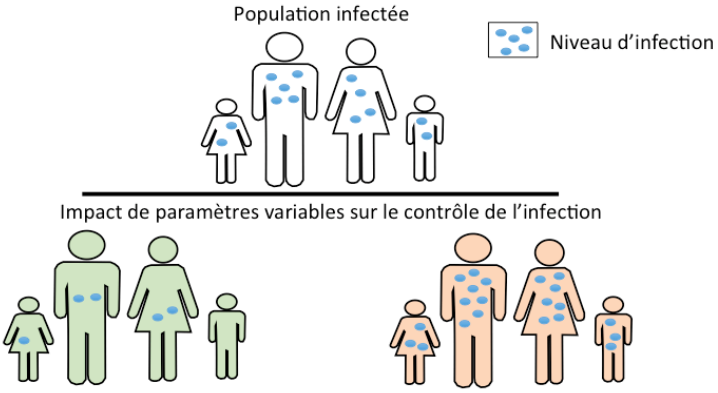
La stratégie vise à co-infecter les insectes vecteurs d'agents pathogènes de mammifères avec *Wolbachia* dans le but de diminuer les risques de transmission des agents pathogènes à l'hôte. Dans ce cas-ci, la co-infection de l'insecte vecteur est utilisée à des fins de prévention et non comme une thérapie (Moreira *et al.*, 2009).

3. Aspect multifactoriel de la variabilité individuelle

De très nombreux paramètres peuvent modifier l'habilité d'un individu à répondre à une infection et expliquer, en partie, la grande variabilité observée au sein d'une population lors d'une épidémie. Il est important de noter que ces paramètres sont interconnectés et que le statut immunologique de l'hôte est influencé par tous les paramètres cités précédemment (**Figure 3**).

Le statut immunologique de l'hôte est aussi très dynamique au cours du temps. Sa capacité à répondre à une infection peut être différente si elle est contractée à des moments différents de sa vie. Par exemple, le régime alimentaire, le microbiote intestinal et le passé infectieux vont évoluer au cours de la vie de l'hôte.

Il est aussi important de noter que nous nous sommes principalement focalisés sur l'hôte pour justifier la variabilité de celui-ci à répondre à une infection. Mais l'agent pathogène influencera lui aussi l'habilité de l'hôte à le contrôler. Deux épidémies de grippe ne sont jamais identiques. Elles peuvent être plus ou moins virulentes et évoluer au cours du temps justifiant aussi parfois l'hétérogénéité des populations à surmonter l'infection.



Paramètre	Effet bénéfique sur le contrôle de l'infection	Effet négatif sur le contrôle de l'infection
Régime alimentaire	vitamine A	obésité (déficience immunitaire)
Microbiote	compétition, poly-spécificité des antigènes	-
Vaccination	poly-spécificité des antigènes	mécanismes inconnus
Infection ancestrale	immunité hétérologue	mécanismes inconnus
Pathologie croisée	modification des tissus, immunosuppression, activation immunitaire	Immunosuppression, polarisation des macrophages
Système nerveux	(infiltration cellulaire, polarisation des macrophages)	(infiltration cellulaire, polarisation des macrophages)

Figure 3 : Paramètres influençant les capacités d'un individu à contrôler une infection

4. Intérêt des pathologies croisées et l'étude de leur impact sur le statut immunologique de l'hôte

Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi d'étudier l'impact de pathologies croisées sur la capacité de l'hôte à surmonter une infection. De nombreuses études ont démontrés que les pathologies croisées (infectieuses ou non) peuvent fortement modifier le statut immunitaire de l'hôte et influencer sa capacité à contrôler une infection. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes restent mal définis.

Cette approche offre également l'opportunité de s'éloigner des stratégies expérimentales réductionnistes qui tendent à limiter la variabilité biologique au sein d'un système pour mieux mettre en évidence le rôle d'un acteur particulier. Il est en effet courant en Immunologie de n'analyser la capacité de contrôler une infection qu'au sein de populations constituées d'individus génétiquement homogènes, immunologiquement naïfs et vivant dans un environnement stable et aseptisé. Or, les populations naturelles ne sont jamais uniquement constituées d'individus naïfs, non infectés et en bonne santé. L'infection et la maladie sont la norme. Cette hétérogénéité du statut immunologique permet d'expliquer l'importante variabilité des individus dans la nature à contrôler une nouvelle infection. Nous voulons donc sortir de ce carcan expérimental réductionniste en réintroduisant de manière contrôlée une variabilité par le biais des pathologies croisées.

Nous avons choisi de tester l'impact de deux pathologies (l'asthme allergique et la trypanosomiase africaine) sur les capacités de l'hôte à contrôler une infection bactérienne chronique, la brucellose. Cette dernière est une zoonose mondiale qui en l'absence de traitement persiste chez l'hôte mammifère. Sa persistance chez l'hôte en fait un bon modèle pour étudier l'impact des pathologies croisées sur le statut immunitaire de l'hôte puisqu'à un moment ou à un autre, l'individu infecté par l'agent de la brucellose pourra être concerné par une pathologie croisée. La mise en évidence d'effets sur le contrôle de la brucellose par une pathologie croisée chez l'hôte permettrait peut-être de mieux comprendre la pathologie et identifier des mécanismes impliqués dans la résistance ou la susceptibilité à l'infection.

III. Brucella-*brucellose : L'histoire d'un agent pathogène devenu furtif pour établir sa chronicité chez l'hôte*

1. *Brucella* : l'agent de la brucellose

Brucella est une α-protéobactérie pathogène Gram négative de forme coccobacille intracellulaire facultative. Le genre *Brucella* est divisé en 12 espèces dont chacune est spécifique d'un hôte mammifère (**Tableau 3**). Parmi ces espèces, 6 sont accidentellement capables d'infecter l'homme (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, et de manière plus anecdotique, *B. canis*, *B. ceti* et *B. pinnipedialis*). La bactérie est l'agent d'une infection chronique, la brucellose (fièvre de Malte ou fièvre méditerranéenne). Il s'agit d'une des zoonoses bactériennes les plus courantes avec plus de 500.000 nouveaux cas humains diagnostiqués chaque année (reviewed in Pappas *et al.*, 2006). Notons que l'incidence de la pathologie est largement sous-estimée pour des raisons telles que les difficultés d'accès aux tests diagnostiques dans certaines régions ou la grande variabilité des symptômes de la pathologie. Chez l'homme, la distribution de la brucellose est en constante évolution (Pappas *et al.*, 2006). La **Figure 4** montre l'incidence de la pathologie entre 2000 et 2006. Les régions les plus touchées sont l'Amérique centrale et du sud, le Moyen-Orient, l'Afrique et l'ouest de l'Asie (reviewed in Pappas *et al.*, 2006; Medzhitov, 2007; Hofer *et al.*, 2016).

Notons que si les différentes espèces de *Brucella* sont classées en fonction de leurs préférences d'hôtes, cette spécificité n'est pas stricte. Par exemple, il a été observé que *B. abortus* qui infecte naturellement les bovins pouvait aussi infecter d'autres animaux comme les chèvres qui partagent les mêmes pâturages. Il a aussi été observé des cas de brucellose liés à l'infection par *B. melitensis* (dont l'hôte naturel est le mouton et la chèvre) chez d'autres animaux comme les chameaux et les chiens (Schneider *et al.*, 2011).

Tableau 3 : Liste des espèces du genre *Brucella* et leurs hôtes associés	
Espèce	**Hôte naturel préférentiel**
B. melitensis	Moutons, chèvres, chameaux ***
B. abortus	Bétail, buffles, wapitis, yaks, chameaux **
B. suis	Cochons, sangliers, rennes, caribous, rongeurs **
B. canis	Chiens *
B. ovis	Moutons
B. neotomae	Rongeurs
B. ceti	Marsouins, dauphins, baleines *
B. pinnipedialis	Phoques *
B. microti	Renards, campagnols
B. inopinata	Inconnu (isolée d'un implant mammaire) *
B. papionis	Singes
B. vulpis	Renards

Potentiel zoonotique de l'espèce (*** élevé, ** moyen,*faible) (Le potentiel zoonotique d'une espèce est variable en fonction du biovar)

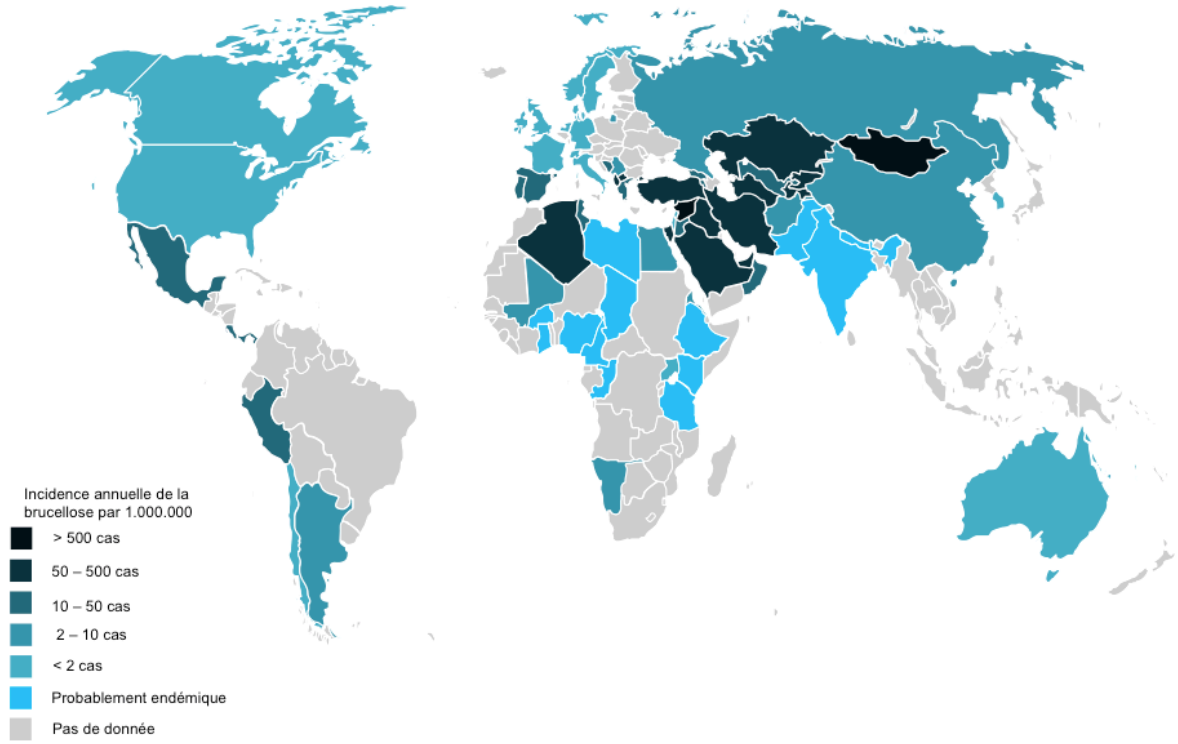


Figure 4 : Incidence de la brucellose humaine (inspiré de Pappas *et al.*, 2006)

A Symptômes et transmission de la pathologie

Chez l'homme, la brucellose est généralement associée à l'apparition d'une fièvre ondulante caractéristique de la phase aiguë. En absence de traitement, la pathologie devient chronique et est caractérisée par l'apparition de complications débilitantes comme encéphalite, arthrite, endocardite, méningite, prostatite et parfois avortement (Schneider *et al.*, 2011). La brucellose est transmise à l'homme de différentes manières : l'inhalation d'aérosols, l'ingestion de produits laitiers contaminés et/ou par contact avec la peau (Atluri *et al.*, 2011). On estime que seulement 10 à 100 bactéries sont nécessaires pour infecter l'homme par inhalation (Bossi *et al.*, 2004).

Chez l'animal, la brucellose se caractérise par l'avortement chez la femelle et la stérilité chez le mâle. *Brucella* présente un fort tropisme pour le tractus reproducteur et plus particulièrement pour les cellules trophoblastiques (Saenz and Taylor, 2008). Chez la femelle gestante, *Brucella* va coloniser le placenta, déstabilisant son homéostasie et ses fonctions, et entrainer la mort du fœtus (**Box 4**). On estime que plus de 50 % des vaches infectées par *B. abortus* avortent (Aparicio, 2013). La transmission horizontale est fréquente et généralement associée à l'inhalation de la bactérie libérée dans l'environnement durant l'avortement ou à l'ingestion de nourriture et d'eau contaminée par les sécrétions animales. Les jeunes animaux peuvent aussi être infectés par ingestion de lait contaminé (transmission verticale) (Aparicio, 2013). Dans les régions où la brucellose est endémique, les pertes économiques sont importantes car il est difficile d'avoir accés au marché de la production. Au niveau mondial, on estime que la brucellose représente des dommages économiques annuels de plusieurs centaines de millions de dollars (Seleem *et al*., 2010).

B Historique et découverte de la brucellose

La brucellose a été caractérisée pour la première fois à Malte pendant la guerre de Crimée (en 1850). David Bruce a isolé l'agent pathogène de la rate de soldats anglais morts d'une pathologie inconnue mais caractérisée par une fièvre ondulante. Il a identifié l'agent responsable de la fièvre de Malte (l'autre nom de la brucellose) et le nomma *Micrococcus melitensis*. Finalement le terme « *Brucella* » a été utilisé pour dénommer le genre en hommage à David Bruce. La nature zoonotique de la maladie a été découverte bien plus tard, en 1905, lorsque la bactérie (*B. melitensis*) fut isolée du lait d'une chèvre infectée (Seleem *et al.*, 2010).

Des ossements humains découverts dans d'anciennes cités albanaises et datant du moyen-âge présentaient des lésions circulaires particulières sur les vertèbres thoraciques et lombaires. Ces lésions sont typiques de celles observées aujourd'hui chez les patients ayant souffert de tuberculose ou de brucellose. Des analyses génétiques ont révélé la présence d'ADN brucellique dans ces lésions suggérant que la brucellose était endémique dans ces régions à cette époque-là (entre le 10ème et le 13ème siècle) (Mutolo *et al.*, 2012). Il s'agissait des premières traces fiables de brucellose mais d'autres éléments, indirects, laissent supposer que la pathologie est beaucoup plus ancienne que cela. Par exemple, l'examen de squelettes découverts ensevelis après l'éruption du Vésuve (79 après Jésus-Christ) a montré la présence de lésions osseuses typiques de la brucellose chez 17 % des habitants. Cela coïncide avec les habitudes alimentaires des habitants, friands du lait de chèvre et de leurs dérivés. En parallèle, la présence de micro-organismes de formes et de tailles similaires à l'agent de la brucellose a été observée dans des morceaux de fromages carbonisés découverts dans les ruines (Capasso, 1999). D'autres observations réalisées sur les squelettes Egyptiens datant de 750 avant Jésus-Christ ont mis en évidence la présence de lésions particulières suggérant que la brucellose pouvait aussi avoir touché l'Afrique à cette période (Pappas and Papadimitriou, 2007). D'autres analyses suggèrent que les plus vieilles traces de brucellose pourraient dater d'il y a 2,5 millions d'années en Afrique lorsque l'australopithèque (*Australopithecus africanus*) a décidé d'ajouter la viande à son régime alimentaire (Anastasio *et al.*, 2009).

C Diagnostic de la pathologie

Le diagnostic de la brucellose peut être réalisé en isolant la bactérie dans différents prélèvements comme le sang, le liquide cérébrospinal et synovial. Il est malheureusement rare de réussir à détecter *Brucella* par isolement et des alternatives ont été développées pour détecter la bactérie. De nombreux tests sérologiques ont été mis au point pour révéler la présence d'anticorps anti-LPS de la bactérie dans le sérum (détails dans le « Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals », 2016, publié par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE, World organisation for animal health)). La combinaison de plusieurs tests est nécessaire car la sensibilité de ceux-ci n'est pas optimale. De plus, des réactions croisées peuvent être observées lors d'infection par *Yersinia enterolitica* O9 (Sandulache and Marx, 1978; for review Ducrotoy *et al.*, 2016).

En Belgique, le CODA-CERVA est le centre de référence national pour la brucellose humaine. Actuellement, les cas de brucellose humaine sont rares en Belgique. Entre 5 et 10

cas sont diagnostiqués chaque année et il s'agit généralement d'individus revenant de régions où la brucellose est endémique. Chez le bétail, la brucellose n'est plus endémique mais elle reste présente dans la faune sauvage. Il est donc important de surveiller qu'aucune transmission au bétail n'ait lieu.

D Traitement et vaccination

Lorsqu'un animal est infecté, il est généralement éliminé pour limiter la dissémination de la pathologie. Dans les régions où la brucellose est endémique, il est possible de vacciner les animaux pour prévenir les risques d'infection. Deux souches vaccinales sont majoritairement utilisées chez les animaux. La souche « S19 » est utilisée pour vacciner les bovins et la souche « Rev1 » protège de la brucellose caprine et ovine. Il s'agit dans les deux cas de vaccins vivants atténués et « *smooth* » pouvant parfois induire l'avortement chez l'animal gestant et infecter l'homme. De plus, la souche « Rev1 » est résistante à la streptomycine, un antibiotique pouvant être utilisé pour éliminer les souches virulentes (Garcia-Yoldi *et al.*, 2006). Ces vaccins vont aussi induire la production d'anticorps anti-LPS pouvant interférer avec les tests diagnostiques (Makala *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant de développer un vaccin qui - n'interfère pas avec les tests diagnostiques, - n'induit pas l'avortement, et qui - n'est pas résistant aux antibiotiques utilisés dans le traitement.

L'infection humaine par *Brucella* requiert un traitement antibiotique lourd pour éliminer la bactérie et éviter les complications liées à la chronicité de la pathologie. Une combinaison de deux antibiotiques est recommandée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour contrôler la division de la bactérie et limiter les risques de rechute. Le traitement classique est la combinaison de doxycycline et de rifampicine à forte dose durant 6 semaines. Il n'existe pas de vaccin protégeant l'homme efficacement.

Box 4 : Colonisation du tractus reproducteur par *Brucella* provoquant l'avortement.

Brucella se multiplie massivement dans le système reproducteur des animaux conduisant à l'infertilité et à l'avortement (Moreno and Moriyon, 2006). Chez les femelles gestantes, la bactérie colonise le chorion, les cotylédons et le liquide amniotique (Burton *et al.*, 1976; Smith, 1965). En phase aiguë, il a été évalué que près de 85 % des bactéries présentes dans l'hôte sont localisées dans le tractus reproducteur. Le nombre de bactéries dans le tissu peut atteindre 10^{13} CFU (Atluri *et al.*, 2011). La colonisation du système reproducteur et des glandes mammaires est essentielle pour assurer la transmission de la pathologie. Le lait, les secrétions sexuelles et l'avorton peuvent contenir des milliards de bactéries pouvant être transmises par inhalation ou ingestion (Xavier *et al.*, 2009).

Les cellules principalement infectées dans le système reproducteur femelle sont les trophoblastes. Une étude datant de 1919 a pu identifier la présence de *B. abortus* dans les trophoblastes chorioniques chez les ruminants (Smith, 1919). La manière dont la bactérie atteint cette niche de réplication est encore peu connue. On sait que certains trophoblastes exercent une fonction d'érythrophagocytose pour éliminer les globules rouges maternels sénescents et les utiliser comme source de fer pour le fœtus (Anderson, 1986). Cette érythrophagocytose pourrait servir de porte d'entrée pour *Brucella* puisque l'on sait que la bactérie est capable d'entrer et de survivre dans les globules rouges (Vitry *et al.*, 2014).

De plus, il a été montré que la source de carbone préférentielle de *Brucella* était l'érythritol (McCullough and Beal, 1951). Ce polyol est particulièrement abondant dans le fluide fœtal, dans le placenta et l'épididyme de nombreuses espèces ciblées par *Brucella* expliquant pourquoi la bactérie présenterait un tropisme fort pour le tractus reproducteur (Smith *et al.*, 1962).

Le système reproducteur est un site immunologique privilégié. Peu de cellules immunitaires y sont présentes afin d'éviter une réaction immune contre le foetus ou les spermatozoïdes. Le tractus reproducteur est caractérisé par un environnement immunosuppresseur avec notamment une forte production de TGF-β. Par exemple, le placenta va produire des molécules anti-C3 convertase (une molécule impliquée dans la réaction du complément) pour éliminer celle-ci et empêcher la reconnaissance de complexes immuns. Il a aussi été décrit que l'IL-12 et l'IFN-γ (cytokines pro-T_H1) étaient des cytokines induisant l'avortement.

La colonisation du placenta par *Brucella* va donc induire l'avortement par deux mécanismes. En infectant massivement les trophoblastes, *Brucella* va induire l'ulcération du tissu et donc altérer l'intégrité et la fonction du placenta induisant la mort du fœtus. D'autre part, *Brucella* va déclencher une réponse immunitaire caractérisée par la production d'IL-12 et d'IFN-γ induisant l'avortement et favorisant ainsi la dissémination de la bactérie. Une étude a d'ailleurs montré que la neutralisation de l'IFN-γ chez la souris gestante retardait l'avortement causé par *B. abortus* (Kim *et al.*, 2005).

2. Trafic intracellulaire

In vivo, *Brucella* infecte principalement les cellules phagocytaires d'origine myéloïde comme les macrophages et les cellules dendritiques. Le trafic intracellulaire de la bactérie a été décrit en détail *in vitro* dans ces types cellulaires (**Figure 5**). La capture de la bactérie par les macrophages peut suivre deux voies différentes dépendantes ou non de l'opsonisation. Concernant l'entrée des bactéries non-opsonisées, généralement réalisée en début d'infection lorsque les anticorps spécifiques n'ont pas encore été produits, elles rentreraient préférentiellement au niveau des *lipid rafts* (Naroeni and Porte, 2002). Certaines équipes ont tenté d'identifier des récepteurs impliqués dans l'interaction entre la cellule et la bactérie mais sans résultats probants. Un seul récepteur cellulaire, le *Class A scavenger receptor*, pourrait interagir avec le LPS de *Brucella* et favoriser son entrée dans la cellule hôte (Kim *et al.*, 2004). Lorsque la réponse anticorps spécifique a été mise en place, les bactéries peuvent entrer par opsonisation et cette fois indépendamment des *lipid rafts*. Notons que les bactéries rentrent plus facilement par la voie d'opsonisation mais survivent et s'établissent moins bien que par la voie des *lipid rafts* (Rolàn and Tsolis, 2007).

Une fois dans la cellule, *Brucella* réside dans une vacuole (*Brucella containing vacuol*e (BCV)) qui porte des marqueurs d'endosomes précoces. Cette vacuole va ensuite fusionner avec les endosomes tardifs, puis les lysosomes et s'acidifier (pH 4,0-4,5). Il a été montré que l'atténuation de la fusion lysosomale avec la BCV altérait la réplication intracellulaire de *Brucella* et donc l'établissement de sa niche réplicative (Starr *et al.*, 2008). L'acidification de la BCV va entrainer l'induction de l'opéron VirB qui encode notamment le système de sécrétion de Type IV (T4SS), un facteur de virulence crucial qui permet la libération d'effecteurs dans le cytoplasme de la cellules hôte (Billard *et al.*, 2008; Marchesini *et al*., 2011; Jong *et al.*, 2008). La libération de ces effecteurs, va permettre à la bactérie de dévier le trafic intracellulaire de la cellule hôte et d'atteindre un compartiment dérivé du réticulum endoplasmique (RE) (4 à 6 heures) avant de commencer à se répliquer (Deghelt *et al.*, 2014). Certains ont investigué les capacités de la bactérie à disséminer vers d'autres cellules (Starr *et al.*, 2012). *In vitro*, après 72 heures d'infection, la bactérie utilise des voies dérivées de l'autophagie pour quitter la cellule hôte et envahir les voisines.

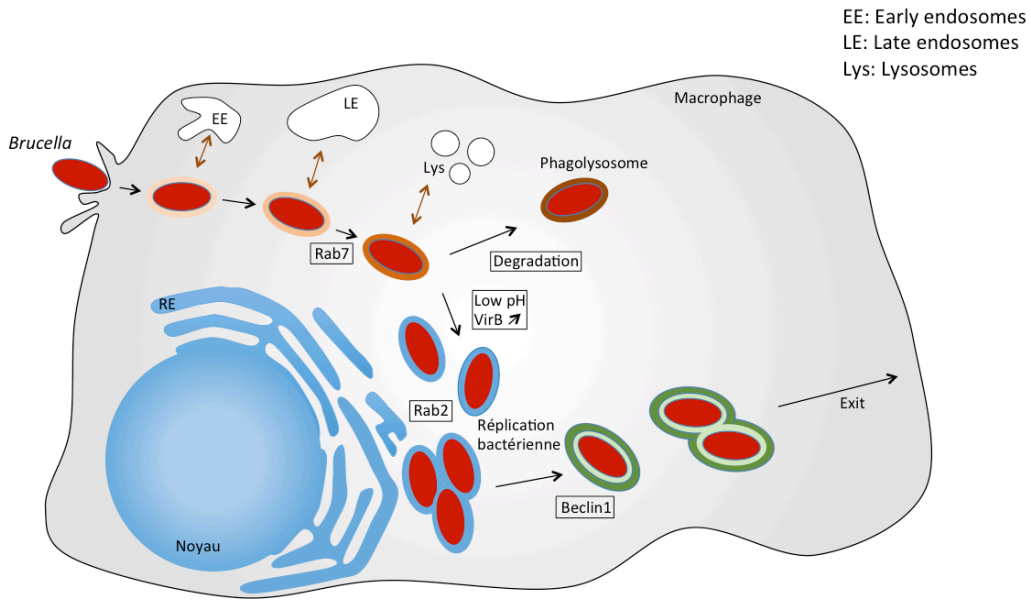


Figure 5 : Trafic intracellulaire de *Brucella* dans la cellule hôte

Après l'entrée dans la cellule hôte, *Brucella* réside dans une vacuole qui fusionnera avec les éléments de la voie endocytaire (les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes successivement) avant d'atteindre un compartiment dérivé du réticulum endoplasmique favorable à la multiplication de la bactérie. Pour sortir, *Brucella* utiliserait les propriétés autophagiques de la cellule hôte.

3. Les modèles d'étude *in vivo* de la relation entre l'hôte et *Brucella*

A Les différents modèles existants

La brucellose est intensivement étudiée en culture cellulaire et dans les modèles animaux. La souris est le modèle *in vivo* le plus couramment utilisé pour étudier l'infection par *Brucella* (Grillo *et al.*, 2012). Ce modèle est généralement utilisé pour investiguer les facteurs de virulence spécifiques de *Brucella*, pour caractériser la réponse immunitaire de l'hôte et pour étudier le potentiel thérapeutique d'un vaccin. Outre la facilité d'élevage et de manipulation du modèle murin, les différentes souches déficientes pour des gènes clés notamment impliqués dans la réponse immunitaire en font un outil indispensable pour caractériser une relation entre l'hôte et l'agent pathogène. De nombreuses études ont notamment montré que la souris produisait une grande quantité d'IL-12 et d'IFN-γ pour contrôler l'infection par *Brucella*. La production est due à l'activation des macrophages et à la réponse Th1 (Cheers, 1984; Copin *et al.*, 2011; Vitry *et al.*, 2012). L'infection de souris déficientes pour la production de cytokines importantes de la réponse immunitaire a permis d'illustrer le rôle de ces acteurs dans le contrôle de l'infection. Il a aussi été décrit que les différentes souches de souris présentaient des profils de susceptibilité différents face à l'infection par *Brucella*. Deux souches couramment utilisées sont les souris C57BL/6 et les souris BALB/c. La première des deux est décrite comme plus résistante à l'infection. En effet, la souris BALB/c présente une capacité réduite à mettre en place une réponse Th1 protectrice qui la rend plus susceptible à l'infection que la souris C57BL/6. Les deux souches de souris présentent aussi des différences au niveau de la polarisation des macrophages. Celle-ci influence les capacités de *Brucella* à se répliquer dans les macrophages infectés (Baldwin and Parent, 2002).

D'autres modèles animaux ont été utilisés pour mieux comprendre la pathologie : rats, cobayes et singes. Par exemple, la consommation chronique d'éthanol augmente la susceptibilité à l'infection par *B. melitensis*, liée à une altération de l'immunité cellulaire, chez le rat (Yumuk *et al.*, 2001). Le cobaye est l'un des modèles de laboratoire le plus susceptible à l'infection. Il développe des lésions granulomateuses après l'infection par seulement 10 CFU de *B. melitensis* ou de *B. suis* (Taran and Rybasov, 1971). La majorité des espèces de *Brucella* sont capables d'infecter le cobaye. Ètant donné qu'il est très susceptible à l'infection ce modèle est souvent utilisé pour tester l'efficacité des traitements antibiotiques contre la brucellose. Quelques équipes ont étudié l'infection par *Brucella* chez les primates

(macaques). Les animaux sont susceptibles à l'infection par différentes voies (orale, respiratoire, sous cutanée) et présentent une persistance de la bactérie plusieurs mois après l'inoculation. Dans certains cas, la bactérie colonise le tractus reproducteur et cause des inflammations de l'épididyme et de l'endomètre (Mense *et al.*, 2004). La bactérie persiste très bien dans les poumons après infection par aérosol. Il a été montré que des macaques naïfs situés dans la même pièce que d'autres singes infectés par aérosol devenaient par la suite infectés avec *Brucella* (Yingst *et al.*, 2010). Il s'agit donc d'un bon modèle pour étudier la transmission de la bactérie par aérosols.

B Les différentes voies d'inoculation de Brucella *chez la souris*

Chez la souris différents modèles d'infection ont été utilisés pour caractériser l'infection par *Brucella* : intra-péritonéale (et intraveineuse), intra-nasale (et aérosol), par ingestion (et intra-gastrique) et sous-cutanée. Les cinétiques d'infections, les organes infectés et les réponses immunes mises à contributions sont différents en fonctions des modèles d'inoculation.

Le mode d'infection par voie intra-péritonéale est le modèle le plus couramment utilisé pour caractériser l'infection par *Brucella*. Cette technique est simple d'application et permet une colonisation quasi instantanée de la majorité des organes avec des taux élevés de bactéries dans la rate et le foie. Ce modèle d'infection, qui reflète peu les voies de transmissions naturelles de la brucellose, a notamment permis de montrer l'importance de la réponse Th1 dans le contrôle de l'infection (Baldwin and Parent, 2002; Stevens *et al.*, 1994).

L'infection par ingestion de lait non pasteurisé venant d'animaux infectés est une voie principale d'infection par *Brucella* chez l'homme. Chez la souris des modèles d'infection intra-gastrique ont été développés pour mimer cette voie de transmission. L'injection intra-gastrique d'une dose élevée de *B. melitensis* (10^{10} CFU) entraine une infection systémique dans les souris BALB/c. La dissémination des bactéries dans l'organisme est probablement due à leur passage à travers la muqueuse intestinale au niveau des cellules M (Paixão *et al.*, 2009). Des souris prétraitées avec du bicarbonate de sodium, afin de neutraliser l'acide gastrique, étaient plus susceptibles à l'infection par *Brucella* que des souris non traitées (Pasquali *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que l'acidité gastrique peut altérer la survie de la bactérie et sa capacité à atteindre l'intestin. Une étude plus récente (Von Bargen *et al*., 2015) montre que *Brucella* pourrait disséminer à l'hôte (l'homme et l'animal) en colonisant le ganglion lymphatique cervical après l'ingestion. Une majorité des patients infectés par

Brucella présentent une lymphadénopatie du ganglion lymphatique cervical suggérant que celui-ci est colonisé par *Brucella* après ingestion de la bactérie. L'infection orale chez la souris a montré que le ganglion cervical était bien infecté par *Brucella* et qu'en parallèle il s'agissait d'un organe facilitant la persistance de la bactérie pendant de nombreuses semaines suivant l'infection (Von Bargen *et al.*, 2015).

L'infection naturelle par *Brucella* peut aussi avoir lieu par inhalation. Le nombre de bactéries nécessaires pour infecter l'homme par aérosol est faible (entre 10 et 100 bactéries) (Bossi *et al.*, 2004). Après infection intra-nasale, aucune lésion histopathologique du poumon n'est observée (structure anatomique du poumon en **Box 5**). Par exemple, nous n'observons pas la formation de granulomes qui sont souvent observés dans la rate ou le foie lors de l'infection par *Brucella*. Après l'infection intra-nasale par *B. melitensis* ($2x10^4$ CFU), il a été observé que la dissémination depuis les poumons vers les autres organes était décalée. Ce n'est qu'à partir du cinquième jour que la bactérie est détectée dans la rate et le foie. À 28 jours la bactérie n'est plus présente dans les poumons et le foie, mais persiste dans la rate pendant plusieurs semaines (Hanot Mambres *et al.*, 2016). Cette voie d'inoculation ajoute une dimension temporelle au suivi de l'infection qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes de dissémination de la bactérie vers les autres organes.

Certains cas d'infection par contact cutané ont été rapportés chez l'homme. Pour mimer cette voie d'infection, des modèles d'infections intradermiques au niveau du coussinet plantaire ont déjà été étudiés. L'infection au niveau du coussinet plantaire est responsable d'une infection moins forte qu'en intra-péritonéale (Chen and Elberg, 1970; Jimenez De Bagues *et al*., 1993; Lison and Demars, Mémoires URBM 2015). Cette voie d'inoculation cause une inflammation locale en partie due à l'injection d'un large volume dans un espace réduit qui induit une destruction tissulaire et un recrutement cellulaire local. Après l'injection intradermique il y a une dissémination rapide de la bactérie vers le ganglion drainant (ganglion poplité), le sang, la rate et le foie.

Ces différents modèles d'infection *in vivo*, en plus des données générées en culture cellulaire, ont permis d'apporter de nombreuses données sur les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *Brucella* en identifiant les mécanismes immunitaires impliqués. D'autres études ont permis d'identifier les mécanismes d'échappement utilisés par la bactérie pour

établir sa chronicité chez l'hôte et minimiser sa reconnaissance par les acteurs de l'immunité (reviewed in Gorvel, 2008).

Box 5 : Architecture des voies respiratoires

Le système respiratoire se divise en deux grandes parties. Les voies respiratoires supérieures qui sont composées de la cavité nasale, la bouche et le nasopharynx et qui ont pour but de filtrer, humidifier et ajuster la température de l'air inhalé. Les voies respiratoires inférieures sont responsables de la conduction de l'air et des échanges gazeux avec le sang. Elles commencent au niveau du larynx et continuent vers la trachée où elles se divisent en deux bronches primaires. Celles-ci se diviseront en bronches secondaires et tertiaires avant d'aboutir sur les bronchioles composées d'alvéoles assurant les échanges gazeux (Scudamore and Mclnnes, 2014). Deux types cellulaires majeurs composent les alvéoles (**figure 6**). Les pneumocytes de type I qui recouvrent la surface des alvéoles et les pneumocytes de type II qui produisent le surfactant (complexe lipoprotéique qui empêche les poumons de collapser) (Goerke, 1998). Chaque alvéole est entourée d'un réseau de capillaires sanguins où les pneumocytes de type I sont en contact avec les cellules endothéliales pour assurer les échanges gazeux. L'espace interstitiel (entre les alvéoles) compte aussi de nombreuses cellules immunitaires comme des macrophages interstitiels, des cellules dendritiques et des lymphocytes T. Dans l'alvéole, les macrophages alvéolaires vont capturer les particules de l'air qui y arrivent, ayant échappé aux filtres précédents.

Dans le tissu pulmonaire, nous retrouvons aussi des *clusters* de cellules immunitaires qui font partie des *Mucosa-Associated Lymphoid Tissues* (MALTs) qui sont appelés BALTs pour *Bronchus-Associated Lymphoid Tissues*. Il s'agit d'un lieu d'initiation de la réponse immunitaire. Le centre de la structure est constitué de lymphocytes T et B qui sont entourés par des cellules dendritiques et des macrophages (Randall, 2010).

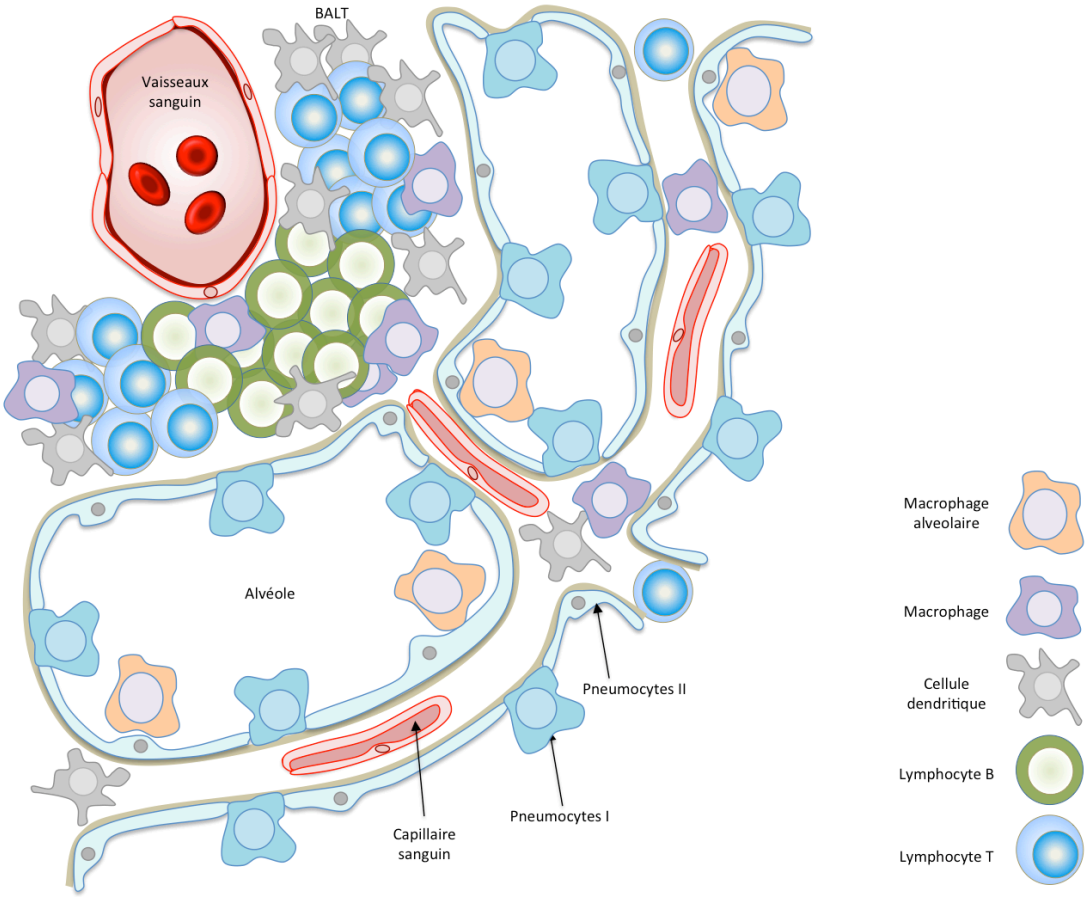


Figure 6 : Microarchitecture du poumon.

4. Brucellose : une relation hôte/agent pathogène dynamique

A La réponse immune innée

Le système immunitaire inné est capable de détecter l'invasion de l'hôte par un agent pathogène en reconnaissant différents motifs conservés chez celui-ci, les *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Cette reconnaissance est médiée par les *pattern-recognition receptors* (PRRs), des récepteurs spécifiques des PAMPs (**Tableau 4**). Une fois l'agent pathogène « identifié », l'hôte va déclencher une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire adaptée pour tenter de l'éliminer (détails de la réponse immunitaire innée dans la **Box 6**). En conséquence, certains agents pathogènes comme *Brucella* ont développé des mécanismes qui permettent d'échapper aux attaques de la réponse immunitaire (reviewed in Gorvel, 2008). *Brucella* est une bactérie furtive, c'est-à-dire qu'elle va limiter l'expression ou modifier la structure de certains PAMPs pour diminuer sa détection par les PRRs.

- Par exemple, *Brucella* possède un lipopolysacharide (LPS) modifié (la chaine-O est allongée) qui entraine un encombrement stérique qui limite sa reconnaissance par le *toll like receptor* (TLR) 4 et donc l'activation de la réponse immunitaire (Cardoso *et al.*, 2006).
- *Brucella* ne possède pas de pili, de fimbriae ou de capsule qui sont des éléments détectés par le système immunitaire (Martirosyan *et al.*, 2011).
- La flagelline exprimée par *Brucella* ne possède pas le domaine de reconnaissance par le TLR 5 (Terwagne *et al.*, 2013).

En plus de modifier la structure de ses PAMPs, *Brucella* présente d'autres mécanismes pour inhiber le développement de la réponse immunitaire lorsqu'elle est rentrée dans la cellule hôte. Par exemple, des protéines de *B. abortus* (*Brucella Tir-containing protein* (Btp1 et Btp2)) présentent des homologies de séquence avec les récepteurs *Toll/Interleukin receptors* (TIR) et vont interférer avec les voies de signalisation des TLR 2 et 4. Cela aura pour conséquence une diminution de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques infectées se traduisant par une diminution de l'expression des marqueurs d'activation et de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-12 (Cirl *et al.*, 2008) (Salcedo *et al.*, 2008).

Le LPS de *Brucella* présente aussi une affinité pour le *major hitocompatibility complex* (MHC) II en surface des cellules immunitaires. Ces deux éléments vont former un complexe

non fonctionnel incapable d'activer les lymphocytes T (Forestier *et al.*, 2000). *Brucella* est aussi capable de séquestrer le complexe MHC I dans l'appareil de Golgi et diminuer l'activation des cellules cytotoxiques par les cellules immunitaires innées (Barrionuevo *et al.*, 2013).

Malgré les différents mécanismes d'échappement qui limitent la reconnaissance de *Brucella* par les PRRs, il est important de noter que certains récepteurs immunitaires sont capables de la détecter et d'activer une réponse immunitaire effective. Par exemple, il a été montré chez la souris que l'ADN de la bactérie pouvait être reconnu par le TLR 9 (Copin *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2008). Des souris déficientes pour le TLR 9 sont plus susceptibles à l'infection et présentent une diminution de la production de l'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques corrélées à la diminution du nombre de cellules produisant l'iNOS et l'IFN-γ (Macedo *et al.*, 2008). Il a été montré que la reconnaissance de la flagelline par l'inflammasome NLRC4 limitait la persistance de la bactérie chez la souris (Terwagne *et al.*, 2013).

Tableau 4 : Liste des PRRs et leur(s) PAMPs associé(s)	
PRRs transmembranaires	PAMPs
Toll-Like Receptors	
TLR1	Peptidoglican, Lipoprotéine
TLR2	Lipoprotéine, Glycolipides, Fimbriae
TLR4	LPS, Fimbriae, Pili
TLR5	Flagelline
TLR6	Lipoprotéines
TLR7/8	ARN simple brin
TLR9	Motifs CpG non méthylés dans l'ADN
Scavenger Receptors	
SR-AI/II	LPS, Acide Lipotéichoïque, Motifs CpG
MARCO	
SR-B	
C-Type Lectins	
Mannose Receptor	LPS, Fucose, Polysaccharides capsulaires
DC-Sign	High mannose, Fucose
Dectin-1	β1,3-glucan
PRRs cytosoliques	
Nod-Like Receptors	
NOD1	Acide diaminopimélique
NOD2	Dipeptide muramyl
NALP1	Dipeptide muramyl
NALP3	ARN, ADN
IPAF	Flagelline
PRRs sécrétés	
Collectins	Carbohydrate (ex : capsule bactérienne)
Ficolins	
Pentraxins	

Box 6 : La réponse immunitaire innée lors d'une infection

La réponse immunitaire innée est constituée d'un ensemble d'éléments solubles et cellulaires qui coopèrent pour rapidement faire face aux attaques contre l'organisme. Il s'agit de la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Les cellules immunitaires innées vont rapidement s'activer après la reconnaissance de structures conservées chez les agents pathogènes (PAMPs) par des récepteurs spécialisés (PRRs). La réponse innée se développe très rapidement mais n'est pas spécifique de l'agent infectieux. En effet, le nombre de PRRs est limité alors que les agents pathogènes comportent de nombreux autres antigènes qui leur sont propres et qui ne sont pas reconnus par les récepteurs de la réponse innée. Les cellules immunitaires innées utilisent trois mécanismes différents pour contrôler rapidement les attaques par un agent pathogène.

- La phagocytose : Les cellules phagocytaires vont activement internaliser les agents pathogènes dans une vacuole intracellulaire qui fusionnera avec de nombreuses vacuoles de la voie endosomale dont « in fine » les lysosomes contenants un panel d'enzymes de digestion qui élimineront le micro-organisme.
- La réaction inflammatoire : Lors d'une infection les tissus endommagés et les cellules immunitaires résidentes vont sécréter des chemokines qui recruteront les cellules phagocytaires de la circulation vers les tissus infectés. De plus, au site d'infection, les cellules vont libérer des médiateurs qui augmenteront les fonctions phagocytaires des cellules recrutées. Les médiateurs libérés (cytokines, mais aussi prostaglandines et amines vasoactives) vont modifier l'environnement tissulaire pour faciliter le déroulement de la réponse immunitaire comme par exemple augmenter la perméabilité vasculaire pour faciliter l'invasion par les cellules phagocytaires. Cela se caractérise par les signes classiques de l'inflammation tels que le gonflement, la chaleur, la rougeur et la douleur (Reviewed in Moser and Oberdan, 2010).
- La cytotoxicité : Les cellules cytotoxiques (comme les Natural Killers, NK cells) vont reconnaître les cellules infectées et utiliser différents mécanismes pour induire la mort de la cellule hôte et donc tenter d'éliminer l'agent pathogène qui y réside. Par exemple, la cellule cytotoxique va libérer différentes molécules comme la perforine qui va polymériser à la surface de la cellule hôte pour former un pore permettant à un deuxième élément, les gramzymes, d'entrer dans la cellule infectée pour induire l'apoptose de celle-ci. La cellule cytotoxique peut aussi induire l'apoptose de la cellule infectée en se liant à un récepteur spécifique présenté par la cellule infectée (interaction Fas-FasLigand). La production de TNF-α par la cellule cytotoxique va aussi envoyer des messages de mort cellulaire à la cellule infectée (Topham and Hewitt, 2009).

Si la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante pour éliminer l'agent pathogène, une réponse immunitaire plus tardive mais plus efficace, la réponse immunitaire adaptative, va se développer. Les cellules de l'immunité et plus particulièrement les cellules phagocytaires professionnelles vont reconnaître l'agent pathogène, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (comme les ganglions lymphatiques et la rate) et présenter les antigènes de celui-ci aux cellules adaptatives (lymphocytes T) via le complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex*, MHC). L'interaction entre ces deux cellules permet l'activation de la réponse immunitaire adaptative (détail en **Box 7**).

B Rôle des populations cellulaires de l'immunité adaptative dans le contrôle de **Brucella**

Après la reconnaissance de l'agent pathogène, les cellules présentatrices d'antigènes (*Antigen presenting cell*, APC) vont mettre en place une réponse immunitaire adaptative plus spécifique qui viendra renforcer la lutte contre le micro-organisme (détail de la réponse immunitaire adaptative en **Box 7**). Comme il a été décrit précédemment, *Brucella* limite sa reconnaissance par le système immunitaire inné en inhibant l'activation des cellules dendritiques et la présentation antigénique. Néanmoins, l'hôte réussit à développer une réponse immunitaire T helper (Th) adaptée pour contrôler l'infection. En effet, il a été montré que les souris déficientes pour RAG1 (absence de lymphocytes B et T matures) présentaient de très grosses difficultés à contrôler l'infection par *Brucella* démontrant un rôle important de la réponse adaptative dans le contrôle de l'infection (Copin *et al*., 2012; Vitry *et al.*, 2012).

De nombreuses équipes ont étudié le rôle des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection. Une cytokine clé de la réponse immunitaire, l'IFN-γ, joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection par *Brucella*. Il est même crucial car il assure la survie de la souris infectée (Baldwin and Parent, 2002; Murphy *et al.*, 2001). Il a régulièrement été montré que le rôle protecteur des lymphocytes T était associé à leurs capacités à produire de l'IFN-γ.

Chez la souris, lors d'une infection intra-péritonéale, il est bien décrit que les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ produisent de l'IFN-γ en réponse à l'invasion par *Brucella* (Sathiyaseelan *et al.*, 2006; Copin *et al.*, 2011). Cependant la production par les lymphocytes T $CD8^+$ n'est effectuée que pendant les premiers jours d'infection. Après dix jours, les lymphocytes T $CD4^+$ sont les producteurs principaux d'IFN-γ chez les souris wild type (de type sauvage) (Copin *et al*., 2011). L'infection de souris déficientes pour TAP-1 (absence de lymphocytes T $CD8^+$ matures) et MHC II (absence de lymphocytes T $CD4^+$ matures) montrent que la production de l'IFN-γ par les cellules T $CD4^+$ est essentielle pour le contrôle tardif de l'infection et que les cellules T $CD8^+$ sont incapables de contrôler l'infection en absence des lymphocytes T $CD4^+$ (Vitry *et al*., 2012).

On a longtemps considéré que la réponse immune Th1 (dominée par l'IFN-γ) était la seule réponse Th impliquée dans le contrôle de l'infection par *Brucella*. Pourtant, la réponse Th17 est théoriquement aussi décrite comme impliquée dans la lutte contre les agents pathogènes intracellulaires (Bai *et al.,* 2009). Cependant, l'infection intra-péritonéale de souris déficientes

pour IL-17R$_\alpha$, IL-21R et IL-22 (déficientes pour la réponse Th17) n'induit qu'une très faible susceptibilité à l'infection suggérant un rôle mineur de la réponse Th17 dans le contrôle de l'infection par *B. melitensis* (Vitry *et al.,* 2012). Plus récemment, dans un modèle d'infection intra-nasale (Hanot Mambres *et al.*, 2016), il a été montré un rôle décisif de l'IL-17 dans les premiers jours de l'infection pulmonaire. En effet, les souris IL-17R$_\alpha^{-/-}$ présentent une susceptibilité accrue dans les poumons les 12 premiers jours qui suivent l'infection. Après ce délai la réponse Th1 seule parvient à contrôler l'infection.

La fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8$^+$ semble peu efficace contre *Brucella*. Il a notamment été montré qu'une protéine de *B. melitensis* (Btp1) inhibait les fonctions des cellules T CD8$^+$ cytotoxiques (Durward *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2016). Par contre, il a récemment été découvert une fonction cytotoxique de certains lymphocytes T CD4$^+$ (qui produisent du granzyme) lors de l'infection par *B. abortus* chez la souris (Martirosyan *et al.*, 2013). Il s'agit d'une population cellulaire très peu décrite dont il reste encore à déterminer le phénotype exact et les modes d'action.

D'autres lymphocytes sont aussi impliqués dans la réponse immunitaire et sont appelés lymphocytes T non conventionnels. Il s'agit des lymphocytes γδ et des lymphocytes NK T. Les lymphocytes γδ sont principalement localisés au niveau des épithéliums de surface comme la peau, les poumons et l'intestin. Ces cellules jouent un rôle important dans la lutte contre les agents pathogènes intracellulaires comme *M. tuberculosis* (McGill *et al.*, 2014) et *L. monocytogenes* (Tramonti *et al.*, 2008). Le rôle de ces cellules lors de l'infection par *Brucella* n'a pas été largement investigué. Il est par exemple décrit que ces cellules s'activent et prolifèrent dans le sang chez les patients infectés avec *B. melitensis* (Bertotto *et al.*, 1993). Il a aussi été montré que les cellules γδ bovines réagissent rapidement à l'infection par *B. abortus* et altèrent (via la production d'IFN-γ) la réplication intracellulaire de la bactérie dans des macrophages en co-culture (Skyberg *et al*., 2011). Plus récemment, il a été montré que lors de l'infection intra-nasale chez la souris, les cellules γδ jouent un rôle précoce dans le contrôle de l'infection pulmonaire. En effet les souris TCR-γδ$^{-/-}$ présentent une susceptibilité accrue dans les poumons les 12 premiers jours d'infection par *B. melitensis* (Hanot Mambres *et al.*, 2016).

Le rôle des lymphocytes NK T dans le contrôle de la brucellose a été investigué *in vitro*. Il a été montré que ces cellules diminuaient la croissance de *Brucella* en macrophages grâce à

leurs fonctions cytotoxiques. Ils induisent l'apoptose des macrophages infectés par la voie FAS-FASL et la libération de granules lytiques (Bessoles *et al.,* 2009).

Concernant le rôle des lymphocytes B dans le contrôle de la brucellose, il semble bien établi qu'ils ne contribuent pas au contrôle primaire de l'infection. Au contraire, les souris déficientes pour les lymphocytes B montrent une résistance accrue par rapport à l'infection de souris wild-type. Ces souris éliminent plus facilement l'infection par *Brucella*. L'hypothèse serait que les lymphocytes B présents chez la souris wild-type exerceraient des fonctions immunosuppressives via la production d'IL-10 et de TGF-β sur le développement de la réponse Th1 protectrice (Goenka *et al.*, 2011; Vitry *et al.*, 2012). L'équipe de Sergio Oliviera a montré que la neutralisation de l'IL-10 (produite par différents types cellulaires lors de l'infection par *Brucella* chez la souris) augmentait les taux de cytokines pro-inflammatoires et facilitait l'élimination de *B. abortus* chez les souris infectées (Corsetti *et al.*, 2013). L'IL-10 produite durant l'infection favoriserait la réplication de la bactérie dans les macrophages en facilitant la déviation du trafic vacuolaire par la bactérie (Xavier *et al.*, 2013). Il a aussi été montré par l'équipe de Baldwin que les lymphocytes B pourraient être une niche intracellulaire pour *Brucella* et participer ainsi à l'établissement de la chronicité de la pathologie (Goenka *et al.*, 2012).

Box 7 : La réponse immunitaire adaptative

La réponse immune adaptative est le fruit de la réponse des lymphocytes T et B. Elle se met en place plus tardivement lors de l'infection mais est beaucoup plus spécifique de l'agent pathogène et donc plus efficace. Les lymphocytes ont la capacité de reconnaître un large panel de structures moléculaires car ils génèrent durant leur maturation une quantité presque illimitée de récepteurs antigéniques différents grâce à un processus de recombinaison de l'ADN.

Pour être activé, un lymphocyte T nécessite de reconnaître un antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, DCs) ou une cellule infectée, un co-récepteur et un signal soluble (cytokine). Une fois activé, les lymphocytes T vont se multiplier et devenir une nouvelle ligne de défense contre l'agent pathogène. Ces lymphocytes T peuvent avoir une fonction cytotoxique et tuer les cellules infectées (lymphocytes T $CD8^+$) ou peuvent produire des cytokines spécifiques qui activeront d'autres cellules qui neutraliseront l'infection (lymphocytes T $CD4^+$). Les lymphocytes les plus efficaces vont se différencier pour former une mémoire immunologique qui assure une protection de longue durée qui facilitera le contrôle d'une réinfection avec le même agent pathogène. Les T $CD4^+$ vont, en fonction des signaux d'activations reçus, se différencier en sous-populations différentes et plus spécifiques du type d'infection (**Box 8**).

Il existe aussi d'autres populations de lymphocytes T. Les *Natural Killer (NK) T cells* sont activés par des PAMPs particuliers (glycolipides) présentés par un complexe similaire au MHC I appelé le CD1. Ces cellules produisent un large panel de cytokines très rapidement après la stimulation antigénique qui module rapidement la réponse immunitaire (Godfrey *et al.*, 2010). Les lymphocytes T γδ s'activent très rapidement sans nécessiter d'activation antigène-spécifique et sont très présents dans les surfaces mucosales. Ils vont produire des cytokines inflammatoires comme l'IFN-γ et l'IL-17.

Pour être activé, un lymphocyte B a besoin de deux signaux distincts. Le premier est la reconnaissance d'un antigène grâce à son récepteur (*B cell receptor* : BCR) et le deuxième est un signal dépendant ou non des lymphocytes T. En effet certains lymphocytes B nécessitent une interaction avec les lymphocytes T pour être activés. Dans ce cas, le lymphocyte B joue le rôle d'une cellule présentatrice d'antigène. L'antigène reconnu par le BCR est internalisé par le lymphocyte B, digéré et présenté à sa surface via le complexe majeur d'histocompatibilité. Le lymphocyte T va reconnaître l'antigène à la surface du lymphocyte B et l'activera par la production de cytokines (activation T-dépendante). Le lymphocyte B peut aussi être activé indépendamment des lymphocytes T et recevoir un signal activateur directement par certains types d'antigènes comme le LPS et la flagelline (activation T-indépendante). Une fois activés, les lymphocytes B vont proliférer dans les organes lymphoïdes secondaires et se différencier en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes vont produire les anticorps qui faciliteront la lutte contre les agents pathogènes extracellulaires. Il existe différents types d'anticorps qui sont produits en fonction de la réponse immunitaire mise en place et donc spécifique du type d'agent pathogène (**Tableau 5**).

Après l'activation immunitaire, des lymphocytes B et T particuliers, les lymphocytes régulateurs, sont capables d'inhiber la réponse immunitaire mise en place pour limiter les effets délétères d'une forte réponse pour l'hôte. La production d'IL-10 et de *transforming growth factor* (TGF)-β exerce un contrôle négatif sur la réponse pro-inflammatoire.

Box 8 : L'activation des lymphocytes T CD4$^+$

Les lymphocytes T CD4$^+$ activés par le complexe MHCII vont se différentier en sous-classes de réponses immunitaires adaptées à la nature du pathogène détecté (**figure 7**). On parle de réponse immune T helper (Th). Il existe trois types majeurs de réponses immunes T helper. La réponse Th1 est adaptée à la lute contre les pathogènes intracellulaires, la réponse Th2 permet l'élimination des parasites extracellulaires comme les helminthes et la réponse Th17 est principalement décrite pour être impliquée dans la lute contre les bactéries extracellulaires. D'autres types de réponses Th sont aussi décrites mais leurs fonctions sont encore peu connues. La réponse Th9 est déclenchée lors de réactions allergiques et la réponse Th22 semble être impliquée dans la réparation tissulaire. Les lymphocytes Th folliculaires (Thf) sont impliqués dans la formation des centres germinatifs au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

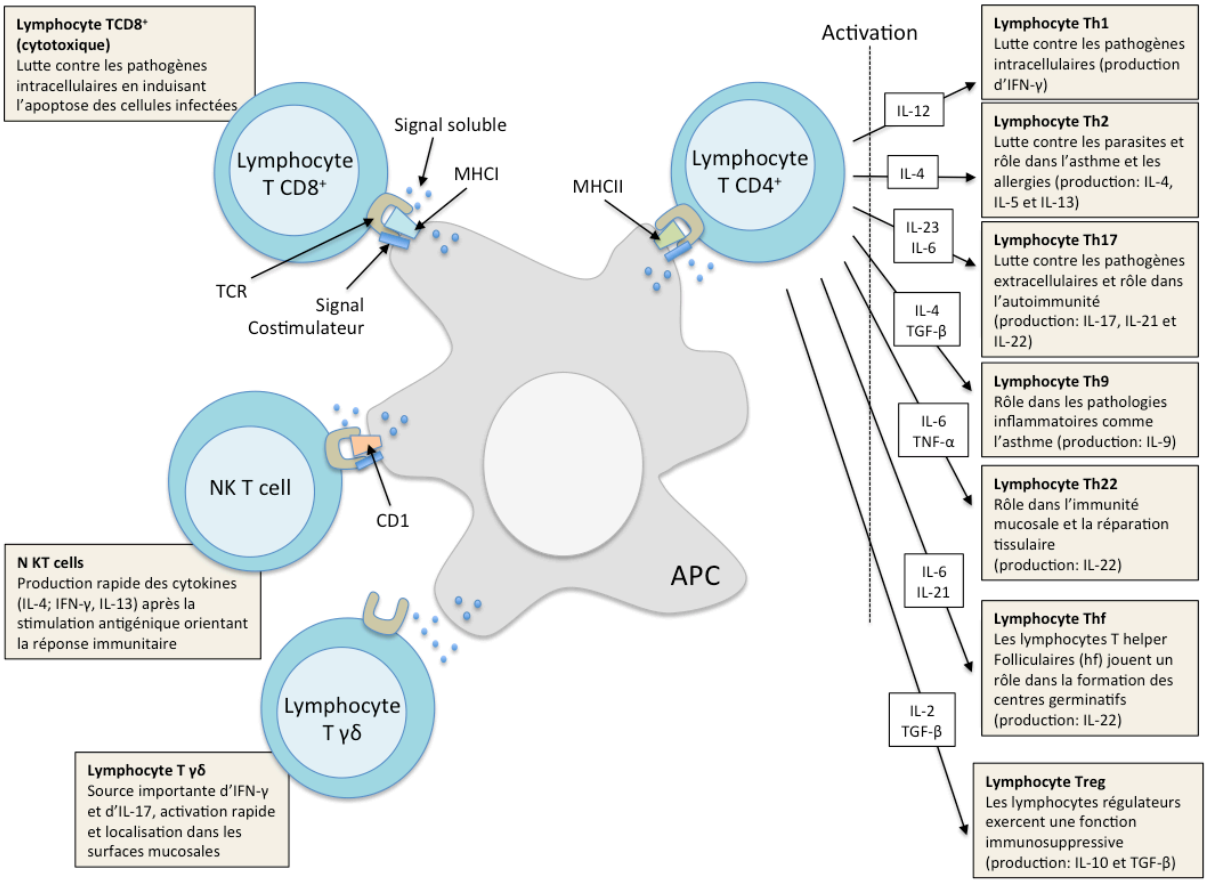


Figure 7 : Différentes populations de lymphocytes T et leurs fonctions.

Tableau 5 : Types d'anticorps (ou immunoglobuline (Ig)) produits par les lymphocytes B		
Classe	Structure	Propriétés
IgA	Monomérique et dimérique	Présents dans les muqueuses intestinales respiratoires et urogénitales.
IgD	Monomérique	Anticorps membranaires des lymphocytes B naïfs.
IgE	Monomérique	Impliqués dans les infections parasitaires et les allergies. Ils induisent la production d'histamine par les basophiles et les mastocytes.
IgG	Monomérique	Immunoglobuline majeure de la réponse immunitaire. Ils sont capables de passer la barrière placentaire chez certains animaux comme les carnivores, les primates et les rongeurs.
IgM	Monomérique et pentamérique	Récepteurs membranaires des lymphocytes B naïfs. Présents dans le sérum et sécrétés rapidement durant la réponse immunitaire.

C Le granulome, une forteresse immunitaire

Lorsque la réponse immunitaire ne parvient pas à éliminer un agent pathogène, elle va mettre en place une structure sophistiquée qui confinera l'agent infectieux: le granulome. Ce dernier est une structure dynamique composée de cellules immunitaires (principalement des macrophages entourés de lymphocytes T) qui coopèrent pour lutter contre les agents pathogènes et réduire leur dissémination. La fonction première du granulome est de permettre au système immunitaire d'améliorer l'élimination de l'agent pathogène mais il a été montré que sa formation pouvait être favorable au micro-organisme et faciliter sa prolifération avant de disséminer (Davis and Ramakrishnan, 2009; Ramakrishnan, 2012). Cette fonction ambivalente du granulome a été décrite lors de l'infection par *M. tuberculosis*.

La brucellose est une pathologie granulomateuse associée à l'apparition de granulomes dans la rate et le foie. Cela a notamment été montré chez la souris lors de l'infection par *B. melitensis* (Copin *et al*., 2012; Hanot Mambres *et al.,* 2016). Ces granulomes sont composés de macrophages et de cellules dendritiques inflammatoires infectées entourées par une couronne de lymphocytes T et quelques granulocytes (**Figure 8**). La distribution des granulomes semble varier en fonction du mode d'infection chez la souris. Après infection intra-péritonéale, ils se localisent principalement dans la pulpe rouge de la rate (durant les 10 premiers jours) avant de se relocaliser en pulpe blanche (Copin *et al*., 2012) tandis qu'après infection intra-nasale ils semblent directement se localiser dans les follicules de pulpe blanche. Notons que lors de l'infection pulmonaire avec *B. melitensis*, nous n'observons pas la formation de structures similaires aux granulomes dans les poumons (Hanot Mambres *et al*., 2016). Après infection par *Brucella*, la formation du granulome semble dépendante de la réponse Th1 et favorable à l'élimination bactérienne. En effet, les souris déficientes pour MyD88, l'IL-12 et l'IFN-γ sont plus susceptibles à l'infection et présentent des structures de granulomes altérées (Copin *et al*., 2012).

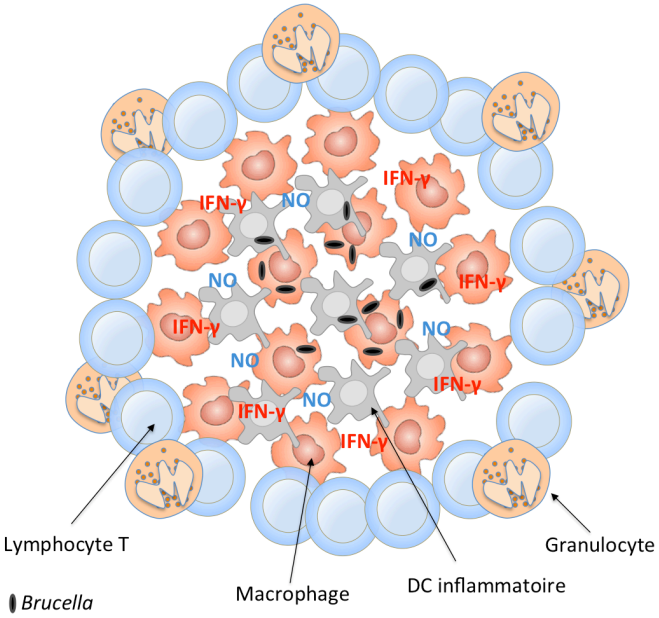


Figure 8 : Structure du granulome splénique après infection par *B. melitensis* chez la souris.

D Contrôle d'une infection secondaire par **Brucella**

Lorsqu'un animal est infecté par *Brucella*, la réponse immunitaire se met en place pour éliminer l'agent pathogène. Certains lymphocytes vont se différencier pour devenir des cellules mémoires et assurer une protection à long terme et contrer l'éventualité d'une nouvelle infection avec l'agent pathogène.

De nombreuses données montrent que l'hôte est capable de développer une réponse mémoire protectrice lors de l'infection par *Brucella*. Par exemple, lors de l'infection intra-péritonéale de souris, il a été montré que l'immunité humorale jouait un rôle lors d'une réinfection par *B. melitensis* (Vitry *et al*., 2014; Goenka *et al.*, 2011). Les anticorps jouent un rôle essentiel en limitant la dissémination de *Brucella* dans le sang de la souris infectée par voie intra-péritonéale. Les anticorps sont cruciaux pour assurer la protection dans la rate puisque les souris déficientes pour la maturation des lymphocytes B (souris MuMT$^{-/-}$) ne sont pas capables d'éliminer la réinfection par *Brucella* dans la rate contrairement aux souris wild-type. Les souris AID$^{-/-}$ (incapacité à réaliser le switch isotypique et donc production d'IgMs seulement) sont protégées lors d'une réinfection par *Brucella*, suggérant que les IgMs sont à elles seules capables d'assurer la protection contre une réinfection intra-péritonéale par *B. melitensis* (Vitry *et al*., 2014). Le rôle des anticorps dans le contrôle d'une réinfection par *Brucella* a récemment été rediscuté. Il semblerait que lors d'une réinfection intra-nasale par *B. melitensis* l'immunité humorale ne soit pas nécessaire pour contrôler la réinfection (Hanot Mambres *et al.,* 2016). En effet, la capacité à contrôler la réinfection intra-nasale de souris déficientes pour la maturation des lymphocytes B n'est pas différente de la souris wild type. Il semblerait donc que la voie d'inoculation influence le rôle de l'immunité humorale dans le contrôle d'une réinfection avec *Brucella*.

L'immunité cellulaire joue un rôle essentiel dans la lutte contre les infections secondaires. Chez la souris, dans un modèle d'infection intra-péritonéale et intra-nasale, il a été montré que comme pour contrôler l'infection primaire, les lymphocytes T CD4^{+} et la production d'IFN-γ étaient essentiels au contrôle de la réinfection par *B. melitensis* (Vitry *et al.*, 2014; Hanot Mambres *et al.*, 2016). En effet, les souris déficientes pour Myd88, MHCII et l'IL-12 (associées à une diminution de l'IFN-γ produit) sont incapables de contrôler la réinfection par *B. melitensis*. Dans le modèle de réinfection intra-péritonéale, ces cellules jouent un rôle plus tardif pour éradiquer la bactérie dans la rate. Par contre lors de l'infection intra-nasale, la réponse mémoire cellulaire joue un rôle protecteur directement au site d'infection.

L'élimination dans le poumon est plus rapide et semble empêcher la dissémination aux autres organes (rate et foie).

Dans le modèle de réinfection par voie intra-nasale, il a été montré une contribution de la réponse Th17 dans le contrôle de la réinfection par *B. melitensis* (Hanot Mambres *et al.*, 2016). Une autre étude montre que la vaccination orale avec une protéine membranaire de *Brucella* (Omp19) protège contre l'infection intra-nasale avec *B. abortus* et que cette protection serait dépendante de la production d'IL-17 (Pasquevich *et al*., 2011). De nouveau, la voie d'infection influence les acteurs immunitaires protecteurs de la réponse mémoire.

5. Phénotype des cellules infectées par *Brucella*

La chronicité de la brucellose découle des capacités de la bactérie à survivre et se répliquer dans la cellule hôte en modulant la réponse immune (Köhler *et al*., 2003; Sathiyaseelan *et al.*, 2006). Cette niche intracellulaire va protéger la bactérie des agressions extracellulaires comme la réponse humorale.

Il est bien décrit que *Brucella* est capable de survivre et se répliquer dans une large gamme de types cellulaires différents incluant les cellules phagocytaires professionnelles comme les macrophages (Forestier *et al.*, 1999), les cellules dendritiques (Billard *et al.*, 2005), les neutrophiles (Riley and Robertson, 1984) et les ostéoblastes (Delpino *et al.*, 2009) et les cellules non phagocytaires comme les cellules trophoblastiques (Anderson, 1986), les cellules épithéliales (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998) et les cellules fibroblastiques (Detilleux *et al.*, 1990). La plupart des études qui ont décrit les cellules favorables à la réplication de *Brucella* ont été réalisées *in vitro* où il semblerait que *Brucella* soit capable d'entrer dans un large panel de types cellulaires différents. *In vivo*, les types cellulaires réellement infectés sont plus restreints. Ces dernières années, notre groupe et d'autres équipes ont identifié certains types cellulaires infectés par *Brucella*.

En 2012, il a été montré par immunohistologie que les cellules infectées dans la rate durant les premiers jours d'infection (infection de 10^8 CFU par voie intra-péritonéale) étaient majoritairement des macrophages. Les macrophages de la pulpe rouge et les macrophages metallophiliques de la zone marginale (MMMs) (Copin *et al.*, 2012). Après quelques jours d'infection, les bactéries se localisent dans les granulomes. L'utilisation de souris susceptibles à l'infection a permis d'identifier un phénotype particulier pour les cellules infectées à long

terme dans la rate après infection intra-péritonéale. Ces cellules sont des cellules $CD11c^+$ $DEC\text{-}205^+$ et sont localisées dans les granulomes et dans la pulpe blanche de la rate (Copin *et al*., 2012).

Une étude plus récente a apporté des informations complémentaires sur le phénotype des cellules réservoirs dans la rate de souris susceptibles après infection intra-nasale cette fois (Hanot Mambres *et al.,* 2015). Toujours par immunohistologie et comme dans l'étude précédente, le phénotype des cellules infectées à long terme par *Brucella* est positif pour les marqueurs CD11c et DEC-205. De plus il a aussi été montré que ces cellules étaient riches en lipides et positives pour l'arginase 1 (marqueurs de macrophages alternatifs, voir **Box 9**, et chapitre sur la polarisation des macrophages). Par contre la cellule est négative pour d'autres marqueurs de macrophages alternatifs comme FIZZ1 et CD301. Ces données suggèrent que le phénotype de la cellule réservoir « à long terme » de *Brucella* est particulier et qu'il s'agit d'une cellule favorable à la survie et la réplication de la bactérie.

Dans les poumons, différentes études ont montré que la majorité des cellules infectées chez la souris après infection intra-nasale sont des macrophages alvéolaires et quelques cellules dendritiques (Archambaud *et al.*, 2010; Xavier *et al.*, 2013). Les bactéries vont s'y répliquer massivement et certaines cellules infectées vont migrer vers les ganglions lymphatiques pour activer la réponse immunitaire adaptative et en contrepartie faciliter la dissémination de la bactérie.

Il a aussi été montré que *B. melitensis* persistait très longtemps dans le sang de souris infectées par voie intra-péritonéale. Dans les premières heures qui suivent l'infection, la plupart des bactéries sont extracellulaires mais pour échapper à la réponse humorale et persister plusieurs semaines dans le sang il a été montré que *Brucella* rentre dans les globules rouges (Vitry *et al*., 2014). Après 3 jours d'infection, la plupart des bactéries présentes dans la circulation sanguine sont à l'intérieur d'un globule rouge. Les images montrent qu'il n'y a généralement qu'une seule bactérie par globule rouge suggérant que la cellule hôte assure plutôt une fonction de protection par rapport à la réponse humorale et pas un site de division actif. L'entrée dans les globules rouges peut aussi faciliter la dissémination de la bactérie à l'organisme et aux autres individus. Chez l'hôte différentes cellules de l'organisme assurent une fonction d'érythrophagocytose pour assurer le turnover des globules rouges. Par exemple, les macrophages de la pulpe rouge et certaines cellules trophoblastiques, sont deux types

cellulaires qui pourraient être infectés lors de « l'ingestion » de globules rouges positifs pour *Brucella*. D'autre part, la persistance dans le sang de l'hôte ouvre des perspectives sur une potentielle transmission de la brucellose par les insectes hématophages.

Certains lymphocytes semblent être aussi une niche cellulaire pour *Brucella*. En 2012, l'équipe de Baldwin, a montré via l'utilisation d'une souche de *Brucella* fluorescente et des techniques de cytométrie en flux que la bactérie rentrait dans certains lymphocytes B spléniques (Goenka *et al.,* 2012). L'étude montre que *B. abortus* est capable d'infecter les lymphocytes B mais que la bactérie présente des difficultés à s'y répliquer suggérant que malgré le fait que la bactérie y rentre, la cellule hôte n'est pas favorable à sa multiplication. Ils ont aussi montré que dans la rate, la bactérie rentre préférentiellement dans les lymphocytes B de la zone marginale par comparaison aux lymphocytes B folliculaires.

Ces différentes études ont montré que *Brucella* infectait des types cellulaires variés au cours de l'infection et en fonction des organes. Parvenir à identifier une niche impliquée dans la persistance de la bactérie permettrait d'affiner les stratégies thérapeutiques et faciliter l'élimination de la bactérie.

6. La brucellose et les pathologies croisées

Avec un minimum de 500.000 nouveaux cas humains recensés chaque année la brucellose est l'une des pathologies bactériennes chroniques les plus fréquentes. Ètant donné le nombre élevé de cas de brucellose, la répartition géographique de la pathologie et sa persistance à long terme dans l'organisme, il est évident qu'un individu contractant la brucellose présente un risque d'infection par un autre agent pathogène ou le développement d'une immunopathologie. Qu'elles soient contractées avant ou pendant l'infection avec *Brucella*, celles-ci peuvent influencer les capacités de l'hôte à contrôler la brucellose. Inversement, la brucellose peut aussi influencer le déroulement de la pathologie croisée. Pourtant peu d'études se sont penchées sur l'impact d'une pathologie croisée et les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par *Brucella* ou inversement.

Quelques cas de pathologies croisées humaines ont cependant été rapportés. De manière attendue, une étude suggère que les patients infectés avec le HIV présentent une prévalence accrue de la brucellose (Hajiabdolbaghi *et al.*, 2011). Sur 184 patients positifs pour le HIV en Iran, la proportion de personnes positives pour *Brucella* (test sérologique) est plus grande que

la moyenne du pays. Les données suggèrent que les personnes positives pour le HIV présentent un risque accru de contracter la brucellose sans en donner davantage d'explications. Une autre étude montre que la brucellose pourrait influencer les capacités de l'hôte à contrôler l'hépatite C (Abou El Azm *et al.*, 2013). En Egypte, la brucellose et l'hépatite C sont toutes les deux des pathologies endémiques laissant penser que des cas de co-infections sont possibles chez l'homme. Sur 241 patients infectés avec le virus de l'hépatite C, 32 étaient positifs pour la brucellose. Les auteurs ont comparé les taux de virus et les fonctions hépatiques des patients avant et deux mois après un traitement antibiotique pour éradiquer la brucellose. Après le traitement, il a été observé que la charge virale était diminuée et que les fonctions hépatiques étaient améliorées. Ces données suggèrent que contracter la brucellose peut être associé à une susceptibilité au virus de l'hépatite C.

Des cochons d'Inde infectés avec *B. suis* pendant 11 jours ou plus présentent une résistance à l'infection par *Coxiella burnetii* (Mika *et al.*, 1959). Les données indiquent qu'il est nécessaire que l'animal soit infecté avec *Brucella* depuis suffisamment de temps pour être protecteur contre la seconde infection. Si l'infection par *Brucella* est contrôlée par une immunisation précédente, il n'y a pas de résistance observée face à l'infection par *C. burnetii* (Pirsch, 1958). Plus tard, les mêmes auteurs ont montré que l'injection sous-cutanée « d'endotoxines » de *B. suis* entrainait une résistance à l'infection par *Coxiella* alors que des endotoxines de *E. coli* et *Salmonella tyhosa* n'ont pas d'effet (Mika *et al.*, 1958).

Une étude de 1964, à l'origine de ce que l'on appelle aujourd'hui l'effet Mackaness, a décrit l'existence de protections croisées chez les souris infectées avec trois espèces différentes de bactéries intracellulaires : *L. monocytogenes*, *B. abortus* et *M. tuberculosis* (Mackaness, 1964). Ainsi, l'infection avec *L. mocytogenes* chez une souris infectée (pendant 18 jours) avec *B. abortus* entraine un contrôle beaucoup plus rapide de *Listeria* qu'une souris non infectée avec *Brucella*. Cela suggère que l'infection chronique par *B. abortus* confère une protection croisée contre *L. monocytogenes*. Inversement, infecter des souris avec *Brucella* un jour après l'infection par *Listeria* et réinjecter la souris avec cette deuxième souche aux jours 5 et 9 permet une élimination plus aisée de *Brucella* chez la souris. Les cellules immunitaires innées activées par la première infection apportent une protection non spécifique contre une infection croisée.

IV. Objectifs

Les bactéries du genre *Brucella* sont intracellulaires facultatives et responsables d'une zoonose mondiale, la brucellose. En modulant la réponse immunitaire et la physiologie de la cellule hôte, elles sont capables de survivre, pour une longue durée, chez l'hôte mammifère. En phase chronique, la pathologie est associée à des complications variées telles que des troubles articulaires, neurologiques, cardiaques et respiratoires. Les pathologies croisées, infectieuses ou non, peuvent influencer de manière indirecte le statut immunologique de l'hôte et ses capacités à surmonter une nouvelle infection. Dans le cadre de ma thèse nous avons développé deux modèles de pathologies croisées pour tenter de déstabiliser la relation hôte/agent pathogène dans un modèle murin d'infection intra-nasale par *B. melitensis*. Nous avons utilisé l'infection par le parasite *trypanosoma brucei* et l'induction de l'asthme allergique pour modifier l'état inflammatoire et immunitaire de la souris afin de moduler ses capacités à contrôler l'infection bactérienne.

Identifier les mécanismes induisant une plus forte résistance ou une susceptibilité accrue de la souris à l'infection permettrait de mieux comprendre la pathologie. Connaître les facteurs induisant une susceptibilité de l'hôte à l'infection permettrait d'identifier les individus à risque, souvent impliqués dans la dissémination de l'agent pathogène (« super-disséminateurs »), et diminuer la propagation de la pathologie. Au niveau individuel, cela permettrait de prédire le développement de la pathologie et prévoir un traitement adapté pour minimiser les risques de rechute.

V. Impact de la réaction asthmatique sur les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par **Brucella melitensis.**

1. L'asthme : une pathologie qui progresse

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires qui résulte de la coopération d'un nombre élevé de cellules immunitaires innées et adaptatives avec les cellules épithéliales pulmonaires. L'asthme se caractérise par une hyper réactivité bronchique (les muscles lisses vont réagir de manière non spécifique à des stimuli comme l'air froid et l'exercice), une surproduction de mucus et un rétrécissement des voies respiratoires. Son développement est le résultat d'interactions complexes entre le bagage génétique de l'individu et les stimuli environnementaux auxquels il est soumis (Busse and Rosenwasser, 2003).

La prévalence de l'asthme est en constante augmentation depuis les années 1960 (Masoli *et al.*, 2004). Aujourd'hui, on estime que 300 millions d'individus sont affectés par la pathologie et que sa prévalence augmente de 50 % tous les dix ans. Les pays occidentaux sont les plus touchés où 1 enfant sur 10 et 1 adulte sur 12 sont asthmatiques. Mais la fréquence des cas d'asthme augmente également dans les régions en voie de développement. L'asthme présente des répercussions économiques non négligeables puisque 1 à 2 % des dépenses en soins de santé lui sont attribuables (Bramman, 2006).

Deux formes d'asthme sont traditionnellement définies : la première forme est l'asthme allergique et touche la majorité des enfants et 50 % des adultes. Il se caractérise par une concentration élevée d'immunoglobuline sérique de type E (IgE) et une « cuti-réaction » positive aux allergènes inhalés comme les acariens, les squames animales, les spores fongiques et le pollen. Par opposition, l'asthme non allergique (fréquent chez les femmes) se développe généralement plus tardivement et n'est pas caractérisé par une réaction cutanée positive et la présence d'IgE sériques. Il n'y a aussi aucune implication évidente des cellules immunitaires de type Th2 au contraire de l'asthme allergique. L'étiologie de l'asthme non allergique reste méconnue et il n'existe aucun modèle expérimental pour l'étudier. Dès lors, la suite de l'exposé se focalisera sur l'asthme de type allergique (Bishop *et al.*, 2010).

A Développement de l'asthme allergique

L'asthme allergique est caractérisé par une réponse immune de type T_H2 aberrante à l'encontre de molécules inoffensives (non associées à un agent pathogène) présentes dans l'environnement (Trompette *et al.*, 2009). La réaction asthmatique s'initie au niveau des muqueuses pulmonaires, où les allergènes rentrent en contact avec l'épithélium (reviewed in Hammad and Lambrecht, 2015) (**Figure 9**). Ceux-ci sont capables d'activer des PRRs sur les cellules épithéliales et les cellules dendritiques ou directement d'endommager la barrière épithéliale. Ces processus entraineront l'activation de la réponse immune suite à la libération de nombreuses cytokines et chimiokines comme le *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), l'IL-33, l'IL-25 et le CCL20. Ce cocktail cytokinique va stimuler les cellules dendritiques à orienter la réponse T_H2 et activer d'autres cellules immunitaires innées comme les mastocytes (Pushparaj, 2009). Lorsque les lymphocytes Th2 sont activés, ils vont soit - migrer dans les zones B des ganglions lymphatiques pour induire la production d'IgE par les lymphocytes B (via l'IL-4), soit - s'installer sur les sites périphériques pour exercer leurs fonctions effectrices via la sécrétion de cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-5 (Locksley, 2010). De plus, différentes études ont montré que le développement de l'asthme était aussi associé à une réponse Th17, impliquée dans la neutrophilie pulmonaire (Traves, 2008), et une réponse Th9 (Soroosh and Taylor, 2009).

La bronchoconstriction caractéristique de la réaction allergique se déroule en deux phases. La première survient juste après le contact avec l'allergène. Elle résulte de la dégranulation des mastocytes présents dans les poumons qui ont détecté les allergènes grâce aux IgE spécifiques présents à leur surface. Différents médiateurs comme l'histamine et les leucotriènes sont libérés et induiront la constriction des muscles respiratoires lisses et la sécrétion du mucus. Les mastocytes activés libèrent aussi différentes cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-13, l'IL-5 et le TNF-α qui augmenteront l'hyperréactivité et la neutrophilie des voies respiratoires (Bernstein, 2008).

La deuxième phase survient quelques heures plus tard et résulte principalement de l'infiltration des éosinophiles (Barrett and Austen, 2009). Suite à l'activation des mastocytes et des lymphocytes Th2, les éosinophiles et les neutrophiles vont migrer vers les voies respiratoires pour libérer des substances responsables de dommages à l'épithélium, d'une augmentation de l'hyperréactivité pulmonaire et de la dégranulation des mastocytes. Les éosinophiles produisent aussi des leucotriènes et des cytokines pro-Th2 qui sont responsables

de la contraction des muscles respiratoires, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une augmentation du recrutement d'éosinophiles, entrainant ainsi une boucle d'auto-entretien de l'inflammation pulmonaire.

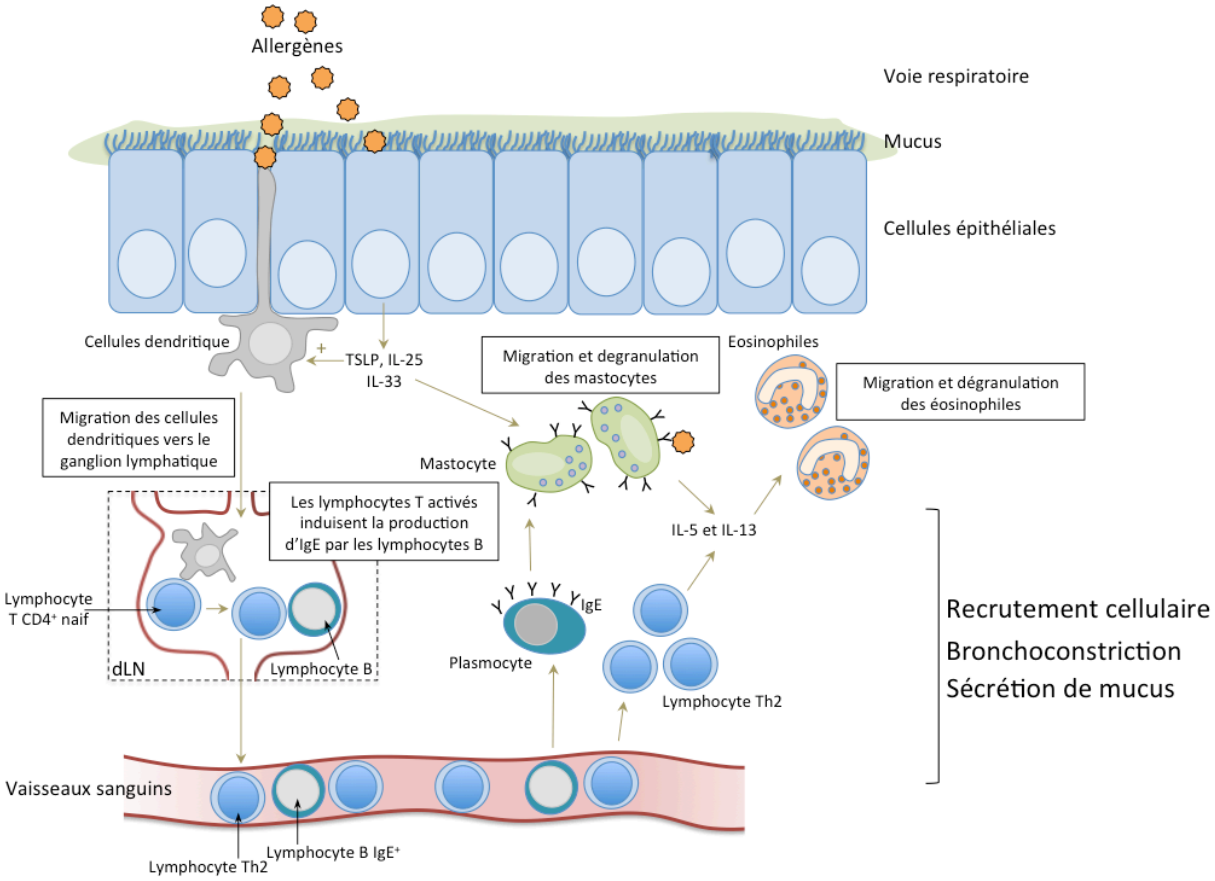


Figure 9 : Développement de l'asthme allergique.
Dans les poumons, les allergènes sont détectés par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. Les cellules épithéliales vont produire des cytokines qui vont recruter et activer différentes cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques et les mastocytes. Les cellules dendritiques activées vont migrer vers le ganglion lymphatique (*draining lymph node*, dLN) et polariser la réponse immune vers une réponse Th2. Les lymphocytes Th2 activés vont induire la production d'IgE par les lymphocytes B. Ils peuvent aussi retourner (via la circulation sanguine) sur les sites périphériques pour produire des cytokines qui activeront les mastocytes et les éosinophiles. Les IgE produits par les lymphocytes B faciliteront la détection des allergènes par les mastocytes et donc leur dégranulation. Ces évènements induisent le développement de l'asthme allergique caractérisé par une bronchoconstriction et une superproduction de mucus.

B Etude de l'asthme allergique chez la souris

Le développement de l'asthme est un résultat complexe d'interactions entre facteurs génétiques et environnementaux. Différents modèles expérimentaux d'asthme allergique basés sur l'exposition aux facteurs environnementaux ont été développés (Debeuf *et al.*, 2016). Un modèle fréquemment utilisé est celui de l'injection répétée d'ovalbumine (OVA). Ce modèle ne coûte pas très cher et induit une inflammation allergique pulmonaire forte. Cependant, il n'est pas toujours relevant de l'asthme humain. L'OVA est une protéine inerte qui doit être systématiquement injectée avec un adjuvant (généralement l'hydroxyde d'aluminium (alum)) pour induire une réponse Th2 chez la souris. De plus ce modèle nécessite des injections intra-péritonéales d'OVA qui entrainent une inflammation systémique Th2 lorsqu'elle est plutôt locale (poumons) dans l'asthme allergique.

Dans le cadre de nos recherches nous avons utilisé deux modèles expérimentaux locaux et plus relevant cliniquement pour étudier l'impact de l'asthme sur les capacités de la souris à contrôler l'infection par *Brucella melitensis*. Les deux modèles sont induits par instillations intra-nasales répétées avec un extrait total d'acariens de maison (*Dermatophagoides farinae*) ou un extrait de moisissure (*Alternaria alternata*).

A Le modèle utilisant *D. farinae*

Dermatophagoides farinae est une source d'allergènes majeure chez l'homme. Il s'agit d'un modèle de référence, couramment utilisé pour l'étude de l'asthme allergique chez la souris (Wang, 2013). Certains des mécanismes d'induction du phénotype allergique chez la souris dans le modèle de sensibilisation aux extraits d'acariens sont connus. Par exemple, l'extrait total d'acariens est contaminé par de faibles quantités de LPS et Derf2 (un allergène majeur de l'acarien) est l'homologue fonctionnel de la molécule MD-2, requise pour la liaison du LPS à son récepteur (TLR 4) (Trompette *et al.,* 2009). Une étude a montré que l'activation du TLR 4 sur les cellules épithéliales du poumon stimule (via la production de TSLP et/ou d'IL-33) les cellules dendritiques à induire une réponse Th2 (Hammad *et al.,* 2009). Un autre antigène de l'acarien, Derf1, est décrit comme ayant une activité protéase (Chapman and Wünschmann, 2007). La molécule serait capable de cliver les jonctions entre les cellules épithéliales et induire des dommages épithéliaux (Tam and Chou, 2006). Derf1 peut aussi se lier au *protease-activated receptor* (PAR)-2 sur les cellules épithéliales conduisant ainsi à l'activation du facteur de transcription NF-κB et induire la production de TSLP (Kouzaki *et al*., 2016). Les motifs riches en β-glycans de l'extrait d'acariens peuvent également induire la

production de CCL20 (chimiokine attractive des DCs) par les cellules épithéliales (Nathan *et al.*, 2013). Les extraits d'acariens peuvent directement activer les cellules dendritiques. Par exemple, Derf1 peut cliver DC-SIGN, un récepteur des cellules dendritiques, et moduler la balance entre l'IL-12 et l'IL-10 pour induire un biais vers la réponse Th2 (Furmonaviciene *et al*., 2007). Notons, que de part sa complexité, l'extrait active vraisemblablement d'autres PRRs et voies de signalisations impliqués dans la physiopathologie de l'asthme qu'il reste à identifier.

B Le modèle utilisant *A. alternaria*

Alternaria alternata est un champignon saprophyte ubiquitaire qui colonise le sol et les plantes régulièrement associé au développement de l'asthme allergique (Bush and Prochnau, 2004). L'injection répétée d'un extrait d'*Alternaria* chez la souris naïve induit une réponse Th2 typique et une inflammation pulmonaire allergique (Denis *et al.*, 2013). Les mécanismes d'induction de l'asthme allergique par l'extrait d'*A. alternata* sont beaucoup moins connus. Quelques allergènes ont été identifiés mais les mécanismes d'induction sont rarement décrits. Par exemple Alta 1, une protéine dimérique, induit la production d'IgE spécifiques chez plus de 90 % des individus asthmatiques contre *A. Alternata*. Son mécanisme d'action est encore méconnu. Une glycoprotéine qui représente 13 % du poids sec de la moisissure est aussi décrite pour induire une « cuti-réaction » positive chez 85 % des patients (Portnoy *et al.*, 1990). D'autres allergènes ont été identifiés comme Alta 3 (heat shock protein), Alta 6 (protéine ribosomale) et Alta 7 (homologue d'une protéine de levure) sans jamais avoir clairement identifié les mécanismes d'action (Simon and Kandler, 1995). Une autre recherche a montré que l'intensité de la réaction allergique induite par *A. alternata* était indépendante de l'activité protéase de l'extrait et indépendante de la voie de signalisation TLR 4 et Myd88 (suggérant un rôle dispensable du LPS dans l'activation de l'asthme) (Denis *et al.*, 2013).

2. Intérêt du modèle de pathologies croisées

La prévalence de l'asthme allergique est en constante augmentation. Il est donc opportun de se demander quel peut être l'impact de cette pathologie sur les capacités de l'hôte à contrôler une infection pulmonaire. Chez l'homme, des études épidémiologiques ont déjà montré que les patients asthmatiques présentaient un risque accru de contracter une infection pulmonaire bactérienne par *Haemophilus influenza* et *Streptococcus pneumoniae* (Juhn *et al*., 1983) (Klemets *et al*., 2010). Il a aussi été montré que les patients asthmatiques montrent des symptômes plus intenses et d'une durée plus longue lors d'infections pulmonaires virales (Corne *et al.*, 2002).

La plupart des études expérimentales de pathologies croisées entre l'asthme et les infections pulmonaires ont généralement étudié l'impact des infections sur le développement de l'asthme et non l'inverse. Le but étant de mieux comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans l'exacerbation ou l'inhibition de la réaction asthmatique pour améliorer le traitement. Par exemple, il a été montré que l'infection par *H. pylori* prévenait le développement de l'asthme chez la souris grâce à la prolifération de lymphocytes T régulateurs qui vont inhiber le développement de la réponse immune Th2 caractéristique de la réaction asthmatique (Arnold *et al*., 2011).

Le nombre d'études chez la souris visant à étudier l'impact de l'asthme sur le contrôle des infections pulmonaires reste aujourd'hui très faible. Ces études se sont principalement concentrées sur l'impact de l'asthme sur le contrôle de l'infection par *S. pneumoniae* (Knippenberg *et al.,* 2015; Sanfilippo *et al*., 2015). *S. pneumoniae* est une bactérie pathogène (extracellulaire, Gram positive) responsable de pneumonies et associée à une mortalité élevée. Les neutrophiles jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection. Avec les macrophages alvéolaires, ils vont phagocyter et éliminer les pneumocoques. L'infiltration des neutrophiles est dépendante des productions de TNF-α, d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-17. Différentes études épidémiologiques ont montré que les individus asthmatiques présentent un risque accru (deux fois plus de chances, d'après (Poehling *et al.,* 2005)) de développer des infections invasives à pneumocoques (Klemets *et al.,* 2010; Jounio *et al.,* 2010). Cette susceptibilité à l'infection est notamment liée à la difficulté d'éliminer la bactérie par les macrophages alvéolaires chez les individus asthmatiques (Poehling *et al.,* 2005). Fondamentalement, ces observations sont à nuancer. Quelques études ont montré que dans certains modèles

d'inductions asthmatiques, l'hôte pouvait présenter une résistance accrue lors d'infections à pneumocoques (Sanfilippo *et al.,* 2015; Clement *et al.*, 2009). Il semble y avoir une influence du modèle d'allergie et de la cinétique expérimentale sur les capacités de l'hôte asthmatique à contrôler une infection pulmonaire.

Il est vraisemblable que la prévalence de l'asthme va continuer de croître. Il serait donc utile de mesurer son impact sur le contrôle des infections pulmonaires. L'asthme étant de plus en plus observé chez les animaux domestiques (Kirschvink, 2008), l'étude de l'interaction entre asthme et infection par *Brucella* nous semble particulièrement pertinente. L'asthme allergique est susceptible d'altérer les capacités de l'hôte à contrôler l'infection intra-nasale par *B. melitensis*. Il pourrait inhiber la mise en place de la réponse immune Th1 effective contre *Brucella*. Différents mécanismes pourraient expliquer cette inhibition.

Le premier mécanisme repose sur un concept bien connu des immunologistes : la balance Th1/ Th2 (Hirahara and Nakayama, 2016; Reviewed in Muraille *et al.*, 2014). Il est en effet bien décrit que les réponses immunitaires Th1 (caractéristique de la lutte contre les agents pathogènes intracellulaires) et Th2 (spécifique de la lutte contre les infections helminthiques) sont antagonistes. Les deux réponses sont caractérisées par des profils cytokiniques différents avec notamment la production d'IFN-γ et d'IL-4 par les lymphocytes Th1 et Th2, respectivement. Puisque la réponse immune efficace pour l'élimination de *B. melitensis* est majoritairement une réponse Th1 (Vitry *et al.,* 2014; Hanot Mambres *et al.,* 2016) et que la réaction asthmatique est caractérisée par une réponse immune à composante Th2 (Lloyd and Hessel, 2010), il est légitime de se demander si la réponse Th2 liée à la réaction asthmatique ne pourrait pas compromettre le développement de la réponse protectrice Th1 contre *Brucella*.

La réaction asthmatique module l'environnement pulmonaire et notamment le métabolisme des macrophages pulmonaires (Dasgupta and Keegan, 2012). En fonction de leur environnement cytokinique les macrophages vont se polariser et acquérir des fonctions spécifiques (**Figure 10**). En présence d'IFN-γ et de LPS, les macrophages adoptent un phénotype pro-inflammatoire et acquièrent les capacités de lutter efficacement contre les agents pathogènes intracellulaires. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de l'enzyme iNOS et des cytokines pro-inflammatoires classiques (IL-1, IL-12 et TNF-α). Comme il s'agit de la première « forme » de macrophages décrite, ils sont généralement appelés macrophages « activés classiques » ou macrophages M1. Ces macrophages sont

typiques d'une réponse immunitaire Th1. Par opposition, dans les conditions d'une réponse Th2 et la présence d'IL-4 ou d'IL-13, les macrophages adoptent un phénotype « alternatif » aussi appelés macrophages M2. Dans ces cellules, l'expression des cytokines pro-inflammatoires est inhibée. En revanche, les macrophages M2 expriment différents marqueurs spécifiques comme l'arginase 1 (Arg1), le *macrophage mannose receptor* (mrc1), le *resistin-like molecule-α/found in inflammatory zone 1* (FIZZ1) et le *chitinase like-3* (YM1) (**Box 9**) (Nair *et al.*, 2003). Si ces phénotypes sont clairs dans les lignées de macrophages, *in vivo* par contre la réponse inflammatoire est souvent complexe et les phénotypes moins tranchés. On peut retrouver différents composés stimulateurs à différentes concentrations dans l'environnement des macrophages induisant des phénotypes intermédiaires (Mosser and Edwards, 2008). Il a été montré que *Brucella* persistait d'avantage dans des macrophages alternatifs et que l'induction *in vivo* de ces macrophages augmentait la persistance de la bactérie chez la souris (Xavier *et al*., 2013). Etant donné que l'asthme est caractérisé par une réponse Th2 et une polarisation des macrophages en cellule M2, on pourrait imaginer que cet afflux de macrophages alternatifs puisse influencer les capacités de la souris à contrôler l'infection par *B. melitensis*.

Box 9: Marqueurs phénotypiques des macrophages M2

Arginase 1 : L'arginase est considérée comme le marqueur prototype des macrophages M2. Des études ont montré que la L-ornithine pouvait entrer dans la synthèse des polyamines et du collagène, pouvant promouvoir la réparation tissulaire. Il a aussi été montré que la consommation de la L-arginine par l'arginase 1 inhibait les fonctions immunes de la L-arginine. La déplétion de la L-arginine inhibe par exemple la prolifération des lymphocytes T effecteurs. L'expression de l'arginase 1 diminue la synthèse du NO en diminuant le substrat disponible pour l'iNOS. Il est aussi décrit que les polyamines produites pas l'arginase 1 activent les cellules mastocytaires dans la réaction allergique (Reviewed in Munder, 2009; Nair *et al.,* 2016).

FIZZ1 : L'expression de ce marqueur est augmentée en présence d'IL-4, d'IL-13 et de l'activation de la voie STAT-6. Elle est aussi inhibée par l'IFN-γ. Durant les infections helminthiques, FIZZ1 diminue l'inflammation. Il est aussi très présent dans les modèles d'allergie en exerçant des fonctions chemoattractantes (Raes *et al.,* 2002).

YM1 : YM1 est une protéine associée au réticulum endoplasmique et peut former des cristaux dans le cytoplasme (Paper, 2004). Chez la souris, son expression est augmentée via l'IL-4 et l'IL-13 et la voie STAT-6. La perte du récepteur de l'IFN-γ augmente l'expression de YM1 dans les macrophages (Arora *et al*., 2016). Il serait impliqué dans la réponse inflammatoire en exerçant une activité chemoattractante des éosinophiles et des granulocytes. YM1 exercerait avec l'IL-10 une fonction immunosuppressive (Zhao *et al.*, 2013).

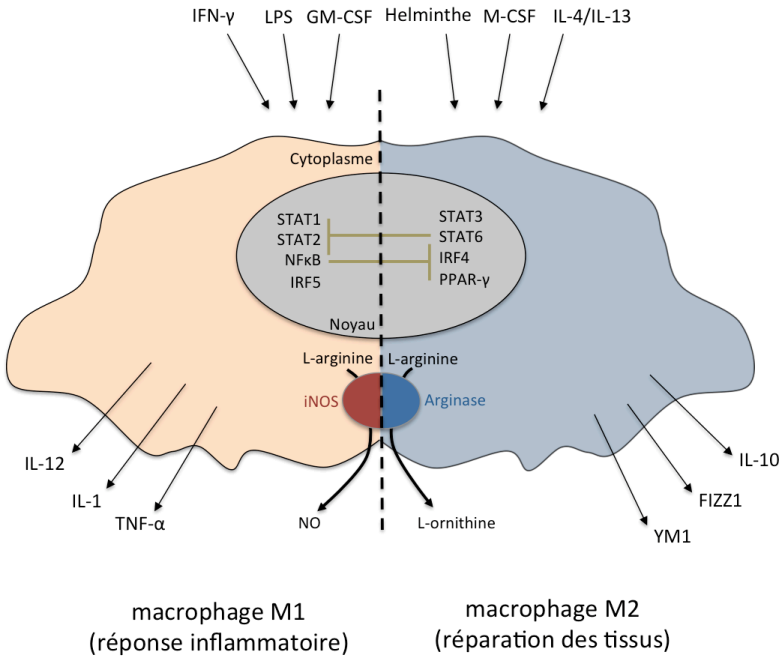


Figure 10 : Polarisation des macrophages M1 et M2

En fonction de l'environnement cytokinique autour des macrophages, ceux-ci vont adopter un phénotype morphologique et fonctionnel caractéristique. Il existe deux formes majeures de polarisation. Les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse inflammatoire et la lutte contre les agents pathogènes et les macrophages M2 sont impliqués dans la réparation tissulaire.

Enfin, le dernier mécanisme repose sur le fait que l'asthme induit une forte réponse immunosuppressive dans les poumons pouvant compromettre le développement d'une réponse efficace. En effet, avec le développement de la réponse asthmatique Th2, nous observons l'apparition d'une réponse immunosuppressive dépendante de la production d'IL-10 et de TGF-β (Robinson, 2009). Ces cytokines, qui sont notamment produites par les lymphocytes T régulateurs et les macrophages interstitiels, inhibent la production d'IgE et les fonctions effectrices des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles afin de diminuer le phénotype allergique (Kawano *et al*., 2016). Différentes études se sont penchées sur l'impact de l'IL-10 dans le contrôle de l'infection par *Brucella* (Corsetti *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2013). Il a par exemple été montré que la production d'IL-10 par les lymphocytes T $CD4^+$ favorisait la persistance de *B. abortus* chez la souris en inhibant les fonctions effectrices des macrophages infectés (Xavier *et al*., 2013). Si l'asthme induit une forte réponse immunosuppressive, nous sommes donc en mesure de nous demander quel peut être l'impact de cette immunosuppression sur les capacités de la souris à contrôler l'infection intra-nasale par *B. melitensis*.

3. L'interaction asthme / *Brucella*

Dans la littérature seulement deux études, réalisées par la même équipe, ont apporté quelques informations concernant l'impact de l'infection par *Brucella* sur le développement des allergies dont l'asthme (Ibañez *et al.*, 2013; Smaldini *et al*., 2015). L'administration intra-nasale de la protéine membranaire Omp16 de *Brucella* induit un environnement inflammatoire à composante Th1 dans les poumons. Cette inflammation réduit significativement les taux d'IgE sériques et les signes cliniques dans un modèle d'allergie aux protéines de lait de vache. L'administration de la protéine brucellique induirait un « shift » à prédominance Th1 dans la balance Th1/ Th2, protégeant ainsi des allergies. Les auteurs suggèrent que la protéine Omp16 de *Brucella* pourrait être un bon candidat d'adjuvant pro-T_H1 dans la vaccination orale. A notre connaissance, aucune autre étude n'a caractérisé l'impact de la brucellose sur la réaction asthmatique et inversement. Cela renforce d'autant plus l'intérêt de se pencher sur ce modèle de cross-pathologie.

4. Publication : L'asthme allergique modifie la croissance et la persistance bactérienne dans les poumons par différents mécanismes.

Arnaud Machelart, Georges Potemberg, Laurye Van Maele, Maxime Lagneaux, Carl De Trez, Catherine Sabatel, Fabrice Bureau, Sofie De Prins, Pauline Lehebel, Olivier Denis, Fabienne Jurion, Marta Romano, Jean-Jacques Letesson, Eric Muraille.

Allergic asthma affect bacterial growth and persistence in lung via multiple pathways

* Arnaud Machelart, * Georges Potemberg, [%]Laurye Van Maele, * Maxime Lagneaux, [†] Carl De Trez, [‡] Catherine Sabatel, [‡] Fabrice Bureau, [#] Sofie De Prins, [#] Pauline Lehebel, [#] Olivier Denis, [&] Fabienne Jurion, [&] Marta Romano, * Jean-Jacques Letesson, [§,] * Eric Muraille

* Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, NARILIS, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix. Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium.

[%] Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

† Department of Molecular and Cellular Interactions, Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, Vrije Universiteit Brussel, Gebouw E, Verdieping 8, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium.

‡ Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, GIGA-Research, University of Liège, Liège, Belgium

Allergology Unit, WIV-Pasteur Institute of Brussels, Brussels, Belgium.

& Service Immunology, Scientific Institute for Public Health (WIV-ISP Site Ukkel), Brussels, Belgium

§ Laboratoire de Parasitologie. Faculté de Médecine. Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles. Université Libre de Bruxelles. Belgium.

Eric Muraille and Jean-Jacques Letesson should be considered equally as last authors

Corresponding author:

Eric Muraille. Mailing address: Laboratoire de Parasitologie. Faculté de médecine. Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles. Université Libre de Bruxelles. Belgium. Fax.32 (0)2 5556128. Email: emuraille@hotmail.com

Running title: Asthma affects bacterial infection

[1] **Grant support:** This work was supported by grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (convention FRSM FNRS 3.4.600.06.F, Belgium), and by the Interuniversity Attraction Poles Programme initiated by the Belgian Science Policy Office. E.M. is a Senior Research Associate from the FRS-FNRS (Belgium). A.M. and G.P. hold FRIA PhD grants from the FRS-FNRS (Belgium).

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic Th2 inflammatory disease of the lower airways affecting a growing number of people worldwide. Until now, little effort has been made to investigate the impact of asthma on the control of infectious microorganisms and the underlying mechanisms. In this work, we investigated the impact of allergic asthma on intranasal (i.n.) infection by four bacteria species in mice. We observed that i.n. sensitization with extracts of the house dust mite *Dermatophagoides fariane* or of the mold *Alternaria alternata* strongly enhanced the growth and persistence of *Brucella melitensis*, *B. suis* and *B. abortus* in lung from infected mice. This enhanced susceptibility appears dependent of $CD4^+$ T cells, IL-4/STAT6 signaling pathway and IL-10. Of note, asthma-induced susceptibility to *Brucella* infection remains present in IL-12, IFNγR and IL17RA deficient mice suggesting that the Th1 or Th17 protective immune response against *Brucella* are not involved in this phenomenon. The same asthma sensitization protocol has been tested on *Streptococcus pneumoniae* i.n. infection. Surprisingly, we observed that sensitization strongly increase the survival of mice by an STAT6 independent signaling pathway. Taken globally, our work demonstrate that same model of allergic asthma can reduce or augment the resistance of mice to bacterial infection depending of the bacterial species.

INTRODUCTION

A striking feature of infectious disease is the marked inter-individual variations in infectiousness. Interestingly, individuals with the highest level of infection are also often the major disseminators (termed super-spreaders) of an epidemic among population (Stein, 2011). Thus, a better knowledge of the factors predisposing individual to susceptibility to a particular infectious agent can allow to anticipate and better treat individual infection but also to control more efficiently the dissemination of infection among population.

Asthma is one of the most common lung disease affecting an estimated 300 million people worldwide (Masoli *et al.,* 2004) and its prevalence continues to increase in many parts of the world (Anandan *et al.,* 2010). It is characterized by recurring symptoms of reversible airflow obstruction, bronchial hyperresponsiveness and lower airway inflammation. Allergic asthma is characterized by increased levels of IL-4-mediated (Th2) inflammation and eosinophilia (Fahy, 2015). The impact of the infection and of the host microbiota composition on allergic asthma has been frequently investigated (reviewed in (Stiemsma *et al.,* 2015)). However, despite the significant proportion of people worldwide who are affected by asthma and of some epidemiological studies (Corne *et al.,* 2002; Young J Juhn, 2012; Klemets *et al.,* 2010) reporting an increased severity of bacterial and viral infection in asthmatic patient, little effort has been made to investigated the impact of asthma on the control of infectious microorganisms and the underlying mechanisms.

Brucella (alpha-proteobacteria) are facultative intracellular Gram-negative coccobacilli that infect mammals and cause brucellosis. Human brucellosis is a zoonotic infection transmitted mainly through ingestion and inhalation (Godfroid *et al.,* 2005). Although rarely fatal, *Brucella* can cause a devastating multi-organ disease in humans with serious health complications in the absence of prolonged antibiotic treatment (Colmenero *et al.,* 1996). Despite significant progress, the incidence of human brucellosis remains very high in endemic areas (Pappas *et al.,* 2006) and is considered to be largely underestimated (Seleem *et al.,* 2010). In mice infection model, we have demonstrated that IFNγ-producing $CD4^+$ T cells (Th1) are key actor of the control of *Brucella* growth in spleen (Vitry *et al.,* 2012; Vitry *et al.,* 2014) and lung (Hanot Mambres *et al.,* 2016).

The extracellular, gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (or pneumococcus) is a serious human pathogen that causes more than 50 % of the cases of community-acquired bacterial pneumoniae and the most common cause of death from infection in developed countries (for a review see (Klugman & Feldman, 2001; van der Poll & Opal, 2009)). In mice model, innate immunity is crucial in the early phase of natural anti-

pneumococcal host defense and alveolar macrophages and neutrophils play key roles in the control of bacteria.

In the current study, we have developed an original experimental model to analyze the impact of allergic asthma sensitization on the course of intranasal bacterial infection in mice. Extract of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* (HDM) (Hammad *et al.,* 2010) and an of the mold *Alternaria alternata* (*Alt.*) (Havaux *et al.,* 2004), that are both recognized as important causes of respiratory allergies, are used to sensitized mice before and during infection. Our results showed that allergic asthma can either reduce or augment the resistance of mice to bacterial infection by several independent mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The procedures used in this study and the handling of the mice complied with current European legislation (directive 86/609/EEC) and the corresponding Belgian law "Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010". The Animal Welfare Committee of the Université de Namur (UNamur, Belgium) reviewed and approved the complete protocol (Permit Number: 14-220).

Mice and reagents

Wild-type BALB/c and C57BL/6 mice were acquired from Harlan (Bicester, UK). STAT6$^{-/-}$ BALB/c mice, IL4$^{-/-}$ BALB/c mice, IL12p40$^{-/-}$ BALB/c mice and TCR-γδ$^{-/-}$ C57BL/6 and IL-10GFP transgenic (B6(Cg)-Il10tm1.1Karp/J) C57BL/6 mice were all purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). IFNγR$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Huang *et al.*, 1993), IL-12p35$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Carrera *et al.,* 1996), IL12p40$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Magram *et al.*, 1996) were acquired from Dr. B. Ryffel (University of Orleans, France). IL17RA$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Nakae *et al.*, 2002), were acquired from Dr. K. Huygen (Belgian Scientific Institute for Public Health, Bruxelles, Belgium). TAP1$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Van Kaer *et al.,* 1992), MHCII$^{-/-}$ C57BL/6 mice (Cosgrove *et al.*, 1991) were acquired from Jörg Reimann (University of Ulm, Ulm, Germany). All wild-type and deficient mice used in this study were bred in the animal facility of the Gosselies campus of the Université Libre de Bruxelles (ULB, Belgium).

We used wild-type strains of *Brucella melitensis* 16M and *Brucella suis* 1330. We also used *Brucella melitensis* 16M and *Brucella abortus* 2308 strains stably expressing a rapidly maturing variant of the red fluorescent protein DsRed (Shaner *et al.,* 2004), the mCherry protein (mCherry-Br), under the control of the strong *Brucella* spp. promoter, PsojA.

Construction of the mCherry-Br strains has been described previously in detail (Copin *et al.,* 2012). *Brucella* strains were grown in biosafety level III laboratory facilities. Cultures were grown overnight with shaking at 37°C in 2YT medium (Luria-Bertani broth with double quantity of yeast extract) and were washed twice in RPMI 1640 (Gibco Laboratories) (3500xg, 10 min) before inoculation of the mice.

Allergens and allergic asthma sensitization protocol

Lyophilized house dust mite *Dermatophagoides farinae* (abbreviated HDM) extracts were from Greer Laboratories (Lenoir, NC). *Alternaria alternata* (strain18586) (abbreviated *Alt.*) was obtained from the BCCM^{TM}/IHEM (Institute of Public Health, Brussels, Belgium) and cultured for 3 weeks at 27°C in flasks containing 250 ml of Czapek's medium. Mold pellicles were harvested and homogenized in 0·4% NH_4HCO_3 + polyvinyl polypyrrolidone (Sigma) with an ultra-thurax. The homogenates were then agitated for 3 h at 4°C. Extracts were centrifuged twice 30 min at 20 000 g, dialyzed against PBS and stored at -20°C in 50% glycerol.

For asthma sensitization, mice were lightly anaesthetized with isoflurane (from Abbott laboratories (# No. B506)). When the mice were unresponsive but breathing comfortably, a solution of HDM (100 µg of *Dermatophagoides farinae* extract in 50 µl of PBS) or *Alt.* (5 µg of *Alternaria alternata* extract in 100 µl of PBS) was directly applied on the nostrils. The animals were allowed to slowly inhale the liquid and were then recovered in a supine position. For the HDM model, mice were instilled i. n. one time by week during all of the experiment (Marichal *et al.,* 2010) and for *Alt.* model mice received the extract two time by week during all of the experiment (Havaux *et al.,* 2004). Mice were infected 17 days after the first instillation.

Brucella infection

Mice were anaesthetized with a cocktail of Xylasine (9mg/kg) and Ketamine (36 mg/kg) in PBS before being inoculated intranasally (i.n.) with $2x10^4$ CFU of *Brucella melitensis*, $2x10^3$ CFU of *Brucella abortus* or $2x10^3$ CFU of *Brucella suis*. We used wild-type or mCherry-expressing *B. melitensis* in 30 µl of PBS (described in (Copin *et al.,* 2012)). Control animals were inoculated with the same volume of PBS. The infectious doses were validated by plating serial dilutions of the inoculums. At the selected time after infection, mice were sacrificed by cervical dislocation. Immediately after sacrifice, spleen, liver and lung cells were collected for bacterial count, flow cytometry and/or microscopic analyses.

Streptococcus pneumoniae infection

Streptococcus pneumoniae serotype 1 (clinical isolate E1586) were grown in Todd Hewitt Yeast Broth (Sigma-Aldrich) as described previously (Muñoz *et al.,* 2010). For infection, frozen working stocks were washed and diluted in Phosphate Buffer Saline (PBS). Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine-xylazine and 20µl of the inoculum were administered by intranasal route.

Bacterial count

Spleens, livers and lungs were crushed and transferred to PBS/0.1% X-100 Triton (Sigma-Aldrich). We performed successive serial dilutions in RPMI to obtain the most accurate bacterial count and plated them onto 2YT medium. The CFU were counted after 5 days of culture at 37°C. For bacterial counts in the blood, 75 µl of blood were collected from the tail into heparinized capillary tubes at selected time points and diluted in PBS/0.1% X-100 Triton (Sigma). Serial dilutions were prepared in RPMI and plated onto 2YT medium. The CFU were counted after 5 days of culture at 37°C.

Bronchoalveolar lavages

Mice were euthanized by cervical dislocation. The trachea was exposed and incised. A needle (1·2x40 mm) was inserted into the trachea and broncho alveolar fluid was harvested by washing the lungs twice with 1 ml of PBS. Total cell counts were determined with an haemacytometer. Differential cell counts were obtained by counting at least 500 cells on cytospin slides stained with Diff-Quick (Dade Behring).

Determination of serum levels of total IgE

Serum IgE levels in sera were determined using a sandwich ELISA. Plates were coated with a rat antimouse IgE mAb (LO-ME-2, IMEX, UCL, Brussels, Belgium) and saturated. Serial twofold dilutions of serum or purified monoclonal mouse IgE (LB-4, IMEX, UCL, Brussels, Belgium) were applied for 2 h. Then peroxidase labelled rat antimouse IgE (LO-ME-3) was used. After 1 h of incubation at RT, plates were washed four times in PBS, and 100 µl substrate solution (BD OptEiA; BD Biosciences) was added to each well. After 10 min of incubation at RT in the dark, the enzyme reaction was stopped by adding 25 µl/well 2 N H_2SO_4, and absorbance was measured at 450 nm.

Quantitative PCR

Lung RNA was extracted using the RNAeasy kit (Qiagen, Crawley,United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using a TaqMan Reverse Transcription Reagent kit (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed on an ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA), using a qPCR Core Kit for Sybr

Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium). Hydroxymethylbilane synthase (HMBS) mRNA was used as reference housekeeping gene for normalization. For each sample (x), the normalization factor was calculated using the formula, mean of Ct of ref(i)- Ct of ref(x), where I represents all samples (Ct is on the threshold cycle-value shown as the mean of three different RT-QPCR reactions). The level of target mRNA, relative to the mean of the reference housekeeping gene, was calculated by raising 2 to the power of {40 – [Ct of target + mean of (Ct of norm. HMBS)]}.

Determination of arginase activity.

Arginase activity was determined by measuring the total production of urea from lung homogenates. Individual lungs were crushed and transferred to 1 ml of PBS. The homogenate were centrifuged and urea levels were determined on the supernatent by using a Arginase Activity Assay kit (Sigma MAK112). Arginase activity is expressed as units per liter of sample, where 1 unit of arginase converts 1 µmole of l-arginine to ornithine and urea per minute at pH 9.5 and 37°C.

IL-5 neutralization and arginase inhibition

For IL-5 neutralization, mice were intraperitoneally injected with 500 µg (in 500 µl of PBS) of mAb anti m/h IL-5 (TRFK5, BioXCell) 2 hour before *Alt.* sensitization and at day 7, 14 and 21 post first *Alt.* sensitization. Control mice receive the same treatment with recommended control mAb.

For arginase inhibition, mice were intranasally injected with 200 µg (in 50 µl of PBS) of nor-NOHA (N-hydroxy-nor-L-arginine, Enzolifesciences) at day 8, 15, 18, 21, 24 and 27 post first mold instillation.

Cytofluorometric analysis

As described previously (Hanot Mambres *et al.,* 2016), lung were harvested, cut into small pieces and incubated for 30 minutes at 37°C with a mix of DNAse I fraction IX (Sigma-Aldrich) (100 µg/ml) and 1.6 mg/ml of collagenase (400 Mandl U/ml). Lung cells were washed and filtered, and then incubated with saturating doses of purified 2.4G2 (anti-mouse Fc receptor, ATCC) in 200 µl PBS 0.2% BSA 0.02% NaN3 (FACS buffer) for 20 minutes at 4°C to prevent antibody binding to the Fc receptor. Various fluorescent mAb combinations in FACS buffer were used to stain 3-5x10^6 cells. We acquired the following mAbs from BD Biosciences: Fluorescein (FITC)-coupled HL3 (anti-CD11c), FITC-coupled 145-2C11 (anti-CD3e), FITC-coupled M1/70 (anti-CD11b), FITC-coupled 1A8 (anti-Ly6G), phycoérythrine (PE)-coupled RM4-5 (anti-CD4), PE-coupled 53-6.7 (anti-CD8a), PE-coupled PK136 (anti-NK1.1), PE-coupled E50-2440 (anti-SIGLEC-F), allophycocyanin (APC)-coupled 1-A/1-E

(anti-MHCII), APC-coupled BM8 (anti-F4/80), APC-coupled 307707 (anti-CD101). The cells were analyzed on a FACScalibur cytofluorometer. Dead cells and debris were eliminated from the analysis according to size and scatter.

Immunofluorescence microscopy

Lungs were fixed for 2 hours at room temperature in 2% paraformaldehyde (pH 7.4), washed in PBS, and incubated overnight at room temperature in a 20% PBS-sucrose solution under a vacuum. Tissues were then embedded in the Tissue-Tek OCT compound (Sakura), frozen in liquid nitrogen, and cryostat sections (5 µm) were prepared. For staining, tissue sections were rehydrated in PBS and incubated in a PBS solution containing 1% blocking reagent (Boeringer) (PBS-BR 1%) for 20 min before incubation overnight in PBS-BR 1% containing any of the following mAbs or reagents: DAPI nucleic acid stain Alexa Fluor 350, 488 phalloidin (Molecular Probes), Allophycocyanin -coupled Gr1 (anti-LY-6C/6G), Alexa Fluor® 647-coupled M5/114.15.2 (anti- I-A/I-E), Allophycocyanin (APC)-coupled BM8 (anti-F4/80, Abcam), Alexa Fluor 647-coupled HL3 (anti-CD11c, BD Biosciences). Slides were mounted in Fluoro-Gel medium (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Labeled tissue sections were visualized with an Axiovert M200 inverted microscope (Zeiss, Iena, Germany) equipped with a high-resolution monochrome camera (AxioCam HR, Zeiss). Images (1384x1036 pixels, 0.16µm/pixel) were acquired sequentially for each fluorochrome with A-Plan 10x/0.25 N.A. and LD-Plan-NeoFluar 63x/0.75 N.A. dry objectives and recorded as eight-bit grey-level *.zvi files. At least 3 slides per organ were analyzed from 3 different animals and the results are representative of 2 independent experiments.

HES histology

Lungs were fixed in 10% formalin. After fixation overnight, the lungs were embedded in paraffin. Tissues were sliced and 5µm sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) for light microscopy examination of the lung inflammation.

Statistical analysis

We used a (Wilcoxon-) Mann-Whitney test provided by the GraphPad Prism software to statistically analyze our results. Each group of deficient mice was compared to the wild-type mice. We also compared each group with each other and displayed the results when required. Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. *, **, *** denote $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively.

RESULTS

Allergic asthma favor *Brucella* growth and persistence in lung

Repeated intranasal (i.n.) sensitization with an extract from the house dust mite *Dermatophagoides farinae* (HDM) (Hammad *et al.,* 2010) or with an extract of the mold *Alternaria alternata* (*Alt.*) (Havaux *et al.,* 2004) have been described to induce allergic asthma in mouse models. In our experimental conditions, BALB/c mice sensitized during 17 days according to standard protocol (see material and methods) display well detectable cellular infiltration in lung (**Figure S1.A**) and increased macrophages, neutrophils and eosinophils in broncho alveolar lavage (BAL) (**Figure S1.B**). As expected, this phenomenon is associated to an increased of IL-4 mRNA expression in lung (**Figure S1.C**) and of total IgE titer in blood (**Figure S1.D**). *Alt.* induces a stronger cellular recruitment in lung but similar IL-4 and IgE levels when compared to HDM. Qualitatively similar results were obtained in C57BL/6 mice (data not shown).

IFN-γ producing $CD4^+$ T (Th1) cells are key player controlling *Brucella melitensis* infection (Hanot Mambres *et al.,* 2016). As chronic IL-4-dominated Th2 response is well known to negatively affect Th1 response (Actor *et al.,* 1993, 1994; Apiwattanakul *et al.,* 2014; Dias *et al.,* 2011; Monin *et al.,* 2015; Potian *et al.,* 2011; Sher *et al.*, 1992), we compared the ability of group of mice having been subjected to i.n. sensitization with PBS, HDM or *Alt.* during 17 days to control a i.n. *B. melitensis* infection ($2x10^4$ CFU, as described in material and methods). It is important to note that sensitization treatments were continued during the course of infection in all of our experiments. We observed that HDM and *Alt.* sensitization deeply affect the control of *B. melitensis* infection in lung but have weak or none effect in spleen and liver (**Figure 1.A**). Asthmatic mice display strongly enhanced bacteria level in lung ranging from 1-2 log for HDM and 3-4 log for *Alt.* at 12 days post infection. Infected lung from asthmatic BALB/c mice display large aggregates of $GR1^+$ cells, presumably neutrophils, surrounding highly infected cells (**Figure 2**). These aggregates are not observed in other group of mice. Infected cells display heterogeneous phenotype and morphology (**Figure 3.A)**. A large fraction of infected cells colocalize with CD11c F4/80 and MHCII and GR1 makers but rarely with MBP (**Figure 3.B**), demonstrating that infected cells are predominantly composed of alveolar macrophages ($CD11c^+$ $F4/80^+$ $MHCII^+$) and neutrophils ($GR1^+$) but not of eosinophils (MBP^+). The more highly infected cells are large cells and harbor a typical morphology of alveolar macrophage. They colocalize with CD11c,

F4/80 and MHCII markers. In contrast, infected $GR1^+$ neutrophils display a few number of bacteria and are mainly observed surrounding highly infected alveolar macrophage.

Genetic background is important in the Th1/Th2 balance in mice. C57BL/6 mice preferentially mount Th1 response with high IFN-γ and low IL-4, whereas those from BALB/c mice favor Th2 response with low IFN-γ and high IL-4 *in vitro* (Hsieh *et al.,* 1995) and *in vivo* (Heinzel et al., 1989). Thus, C57BL/6 is regarded as a prototypic Th1-dominant mouse strains. However, C57BL/6 mice sensitized with HDM and *Alt.* also display enhanced bacteria growth in lung (**Figure 1.B**), demonstrating that this phenomenon is not restricted to Th2-dominant BALB/c mice. Finally, to generalize our observation, we also tested the impact of *Alt.* sensitization on the ability of BALB/c mice to control *Brucella suis* and *Brucella abortus* infection, the two other *Brucella* species causing human brucellosis. At 12 days post infection, we observed that asthmatic mice display enhanced level of both *Brucella* strain in lung (**Figure 1.C**). Note that we used weak dose of *B. suis* and *B. abortus* ($2x10^3$ CFU) to infect mice because these species display already an higher level of growth and persistence in lung from control mice when compared to *B. melitensis.*

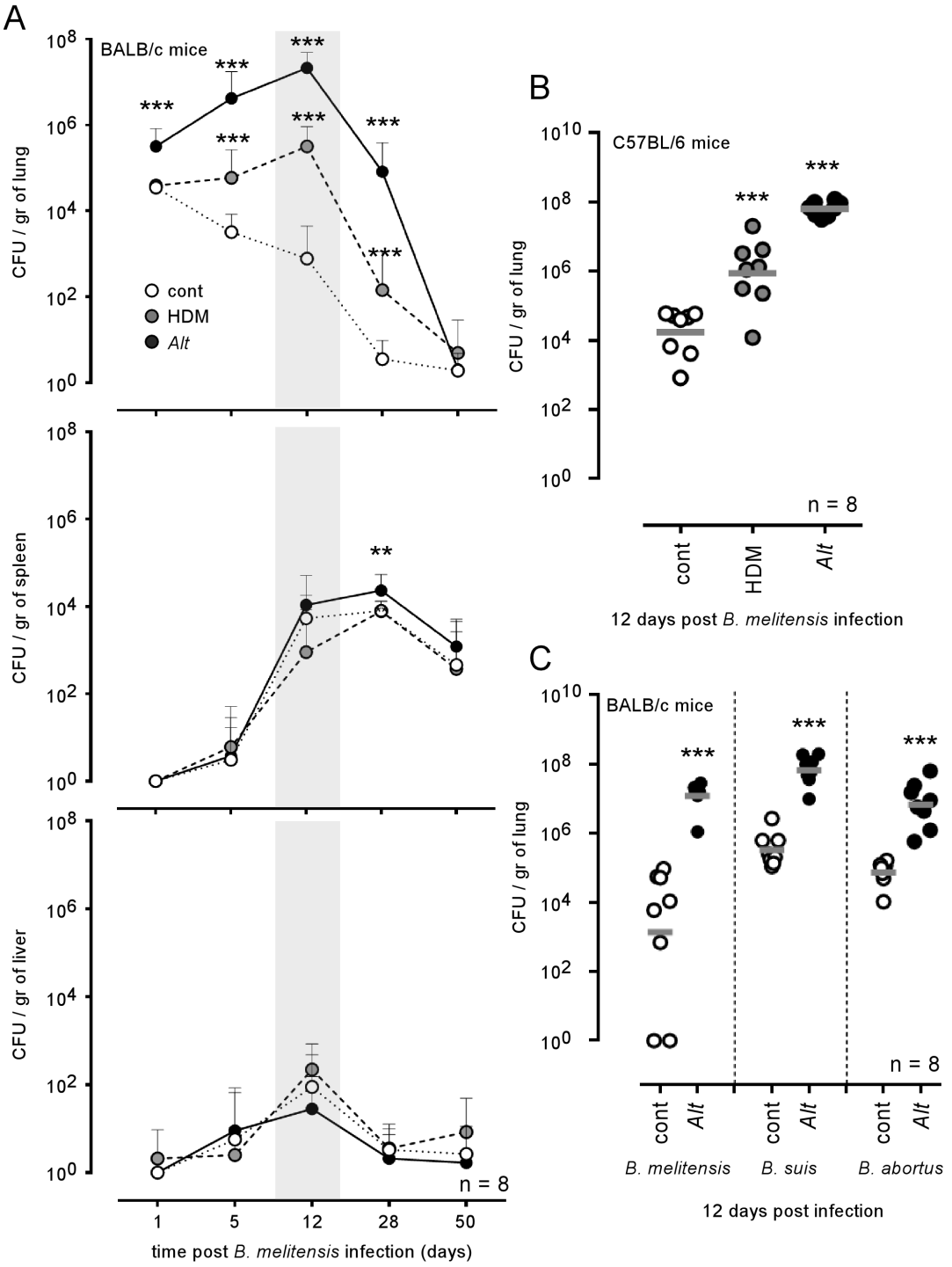


Figure 1: Impact of allergic asthma sensitization on the course of *Brucella* infection in wt mice. Wild type BALB/c and C57BL/6 mice received repeated i.n. administration of PBS, HDM or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis* (**A**,**B**) or $2x10^3$ CFU of *B. abortus* or *B. suis* (**C**), as indicated in the figure and in the material and methods. At selected time post infection, mice were sacrificed. The data represent the number of CFU/g of lung. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05, **p , 0.01.

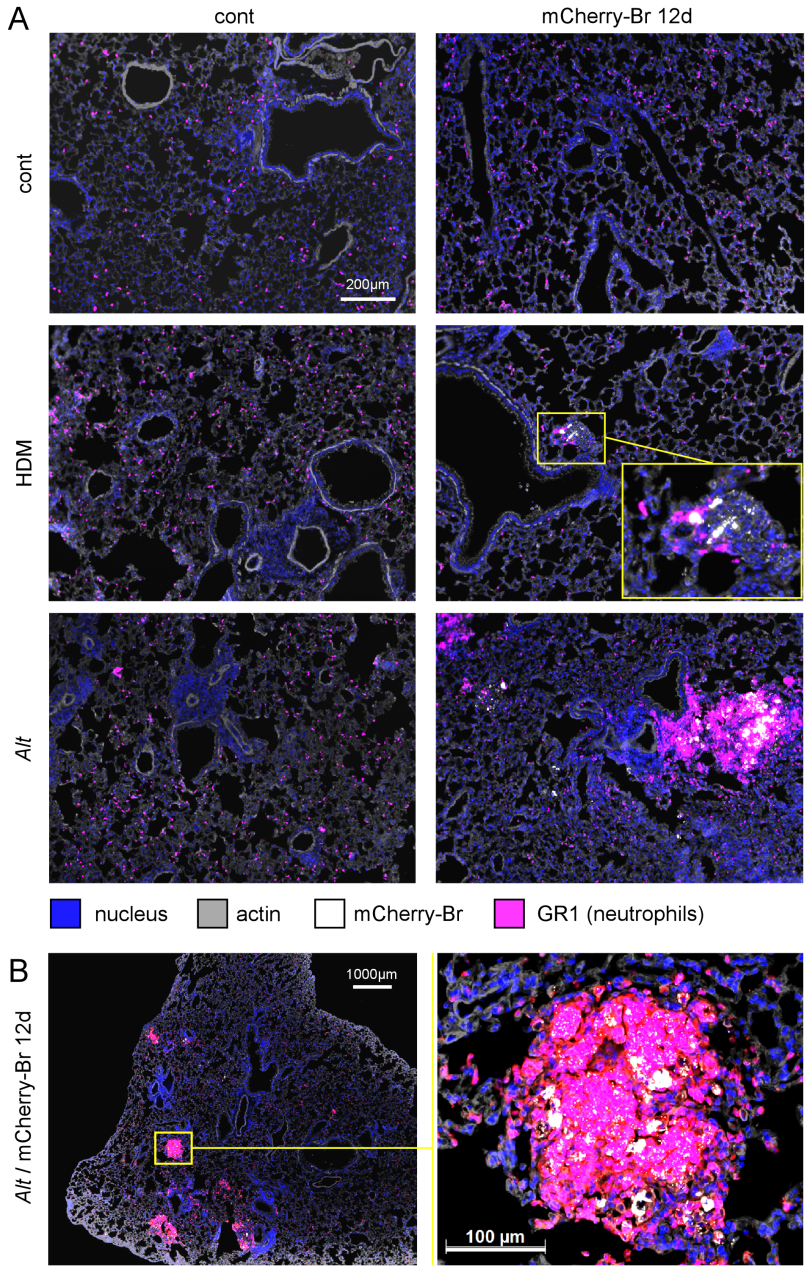


Figure 2: Microscopic analysis of lung from control and asthmatic BALB/c mice.
Wild type BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS, HDM or *Alt.* before i.n. inoculation of PBS or $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. The lung were harvested and fixed. Frozen sections were examined by immunohistofluorescence for bacteria (mCherry signal) and GR1-expressing cells. The panels are color-coded by Ag as indicated. The data are representative of two independent experiments. Scale bars, 200 µm.

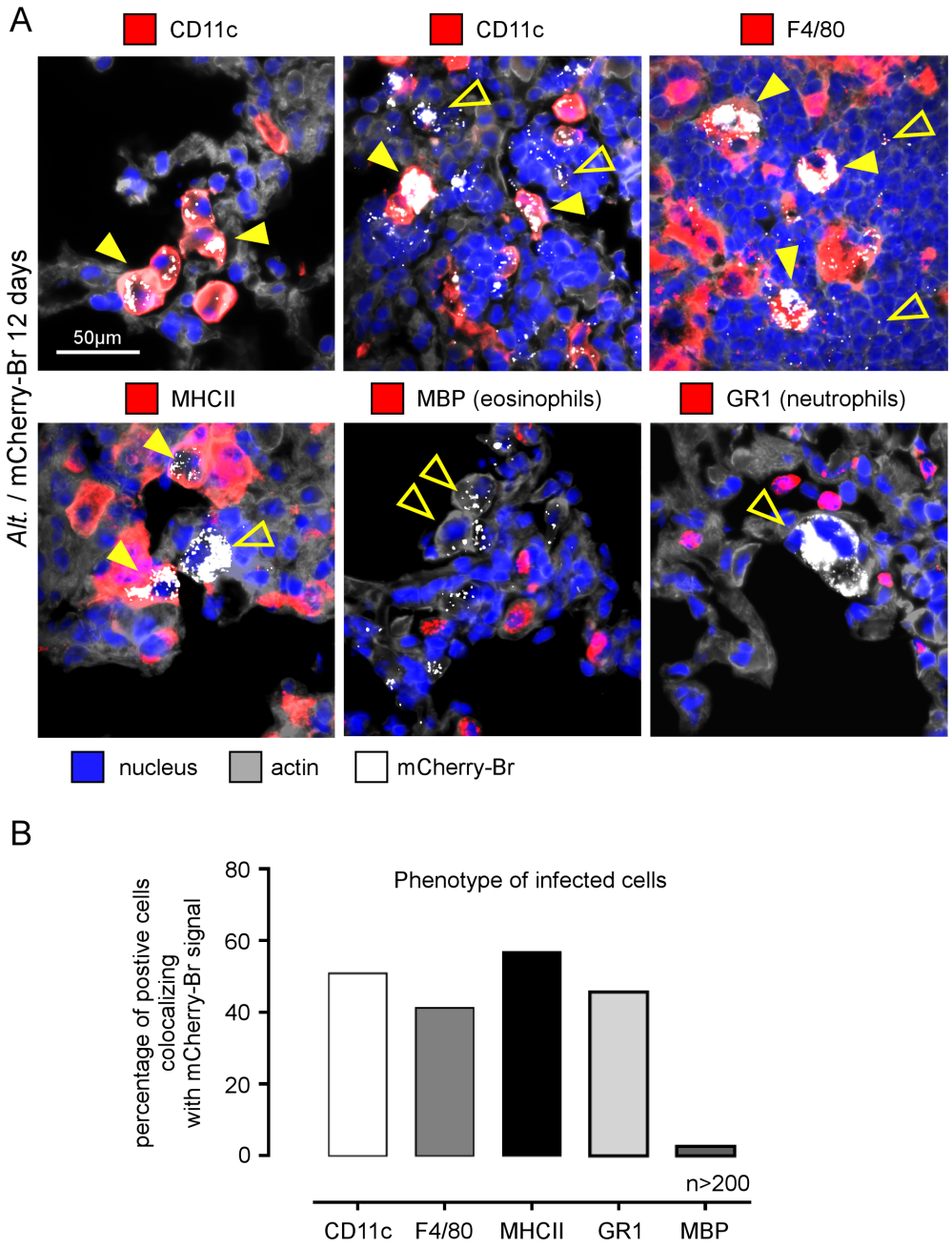


Figure 3: Cell surface phenotype of *Brucella melitensis* infected cells in asthmatic lung. Wild type BALB/c mice received repeated i.n. administration of *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. The lung were harvested and fixed. Frozen sections were examined by immunohistofluorescence for bacteria (mCherry-*Br* signal), CD11c, F4/80, GR1, MBP and MHCII-expressing cells. The panels are color-coded by Ag as indicated. **A**, high magnification representative view of infected cells. **B**, The data represent the percentage of mCherry-*Br* that co-localize with CD11c, F4/80, GR1, MBP and MHCII markers. A minimum of 200 infected cells from three different infected mice has been analyzed for each staining. These data are of two independent experiments. Scale bars, 100 or 50 µm.

Allergic asthma induced susceptibility to *Brucella* is dependent of IL-4/STAT6 signaling pathway and $CD4^+$ T cells

Mice deficient for IL-4, IL-13, or STAT6 develop attenuation of certain features of asthma, including eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness (Akimoto *et al.,* 1998; Webb *et al.,* 2000). However, DNA microarray profile analysis of wild type and $STAT6^{-/-}$ asthmatic mice showed that a large portion of the transcriptional asthma signature is STAT6 independent (Zimmermann *et al.,* 2004). In agreement, comparative analysis of wild type and $STAT6^{-/-}$ asthmatic lung showed that in absence of STAT6 sensitized mice displayed reduced IgE level in blood (**Figure S2.A**) and lymphocytes and eosinophils infiltration in lung airways (**Figure S2.B**). However, macrophage and neutrophil infiltration remains higher than in control mice and neutrophil have been reported exert a suppressive effect on protective response against *Brucella* (Barquero-Calvo *et al.,* 2013). Thus, we though first to determine if enhanced susceptibility to *B. melitensis* lung infection induced by HDM and *Alt.* treatment is dependent of IL-4/STAT6 signaling pathway. In this goal, we compared the impact of HDM and *Alt.* sensitization on *B. melitensis* infection in wild type, $IL\text{-}4^{-/-}$ and $STAT6^{-/-}$ BALB/c mice. We observed that neutralization of IL-4/STAT6 signaling pathway completely abrogate the enhanced susceptibility to *B. melitensis* infection due to both HDM and *Alt.* sensitization (**Figure 4**), demonstrating that enhanced susceptibility observed in asthmatic wild type mice is strictly dependent of Th2 response. Note that we have previously showed (Hanot Mambres *et al.,* 2015b) that absence of STAT-6 signaling does not affect the course of *B. melitensis* infection in non asthmatic mice.

As both αβ $CD4^+$ T cells (Fahy, 2015) and γδ T cells (Mathews et al., 2015) have been implicated in allergic asthma development, we next compared the ability of wild type, γδ $TCR^{-/-}$, $TAP1^{-/-}$ ($CD8^+$ T cells deficient) and $MHCII^{-/-}$ ($CD4^+$ T cells deficient) C57BL/6 mice sensitized with *Alt.* to control i.n. *B. melitensis* infection. Flow cytometry analysis (**Figure 5.A**) showed that $CD4^+$ T cell deficiency completely abrogated eosinophil recruitment in infected asthmatic mice. Absence of γδ T cells also reduce eosinophil recruitment but more moderately. However, only $CD4^+$ T cell deficiency impaired significantly *Alt.*-induced susceptibility to *Brucella* infection (**Figure 5.B**). Similar results were obtained in HDM model (data not shown).

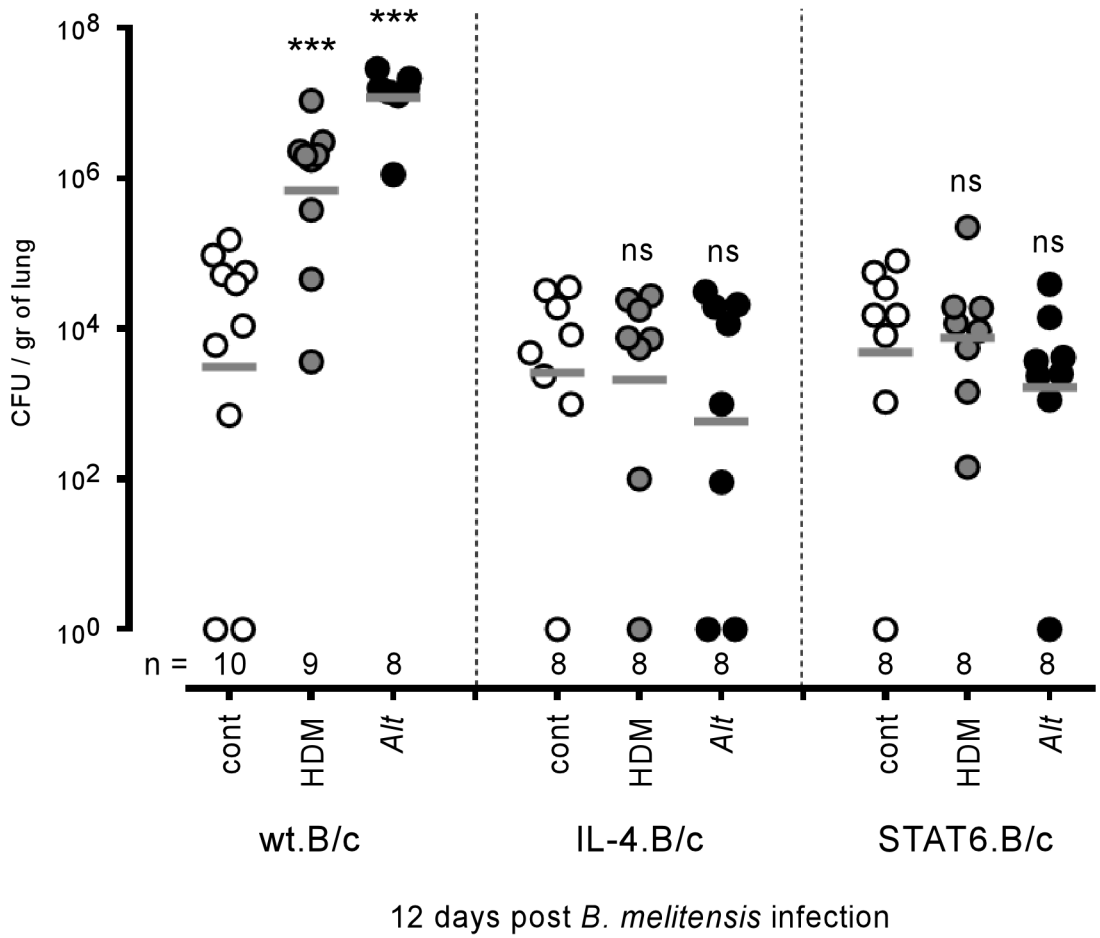


Figure 4: Impact of IL-4 and STAT6 deficiency on asthma-induced *Brucella* susceptibility. Wild type, IL4$^{-/-}$ and STAT6$^{-/-}$ BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS, HDM or *Alt.* before i.n. infection with 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. The data represent the number of CFU/g of lung at 12 days post infection from each group. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05, **p , 0.01.

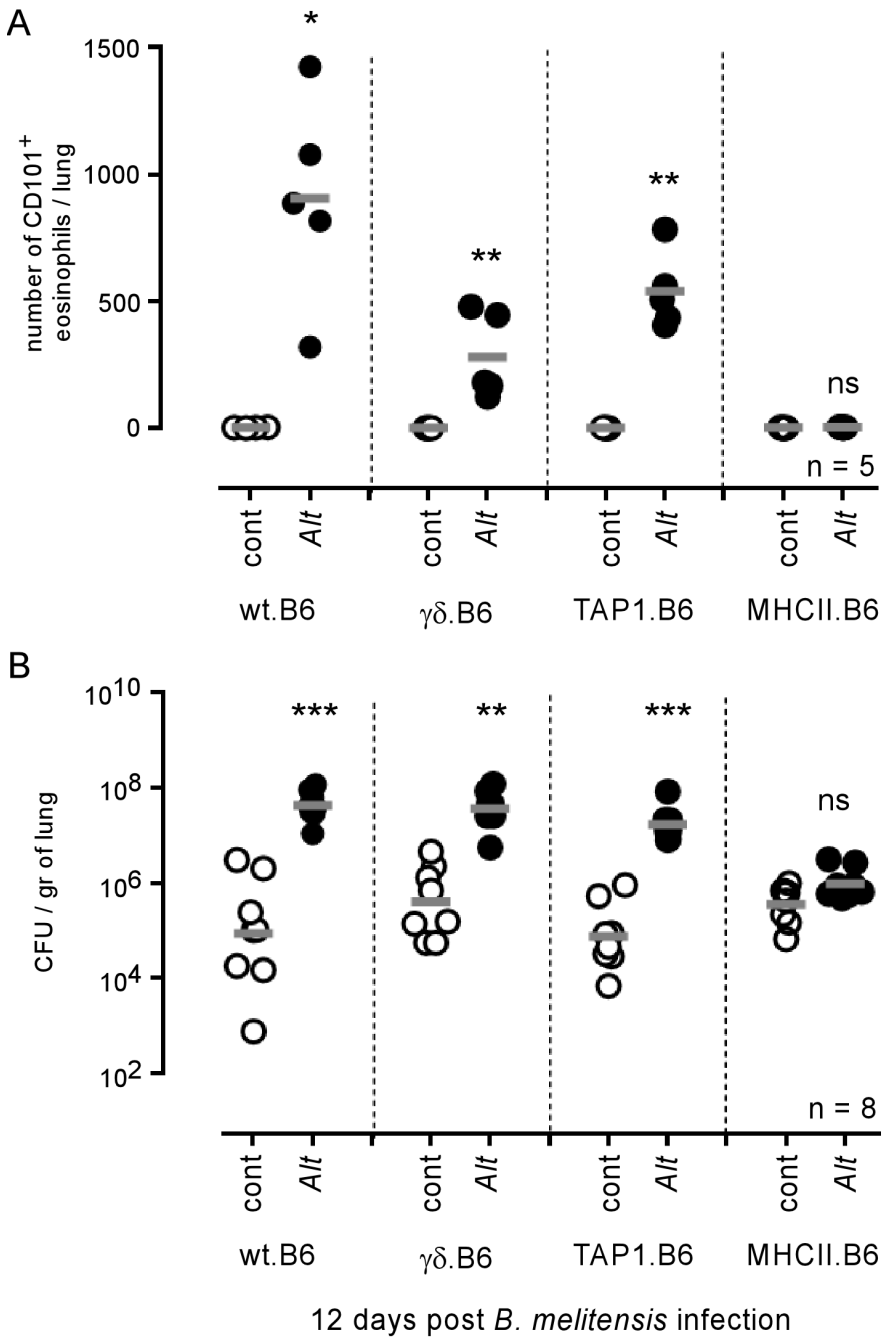


Figure 5: Impact of T lymphocyte deficiencies on asthma-induced *Brucella* susceptibility. Wild type, TAP1$^{-/-}$, MHCII$^{-/-}$ and γδTCR$^{-/-}$ C57BL/6 mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. infection with 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. **A**, The data represents the number of recruited eosinophils (SIGLEC-F$^+$ CD11c$^-$ CD101$^+$) x 10^5 per lung from each groups as determined by flow cytometry. **B**, The data represent the number of CFU/g of lung at 12 days post infection from each group. Horizontal gray lines represent the medians. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least three independent experiments. **p , 0.01.

Allergic asthma induced susceptibility to *Brucella* is independent of M2 macrophage polarization and eosinophils

Th2 response are known to induce via a STAT-6 dependent pathways the M2 polarization of macrophage characterized by high expression of Arginase1 level (For a review see (Muraille *et al.,* 2014b)). As *in vitro* study have demonstrated that *Brucella* multiply more actively in M2 macrophages (Xavier *et al.,* 2013), we analyzed the impact of our allergic asthma sensitization protocols on arginase activity in lung extract. We observed that both *Alt.* (**Figure 6.A**) and HDM (data not shown) sensitization significantly increase the arginase activity in lung. Flow cytometry analysis showed that Eosinophils are the main source of Arginase1 in the lung of control and asthmatic mice (**Figure 6.B**), suggesting that the increase arginase activity induced by allergic asthma is due to eosinophil recruitment and not to an M2 macrophage polarization.

In order to determine if asthma induced susceptibility to *Brucella* infection is dependent of arginase activity, we neutralized arginase and depleted eosinophils with repeated administration of nor-NOHA, a specific arginase inhibitor, and anti-IL-5, respectively. Any of these treatments are found to reduce the susceptibility induced by *Alt.*-sensitization (**Figure 6.C**), demonstrating that asthma induced susceptibility to *Brucella* is independent of M2 macrophage polarization and eosinophils. Note that eosinophil depletion following IL-5 neutralization as been confirmed by flow cytometry (**Figure S3**).

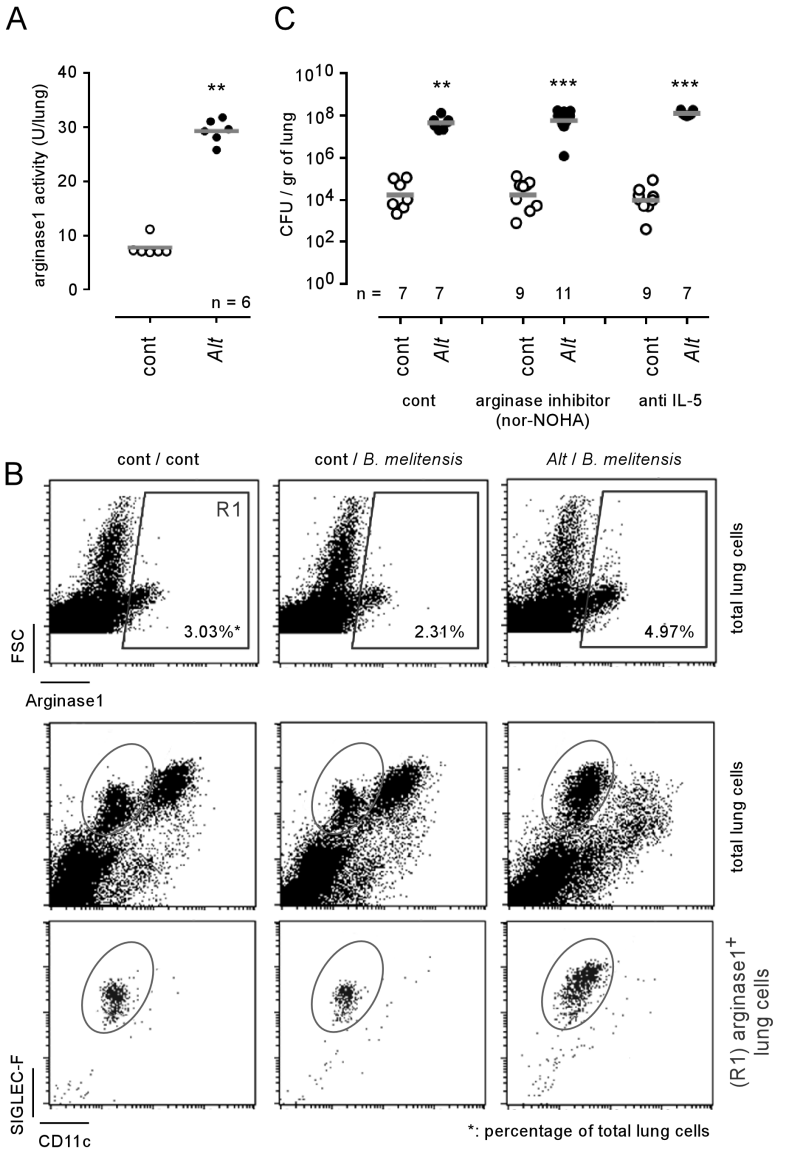


Figure 6: Asthma induced *Brucella* susceptibility is independent of arginase. A. The data represents the arginase activity / lung of PBS (cont) and *Alt.* sensitized wild type BALB/c mice. **B.** Wild type BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. administration of PBS or $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. Lung cells were collected, stained with anti CD11c, anti SIGLEC-F and anti Arginase1 as indicated in material and methods and analyzed by flow cytometry. Cells were gated according to the size and scatter to exclude dead cells and debris for analysis. The figure shows representative dot plots from individual lung in each group. **C.** Wild type BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. As indicated in Material and Methods, during sensitization and infection process, mice receive repeated administration of control mAb (cont group), mAb anti-IL-5 or arginase inhibitor. The data represent the number of CFU/g of lung at 12 days post infection from each group. Horizontal gray lines represent the medians. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least three independent experiments. **p , 0.01.

Allergic asthma induced susceptibility to *Brucella* is partially dependent of IL-10

Asthma induced Th2 response could directly or indirectly suppress Th1 protective immune response against *Brucella*. As IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and a master regulator of Th1 response (Couper *et al.,* 2008; Trinchieri, 2007) able to reduce protective immune response against *Brucella* (Corsetti *et al.,* 2013), we compared the ability of sensitized wild type, IL-12p40$^{-/-}$ and IL-10$^{-/-}$ BALB/c mice to control *Brucella melitensis* infection. Surprisingly, if IL-10 deficiency strongly reduces the asthma-induced susceptibility, this is not the case of IL-12p40 (**Figure 7.A**). A similar absence of effect was obtained in IL12p35$^{-/-}$, IL12p40$^{-/-}$, IFNγR$^{-/-}$ and IL-17RA$^{-/-}$ C57BL/6 mice (**Figure 7.B**), confirming that this result is not dependent of the strain of mice and that suppression of Th17 response is also not implicated in asthma-induced *Brucella* susceptibility. Flow cytometry analysis of lung cells from control, HDM and *Alt.* sensitized infected transgenic mice expressing GFP under the control of IL-10 promoter showed that IL-10 is mainly produced by B cells in control mice and is induced in CD4^{+} T cells following asthma sensitization (**Figure 8.A** and **8.B**). Taken together, these results suggest that IL-10 is a major mediator of HDM and *Alt.*-induced susceptibility to *B. melitensis* lung infection but that this phenomenon is independent of the neutralization of IL-12/IFNγ and IL-17RA dependent signaling pathway by IL-10.

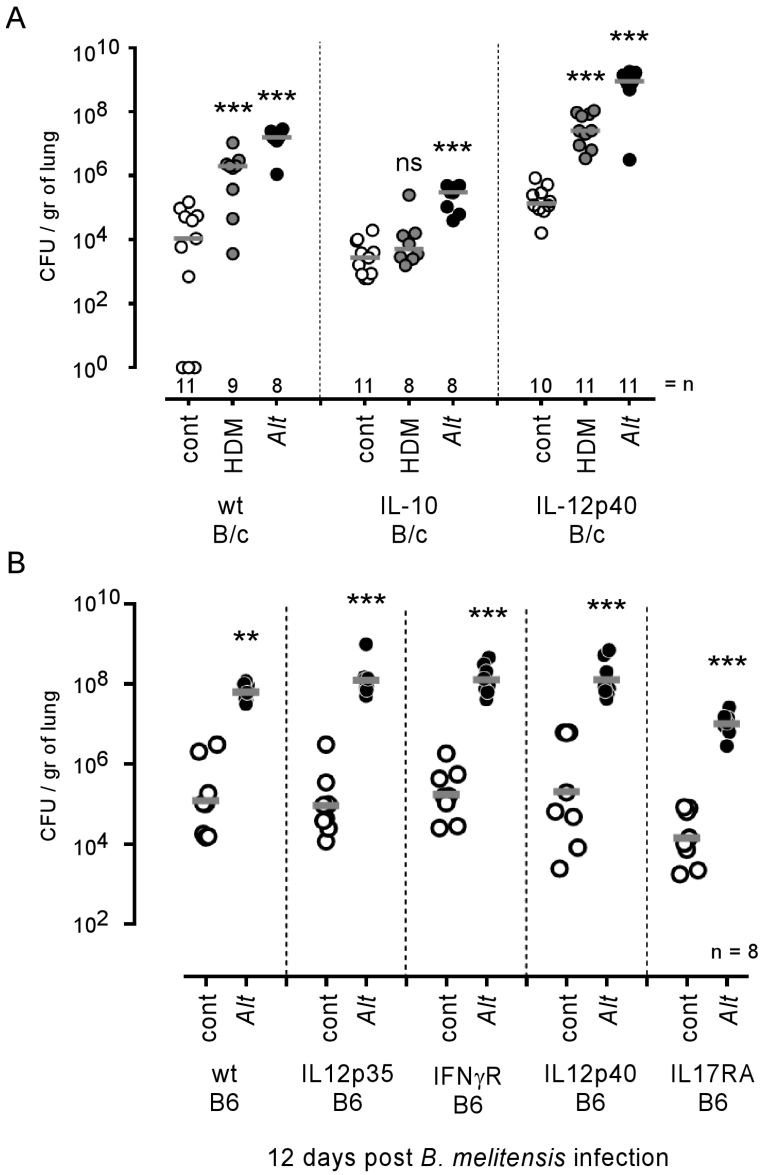


Figure 7: Impact of IL-10, IL-12, IFNγR and IL-17RA deficiency on asthma-induced *Brucella* susceptibility. A, Wild type, IL-$10^{-/-}$ and IL-$12p40^{-/-}$ BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. Data represents the CFUs per gram of lung. **B,** Wild type, IL-$12p35^{-/-}$, IL-$12p40^{-/-}$, IFNγ$R^{-/-}$ and IL-$17RA^{-/-}$ C57BL/6 mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed. Data represents the CFUs per gram of lung. Horizontal gray lines represent the medians. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least three independent experiments. **p , 0.01, ***p , 0.001.

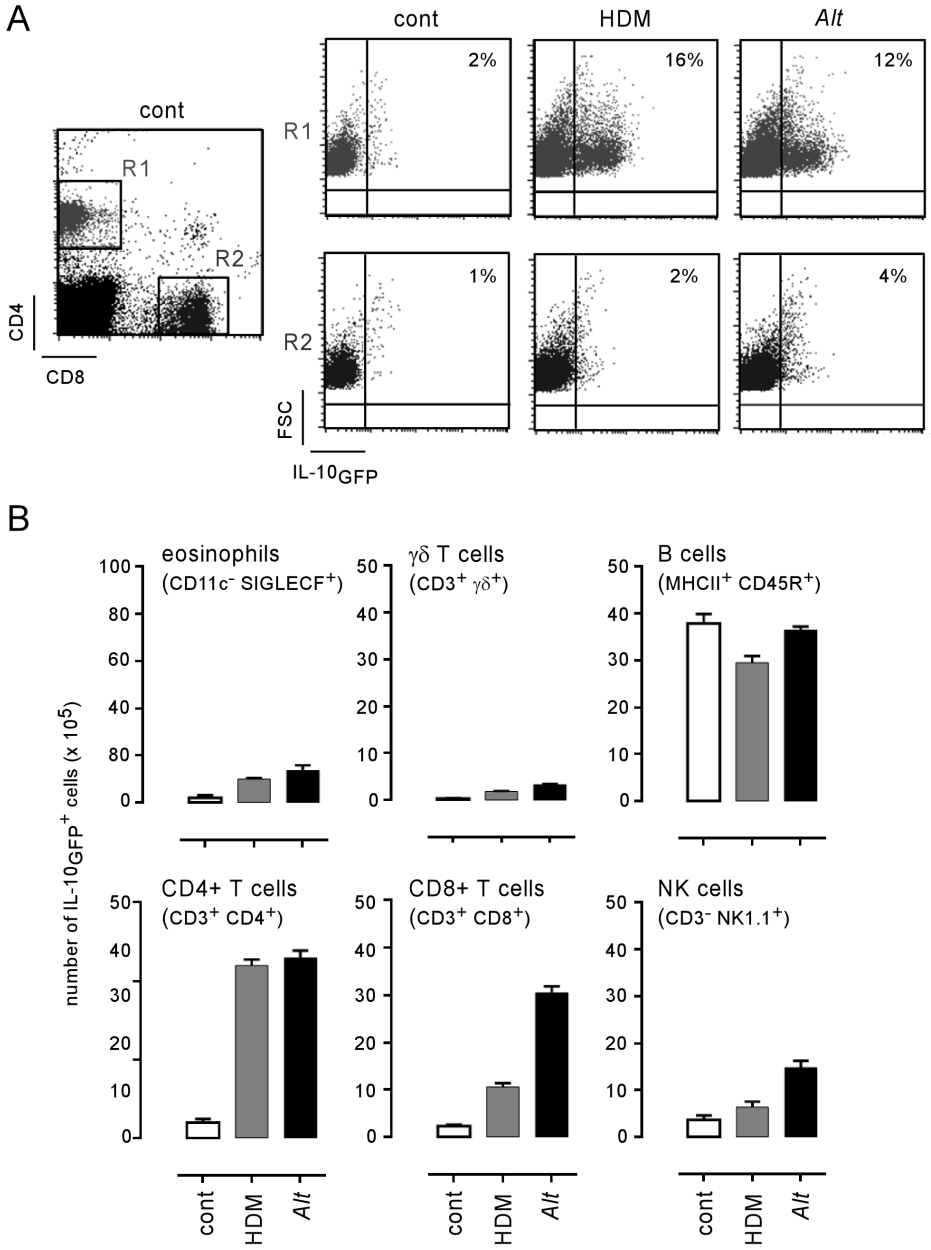


Figure 8: Characterization of IL-10 producing cells in lungs from infected asthmatic mice. IL-10GFP transgenic C57BL/6 mice were sensitized with PBS, HDM or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed and the spleen cells were analyzed by flow cytometry. **A**, Cells from PBS, HDM and *Alt.* infected mice were analyzed for IL-10GFP, CD4 and CD8 expression. The figure shows representative dot plots from individual lung in each group, as indicated in the figure. Number represent the percentage of IL-10GFP$^+$ cells on 50.000 acquired events. **B**, Data represents the number of IL-10GFP$^+$ eosinophils, gd$^+$ T cells, B cells, CD4$^+$ T cells, CD8$^+$ T cells and natural killer cells per 10^5 lung cells from control, HDM and *Alt.* infected mice. The data are representative of two independent experiments.

Allergic asthma does not affect protective immune memory against *Brucella*

As both HDM and *Alt.* sensitization strongly favor the growth and persistence of *B. melitensis* in lung, we tried to determine if it also affect the development of a protective memory against secondary i.n. *B. melitensis* infection. We compared the ability of group of wild type and STAT-$6^{-/-}$ BALB/c mice sensitized with PBS, HDM or *Alt.* during the course of a primary i.n. *Brucella* infection to control a secondary i.n. infection. As described in **Figure 9.A**, mice were sensitized during 17 days with PBS (control), HDM or *Alt.* before receive i.n. $2x10^4$ CFU of wild type *B. melitensis*. At 50 days post primary infection, mice were challenged with a mCherry-expressing *B. melitensis* and sacrificed at 28 days post challenge. Note that sensitization treatment was continued during both primary infection and secondary infection. As showed **Figure 9.B** and **9.C**, we observed that all group of wild type and STAT-$6^{-/-}$ BALB/c sensitized mice display a similar ability to control secondary *Brucella* infection suggesting that sensitization has not significantly affected the development of a protective memory against i.n. *B. melitensis* infection.

Allergic asthma increase the resistance *to Streptococcus pneumoniae* infection in mice

As asthma sensitization strongly increase the susceptibility of mice to pulmonary *Brucella* infection, we tried to determined if this effect can also be observed with another bacterial infection. In this goal, we compared the survival of control and *Alt.* sensitized wild type C57BL/6 (**Figure 10.A**) and wild type and STAT-$6^{-/-}$ BALB/c mice (**Figure 10.B**) to an i.n. infection with $2,4x10^7$ CFU of *Streptococcus pneumoniae.* This bacterial dose is 100% lethal in control mice but is well tolerated by asthmatic C57BL/6 and BALB/c mice. Only 10% of these later die after 8 days of infection. This increased resistance to *S. pneumoniae* is also observed in sensitized STAT-$6^{-/-}$ BALB/c mice demonstrating that this effect is independent of asthma-induced Th2 response.

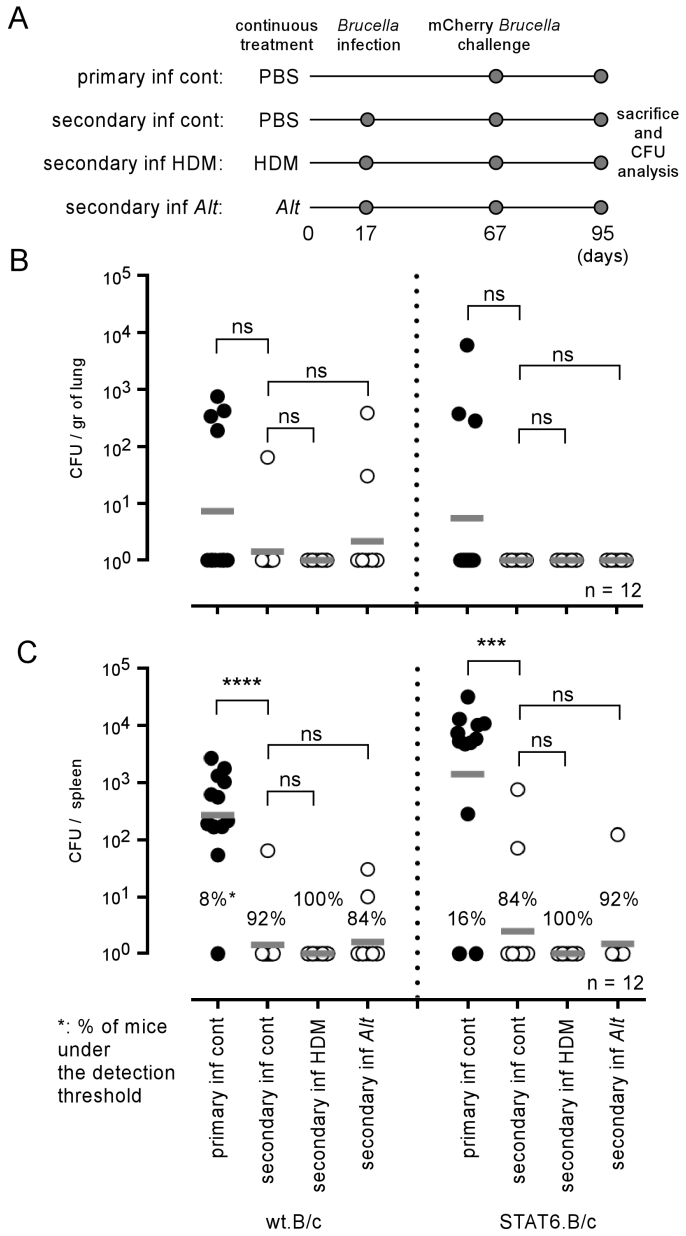


Figure 9: Influence of allergic asthma on the development of protective memory against *B. melitensis*. Wild type and STAT-6$^{-/-}$ BALB/c mice were weekly sensitized with PBS (twice a week), HDM extract (once a week) or *Alt.* extract (twice a week), as described in material and methods, during the entire experiment. Primary and secondary groups received i.n. administration of PBS or 2x10^4 CFU of wild type *B. melitensis* at 17 days, respectively. All groups were infected i.n. with 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis* at 67 days, are sacrificed at 95 days and the spleen is harvested and the CFU analyzed. **A** is a schematic representation of the protocol. **B** and **C** represent the number of CFU/g per of lung (**B**) and spleen (**C**). Horizontal gray lines represent the medians. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least two independent experiments. ***p , 0.001.

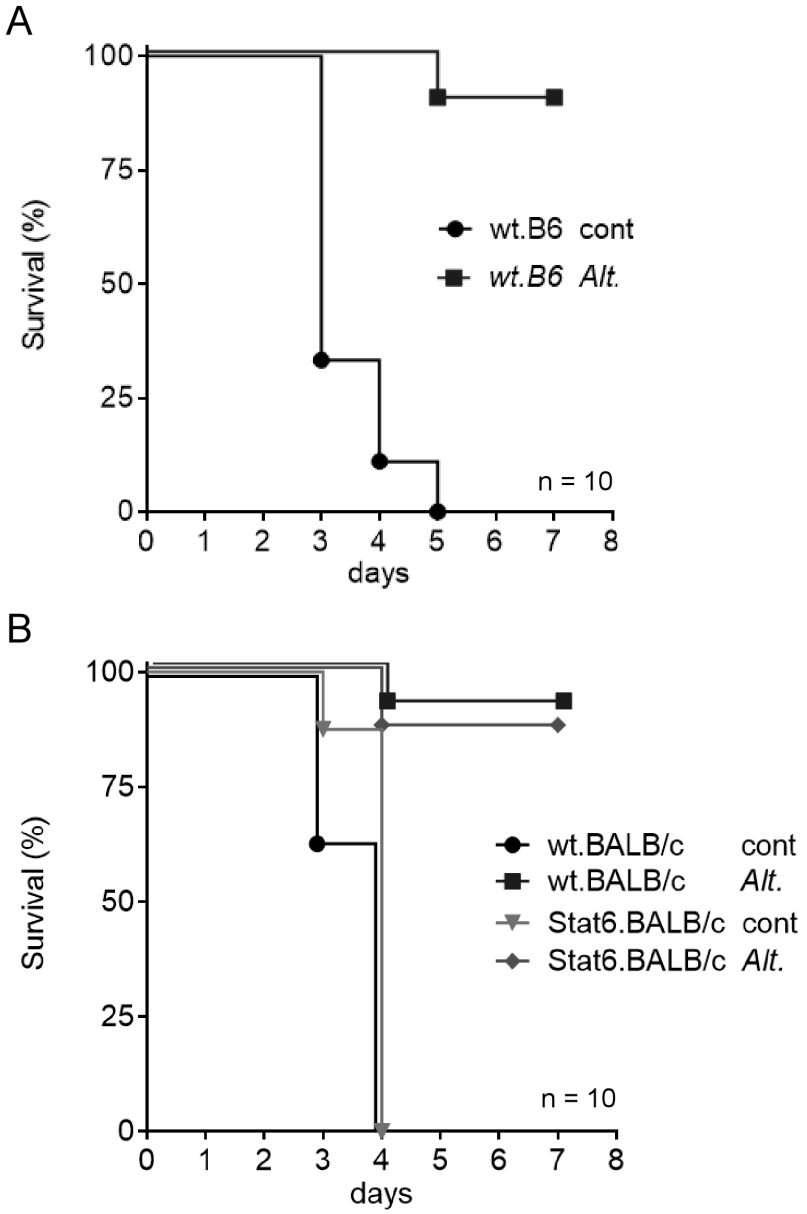


Figure 10: Asthma sensitization increase the resistance against intranasal *Streptococcus pneumoniae* infection. Wild type C57BL/6 (**A**) and Wild type and STAT-6$^{-/-}$ BALB/c mice (**B**) were sensitized with PBS (cont) or *Alt.* before i.n. infection with a lethal CFU dose of *Streptococcus pneumoniae,* as indicated in the legend. Data shown the percentage of mice surviving infection at a given time. n indicate the number of mice per group. These results are representative of at least two independent experiments.

DISCUSSION

Allergic asthma is one of the most common chronic inflammatory lung disease affecting humans. The risk factors for developing asthma are a combination of genetic predisposition along with environmental exposure to inhaled substances. The most common indoor allergens are derived from dust mites, mammals (including wild rodents and pets), and fungi (Pomés *et al.,* 2016). Infection play also a well documented role in asthma development (Stiemsma *et al.,* 2015). Conversely, the impact of asthma as a predisposing or aggravating condition to infection has been documented (for a review see (Patella *et al,,* 2015)) but has not clearly been addressed experimentally. Asthma is dominated by IL-4 (Th2) immune response and this later is well known since pioneer works of Mossman and Coffman (A. Sher *et al.,* 1992) to counter regulate IFNγ dominated (Th1) immune response controlling viral and bacterial infection. For example, chronic Th2 response induced by helminthes infection as been associated in numerous experimental model to impair Th1 response against intracellular (Dias *et al.,* 2011; Monin *et al.,* 2015; Potian *et al.,* 2011) and extracellular (Apiwattanakul *et al.,* 2014) bacteria and also virus (Actor *et al.,* 1993, 1994) and can reduce the efficacy of vaccines (Elias *et al.,* 2005; Noland *et al.,* 2010; Sabin *et al.,* 1996). However, contradictory results have been reported, showing no effect (Rafi *et al.,* 2015) or even boosting effect (Scheer *et al.,* 2014) of helminthes infection on Th1 response.

In the present study, we have analyzed the impact of chronic i.n. sensitization with house dust mite *Dermatophagoides farinae* (HDM) or the mold *Alternaria alternata* (*Alt.*) extract on the course of *Brucella* spp. and *Streptococcus pneumoniae* i.n. infection. We observed that both asthma sensitization protocols strongly enhanced the growth and persistence of *B. melitensis* in lung but not in other organs such as spleen and liver. In particular, at 12 days post infection, *Alt.* sensitization induces an increase of 2 and 3 log of CFU in lung of C57BL/6 and BALB/c mice, respectively. This increase is very surprising if we compare with the impact of IFNγ-R or αβTCR deficiency in C57BL/6 that lead only to an increase of 1 to 1,5 log of *Brucella* in lung of C57BL/6 (Hanot Mambres *et al.,* 2016). The lung from infected asthmatic mice display large aggregates of $GR1^+$ cells, presumably neutrophils, surrounding *Brucella* infected alveolar macrophages. Infection is concentrated in these areas and large fraction of lung tissue seems uninfected and healthy. In agreement,

infected asthmatic mice do not exhibit increased mortality, even after 100 days of chronic sensitization and infection. Asthma sensitization also favor the growth of *B. abortus* and *B. suis* infection in lung, demonstrating that this phenomenon can be generalized to all *Brucella* species described to affect human.

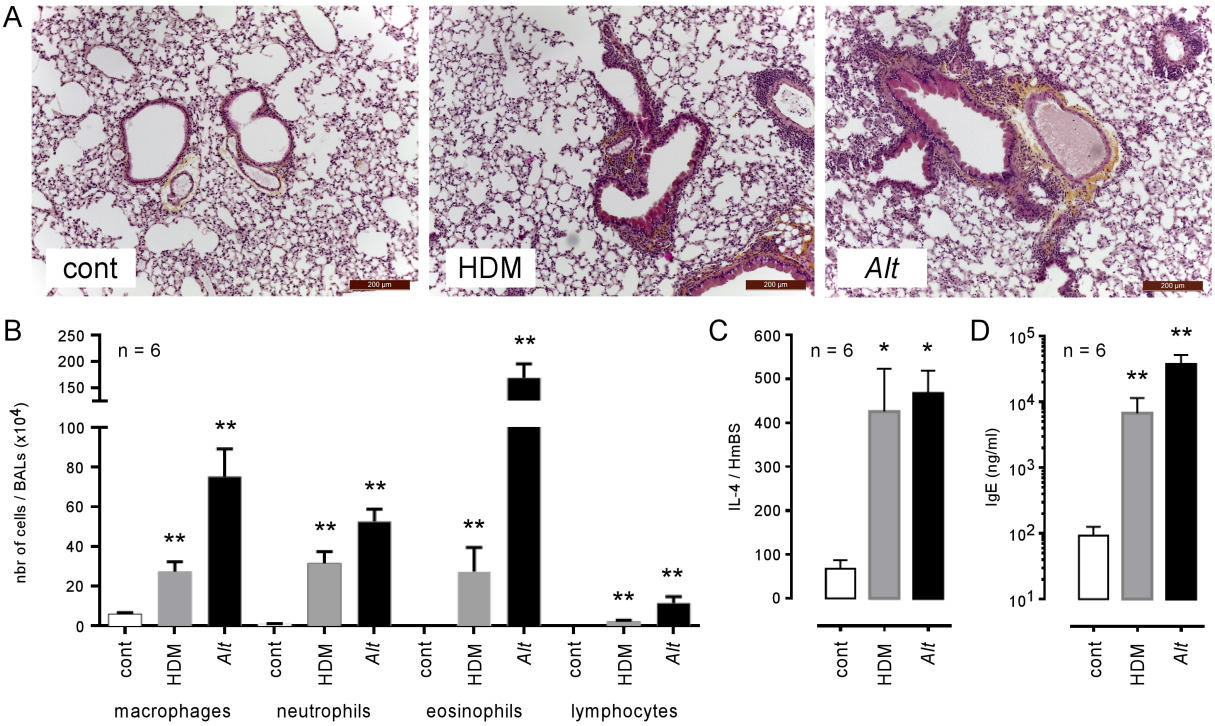
Despite of clinical studies identifying asthma as a significant risk factor for invasive pneumococcal disease (Jounio *et al.,* 2010; Juhn *et al.,* 2008; Klemets *et al.,* 2010; Talbot *et al.,* 2005), we observed that our asthma sensitization protocols dramatically increase the resistance of mice to *S. pneumoniae* infection, demonstrating that asthma induced susceptibility to *Brucella* is not generalizable to all bacterial infection in our experimental model and that asthma can also, in some cases, improve the resistance to bacterial infection. Very conflicting results have been published about the impact of asthma on *S. pneumoniae* infection in mice. It has been showed that intraperitoneally OVA sensitized mice display reduce (Sanfilippo *et al.,* 2015), similar (Clement *et al.,* 2009b) or enhanced (Guo *et al.,* 2016; CKang *et al,* 2009) susceptibility to infection. Discrepancies between these results can come from the serotype of *S. pneumoniae*, the sanitary level of mice or the delay between infection and asthma challenge.

The comparison of various mice strains displaying selective deficiency for key elements of immune response have demonstrated that the impact of asthma on *Brucella* lung infection is strictly dependent of $CD4^+$ T cells and of the IL-4/STAT6 pathways, suggesting that IL-4-producing $CD4^+$ (Th2) T cells are key actors of this phenomenon. Neutralization of IL-10 restore the control of *Brucella* growth control in lung of asthmatic mice. Flow cytometry analysis of infected asthmatic and control IL-10GFP transgenic mice showed that asthma sensitization increase the IL-10 production by $CD4^+$ T cells. Surprisingly, asthma-induced susceptibility is also observed in mice deficient for IL-12/IFNδR and IL-17RA pathway, suggesting that asthma affect other pathways controlling *Brucella* growth in lung. STAT-6 deficiency does not impair the resistance to *S. pneumoniae* infection following asthma sensitization, demonstrating that this phenomenon is induced by a different way of *Brucella* susceptibility. It has been reported that stimulation of lung innate immunity with an aerosolized lysate of non-typeable Haemophilus influenzae confers high-level protection against challenge with otherwise lethal inocula of *S. pneumoniae* (Clement *et al.,* 2008), suggesting that innate immune inflammation induced by asthma sensitization in STAT-$6^{-/-}$ mice could be sufficient to increase the resistance against *S. pneumoniae* .

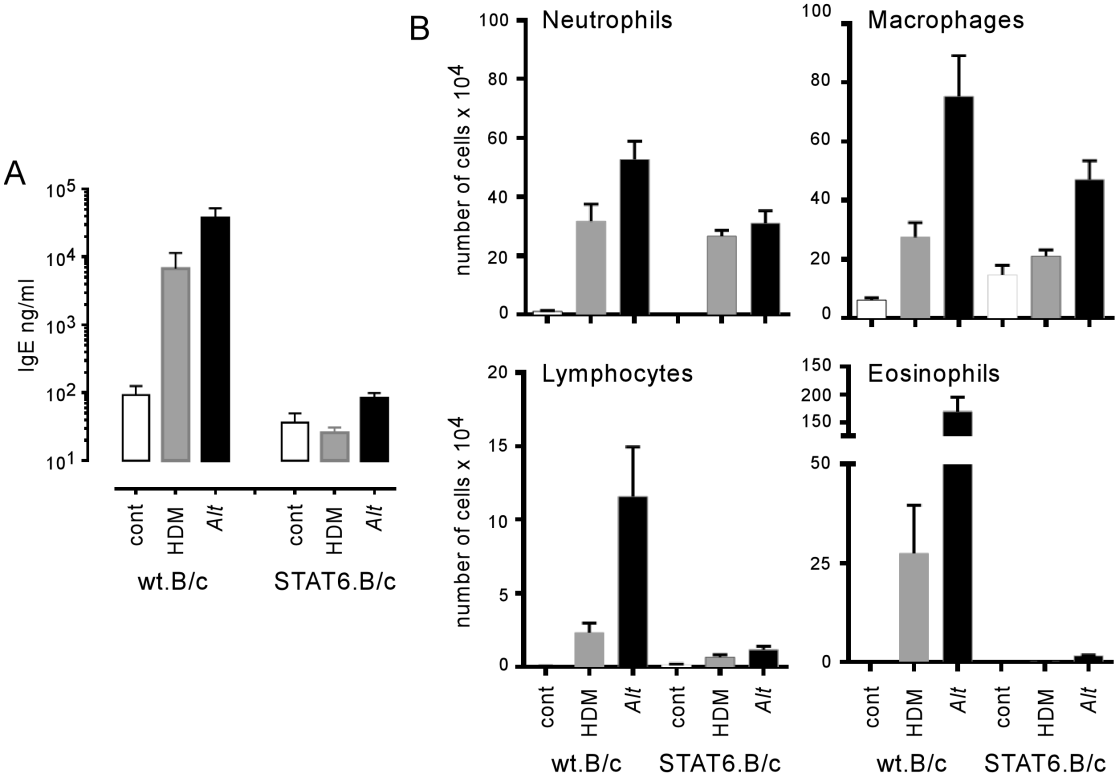
In summary, our results demonstrated that a same protocol of allergic asthma sensitization can dramatically reduce or increase the resistance to bacterial infection in mice depending of the infectious agent. These result open up new areas for investigation of the immune effectors controlling *Brucella* and *S. pneumoniae* growth in lung and suggests that it could be interesting to perform further clinical studies on the impact of asthma on *Brucella* and *S. pneumoniae* infections in human.

ACKNOWLEDGEMENTS

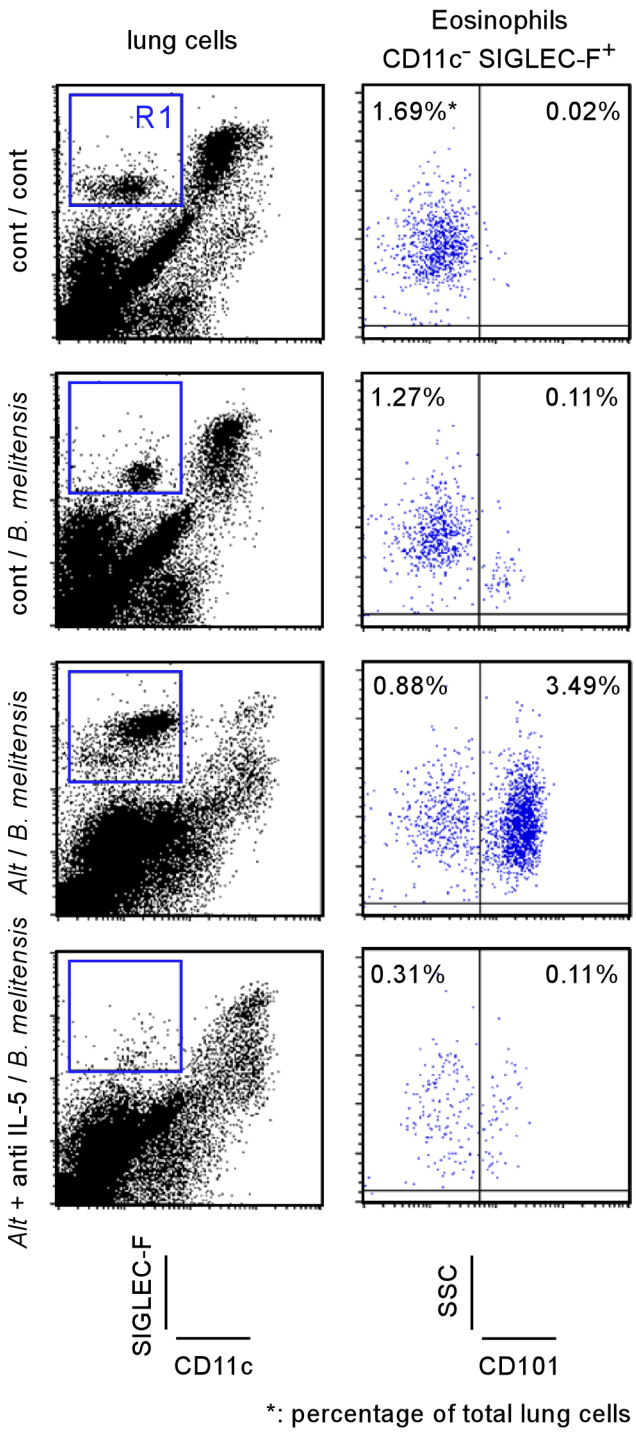
We thank Manon Merckx, Margaux Van Vyve and Aurore Demars for their helpful and kind assistance.



Supplementary figure 1: Comparison of allergic asthma models induced by intranasal sensitization with HDM or *Alt.* extracts. Wild type BALB/c mice were i.n. instillated with PBS (control), HDM or *Alt.* extracts during 17 days to induces allergic asthma. Three day after last sensitization, mice were sacrificed and lungs are collected to evaluated the intensity of asthma. **A**, Hematoxylin and eosin (HE) staining of lung paraffin sections (scale bar : 200 µm). **B**, Differential cell counts in BAL fluid. **C**, Q-PCR analysis of IL-4 mRNA expression level in lungs. **D**, Total blood IgE antibody concentration determined by ELISA. n denotes the number of mice used for each lineage. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05, **p , 0.01.



Supplementary figure 2: Impact of IL-4 and STAT6 deficiency on asthma-induced cell recruitment in lung. Wild type, IL4$^{-/-}$ and STAT6$^{-/-}$ BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS, HDM or *Alt.* before i.n. infection with 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis*. At 12 days post infection, mice were sacrificed and lungs are collected to evaluated the intensity of allergic phenotype. **A**, Blood circulating non specific IgE antibody concentration determined by ELISA. **B**, Number of cell counts in BAL fluid from control, HDM and *Alt.* infected mice. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05, **p , 0.01.



Supplementary figure 3: Depletion of eosinophil following the neutralisation of IL-5 in asthmatic mice. Wild type BALB/c mice received repeated i.n. administration of PBS or *Alt.* before i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis*. As indicated in Material and Methods, during sensitization and infection process, mice receive repeated administration of control mAb (cont group) or mAb anti-IL-5. At 12 days post *Brucella* infection, mice were sacrificed and the lung harvested and analyzed by flow cytometry. Data shown representative dot plot from individual mice. These results are representative of at least two independent experiments.

REFERENCES

Actor, J. K., M. A. Marshall, I. A. Eltoum, R. M. L. Buller, J. A. Berzofsky, and A. Sher. 1994. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: Association of viral persistence with egg granuloma formation. Eur.J.Immunol. 24: 3050–3056.

Actor, J. K., M. Shirai, M. C. Kullberg, R. M. Buller, A. Sher, and J. A. Berzofsky. 1993. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. Proc Natl Acad Sci USA 90: 948–52.

Akimoto, T., F. Numata, M. Tamura, Y. Takata, N. Higashida, T. Takashi, K. Takeda, and S. Akira. 1998. Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. J. Exp. Med. 187: 1537–1542.

Anandan, C., U. Nurmatov, O. C. P. Van Schayck, and A. Sheikh. 2010. Is the prevalence of asthma declining Systematic review of epidemiological studies. Allergy 65: 152–167.

Apiwattanakul, N., P. G. Thomas, R. E. Kuhn, D. B. R. Herbert, and J. A. McCullers. 2014. Helminth infections predispose mice to pneumococcal pneumonia but not to other pneumonic pathogens. Med. Microbiol. Immunol. 203: 357–364.

Barquero-Calvo, E., A. Martirosyan, D. Ordoñez-Rueda, V. Arce-Gorvel, A. Alfaro-Alarcón, H. Lepidi, B. Malissen, M. Malissen, J. P. Gorvel, and E. Moreno. 2013. Neutrophils Exert a Suppressive Effect on Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella abortus*. PLoS Pathog. 9.

Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn, and D. L. Sacks. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. J. Exp. Med. 183: 515–526.

Clement, C. G., M. J. Tuvim, C. M. Evans, D. M. Tuvin, B. F. Dickey, and S. E. Evans. 2009. Allergic lung inflammation alters neither susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection nor inducibility of innate resistance in mice. Respir. Res. 10: 70.

Clement, C. G., S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim. 2008. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177: 1322–1330.

Colmenero, J. D., J. M. Reguera, F. Martos, D. Sánchez-De-Mora, M. Delgado, M. Causse, A. Martín-Farfán, and C. Juárez. 1996. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases.,. ; :195–211.

Copin, R., M.-A. Vitry, D. Hanot Mambres, A. Machelart, C. De Trez, J.-M. Vanderwinden, S. Magez, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. PLoS Pathog. 8: e1002575.

Corne, J. M., C. Marshall, S. Smith, J. Schreiber, G. Sanderson, and S. T. Holgate. 2002. Frequency , severity , and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals : a longitudinal cohort study. Lancet 359: 831–834.

Corsetti, P. P., L. A. de Almeida, N. B. Carvalho, V. Azevedo, T. M. A. Silva, H. C. Teixeira, A. C. Faria, and S. C. Oliveira. 2013. Lack of Endogenous IL-10 Enhances Production of Proinflammatory Cytokines and Leads to *Brucella abortus* Clearance in Mice. PLoS One 8.

Cosgrove, D., D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. Mice lacking MHC class II molecules. Cell 66: 1051–1066.

Couper, K., D. Blount, and E. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J. Immunol. 180: 5771–5777.

Dias, A. T., S. B. R. de Castro, C. C. S. Alves, A. B. Rezende, M. F. Rodrigues, R. R. P. Machado, A. Fernandes, D. Negrão-Corrêa, H. C. Teixeira, and A. P. Ferreira. 2011. Lower production of IL-17A and increased susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfected with *Strongyloides venezuelensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106: 617–619.

Elias, D., H. Akuffo, A. Pawlowski, M. Haile, T. Schön, and S. Britton. 2005. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine 23: 1326–1334.

Fahy, J. V. 2015. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. Nat. Immunol. 15: 57–65.

Godfroid, J., A. Cloeckaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji, and J. J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 36: 313–326.

Guo, S., L. X. Wu, C. X. Jones, L. Chen, C. L. Hao, L. He, and J. H. Zhang. 2016. Allergic airway inflammation disrupts interleukin-17 mediated host defense against *streptococcus pneumoniae* infection. Int. Immunopharmacol. 31: 32–38.

Hammad, H., M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M. A. M. Willart, M. Kool, F. Muskens, and B. N. Lambrecht. 2010. Inflammatory dendritic cells — not basophils — are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. J. Exp. Med. 207: 2097–2112.

Hanot Mambres, D., A. Machelart, G. Potemberg, C. De Trez, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2016. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. J. Immunol. 196: 3780–3793.

Havaux, X., A. Zeine, and A. Dits. 2004. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. Clin. Exp. Immunol. 139: 179–188.

Heinzel, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, and R. M. Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J. Exp. Med. 169: 59–72.

Hsieh, C., S. E. Macatonia, A. O. Garra, and K. M. Murphy. 1995. T Cell Genetic Background Determines Default T Helper Phenotype Development In Vitro. J. Exp. Med. 181: 713–721.

Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 259: 1742–1745.

Jounio, U., R. Juvonen, A. Bloigu, S. Silvennoinen-Kassinen, T. Kaijalainen, H. Kauma, A. Peitso, A. Saukkoriipi, O. Vainio, T. Harju, and M. Leinonen. 2010. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. Clin. Respir. J. 4: 222–229.
Juhn, Y. J. 2012. Influence of Asthma Epidemiology on the Risk for Other Diseases. Allergy Asthma Immunol Res. 4: 122–131.
Juhn, Y. J., H. Kita, B. P. Yawn, T. G. Boyce, K. H. Yoo, M. E. McGree, A. L. Weaver, P. Wollan, and R. M. Jacobson. 2008. Increased risk of serious pneumococcal disease in patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 122: 719–723.
Kang, C. I., M. S. Rouse, R. Patel, H. Kita, and Y. J. Juhn. 2009. Allergic airway inflammation and susceptibility to pneumococcal pneumonia in a murine model with real-time in vivo evaluation. Clin. Exp. Immunol. 156: 552–561.
Klemets, P., O. Lyytika, P. Ruutu, J. Ollgren, and T. Kaijalainen. 2010. Risk of invasive pneumococcal infections among working age adults with asthma. Thorax 65: 698–703.
Klugman, K. P., and C. Feldman. 2001. *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract infections. Curr. Opin. Infect. Dis. 14: 173–9.
Magram, J., S. E. Connaughton, R. R. Warrier, D. M. Carvajal, C. Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. A. Faherty, and M. K. Gately. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN-γ production and type 1 cytokine responses. Immunity 4: 471–481.
Mambres, D. H., A. Machelart, J. M. Vanderwinden, C. De Trez, B. Ryffel, J. J. Letesson, and E. Muraille. 2015. In situ characterization of splenic *brucella melitensis* reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice. PLoS One 10: 1–20.
Marichal, T., D. Bedoret, C. Mesnil, M. Pichavant, S. Goriely, F. Trottein, D. Cataldo, M. Goldman, P. Lekeux, F. Bureau, and C. J. Desmet. 2010. Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 126.
Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley. 2004. The global burden of asthma : executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. Allergy 59: 469–478.
Mathews, J. a., D. I. Kasahara, L. Ribeiro, A. P. Wurmbrand, F. M. C. Ninin, and S. a. Shore. 2015. γδ T Cells Are Required for M2 Macrophage Polarization and Resolution of Ozone-Induced Pulmonary Inflammation in Mice. PLoS One 10: e0131236.
Monin, L., K. L. Griffiths, W. Y. Lam, R. Gopal, D. D. Kang, M. Ahmed, A. Rajamanickam, A. Cruz-Lagunas, J. Zuniga, S. Babu, J. K. Kolls, M. Mitreva, B. A. Rosa, R. Ramos-Payan, T. E. Morrison, P. J. Murray, J. Rangel-Moreno, E. J. Pearce, and S. A. Khader. 2015. Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. J. Clin. Invest. 125: 4699–4713.
Muñoz, N., L. Van Maele, J. M. Marqués, A. Rial, J. C. Sirard, and J. A. Chabalgoity. 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. Infect. Immun. 78: 4226–4233.
Muraille, E., O. Leo, and M. Moser. 2014. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? Front. Immunol. 5: 1–12.
Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in Il-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. Immunity 17: 375–387.

Noland, G. S., D. R. Chowdhury, J. F. U. Jr, F. Zavala, and N. Kumar. 2010. Helminth infection impairs the immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* DNA vaccine, but not irradiated sporozoites, in mice. Vaccine 28: 2917–2923.
Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V Tsianos. 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 6: 91–99.
Patella, V., M. Bocchino, and G. Steinhilber. 2015. Asthma is associated with increased susceptibility to infection. Minerva Med. 106: 1–7.
Pomés, A., M. D. Chapman, and S. Wünschmann. 2016. Indoor Allergens and Allergic Respiratory Disease. Curr. Allergy Asthma Rep. 16: 43.
Potian, J. A., W. Rafi, K. Bhatt, A. McBride, W. C. Gause, and P. Salgame. 2011. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. J. Exp. Med. 208: 1863–1874.
Rafi, W., K. Bhatt, W. C. Gause, and P. Salgame. 2015. Neither primary nor memory immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection is compromised in mice with chronic enteric helminth infection. Infect. Immun. 83: 1217–1223.
Sabin, E. a, M. I. Araujo, E. M. Carvalho, and E. J. Pearce. 1996. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J. Infect. Dis. 173: 269–272.
Sanfilippo, A. M., Y. Furuya, S. Roberts, S. L. Salmon, and D. W. Metzger. 2015. Allergic Lung Inflammation Reduces Tissue Invasion and Enhances Survival from Pulmonary Pneumococcal Infection in Mice: Correlation with Increased Expression of TGF-β1 and SiglecFlow Alveolar Macrophages. Infect. Immun. 83: 2976–2983.
Scheer, S., C. Krempl, C. Kallfass, S. Frey, T. Jakob, G. Mouahid, H. Mone, A. Schmitt-Gräff, P. Staeheli, and M. C. Lamers. 2014. *S. Mansoni* bolsters anti-viral immunity in the murine respiratory tract. PLoS One 9.
Seleem, M. N., S. M. Boyle, and N. Sriranganathan. 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. Vet. Microbiol. 140: 392–398.
Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat. Biotechnol. 22: 1567–1572.
Sher, A., R. T. Gazzinelli, I. P. Oswald, M. Clerici, M. Kullberg, E. J. Pearce, J. a Berzofsky, T. R. Mosmann, S. L. James, and H. C. Morse. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. Immunol. Rev. 127: 183–204.
Stein, R. A. 2011. Super-spreaders in infectious diseases. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. 15: e510–e513.
Stiemsma, L. T., L. A. Reynolds, S. E. Turvey, and B. B. Finlay. 2015. The hygiene hypothesis : current perspectives and future therapies. ImmunoTargets Ther. 4: 143–157.
Talbot, T. R., T. V. Hartert, E. Mitchel, N. B. Halasa, P. G. Arbogast, K. A. Poehling, W. Schaffner, A. S. Craig, and M. R. Griffin. 2005. Asthma as a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease. Pediatr. Infect. Dis. J. 24: 854–63.
Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. J. Exp. Med. 0: 239–243.

van der Poll, T., and S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet 374: 1543–1556.
Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, H. L. Ploegh, and S. Tonegawa. 1992. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. Cell 71: 1205–1214.
Vitry, M.-A., C. De Trez, S. Goriely, L. Dumoutier, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. Infect. Immun. 80: 4271–80.
Vitry, M.-A., D. Hanot Mambres, C. De Trez, S. Akira, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2014. Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*. J. Immunol. 192: 3740–52.
Webb, D. C., a N. McKenzie, a M. Koskinen, M. Yang, J. Mattes, and P. S. Foster. 2000. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. J. Immunol. 165: 108–113.
Xavier, M. N., M. G. Winter, A. M. Spees, A. B. Den Hartigh, K. Nguyen, C. M. Roux, T. M. A. Silva, V. L. Atluri, T. Kerrinnes, A. M. Keestra, D. M. Monack, P. A. Luciw, R. A. Eigenheer, A. J. Baumler, R. L. Santos, and R. M. Tsolis. 2013. PPARγ-mediated increase in glucose availability sustains chronic *brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. Cell Host Microbe 14: 159–170.
Zimmermann, N., A. Mishra, N. E. King, P. C. Fulkerson, M. P. Doepker, N. M. Nikolaidis, L. E. Kindinger, E. a Moulton, B. J. Aronow, and M. E. Rothenberg. 2004. Transcript signatures in experimental asthma: identification of STAT6-dependent and -independent pathways. J. Immunol. 172: 1815–1824.

VI. Impact de l'infection par Trypanosoma brucei *sur les capacités de l'hôte à contrôler l'infection par* Brucella melitensis.

1. Trypanosomiase Africaine humaine : Agent infectieux et épidémiologie

La trypanosomiase Africaine Humaine (TAH), ou maladie du sommeil, est une pathologie qui résulte de l'infection par un groupe de parasites, les trypanosomes. Le trypanosome est un organisme unicellulaire (protozoaire), qui fait partie de la famille des *Trypanosomatidae* et du genre *Trypanosoma*. Le parasite mesure entre 15 et 30 μm et se déplace à l'aide de son flagelle. Il présente la structure d'une cellule eucaryote avec une mitochondrie tubulaire contenant le kinétoplaste (ADN circulaire mitochondriale condensé) (**Figure 11**). Parmi les différentes espèces de trypanosomes, *Trypanosoma brucei*, le parasite responsable de la TAH, est généralement extracellulaire (Brun *et al*., 2010). Il existe trois sous-espèces de *Trypanosoma brucei*: *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*. Chacune infecte les mammifères mais seul *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont pathogènes pour l'homme. En effet, le plasma humain contient naturellement des facteurs lytiques qui protègent l'organisme contre les infections par les trypanosomes. Un complexe composé de différentes protéines sériques et de HDL (*high density lipoprotein*) entre dans le parasite par endocytose. Lorsque la vacuole d'endocytose fusionne avec les lysosomes, les facteurs lytiques de l'hôte vont induire une perméabilisation de la membrane lysosomale. La libération du contenu lysosomale dans le cytoplasme induira la mort du parasite. Il semblerait que, par des mécanismes encore peu décrits, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* possèdent des mécanismes de résistance à ces facteurs lytiques (reviewed in Vanhamme and Pays, 2004).

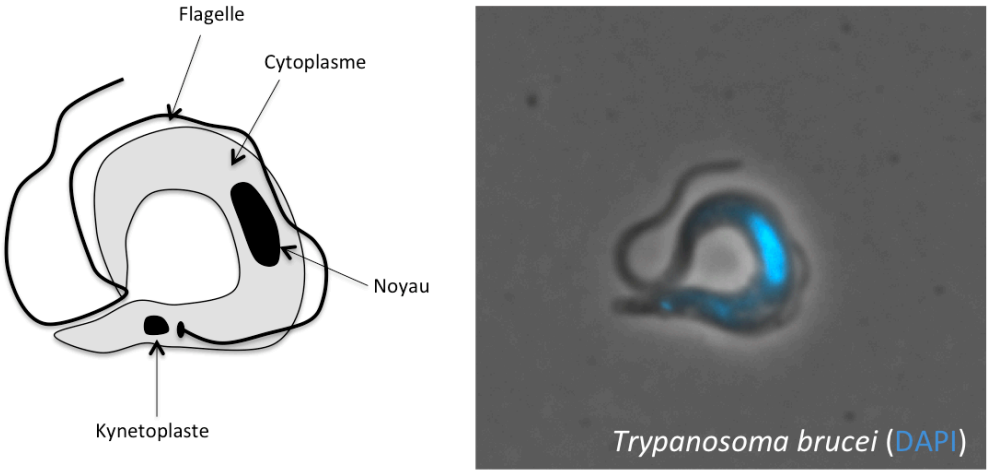


Figure 11 : Structure cellulaire de *T. brucei brucei*

Trypanosoma brucei est un parasite extracellulaire eucaryote. Il est caractérisé par un large noyau central et un kinétoplaste apical (contenant de l'ADN mitochondrial).

T. brucei est transmis d'un hôte mammifère à un autre par un insecte vecteur sanguinivore du genre *Glossina*, la mouche tsétsé. Il existe 30 espèces de mouches tsétsé qui présentent différentes capacités à transmettre *T. brucei rhodesiense* et *T. brucei gambiense* à l'homme (Cecchi *et al.*, 2015). Le mâle et la femelle peuvent transmettre le parasite mais il n'y a pas de transmission verticale aux larves. Chaque nouvelle mouche a donc besoin de se nourrir du sang d'un animal infecté avant de pouvoir transmettre le parasite à un autre mammifère. Une fois dans le tube digestif, le parasite met environ 5 semaines pour se multiplier, atteindre les glandes salivaires et développer sa forme infectieuse (Macleod *et al.*, 2007).

La symptomatologie de la TAH se divise en deux grandes phases. La première fait suite à l'infection qui s'associe parfois à la formation d'un chancre au site d'inoculation du parasite par la mouche tsétsé (observé chez 20 % des patients). Le parasite va se multiplier au site d'infection avant de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants pour disséminer dans tout le système circulatoire (sanguin et lymphatique). Durant cette première phase d'infection, la pathologie se caractérise par une fièvre intermittente, une fatigue, une lymphadénopathie et une hépatosplénomégalie.

La santé du patient se détériore rapidement lorsque le parasite passe du système circulatoire vers le système nerveux central (SNC) (**Box 10, Figure 12**) (Lamour *et al*., 2015). Après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique, la colonisation du SNC par le parasite entraine une inflammation du cerveau (meningo-encephalite) et une infiltration cellulaire dans la moelle épinière. L'entrée du parasite dans le système nerveux est un processus actif et a lieu au niveau des jonctions intercellulaires de la barrière hémato-encéphalique (Masocha *et al.*, 2007). Cette deuxième phase de l'infection, est généralement associée à des troubles du sommeil et des troubles neuropsychologiques chez les patients infectés.

T. b. rhodesiense cause une infection aiguë chez l'homme culminant avec la colonisation rapide du SNC. En l'absence de traitement, le parasite induit la mort du patient en 6 à 8 mois (Fèvre *et al.*, 2006). Par opposition, l'infection par *T. b. gambiense* est décrite comme une maladie chronique avec une période asymptomatique de plusieurs années avant l'apparition des troubles neuropsychologiques (Brun *et al*., 2010).

Pour les deux formes de TAH, on estime que 500.000 à 700.000 individus sont infectés avec environs 30.000 nouveaux cas chaque année (Brun *et al*., 2010). Il est important de noter que

ces chiffres sont vraisemblablement sous-estimés. Environ 60 millions de personnes vivent dans les zones à risque et la plupart d'entre eux n'ont pas accès aux soins de santé et aux tests diagnostiques. Les répartitions géographiques des deux formes de TAH sont diamétralement opposées. Les foyers infectieux de *T. b. gambiense* recouvrent l'ouest de l'Afrique alors que l'infection par *T. b. rhodesiense* recouvre l'est et le sud de l'Afrique. Un seul pays d'Afrique (l'Ouganda) est touché par les deux formes de TAH (**Figure 13**).

Trois grandes épidémies ont touché le continent africain dans le siècle passé (Steverding, 2008). La première a touché l'Afrique équatorienne et a causé la mort d'environ 800.000 personnes entre 1896 et 1906 (Louis, 2005). L'épidémie a ressurgi à deux reprises en 1930 et en 1990 causant la mort de millions de personnes (Smith *et al., 1998)*.

« En l'absence de traitement, le virus Ebola tue rapidement 70 % des patients lorsque la TAH tue 100 % des patients mais plus lentement. »

Molyneux

Box 10 : Passage du parasite dans le système nerveux central

Le cerveau se protège des micro-organismes circulant grâce à la barrière hémato-encéphalique. Une structure cellulaire complexe qui vise à sélectionner les éléments pouvant entrer ou non dans le système nerveux central. Le cerveau est aussi considéré comme un site immunitaire privilégié puisqu'il contient peu de cellules immunitaires dans le but de limiter les réactions inflammatoires pouvant être fatales pour l'organisme. Le système nerveux central offre donc un environnement favorable à la survie microbienne si ceux-ci parviennent à y accéder. De nombreux agents pathogènes et notamment les trypanosomes vont coloniser le SNC et échapper à la pression immunitaire de l'hôte (Masocha and Kristensson, 2012).

Le parasite est donc capable de quitter les vaisseaux sanguins pour entrer dans le parenchyme cérébral. Cependant, les jonctions intercellulaires restent intactes et il n'y a aucune protéine plasmatique retrouvée dans le parenchyme cérébral (Mulenga *et al*., 2001). Cela suggère que l'entrée du parasite est un processus actif et qu'il ne découle pas d'un évènement passif lié à une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Les mécanismes d'entrée du parasite sont peu décrits, mais il semblerait que l'entrée du trypanosome dans le cerveau soit diminuée dans les souris déficientes pour les lymphocytes B et T (souris RAG-1 déficiente) (Masocha *et al*., 2004). Cela suggère que le parasite utilise des mécanismes similaires à ceux des lymphocytes pour entrer dans le système nerveux central ou encore que les lymphocytes altèrent l'intégrité de la membrane basale qui faciliterait l'entrée du parasite. Il a aussi été montré qu'une souris déficiente pour l'IFN-γ (une cytokine clé impliquée dans le contrôle du parasite), présente une diminution de l'invasion du parasite dans le système nerveux central (Masocha *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la réponse immunitaire mise en place par l'hôte contre l'infection par le parasite facilite finalement l'invasion du système nerveux central par celui-ci.

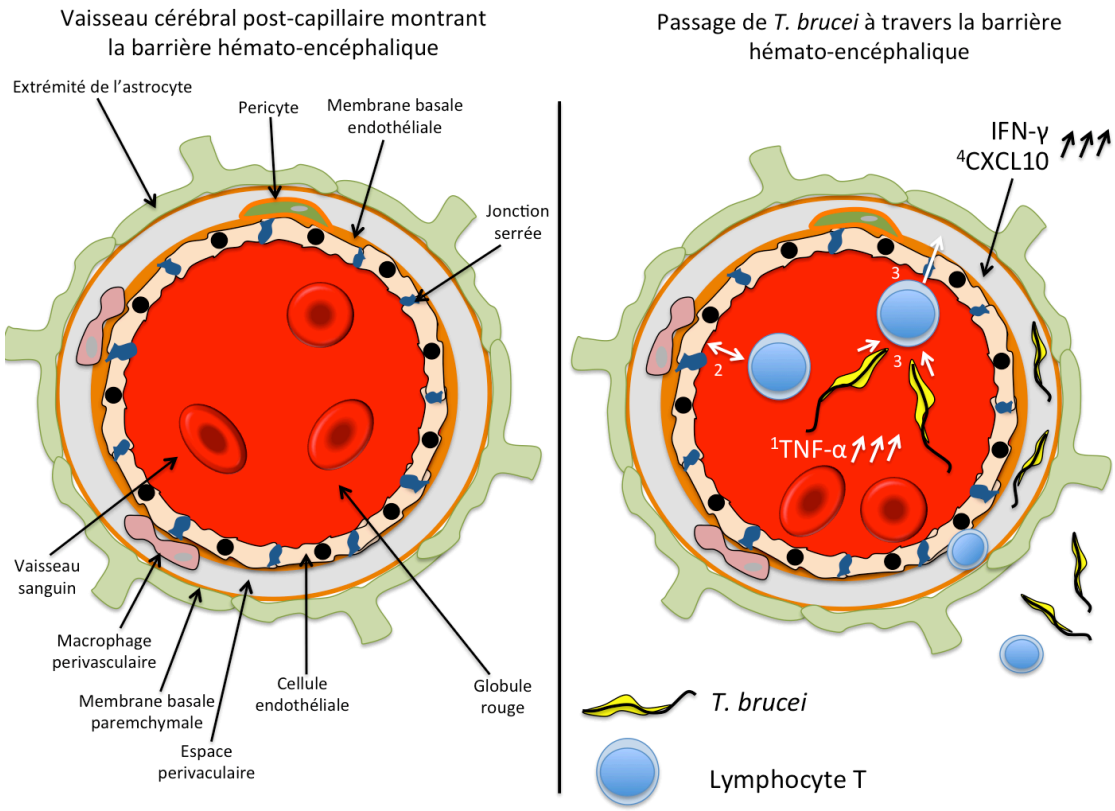


Figure 12 : Entrée du parasite *T. brucei* et des lymphocytes T à travers la barrière hémato-encéphalique pour envahir le parenchyme cérébral.

[1]En réponse à l'infection, les concentrations sanguines en TNF-α vont augmenter et induire l'expression des récepteurs ICAM/VCAM sur les cellules endothéliales cérébrales. [2]L'expression de ces récepteurs entraine l'attachement des lymphocytes T circulants à l'endothélium. [3]La réponse immune induit la production de CXCL10 par les astrocytes qui va entrainer l'entrée des lymphocytes T dans l'espace périvasculaire qui permettra l'entrée opportuniste du parasite qui va « suivre » la cellule qui entre. [4]La reconnaissance du parasite dans le système nerveux va induire la production d'IFN-γ qui continuera d'augmenter la production de CXCL10 qui facilitera l'entrée de nouveaux lymphocytes T et donc de nouveaux parasites.

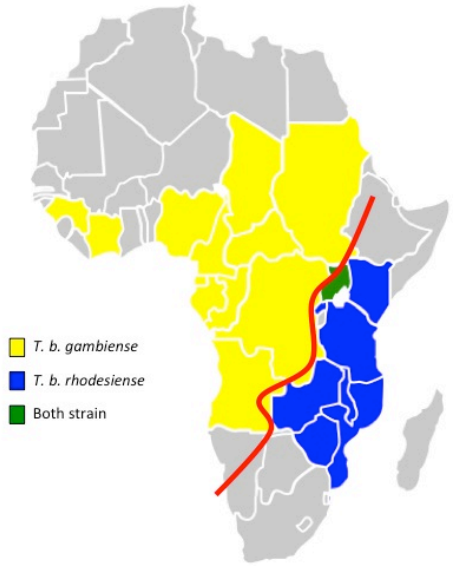


Figure 13 : Distribution géographique des deux formes de trypanosomiases africaines humaines.

Les infections par *T. b. gambiense* se localisent sur l'ouest de l'Afrique alors que celles par *T. b. rhodesiense* recouvrent l'est et le sud du continent. L'Ouganda (en vert) est le seul pays touché par les deux espèces de parasites.

A Trypanosomiase animale et réservoir biologique

Trypanosoma brucei infecte une large gamme d'espèces de mammifères (chez l'animal on parle de la maladie de *Nagana*). Chez l'animal, l'infection est asymptomatique entrainant des difficultés à diagnostiquer les animaux infectés. Une étude réalisée par David Bruce suggère que les animaux domestiques jouent un rôle majeur dans la transmission de la trypanosomiase humaine due à *T. b. rhodesiense*. Le bétail semble être un réservoir important (Enyaru *et al.,* 2006). Un nombre élevé d'espèces d'animaux domestiques comme les cochons, les chiens, les chèvres, les moutons et le bétail sont décrites comme les principales espèces qui transmettent le parasite à l'homme (Powellis, 1995; Alhaji and Kabir, 2015). En Revanche, pour *T. b. gambiense*, la transmission est généralement faite d'homme à homme (l'homme serait le réservoir principal) (Simo *et al*., 2006).

B Réponse immune innée et adaptative lors de l'infection par **T. brucei**

La réponse immune développée par l'hôte lors de l'infection par *T. brucei* a été largement décrite (reviewed in Kato *et al*., 2016; Mugnier *et al.*, 2015). Les antigènes principaux reconnus par le système immunitaire pour détecter et éliminer les parasites sont ses glycoprotéines de surface. En effet ces *variant surface glycoprotein* (VSG) activent une forte réponse Th1 et est dépendante des lymphocytes B. Il est intéressant de noter que le parasite échappe au système immunitaire de l'hôte en variant les protéines exprimées à sa surface. Les VSG sont présentées via le complexe MHCII par les cellules phagocytaires professionnelles (macrophages et cellules dendritiques) aux lymphocytes T et induisent une réponse immune à composante Th1. La réponse immune se caractérise par une forte production d'IFN-γ par les lymphocytes T $CD4^+$, avec l'aide des cellules NK et NKT durant les premiers jours d'infection (Schleifer *et al.,* 1993). Les macrophages activés vont produire différents facteurs antimicrobiens comme le TNF-α et des intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène (H_2O_2) et de l'azote (NO) (reviewed in Pays *et al.*, 2006). Cette activation dépendante des VSG est d'autant plus importante que ces protéines peuvent être libérées par le parasite dans la circulation. En effet pendant le processus infectieux du parasite, une phospholipase du parasite est activée et va induire le clivage de la protéine et libérer une forme soluble de VSG (sVSG). Au pic infectieux on peut compter 10^8 parasites par ml de sang, chaque cellule contenant 10^7 VSG, le nombre de sVSG peut devenir très élevé et induire une très forte activation des cellules immunitaires (Herelds *et al*, 1986). Des études ont montré que l'ADN du parasite peut activer la réponse immunitaire pendant l'infection (Shoda *et al*., 2001). En effet, l'injection d'ADN purifié du parasite stimule les macrophages à produire de l'IL-1, du

TNF-α, de l'IL-12 et du NO. Le parasite contient dans son noyau (pas dans le kinétoplaste) des motifs CpG non méthylés, comme pour l'ADN bactérien, pouvant être reconnus par le TLR 9 et ainsi activer les cellules de l'immunité (Harris *et al.*, 2006). Notons qu'avec le développement d'une forte réponse immunitaire, on observe aussi la formation d'une réponse immunosuppressive qui inhibe les fonctions des lymphocytes T et B (Mansfield and Bagasra, 1978).

C Changer de manteau antigénique pour échapper à la pression immunitaire

Les trypanosomes sont capables de faire varier les glycoprotéines exprimées à leur surface (VSG) et altérer ainsi l'établissement d'une réponse immune protectrice (Taylor and Rudenko, 2006). Le génome de *Trypanosoma brucei* contient 2000 gènes impliqués dans la génération des glycoprotéines de surface mais une seule forme de glycoprotéine est exprimée à la fois à un temps déterminé. Lors de l'infection, le système immunitaire de l'hôte reconnaît les glycoprotéines en surface du parasite et va produire des anticorps (IgMs et IgGs) dirigés contre ces protéines. Ces anticorps vont neutraliser le parasite et entrainer une diminution de la parasitémie. En réponse à la pression immunitaire, le trypanosome va modifier la nature des glycoprotéines exprimées en surface et devenir indétectable par les anticorps précédemment produits. Cela va faciliter sa prolifération en attendant que le système immunitaire ne reproduise des anticorps dirigés contre les nouvelles VSG. La trypanosomiase africaine est donc caractérisée par un profil typique de parasitémie ondulante chez l'hôte mammifère (Marcello and Barry, 2007).

D Modèle d'étude de la trypanosomiase chez la souris.

De nombreuses équipes ont développé des modèles pour étudier la trypanosomiase africaine chez la souris. Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle d'infection intra-péritonéale du parasite *T. brucei brucei* (souche pléomorphe ANTAT1.1), notamment étudié par l'équipe de Stefan Magez (laboratoire d'immunologie moléculaire et cellulaire, VUB, Bruxelles) (Radwanska *et al*., 2008). Chez la souris C57BL/6, l'infection se caractérise par une parasitémie ondulante avec l'apparition d'un nouveau pic infectieux tous les 7 à 8 jours. A partir de 30 jours, l'infection cause la mort de la souris avec 50 % de mortalité atteint à partir de 35 jours. En parallèle l'infection se caractérise par une forte anémie (chute de taux de globules rouges circulant), une hépatosplénomégalie et une colonisation du SNC (Magez *et al*., 2008).

2. Impact de l'infection par *Trypanosoma brucei* sur les capacités de la souris à contrôler la brucellose.

Il est légitime de se demander si un modèle de co-infection par *Brucella* et *Trypanosoma* est relevant. Les données épidémiologiques et la redondance d'hôte suggèrent qu'il est vraisemblable de rencontrer des mammifères infectés par les deux agents pathogènes. Il s'agit de deux zoonoses mondiales qui recouvrent une large partie de la planète et qui infectent le bétail. De plus si l'on généralise la question à l'étude de l'impact des infections parasitaires sur les capacités de l'hôte à contrôler la brucellose il est important de noter que de nombreux parasites infectent le bétail de manière asymptomatique augmentant les risques de rencontrer des hôtes co-infectés.

Indépendamment des données épidémiologiques, de nombreux arguments soulignent l'intérêt d'utiliser l'infection par *T. brucei* comme outil pour moduler le statut immunitaire de la souris infectée avec *Brucella*. L'infection par le parasite est décrite pour induire une forte réponse Th1 (Liu *et al*., 2015), avec une production élevée d'IFN-γ par les lymphocytes T $CD4^+$ (réponse protectrice contre *Brucella*). Etant donné que *Brucella* est une bactérie furtive qui déclenche une faible réponse immune caractérisée par de faibles taux d'IFN-γ, il serait intéressant de savoir si l'induction forte d'une réponse Th1 pourrait influencer les capacités de la bactérie à atteindre sa niche cellulaire et établir sa chronicité.

De récentes études ont montré que les infections parasitaires induisaient une chute du nombre de lymphocytes chez les souris (Zuniga *et al.,* 2005; Radwanska *et al*., 2008). Les études se sont principalement focalisées sur les lymphocytes B spléniques montrant une chute significative par apoptose des lymphocytes B folliculaires et de la zone marginale lors de l'infection par *T. brucei*. Les auteurs ont montré que cette chute des lymphocytes B était associée à une chute des IgMs protecteurs qui altérait les capacités de la souris à contrôler une réinfection avec *T. brucei*. De plus, l'altération des lymphocytes B par l'infection parasitaire a été associée à une altération des capacités de l'hôte à développer une mémoire protectrice après vaccination (Radwanska *et al.*, 2008). Etant donné que la souris infectée avec *Brucella* est capable de mettre en place une réponse mémoire protectrice qui la protège des réinfections (Vitry *et al.,* 2014; Hanot Mambres *et al.*, 2016), il peut être intéressant d'étudier l'impact de l'infection par *T. brucei* sur les capacités de la souris à mettre en place une réponse mémoire protectrice contre *Brucella*.

3. Précédentes études de l'interaction entre *Brucella* et *Trypanosoma*

Dans la littérature, trois publications décrivent l'impact des infections par les *Trypanosomatidae* sur les capacités de la souris à contrôler l'infection par *Brucella* ou inversement.

En 1983, Rurangirwa *et al*., ont étudié l'impact des infections parasitaires sur les capacités du bétail à produire des anticorps contre un vaccin anti-*Brucella* (Rurangirwa *et al.*, 1983). Les auteurs ont observé que la dépression immunitaire liée à l'infection par *T. congolense* induisait une chute des taux d'anticorps spécifiques contre la souche vaccinale de *B. abortus* (S19) chez le bétail. Ces données suggèrent que l'infection parasitaire pourrait altérer les capacités de l'hôte à développer une réponse immunitaire mémoire protectrice contre *Brucella*. Ces observations relient la récente recherche montrant que l'infection par le parasite *T. brucei* induit l'apoptose des lymphocytes B pouvant altérer la mise en place d'une mémoire protectrice (Radwanska *et al*., 2008).

En 2011, une étude (Pasquevich *et al*., 2009) a montré que la co-administration sous-cutanée de la protéine membranaire de *Brucella* Omp-19 et des antigènes de *T. cruzi* induisait une protection contre l'infection avec une souche virulente du parasite chez la souris. L'administration de l'Omp19 va induire une réponse Th1 « mémoire » plus forte qui va réduire la parasitémie, la perte de poids et augmenter la survie des animaux infectés lors de l'infection. La protéine Omp19 de *B. abortus* a déjà été décrite comme inductrice de réponse immunitaire Th1. Par exemple, l'immunisation intra-péritonéale de souris avec cette protéine induit une réponse Th1 qui confère une protection contre une infection avec *Brucella* (Pasquevich *et al.*, 2011).

En 2014, l'impact de l'infection par *Trypanosoma musculi* sur la cinétique d'infection de la souche vaccinale *Brucella abortus* (S19) chez la souris a été analysée (Lowry *et al.*, 2014). Les auteurs ont comparé la charge bactérienne splénique chez les souris préalablement infectées avec le parasite ou non pendant 70 jours. Les données montrent que dans la phase tardive du suivi de l'infection, les souris co-infectées éprouvent des difficultés à contrôler la bactérie dans la rate. Les auteurs associent cette susceptibilité à une chute des taux d'IFN-γ (cytokine protectrice contre *Brucella*) liée à une augmentation d'IL-10 (cytokine immuno-suppressive) due à l'infection par le parasite.

4. Publication : L'infection par *Trypanosoma* améliore l'élimination de *Brucella* par la voie IL-12/IFN-γ

Arnaud Machelart, Margaux Van Vyve, Georges Potemberg, Aurore Demars, Carl De Trez, Hermann Giresse Tima, Gilles Vanwalleghem, Marta Romano, Carine Truyens, Jean-Jacques Letesson, Eric Muraille.

Trypanosoma infection favor *Brucella* elimination via IL-12/IFNγ dependent pathways

* Arnaud Machelart, * Margaux Van Vyve, * Georges Potemberg, * Aurore Demars, † Carl De Trez, & Hermann Giresse Tima, # Gilles Vanwalleghem, & Marta Romano, § Carine Truyens, * Jean-Jacques Letesson, §, * Eric Muraille

* Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, NARILIS, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix. Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium.

† Department of Molecular and Cellular Interactions, Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, Vrije Universiteit Brussel, Gebouw E, Verdieping 8, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium.

& Service Immunology, Scientific Institute for Public Health (WIV-ISP Site Ukkel), Brussels, Belgium

Laboratory of Molecular Parasitology, IBMM, Université Libre de Bruxelles (ULB), 12 rue des Prof Jeener et Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium

§ Laboratoire de Parasitologie. Faculté de Médecine. Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles. Université Libre de Bruxelles. Belgium.

Corresponding author:

Eric Muraille. Mailing address: Laboratoire de Parasitologie. Faculté de médecine. Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles. Université Libre de Bruxelles. Belgium. Fax.32 (0)2 5556128. Email: emuraille@hotmail.com

Running title: *T. brucei* increases *Brucella* control.

[1] **Grant support:** This work was supported by grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (convention FRSM FNRS 3.4.600.06.F, Belgium), and by the Interuniversity Attraction Poles Programme initiated by the Belgian Science Policy Office. E.M. is a Senior Research Associate from the FRS-FNRS (Belgium). A.M. holds FRIA PhD grants from the FRS-FNRS (Belgium).

ABSTRACT

In nature, co-infection with unrelated pathogens are very common. However, the interplay between immune response directed against unrelated infection is rarely analyzed. In the current study, using *Brucella melitensis*, the most frequent cause of human brucellosis and *Trypanosoma brucei*, the agent of african trypanosomiasis, we develop an original co-infection model in mice. Although the immunosuppressive effect of *T. brucei* in natural host and mice model are well established, we observed that injection of *T. brucei* in *B. melitensis* chronically infected mice induce a drastic reduction of the number of *B. melitensis* in spleen, the main reservoir of the infection. Similar result is obtain with *B. abortus and B. suis* infected mice co-infected with *T. brucei* but also with *B. melitensis* infected mice co-infected with *T. cruzi*, demonstrating that this phenomenon is not due to antigenic cross-reaction. Comparison of co-infected wild type and deficient mice showed that *B. melitensis* elimination by *T. brucei* required functional IL-12/IFNγ signaling pathways and the presence of $CD4^+$ T cells. However, wild type and attenuated mutant of *T. brucei* showed similar impact on *B. melitensis*, suggesting that chronic intense inflammatory reaction is not required to achieve *B. melitensis* elimination. Finally, we have also tested the impact of *T. brucei* infection on the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Although *T. brucei* increase the frequency of $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ T cells, it does not ameliorate the control of *M. tuberculosis* infection, suggesting that this later is not controlled by the same effectors mechanisms that *Brucella*. Thus, whereas the *T. brucei* infections are commonly viewed as immunosuppressive and pathogenic, our data suggest that these parasitic infections can specifically affect the immune control of *Brucella* infection with benefits for the host.

INTRODUCTION

In natural populations, the resistance to infection among individuals presents a remarkable diversity. This phenomenon has been linked to many factors (reviewed in (Muraille, 2016)). Among them, chronic infection can enhance the ability to control unrelated pathogens, a phenomenon termed the "Mackaness effect" in reference to the seminal work of Mackaness (Blanden *et al,* 1969; Mackaness, 1964) in demonstrating cross-protection between *L. monocytogenes*, *Brucella abortus* and *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Since these pioneers' works, numerous example of Mackaness effect have been reported. For example, *Herpes virus* infection can confer beneficial protection against *L. monocytogenes* and *Yersinia pestis* (Barton *et al.,* 2007). At the opposite, a lethal synergism between *influenza virus* and certain bacteria, particularly *Streptococcus pneumoniae* is well documented (Morens *et al.,* 2009). As multiple unrelated infections in the same host are probably more common than single infection, it would be interesting to better understand the mechanisms underlying these cross-protections or cross-aggravations.

Brucella (alpha-proteobacteria) are facultative intracellular Gram-negative coccobacilli that infect mammals and cause brucellosis. Human brucellosis is a zoonotic infection transmitted mainly through ingestion and inhalation (Godfroid *et al.,* 2005). Without prolonged antibiotic treatment it causes a severe and debilitating chronic disease (Colmenero *et al.,* 1996; Corbel, 1997). Despite significant progress, the incidence of human brucellosis remains very high in endemic areas, such as North Africa, the Mediterranean basin and South America (Pappas *et al.,* 2006) and is considered to be largely underestimated (Seleem *et al.,* 2010). Presently, safe and protective vaccine for human is still not available (Ficht *et al,* 2009; Sérgio Costa Oliveira *et al.,* 2011). *B. melitensis* is the most frequent cause of human brucellosis (Corbel, 1997). Whole body imaging of mice infected with bioluminescent *B. melitensis* have confirmed that mice infection model parallels human infection and identified major sites of bacterial growth and persistence, such as the spleen (Rajashekara *et al.,* 2005). Although the precise mechanisms of protective immunity against *Brucella* remain largely unknown, the role of IFNγ-producing $CD4^+$ T cells (Th1) in the control of *Brucella* growth in spleen from infected mice is well established (Hanot Mambres *et al.,* 2016; Vitry *et al.*, 2012).

Trypanosoma brucei is a strictly extracellular parasitic protozoan haemoflagellates, causing African trypanosomiasis, also known as sleeping sickness in humans and nagana in animals. The mammalian bloodstream forms of *T. brucei* are remarkable for their variant surface glycoprotein coats, which undergo antigenic variation, enabling persistent escape of

host adaptive immunity and chronic host infection (for a review see (Stijlemans *et al.,* 2016)). Wild-type C57BL/6 infected with *T. brucei* were characterized by an initial parasitaemia surge inducing intense IFNγ inflammatory response followed by subsequent parasitaemia cyclic waves that were lower than the first peak. During chronic infection, *T. brucei* cause immunosuppression by various mechanisms. In particular, *T. brucei* induce the loss by apoptosis of various B cell populations and thus abrogate vaccine-induced protective response to a non-related pathogen (Radwanska *et al.,* 2008). It also suppress T cells response by a IFNγ/nitric oxide dependent and independent pathways (Beschin *et al,* 1998; J. Sternberg & McGuigan, 1992).

In the current study, we develop an original co-infection model. *B. melitensis* infected mice were infected with *T. brucei*. Surprisingly, co-infection induces a rapid and drastic reduction of the number of *B. melitensis* in spleen and its frequent complete elimination. This phenomenon appeared dependant of IFNγ and $CD4^+$ T cells.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The procedures used in this study and the handling of the mice complied with current European legislation (directive 86/609/EEC) and the corresponding Belgian law "Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010". The Animal Welfare Committee of the Université de Namur (UNamur, Belgium) reviewed and approved the complete protocol (Permit Number: 12-188).

Mice and reagents

Wild-type C57BL/6 mice were acquired from Harlan (Bicester, UK). $IL1R^{-/-}$ C57BL/6, $CD3e^{-/-}$ C57BL/6 and $TCR\text{-}d^{-/-}$ C57BL/6 was purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). $IL\text{-}12p35^{-/-}$ C57BL/6 mice (Carrera *et al.,* 1996) were acquired from Dr. B. Ryffel (University of Orleans, France). $TAP1^{-/-}$ C57BL/6 mice (Van Kaer *et al.,* 1992), $MHCII^{-/-}$ C57BL/6 mice (Cosgrove *et al.,* 1991) were acquired from Jörg Reimann (University of Ulm, Ulm, Germany). CD11c-DTR C57BL/6 mice were obtained from Dr. G. Holdenhove (Université Libre de Bruxelles, Belgium) and treated with diphtheria toxin (Sigma). All wild-type and deficient mice used in this study were bred in the animal facility of the Gosselies campus of the Université Libre de Bruxelles (ULB, Belgium).

Brucella infection

We used wild type *Brucella melitensis* 16M and *a* strains stably expressing a rapidly maturing variant of the red fluorescent protein DsRed (mCherry-Br) (Shaner *et al.,* 2004), the mCherry protein (mCherry-Br), under the control of the strong *Brucella* spp. promoter, PsojA. Construction of the mCherry-Br strains has been described previously in detail (Copin *et al.,* 2012). We also used *Brucella abortus* 2308 and *Brucella suis* 1330. All *Brucella* strains were grown in biosafety level III laboratory facilities. Cultures were grown overnight with shaking at 37°C in 2YT medium (Luria-Bertani broth with double quantity of yeast extract) and were washed twice in RPMI 1640 (Gibco Laboratories) (3500xg, 10 min) before inoculation of the mice. Mice were anaesthetized with a cocktail of Xylasine (9mg/kg) and Ketamine (36 mg/kg) in PBS before being inoculated intranasally (i.n.) with $2x10^4$ CFU of *Brucella melitensis, Brucella abortus* and *Brucella suis* in 30 µl of PBS (described in (Copin *et al.,* 2012)). For intraperitoneal infection with *B. melitensis*, mice received 4 x 10^4 CFU/500 µl of PBS. Control animals were inoculated with the same volume of PBS. The infectious doses were validated by plating serial dilutions of the inocula. At the selected time after infection, mice were sacrificed by cervical dislocation. Immediately after sacrifice, spleen cells were collected for bacterial count, flow cytometry and/or microscopic analyses.

Mycobacterium tuberculosis infection

Mice receive by aerosol $5x10^3$ CFU of *M. tuberculosis* H37Rv, grown for 2 weeks as a surface pellicle on Sauton medium and stored frozen in aliquots at − 80°. The H37Rv strain has been transformed with the reporter plasmid pSMT1, which expresses the *Vibrio harveyi luxAB* genes under the control of the BCG hsp60 promoter. The number of bioluminescent organisms (determined as relative light units (RLU)) in lung and spleen homogenates was determined by using a bioluminescence assay with a Turner Design 20/20 luminometer and 1% n-decanal in ethanol as a substrate. All *Mycobacterium tuberculosis* infection were performed at the Scientific Institute of Public Health (WIV-ISP)/Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA-CERVA) and according to rules established by the ethics committee of the WIV-ISP and CODA-CERVA (permit 060202-02).

Trypanosoma infection

The pleomorphic AnTat 1.1E (EATRO 1125 stock) *Trypanosoma brucei brucei* (Radwanska *et al.,* 2008) and a dominant-negative adenylate cyclases (DNc) mutant (Salmon *et al.,* 2012) were used in this study. *T. brucei* infection is characterized by a multi-waves parasitaemia development, in which every wave represents a parasite population of different antigenic type. DNc mutant parasitaemia is considerably lower and displays no peak of infection (Salmon *et al.,* 2012). Mice were infected by i.p. injection of 5000 parasites/mouse.

Every 2 to 3 days, the number of parasites present in the blood was estimated using a counting chamber and a light microscope. For *T. brucei* elimination, mice were treated by i.p. injection of Berenil (diminazene aceturate, 14 mg/kg, Sigma Aldrich) in 200 µl of PBS (Kuriakose *et al.,* 2012). Lysat of parasite is obtained by 3 freeze/thaw cycles as described in (Rifkin & Landsberger, 1990).

Concerning *Trypanosoma cruzi*, we used the Tulahuen strain (genotype TcVI). Mice were infected by i.p. injection of 1,000 blood trypomastigotes as previously described (Mjihdi *et al.,* 2004). Blood parasitaemia was regularly determined by microscopic examination.

Antibiotic treatment

Antibiotic treatment was administered to both immunized and control mice for 2 wk. The oral treatment was a combination of rifampicin (12 mg/kg) and streptomycin (450 mg/kg) (adapted from (Vitry *et al.,* 2014)) prepared fresh daily and given in the drinking water. To ensure that the antibiotic treatment was effective, some mice from each group were sacrificed 1 wk prior to the challenge, and the CFU counts were evaluated in the spleen.

Brucella counting

Spleens were crushed and transferred to PBS/0.1% X-100 Triton (Sigma-Aldrich). We performed successive serial dilutions in RPMI to obtain the most accurate bacterial count and plated them onto 2YT medium. The CFU were counted after 5 days of culture at 37°C.

ELISA

Brucella specific murine IgM and IgG isotypes were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Polystyrene plates (Nunc 269620) were coated with heat-killed *B. melitensis* (10^7 CFU/ml). After incubation overnight at 4°C, plates were blocked for 2 hours at room temperature (RT) with 200 µl of PBS-3.65% casein. Then plates were incubated overnight at 4 °C with 50 µl of serial dilutions of the serum in PBS-3.5% casein. The sera from unimmunized mice were used as the negative control. After 4 washes with PBS, isotype-specific goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugates were added (50 µl/well) at appropriate dilutions (hIgM from Sigma; LO-MG2a-9 HRPO). Plates were incubated for 2 hours at room temperature and washed 4 times in PBS before the addition of 100 µl of substrate solution (BD OptEiA) to each well. After 10 minutes of incubation at room temperature in the dark, the enzyme reaction was stopped by adding 25 µl/well of 2N H_2SO_4, and absorbance was measured at 450 nm.

Cytofluorometric analysis

As described previously (Hanot Mambres *et al.,* 2016), spleen were harvested, cut into small pieces and incubated for 30 minutes at 37°C with a mix of DNAse I fraction IX (Sigma-

Aldrich) (100 µg/ml) and 1.6 mg/ml of collagenase (400 Mandl U/ml). Spleen cells were washed and filtered, and then incubated with saturating doses of purified 2.4G2 (anti-mouse Fc receptor, ATCC) in 200 µl PBS 0.2% BSA 0.02% NaN_3 (FACS buffer) for 20 minutes at 4°C to prevent antibody binding to the Fc receptor. Various fluorescent mAb combinations in FACS buffer were used to stain 3-5x10^6 cells. We acquired the following mAbs from BD Biosciences: Phycoerythrin (PE)-coupled HL3 (anti-CD11c), FITC-coupled 145-2C11 (anti-CD3e), FITC-coupled M1/70 (anti-CD11b), phycoérythrine (PE)-coupled RM4-5 (anti-CD4), allophycocyanin (APC)-coupled 1-A/1-E (anti-MHCII). Purified M-19 (rabbit polyclonal igG anti-NOS2; Santa Cruz Biotechnology) is stained with Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit (Molecular Probes). The cells were analyzed on a FACScalibur cytofluorometer. Dead cells and debris were eliminated from the analysis according to size and scatter.

Statistical analysis

We used a (Wilcoxon-) Mann-Whitney test provided by the GraphPad Prism software to statistically analyze our results. Each group of deficient mice was compared to the wild-type mice. We also compared each group with each other and displayed the results when required. Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. *, **, *** denote $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively.

RESULTS

Brucella melitensis persist in CD11c$^+$ reservoir cells in spleen able to resist to protective memory immune response.

The kinetic of *B. melitensis* growth in lung, spleen and liver of C57BL/6 mice following primary intranasal (i.n.) infection has been previously established by our group (Hanot Mambres *et al.,* 2016). In summary, following i.n. administration of 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis,* the bacteria persist in lung until 12 days post infection and the spleen and liver are colonized from 5 days post infection. At 28 days post infection, *B. melitensis* is only detected in spleen where it persists more than 50 days. Microscopic analysis have demonstrated that during the chronic phase of infection of highly susceptible IL-12p40$^{-/-}$ BALB/c mice, *Brucella* reside in specific reservoir cells expressing a particular phenotype (CD11c$^+$ CD205$^+$ Arginase$^+$) (Mambres *et al.,* 2015b). Due to the low number of *Brucella* persisting in spleen of resistant mice, a microscopic analysis of the phenotype of infected cells is impossible. To solve this problem, we choose to used DTR-CD11c C57BL/6 mice that express diphteria toxin (DT) receptor under the control of CD11c promoter. As previously

reported (Van Blijswijk *et al.,* 2013), injection of DT in these mice induced the transitory elimination of $CD11c^+$ cells. To determine if the *Brucella* reservoir cells express CD11c, mice infected since 26 days with $2x10^4$ CFU of *B. melitensis* receive 10 ng of DT in 500 µl of PBS or PBS alone (control group). Two day later, mice were sacrificed and the spleen harvested. As showed, flow cytometry analysis showed that DT induce a drastic elimination of $CD11c^{low}$ and $CD11c^{high}$ cells in *Brucella* infected mice **(Figure 1.A**). The elimination of $CD11c^+$ cells lead to a drastic reduction of the number of bacteria when compared to PBS treated mice (**Figure 1.B**). A similar phenomenon is observed in mice treated at 48 days post infection (**Figure 1.B**). These results suggest that *Brucella* persist in $CD11c^+$ reservoir cells in wild type C57BL/6 mice.

We have previously showed (Hanot Mambres *et al.,* 2016) that intranasal *Brucella* infection in wild type C57BL/6 mice induce a protective memory T cell response able to control and completely eliminate in a majority of mice a secondary *Brucella* infection. In order to determine if the activation of memory T cells during a secondary infection is able to eliminate the *Brucella* from the first infection persisting in splenic reservoir cells, we compare the CFU level of non fluorescent (wt) *B. melitensis* and mCherry-*B. melitensis* in spleen from 3 group of mice. As described in detail **Figure 2.A**, the first group is only infected with mCherry *B. melitensis*. The second group is infected with wt *B. melitensis* and challenged 45 days later with mCherry *B. melitensis*. The third group is only infected with wt *B. melitensis.* As expected, mCherry *Brucella* challenge is well controlled in immune group 2 when compared to non immune group 1. In contrast, the CFU level of wt *Brucella* is similar in challenged group 2 and unchallenged group 3, demonstrating that memory response is able to eliminate the challenge strain but not the *Brucella* strain that has settled in the $CD11c^+$ reservoir cells. This suggests that the $CD11c^+$ reservoir cells protect *Brucella* against fully protective *Brucella* specific memory response.

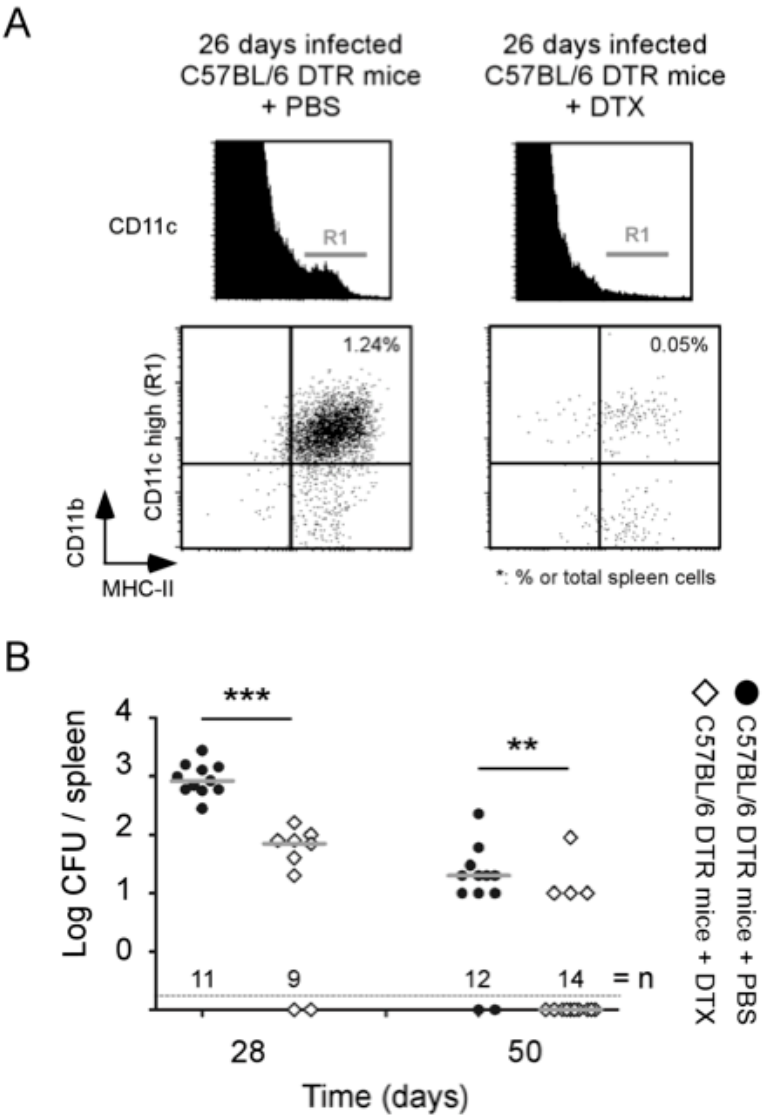


Figure 1: *Brucella* persist in CD11c$^+$ reservoir cells in spleen of chronically infected wild type C57BL/6 mice. DTR-CD11c C57BL/6 mice infected since 26 or 48 days with 2x10^4 CFU of *B. melitensis* receive 10 ng of diphteria toxin by i.p. in 500 µl of PBS or PBS alone. Two days later, mice were sacrificed and the spleen harvested. **A**. Flow cytometry analysis of CD11c and MHCII expression on spleen cells. Data show representative dot plot from individual mice. **A**. The data represent the number of CFU/g of spleen for each group of mice at indicated time of infection. These results are representative of at least two independent experiments. **p , 0.01, ***p , 0.001.

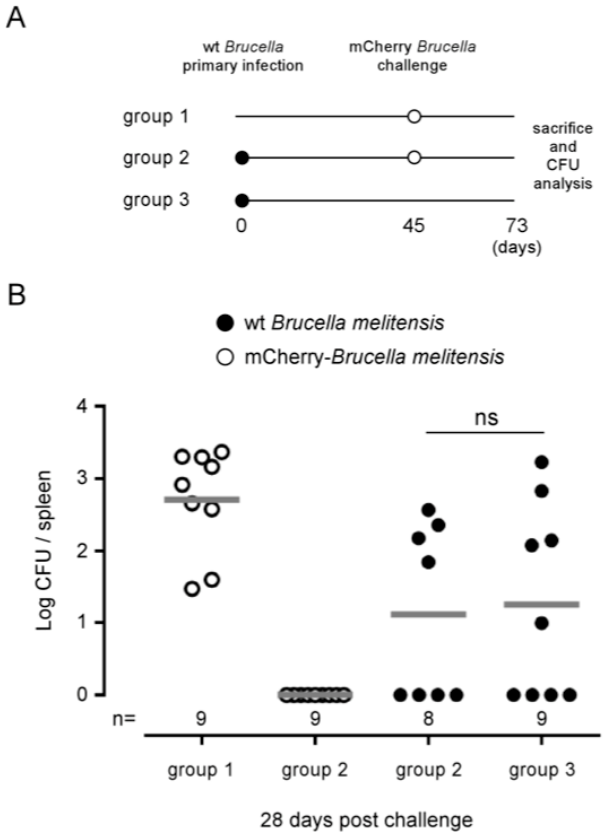


Figure 2: *Brucella* reservoir cells are resistant to protective memory response. Wild type C57BL/6 mice were infected with $2x10^4$ CFU of wild type *B. melitensis* or mCherry-*B. melitensis* and euthanatized at selected time and the spleen harvested, as described in panel **A**. The data in **B** represent the number of CFU/g of spleen for each group of mice. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments.

***T. brucei* infection reduce the number of *Brucella* persisting in spleen**

In order to examine the impact of *T. brucei* on the course of *B. melitensis* infection, wild type C57BL/6 mice were infected via i.n. way with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis* and then received at 7 or 45 days post infection an intraperitonal (i.p.) injection of 5000 parasites. At selected time post infection (as indicated in **Figure 3.A)**, mice were sacrificed, the spleen harvested and the CFU number of each organs counted by plating. Our results showed that *T. brucei* infection induce a rapid decrease of the CFU count of *B. melitensis* in spleen. At 5 days post *T. brucei* infection, the CFU level decrease already of 1-1,5 log in co-infected mice, when compared to mice infected by *B. melitensis* alone. This result is obtained at early (**Figure 3.B**) and later time point (**Figure 3.C**) of *B. melitensis* infection. At 21 days post *T. brucei* infection, the CFU level appears reduced of approximately 3 log and *B. melitensis* CFU level are under the detection threshold (10 CFU / spleen) in the majority of co-infected mice. Similar results were obtained in the i.p. model of *B. melitensis* infection (**Figure S1**). These results suggest that the immune response induce by *T. brucei* infection is able to eliminate *Brucella* in its reservoir cells.

In order to determine if the elimination of *B. melitensis* observed after *T. brucei* infection could be the consequence of an antigenic cross-reaction, we tested if *T. brucei* can affect the growth of two other *Brucella* species able to infect human, *B. abortus* and *B. suis,* in the spleen (**Figure 4.A** and **4.B**) and if *Trypanosoma cruzi* i.p. infection can also reduce the level of *B. melitensis* (**Figure 4.C**). *T. cruzi* is an intracellular parasite displaying a different kinetic of infection, and do not share antigen with *T. brucei*. We observed that *T. brucei* have the same impact on *B. abortus* and *B. suis* and that *T. cruzi* induces also a drastic reduction of *B. melitensis* in spleen of infected mice. These results demonstrate that elimination of *Brucella* following *Trypanosoma* infection is not due to shared antigens between both pathogens.

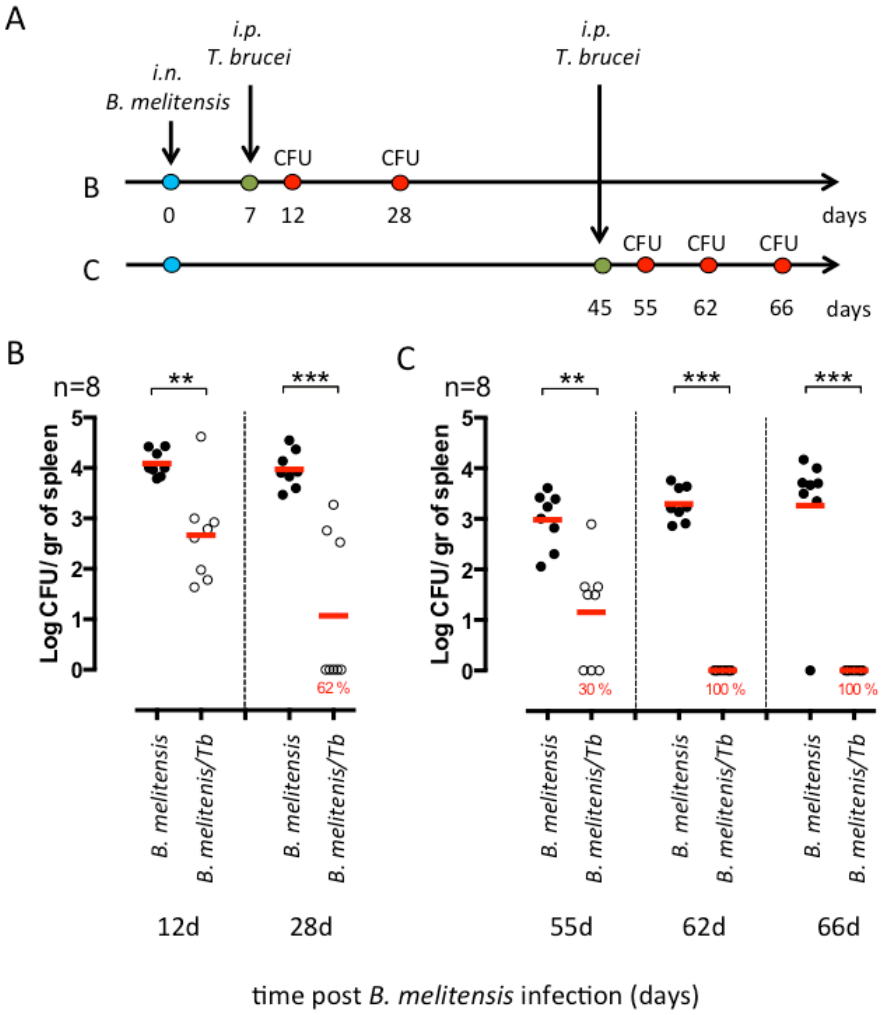


Figure 3: Impact of *T. brucei* co-infection on the course of intranasal *B. melitensis* infection in mice. Wild type C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis* and receive at 7 or 45 days post infection an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200 µl of PBS (*B. melitensis/Tb* group) or PBS alone (*B. melitensis* group). Mice were euthanatized at selected time and the spleen harvested, as described in panel **A**. The data in **B** and **C** represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments. **p , 0.01, ***p , 0.001.

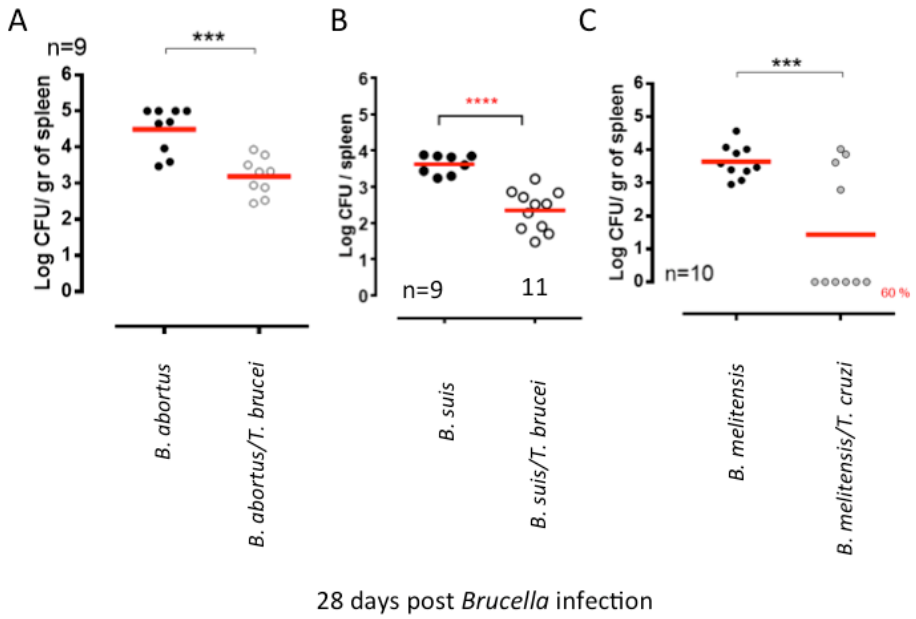


Figure 4: Impact of *T. brucei* co-infection on *B. suis and B. abortus* infection and impact of *T. cruzi* on *B. melitensis* infection.

Wild type C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of *B. abortus* (**A**) or *B. suis* (**B**) and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200µl of PBS or PBS alone. **C**. Wild type C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis* and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 1000 *T. cruzi* in 200 µl of PBS or PBS alone. Mice were euthanatized at 28 post *Brucella* infection and the spleen harvested. The data represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments. ***p , 0.001.

Elimination of *Brucella by T. brucei* required functional IL-12/IFNγ signaling pathways.

IFNγ producing $CD4^+$ T cells are key player of protective immune response against *B. melitensis* (Hanot Mambres *et al.,* 2016). By comparing the impact of *T. brucei* infection on *B. melitensis* in wild type and various deficient mice, we observed that *T. brucei*-induced elimination of *B. melitensis* is abrogated in $CD3^{-/-}$, $MHCII^{-/-}$, and $IL\text{-}12p35^{-/-}$ mice but not in $TAP1^{-/-}$, $gdTCR^{-/-}$ and $IL\text{-}1R^{-/-}$ (**Figure 5.A**). These results suggest the mechanism allowing the elimination of *B. melitensis* by *T. brucei* is well dependent of the host immune response and strictly required functional IL-12/IFNγ signaling pathways and $CD4^+$ T cells.

As nitric oxide produced by iNOS/NOS2 is well known to be produced in response to IFNγ and described negatively affects *B. melitensis* growth in spleen (Copin *et al.,* 2007), we analyzed by flow cytometry the frequency of IFNγ and iNOS-producing cells in spleen from wild type and various deficient mice infected by *B. melitensis*, *T. brucei* or coinfected with both pathogens. Our results showed that *T. brucei* induced a strong increase of the frequency of IFNγ (**Figure 5.B**) and iNOS-producing cells (**Figure 5.C**). IFNγ is mainly produced by $CD3^+$ $CD4^+$ T cells (data not shown). As expected, the absence of IL-12p35 reduces significantly the frequency of $IFN\gamma^+$ and $iNOS^+$ cells. Interestingly, there are no significant difference between the frequency of IFNγ and iNOS-producing cells in spleen from $TAP1^{-/-}$ (deficient in CD8+ T cells) and $MHCII^{-/-}$ (deficient in CD4+ T cells) mice, demonstrating that the absence of *T. brucei* induced *B. melitensis* control in $MHCII^{-/-}$ mice is well due to the absence of $CD4^+$ T cells and not only to a default in IL-12/IFNγ signaling pathways.

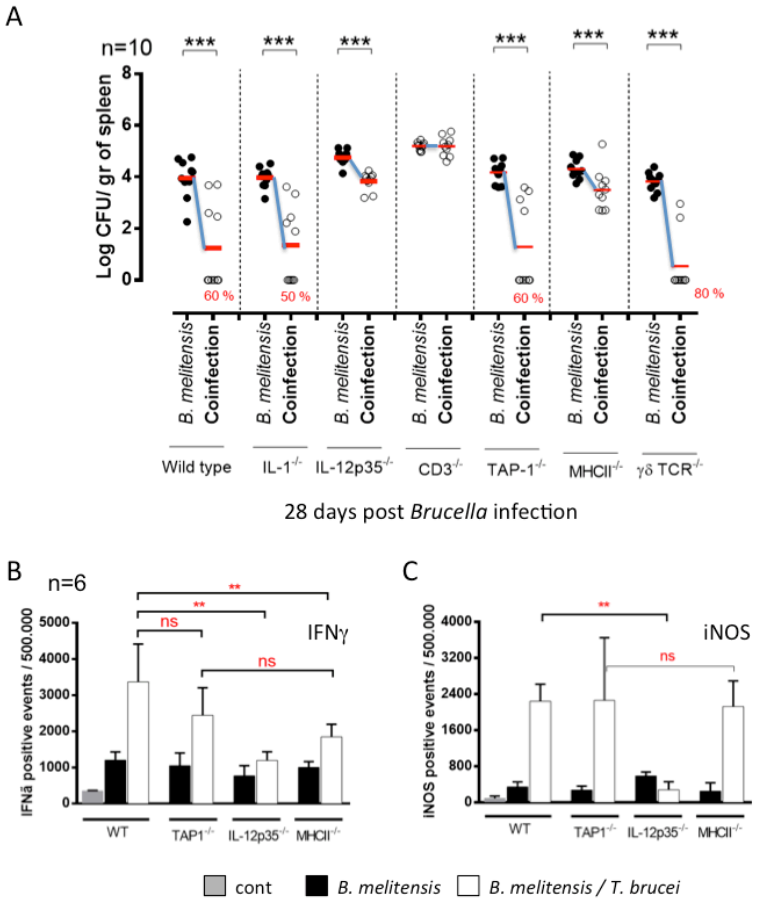


Figure 5: Elimination of *Brucella* during *T. brucei* infection required IL-12 and CD4$^+$ T cells. A. Wild type and various deficient C57BL/6 mice are i.n. infected with 2x10^4 CFU of mCherry-*B. melitensis* and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200 µl of PBS (co-infection group) or PBS alone (*B. melitensis* group). Mice were euthanatized at 28 post *Brucella* infection and the spleen harvested. **A**. The data represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. **B**,**C**: The data represent the frequency of IFNγ and iNOS producing cells in spleen as determined by flow cytometry analysis. Cont group are naive mice receiving PBS only. These results are representative of at least two independent experiments. **p , 0.01, ***p , 0.001.

***T. brucei* infection does not affect the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice.**

B. melitensis and *Mycobacterium tuberculosis* are both facultative intracellular bacteria able to chronically colonize the spleen of infected mice. It is clearly establish that IFNγ production (Dalton *et al.,* 1993; Feng *et al.,* 2005) and activated $CD4^+$ T cells (Caruso *et al.,* 1999) participate to protective immune response against *M. tuberculosis* in mice, suggesting that bystander activation of these effector mechanisms by *T. brucei* could promote the control of *M. tuberculosis*. Thus, we tested the impact of *T. brucei* i.p. infection on the course of C57BL/6 mice previously infected by aerosol with *M. tuberculosis*, as described **Figure 6.A**. Surprisingly, we observed that, despite of enhanced frequency of IFNγ and iNOS producing cells in spleen of co-infected mice (**Figure 6.B**), *T. brucei* does not affect *M. tuberculosis* infection neither at early (36 days, **Figure 6.C**) nor later time (91 days, **Figure 6.D**). This result demonstrates that *T. brucei* infection specifically impacts *B. melitensis* infection and that these effects cannot be generalized to all other intracellular bacterial infection.

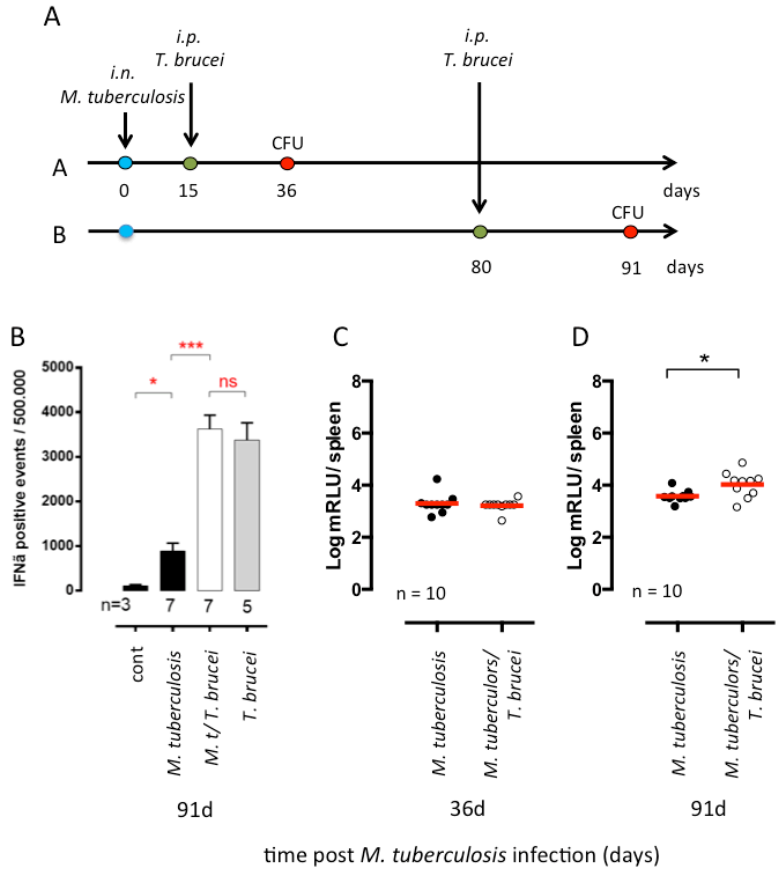


Figure 6: Impact of *T. brucei* co-infection on the course of *M. tuberculosis* infection in mice. Wild type C57BL/6 mice are infected by aerosol with $5x10^3$ CFU of *M. tuberculosis* and receive at 15 or 80 days post infection an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200 µl of PBS (*M. tuberculosis*/*T. brucei* group) or PBS alone (*M. tuberculosis* group). Mice were euthanized at selected time post *M. tuberculosis* infection and the spleen harvested, as described in **A**. **B**: The data represent the frequency of IFNγ producing cells in spleen as determined by flow cytometry analysis. **C,D**. The data represent the number of RLU/spleen. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05, ***p , 0.001.

Attenuated *T. brucei* mutant but not killed parasite is able to reduce *Brucella* infection.

Our previous experiments showed that *T. brucei* induce a strong inflammatory Th1 response in infected mice and that this response is indispensable to the reduction of *Brucella* infection in co-infected mice. In order to determine if the intensity and duration of Th1 response are key parameters, we compared the ability of wild type *T. brucei* and a dominant-negative adenylate cyclases (DNc) *T. brucei* mutant (Salmon *et al.,* 2012). DNc mutant infection displays a considerably lower parasitaemia and induces a lower inflammatory immune response (Salmon *et al.,* 2012). We observed that both wild type and DNc *T. brucei* induce the elimination of *B. melitensis* in co-infected mice (**Figure 7.A**). The kinetic of elimination is very close, except for the early time for co-infection. The slower impact of DNc mutant on *Brucella* could be due to the fact that it induces less rapidly and less intensely IFNγ in spleen as demonstrated by the reduced frequency of IFNγ producing cells in the spleen from DNc *T. brucei* infected mice at early time of co-infection when compared to wild type *T. brucei* infected mice (**Figure 7.B**). Like for wild type *T. brucei, Brucella* elimination by DNc *T. brucei* is impaired in IL-12$^{-/-}$ mice (**Figure S2**). Globally, these results suggest that even low persistence of parasite is able to achieve *B. melitensis* elimination. However, live parasite seems required as we fail, in the same experiment, to reduce *B. melitensis* infection by repeated injection of a lysate of *T. brucei* (data not shown).

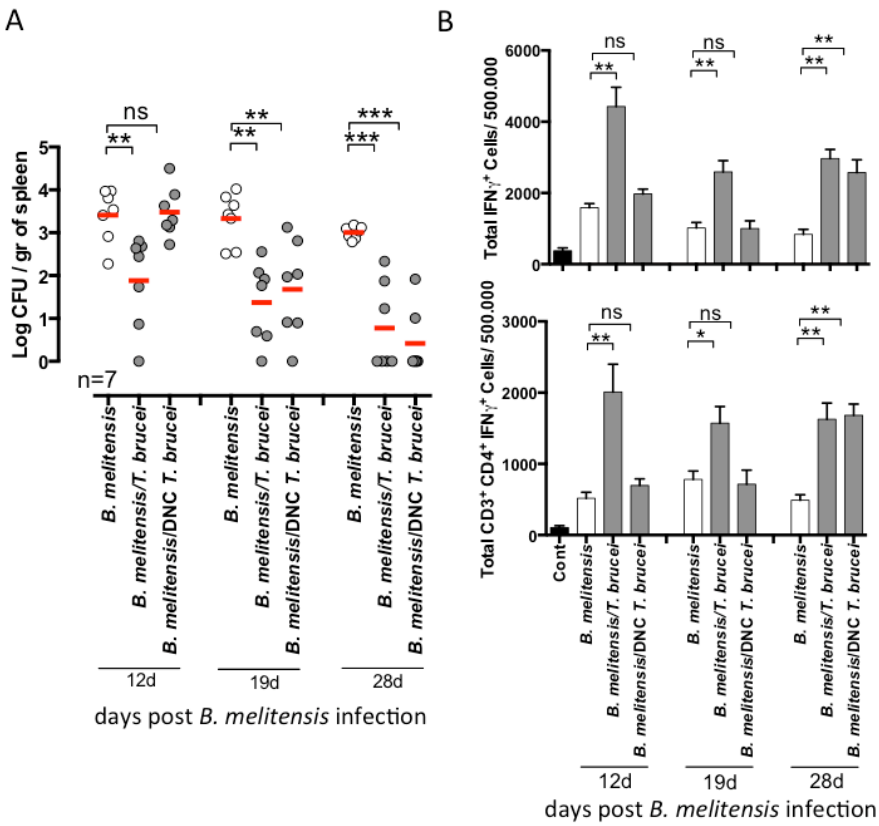


Figure 7: Attenuated dominant negative adenylate cyclase (DNc) mutant of *T. brucei* induce the elimination of *Brucella*. Wild type C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. abortus* and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 5000 wild type *T. brucei*, or attenuated DNc mutant of *T. brucei* in 200 µl of PBS or PBS alone. Mice were euthanatized at 12, 19 and 28 days post *Brucella* infection and the spleen harvested. **A**. The data represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. **B**: The data represent the mean of the frequency of IFNγ producing cells and $CD3^+$ $CD4^+$ IFNγ producing cells in spleen from 5 individual spleen as determined by flow cytometry analysis for each group. These results are representative of at least two independent experiments. *p , 0.05.

***Transient T. brucei* infection does not alter the development of protective memory response against *B. melitensis*.**

T. brucei infection has been described to deeply affect the protective humoral immune memory against unrelated pathogens (Radwanska *et al.,* 2008), thus we planned to analyze the impact of *T. brucei* infection on the specific protective immune memory following *B. melitensis* infection. We have previously showed that the requirement for humoral immunity to control secondary infection by *B. melitensis* is dependent of the way of infection. In the i.p. model, bacteria disseminate by blood and humoral immune response is indispensable to efficiently control secondary infection (Vitry *et al.,* 2014). In contrast, bacteria disseminate slowly after i.n. infection and absence of B cells does not affect the control of secondary infection (Hanot Mambres *et al.,* 2016). In consequence, we choice to analyzed the effect of *T. brucei* in both i.p. and i.n. *B. melitensis* infectious model.

Mice were i.p. infected with wild type *B. melitensis* for 28 days, treated with antibiotic and then infected (Sec tb group) or not (Sec cont group) with *T. brucei*, as described **Figure 8.A**. Both group of mice were treated with Berenil, an anti-parasitic drug (Kuriakose *et al.,* 2012). After a resting period, mice were i.p. challenged with mCherry *B. melitensis*. A group of naive mice, treated with antibiotic and Berenil, was also i.p. infected with mCherry *B. melitensis* and is used as internal control (Pri cont group). Surprisingly, *T. brucei* infection does not reduce the ability of *B. melitensis* immunized mice to control *Brucella* challenge in blood (**Figure 8.B**) or in spleen (**Figure 8.C**), in despite of a drastic reduction the frequency of B cells (**Figure S3.A**) and *Brucella* specific IgM and IgG (**Figure S3.B**). As expected, the same experiment in the *B. melitensis* i.n. infection model (i.n. infection and challenge with *B. melitensis*) gives similar results **(Figure 8.D).** Thus, although *T. brucei* infection reduces the specific humoral response against *B. melitensis*, it does not impair the protective memory response controlling secondary *B. melitensis* infection in both i.p. and i.n. infection model.

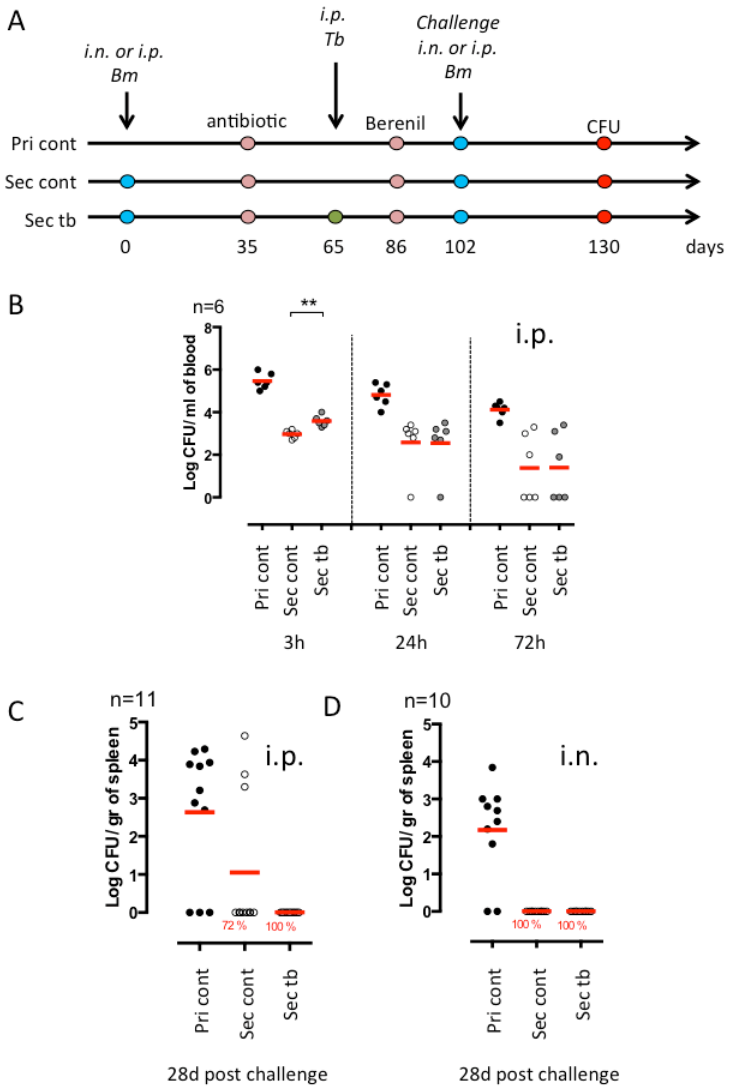


Figure 8: *T. brucei* co-infection does not affect the protective memory against *B. melitensis*. **A**. Experimental design. **B**,**C**, Wild type C57BL/6 mice are i.p. infected with $2x10^4$ CFU of wild type *B. melitensis* and treated with antibiotic à 28 days post infection during 15 days. At 65 days, mice receive an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200µl of PBS (Sec tb group) or PBS alone (Sec cont group), are treated with Berenil at 86 days and are challenged at 102 days by i.p. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis,* as described in panel **A**. Pri cont group receive only PBS, antibiotic and Berenil until *Brucella* challenge. **B,C**, The data represent the number of CFU/ml of blood or /g of spleen at selected time post challenge, as indicated. **D.** Wild type C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of wild type *B. melitensis,* are treated with antibiotic à 28 days post infection during 15 days. At 65 days post *Brucella* infection, mice receive an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200µl of PBS or PBS alone, are treated with Berenil at 86 days and are challenged at 102 days by i.n. infection with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis,* as described in panel **A**. The data represent the number of CFU/g of spleen at 28 days post challenge. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments. **p , 0.01, ***p , 0.001.

DISCUSSION

Immunology arose from the will and the need to ameliorate vaccination. During the 20th century, the revolution in molecular biology has led immunogists to develop very reductionist experimental models, far away from reality. For many years, the most studied immunological models were based on the injection of adjuvanted proteins. Much of our vision of the immune system functioning derives from the study of these models. We must not forget that our perception of reality results from the experimental model in which we study it. It may be time to remember that the first successful vaccination results in fact of a cross-reaction between smallpox and cowpox virus and that multiple unrelated infections in the same host are probably more common than single mono-species infections. The impact of past or chronic unrelated infection on the ability of host to control infection is well documented (reviewed in (Muraille, 2016)) but the mechanisms remain largely unknown.

In the current study, we have developed an original model of co-infection to study the impact of *T. brucei* infection on the course of chronic infection by *B. melitensis* in mice. *Brucella* has acquired during evolution dedicated stealth strategies that allow it to interfere with its recognition by immune system and neutralize immune effectors mechanisms. For example, after phagocytosis, *Brucella* control the intracellular trafficking of its vacuole to avoid degradation by phagolysosome (reviewed in (Charbit *et al.,* 2016)). We have previously showed in mice model that following intraperitoneal (Vitry *et al.,* 2012) or intranasal infection (Hanot Mambres *et al.,* 2016), the spleen is stably and durably colonized by *Brucella* and constitute one of the major reservoir of the infection. In spleen from susceptible mice, *Brucella* persist within specific $CD11c^+$ $CD205^+$ $arginase1^+$ myeloid cells displaying high level of lipid (Mambres *et al.,* 2015b). In this study, using DTR-CD11c mice, we demonstrated that *Brucella* survive in CD11c reservoir cells in resistant C57BL/6 mice and these cells constitute a niche hiding it to the primary immune response and even of the protective memory response. Thus, *Brucella* appears well equipped to escape the Th1 protective immune response (Hanot Mambres *et al.,* 2016) and persist in the host throughout his life. So it is really surprising and unexpected, in view of the well documented immunosuppressive effects of many trypanosomes (Sztein & Kierszenbaum, 1993), that both *T. brucei* and *T. cruzi* infection lead to a reduction of almost 2-3 log *Brucella* load in the spleen from co-infected mice. *T. brucei* is known to suppress T cells (Beschin *et al.,* 1998; Sternberg & McGuigan, 1992) and B cell (Radwanska *et al.,* 2008) responses in mice. *T. cruzi*

infection reduce humoral immune response against sheep erythrocytes in human (Cunningham *et al.,* 1980). At our knowledge, *T. brucei* and *T.cruzi* infection have not been associated with increased response against unrelated pathogens.

The fact that two *Trypanosoma* displaying completely different antigens and infectious cycle and dynamics are both able to favor the elimination of three different species of *Brucella* suggests that the underlying mechanism has very little chance of being based on an antigenic cross-reaction. The comparison of various deficient mice has demonstrated that $CD4^+$ T cells, but not $CD8^+$ T cells or gd^+T cells, are indispensable to *Brucella* elimination, demonstrating that the immune response is directly implicated in this phenomenon. In addition, we also observed that functional IL-12/IFNγ signaling pathways is also required. Taken together, these results suggest that the strong inflammatory Th1 response induced by *T. brucei* and *T. cruzi* infection is responsible of *Brucella* elimination. Interestingly, in absence of $CD4^+$ T cells, *T. brucei* induced a strong Th1 response mediated by $CD8^+$ T cells but is not able to reduce the level of *Brucella* persistence in spleen suggesting that IFNγ production is necessary but not sufficient to eliminate *Brucella* and that $CD4^+$ T cells are key actors in this process. Strongly attenuated *T. brucei* mutant infection, but not repeated injection of *T. brucei* lysate, is able to eliminate *Brucella* in spleen, suggesting that the level of inflammation is not a limiting factor but that a living parasite is required. The fact that *T. brucei* infection affect all *B. melitensis, B. suis* and *B. abortus* but not early or late phase of *Mycobacterium tuberculosis* infection demonstrates that the mechanism implicated is specific of *Brucella* species and not effective against all intracellular bacterial infections.

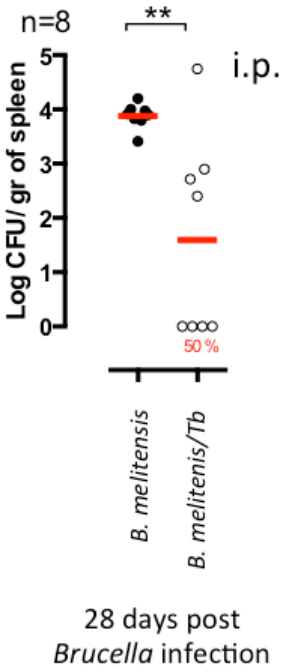
Finally, as *T. brucei* is especially known for its ability to suppress vaccine induce protective humoral memory (Radwanska *et al.,* 2008), we have tested the ability of *T. brucei* to neutralize *Brucella* induced protective memory in the i.p. and i.n. infection model. As expected, we have observed a significant diminution of B cell number in spleen and a reduction of the *Brucella* specific IgM and IgG in the serum of co-infected mice, when compared to control *Brucella* infected mice. Interestingly, similar results have been reported in cattle infected with either *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma vivax* that display suppressed humoral immune responses to attenuated *Brucella abortus* injected subcutaneously (Rurangirwa *et al.,* 1979). In spite of this reduction of *Brucella*-specific humoral response, we do not observed a reduced ability of humoral response to neutralize *Brucella* in blood or to impair *Brucella* persistence in spleen.

Taken globally, our results demonstrated that both *T. brucei* and *T. cruzi* infection are able to positively improve the immune control of *Brucella* infection in mice. This co-infection

model offers a unique opportunity to identify the mechanisms involved in elimination of *Brucella* reservoir cells and could allow us to discover new therapeutic strategies for brucellosis which are not dependent of antibiotic treatment. As mouse is not a natural host for *B. melitensis* and *T. brucei*, extrapolation of these results to natural hosts must be done carefully. However, the geographic distribution of these pathogens is largely overlapping and all of them infect cattle and human. Thus, co-infection of natural host with *Brucella* and *Trypanosoma*, although it is not documented, should not be uncommon and these effects deserve to be studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fabienne Jurion (WIV-ISP) for expert technical assistance. Aurore Lison and Alain Wathelet-Depauw for helpfull assistance.



Supplementary figure 1: Impact of *T. brucei* co-infection on the course of intraperitoneal *B. melitensis* infection in mice. Wild type C57BL/6 mice are i.p. infected with $4x10^4$ CFU of mCherry-*B. melitensis* and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200µl of PBS (*B. melitensis/Tb* group) or PBS alone (*B. melitensis* group). Mice were euthanatized at 28 days post *Brucella* infection and the spleen harvested. The data represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. These results are representative of at least two independent experiments. ***p , 0.001.

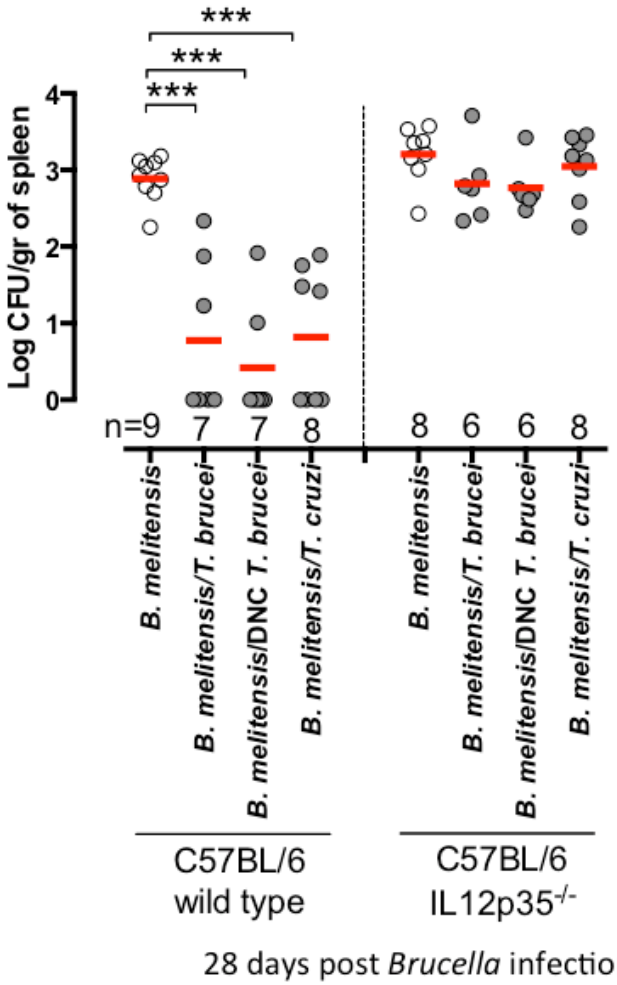


Figure S2: *Brucella* elimination by *Trypanosoma* infection is dependent of IL-12. Wild type and IL-12p35 C57BL/6 mice are i.n. infected with $2x10^4$ CFU of mCherry-*B. abortus* and receive at 7 days post infection an i.p. injection of 5000 wild type *T. brucei*, 5000 attenuated DNc mutant of *T. brucei* or 1000 *T. cruzi* in 200µl of PBS or PBS alone, as indicated. Mice were euthanatized at 28 days post *Brucella* infection and the spleen harvested. The data represent the number of CFU/g of spleen. n denotes the number of mice used for each group. **B**: These results are representative of at least two independent experiments. ***p , 0.001.

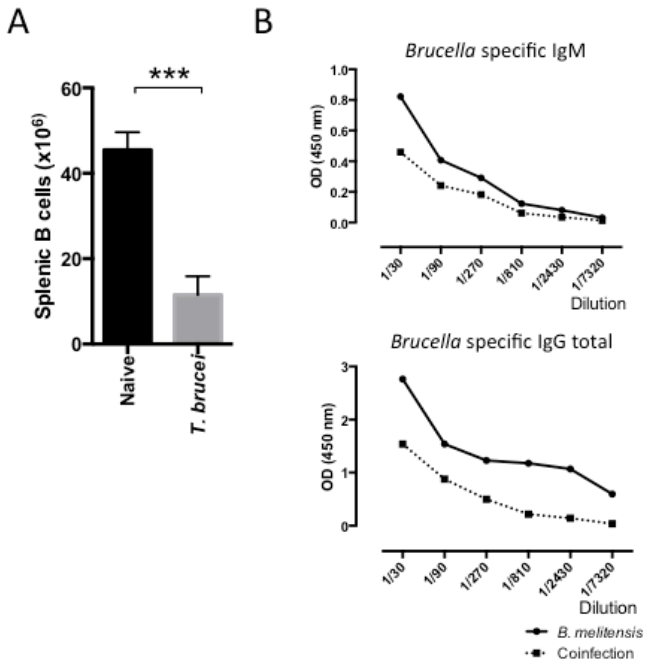


Figure S3: *T. brucei* co-infection reduce the humoral immune memory against *B. melitensis*. Wild type C57BL/6 mice are i.p. infected with $2x10^4$ CFU of wild type *B. melitensis* and treated with antibiotic at 28 days post infection during 15 days. At 65 days, mice receive an i.p. injection of 5000 *T. brucei* in 200µl of PBS (Sec tb group) or PBS alone (Sec cont group) and then are treated with Berenil as described in **Figure 6.A**. The data represent (**A**) the number of $B220^+$ $MHCII^+$ B cells / spleen as determined by cell counting and Flow cytometry analysis, (B) the level of *Brucella* specific IgM and IgG2a in the serum of infected mice. These results are representative of at least two independent experiments. ***p , 0.001.

References

Barton, E. S., D. W. White, J. S. Cathelyn, K. a Brett-McClellan, M. Engle, M. S. Diamond, V. L. Miller, and H. W. Virgin. 2007. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. Nature 447: 326–9.

Beschin, a, L. Brys, S. Magez, M. Radwanska, and P. De Baetselier. 1998. *Trypanosoma brucei* infection elicits nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent suppressive mechanisms. J. Leukoc. Biol. 63: 429–39.

Blanden, R. V, M. J. Lefford, and G. B. Mackaness. 1969. The host response to Calmette-Guérin bacillus infection in mice. J. Exp. Med. 129: 1079–1107.

Carrera, L., R. T. Gazzinelli, R. Badolato, S. Hieny, W. Muller, R. Kuhn, and D. L. Sacks. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. J. Exp. Med. 183: 515–526.

Caruso, A. M., N. Serbina, E. Klein, B. R. Bloom, J. L. Flynn, A. M. Caruso, N. Serbina, E. Klein, K. Triebold, B. R. Bloom, and J. L. Flynn. 1999. Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished Levels of IFN-γ, Yet Succumb to Tuberculosis. J. Immunol. 162: 5407–5416.

Charbit, A., M. A. Gavrilin, S. M. Zughaier, Z.-F. Liu, W. Ahmed, and K. Zheng. 2016. Establishment of Chronic Infection: *Brucella*'s Stealth Strategy. Front. Cell. Infect. Microbiol 6: 303389–30.

Colmenero, J. D., J. M. Reguera, F. Martos, D. Sánchez-De-Mora, M. Delgado, M. Causse, A. Martín-Farfán, and C. Juárez. 1996. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases.,. ; :195–211.

Copin, R., M.-A. Vitry, D. Hanot Mambres, A. Machelart, C. De Trez, J.-M. Vanderwinden, S. Magez, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. PLoS Pathog. 8: e1002575.

Copin, R., P. De Baetselier, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2007. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. J. Immunol. 178: 5182–5191.

Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: An Overview. Emerg. Infect. Dis. 3: 213–221.

Cosgrove, D., D. Gray, A. Dierich, J. Kaufman, M. Lemeur, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. Mice lacking MHC class II molecules. Cell 66: 1051–1066.

Cunningham, D. S., M. Grogl, and R. E. Kuhn. 1980. Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 30: 496–499.

Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted Interferon-g genes. Science (80-.). 259: 1739–1742.

Feng, C. G., D. Jankovic, M. Kullberg, A. Cheever, C. a Scanga, S. Hieny, P. Caspar, G. S. Yap, and A. Sher. 2005. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. J. Immunol. 174: 4185–92.

Ficht, T. A., M. M. Kahl-McDonagh, A. M. Arenas-Gamboa, and A. C. Rice-Ficht. 2009. Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines. Vaccine 27.

Godfroid, J., A. Cloeckaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji, and J. J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 36: 313–326.

Hanot Mambres, D., A. Machelart, G. Potemberg, C. De Trez, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2016. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. J. Immunol. 196: 3780–3793.

Kuriakose, S., H. M. Muleme, C. Onyilagha, R. Singh, P. Jia, and J. E. Uzonna. 2012. Diminazene Aceturate (Berenil) Modulates the Host Cellular and Inflammatory Responses to *Trypanosoma congolense* Infection. PLoS One 7: 1–8.

MACKANESS, G. B. 1964. THE IMMUNOLOGICAL BASIS OF ACQUIRED CELLULAR RESISTANCE. J. Exp. Med. 120: 105–120.

Mambres, D. H., A. Machelart, J. M. Vanderwinden, C. De Trez, B. Ryffel, J. J. Letesson, and E. Muraille. 2015. In situ characterization of splenic *Brucella melitensis* reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice. PLoS One 10: 1–20.

Mjihdi, A., C. Truyens, O. Detournay, and Y. Carlier. 2004. Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 107: 58–64.

Morens, D. M., J. K. Taubenberger, and A. S. Fauci. 2009. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. J. Infect. Dis. 198: 962–970.

Muraille, E. 2016. The Unspecific Side of Acquired Immunity Against Infectious Disease: Causes and Consequences. Front. Microbiol. 6: 1–11.

Oliveira, S. C., G. H. Giambartolomei, and J. Cassataro. 2011. Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. Expert Rev. Vaccines 10: 1291–1305.

Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V Tsianos. 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 6: 91–99.

Radwanska, M., P. Guirnalda, C. De Trez, B. Ryffel, S. Black, and S. Magez. 2008. Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. PLoS Pathog. 4.

Rajashekara, G., D. A. Glover, M. Krepps, and G. A. Splitter. 2005. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. Cell. Microbiol. 7: 1459–1473.

Rifkin, M. R., and F. R. Landsberger. 1990. Trypanosome variant surface glycoprotein transfer to target membranes: a model for the pathogenesis of trypanosomiasis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 87: 801–805.

Rurangirwa, F. R., H. Tabel, G. J. Losos, and I. R. Tizard. 1979. Suppression of antibody response to *Leptospora biflexa* and *Brucella abortus* and recovery from immunosuppression after Berenil treatment. Infect. Immun. 26: 822–826.

Salmon, D., G. Vanwalleghem, Y. Morias, J. Denoeud, C. Krumbholz, F. Lhomme, S. Bachmaier, M. Kador, J. Gossmann, F. B. S. Dias, G. De Muylder, P. Uzureau, S. Magez, M. Moser, P. De Baetselier, J. Van Den Abbeele, a. Beschin, M. Boshart, and E. Pays. 2012.

Adenylate Cyclases of *Trypanosoma brucei* Inhibit the Innate Immune Response of the Host. Science (80-.). 337: 463–466.
Seleem, M. N., S. M. Boyle, and N. Sriranganathan. 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. Vet. Microbiol. 140: 392–398.
Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat. Biotechnol. 22: 1567–1572.
Sternberg, J., and F. McGuigan. 1992. Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection. Eur. J. Immunol. 22: 2741–2744.
Stijlemans, B., G. Caljon, J. Van Den Abbeele, J. A. Van Ginderachter, S. Magez, and C. De Trez. 2016. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. Front. Immunol. 7.
Sztein, M. B., and F. Kierszenbaum. 1993. Mechanisms of development of immunosuppression during Trypanosoma infections. Parasitol. Today 9: 424–428.
Van Blijswijk, J., B. U. Schraml, and C. R. e Sousa. 2013. Advantages and limitations of mouse models to deplete dendritic cells. Eur. J. Immunol. 43: 22–26.
Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, H. L. Ploegh, and S. Tonegawa. 1992. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. Cell 71: 1205–1214.
Vitry, M.-A., C. De Trez, S. Goriely, L. Dumoutier, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. Infect. Immun. 80: 4271–80.
Vitry, M.-A., D. Hanot Mambres, C. De Trez, S. Akira, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2014. Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*. J. Immunol. 192: 3740–52.

VII. Impact de l'infection par **Brucella melitensis** *sur la microarchitecture splénique et sa capacité à filtrer le sang.*

Les deux modèles de pathologies croisées présentés précédemment nous ont montré que déstabiliser le statut immunitaire de l'hôte avec des pathologies inflammatoires fortes (trypanosomiase africaine et asthme) modulait considérablement le contrôle de l'infection par *B. melitensis*. Il est légitime de se demander si une pathologie beaucoup moins inflammatoire serait en mesure de moduler le statut immunologique de l'hôte et altérer ses capacités à contrôler une infection. De par sa furtivité, *Brucella* est décrite pour induire une inflammation faible mais persistante chez l'hôte.

Nous avons investigué l'impact de l'infection par *B. melitensis* sur la microarchitecture splénique et plus particulièrement sur les deux populations de macrophages qui composent la zone marginale (structure de la rate en **Box 11**). L'infection induit une altération de la zone marginale se traduisant par une disparition variable des deux populations de macrophages. Les macrophages metallophiliques de la zone marginale disparaissent progressivement et sont finalement pratiquement absents de la rate 18 jours post infection intra-péritonéale avec 10^5 CFU. À partir de 18 jours, la population de MMMs recolonise la zone marginale pour récupérer son état initial à partir de 50 jours. La chute des macrophages de la zone marginale, l'autre population de macrophages, est plus drastique que la première. Dès le premier jour d'infection la disparition de cette population est complète et va persister pendant plus de 50 jours d'infection. Cette altération de la zone marginale est indépendante de la charge bactérienne mais associée à la réponse immune Th1 mise en place lors de l'infection. En effet, l'infection de souris déficientes pour l'IFN-γ induit peu ou pas d'altération de la zone marginale malgré une charge bactérienne plus élevée. La fonction première de ces deux populations de macrophages est d'assurer la filtration du sang en capturant les particules et les bactéries présentes dans le sang. L'article montre d'ailleurs que les capacités de filtration de la zone marginale sont altérées lorsque la souris est infectée par *B. melitensis*. L'injection de particules fluorescentes montre des capacités diminuées de rétention de ces particules par la zone marginale dans les souris infectées suggérant que l'infection par *Brucella* peut influencer les capacités de l'hôte à contrôler une infection dépendante des fonctions filtrantes de la zone marginale splénique.

Box 11 : Microarchitecture de la rate

Les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate, sont chargés d'orchestrer la réponse immunitaire en facilitant l'interaction entre les différentes cellules de l'immunité. La rate est un organe complexe considéré comme l'organe le plus important du système lymphoïde en termes de nombre de lymphocytes qui y transitent chaque jour (Pabst *et al.*, 1989). En forme de haricot, l'organe est constitué de follicules de pulpe blanche entourés de pulpe rouge (**Figure 14**). Cette structure facilite la réponse immunitaire et permet la capture, le transport et la présentation des antigènes (Benedict *et al.*, 2006). La pulpe rouge assure une fonction de filtration du sang et de renouvèlement des globules rouges. Les nombreux macrophages présents dans cette zone permettent ce turnover des érythrocytes (Aoshi *et al.*, 2009). La pulpe blanche est divisée en deux zones, une zone T qui comprend l'artériole centrale et qui est constituée de lymphocyte T et une zone B (entourant la zone T) constituée principalement de lymphocytes B (Elmore, 2006). Entre la pulpe blanche et la pulpe rouge, la zone marginale crée une zone de transit pour l'arrivée des lymphocytes et assure une fonction de filtration sanguine grâce aux macrophages présents en nombre. Deux populations distinctes de macrophages composent la zone marginale. Les *Marginal Zone Macrophages* (MZMs) facilitent la capture de polysaccharides présents sur les bactéries comme *S. pneumoniae* et les *Marginal Metallophilic macrophages* (MMMs) reconnaissent l'acide sialique et le LPS des bactéries Gram négatif comme *N. meningitidis* (Aoshi *et al.*, 2009). Le sang arrive dans la rate par l'artériole centrale et débouche dans le sinus marginal où la circulation est ralentie pour faciliter la capture des particules par les MZMs et les MMMs (Aichele *et al.*, 2003). La zone marginale contient aussi des lymphocytes B et des cellules dendritiques.

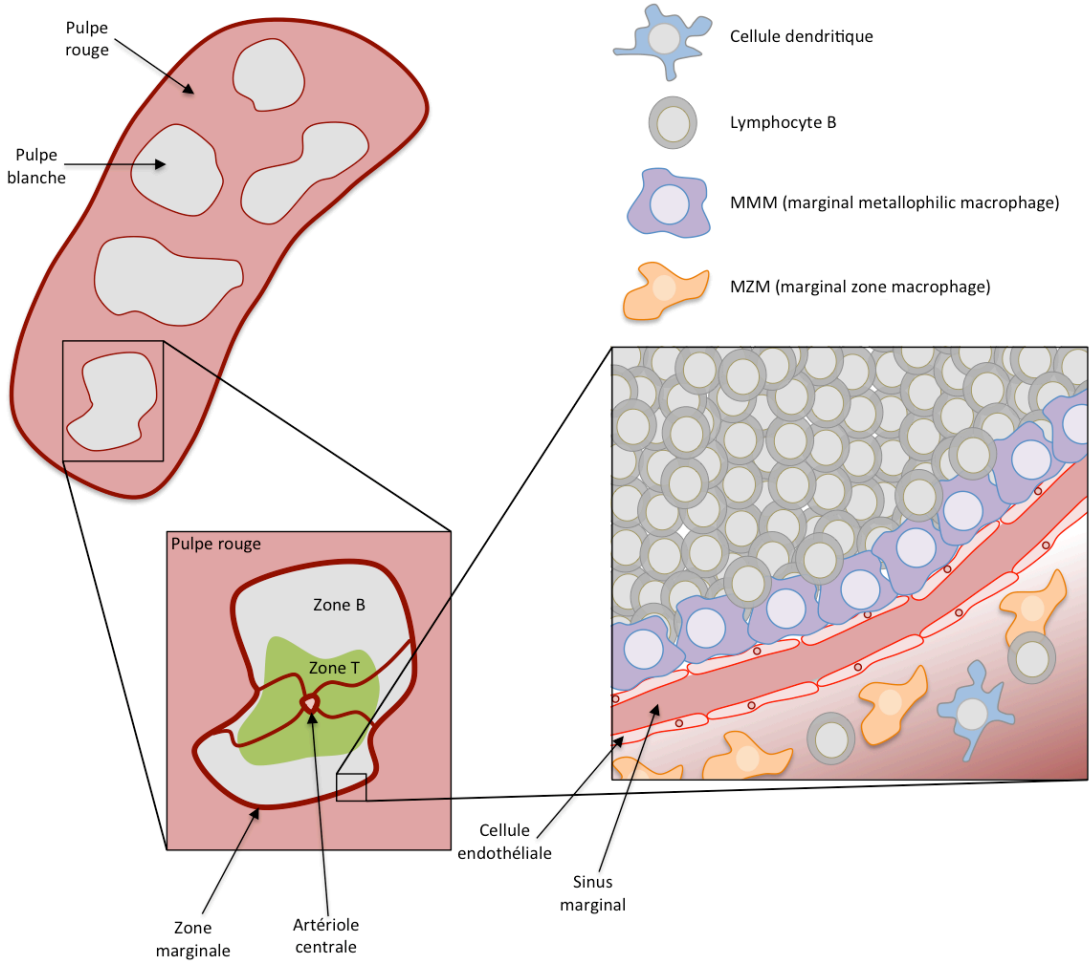


Figure 14 : Structure de la rate.

1. Publication : L'inflammation à bas niveau de type Th1 induite par l'infection par *Brucella melitensis* induit une alteration de la zone marginale de la rate chez la souris.

Arnaud Machelart, Abir Khadrawi, Kevin Willemart, Aurore Demars, Carl De Trez , Jean-Jacques Letesson, Eric Muraille.

Chronic low-grade Th1 inflammation generated by *Brucella* infection induces selective alterations of marginal zone macrophages in spleen

Arnaud Machelart [1, ¶], Abir Khadrawi [1, ¶], Kevin Willemart [1], Aurore Demars [1], Carl De Trez [2], Jean-Jacques Letesson [1], Eric Muraille [1,3]

[1] Unité de Recherche en Biologie des Micro-organismes, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, Université de Namur. Namur, Belgium.

[2] Research Unit of Cellular and Molecular Immunology, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium; Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) Department of Structural Biology Research Center (SBRC), Brussels, Belgium.

[3] Laboratoire de Parasitologie, Université Libre de Bruxelles, Campus Erasme, Bruxelles. Belgique.

[¶]: Arnaud Machelart and Abir Khadrawi contributed equally to this work.

* Corresponding author: Eric Muraille. Laboratoire de Parasitologie, Université Libre de Bruxelles, Campus Erasme, Bruxelles. Belgique. Email: emuraille@hotmail.com

Key words: *Brucella melitensis*, marginal zone macrophages, low-grade Th1 inflammation

Running title: *Brucella* induces marginal zone alterations in spleen

Abstract

The spleen is known as an important filter for blood-borne pathogens that are trapped by specialized macrophages in the marginal zone (MZ): the $CD209^+$ MZ macrophages (MZMs) and the $CD169^+$ marginal metallophilic macrophages (MMMs). Acute systemic infection strongly impacts MZ populations and the location of T and B lymphocytes. This phenomenon has been linked to reduced chemokine secretion by stromal spleen cells in response to inflammatory reactions. *Brucella* spp. are the causative agent of brucellosis, a widespread zoonotic disease leading to debilitating and febrile illness in humans. Here, we used *B. melitensis* infection as a model to investigate the impact of chronic stealth infection on splenic MZ macrophage populations. During the late phase of *Brucella* infection, we observed durable disappearance of both MZMs and MMMs, leading to a reduction of the ability of the spleen to take up soluble antigens, beads and unrelated bacteria. This effect appears to be selective as every other lymphoid and myeloid population analyzed increased during infection. Comparison of wild type and deficient mice suggested that MZ macrophage population loss is dependent on IFNγR but independent of T cells or TNFαR1 signaling pathways and is not correlated to an alteration of CCL19, CCL21 and CXCL13 chemokine mRNA expression. Our results suggest that MZ macrophage populations are particularly sensitive to persistent low-grade Th1-mediated inflammation and that *Brucella* infection could reduce the ability of the spleen to perform certain MZM- and MMM-dependent MZ tasks, such as antigen delivery to lymphocytes and control of systemic infection.

Introduction

The spleen is both the largest secondary lymphoid organ and the main filter of blood (for a general review see (Bronte & Pittet, 2013)). The white pulp, which contains T and B cell populations, is surrounded by the red pulp, a network of reticular fibers and fibroblasts rich in macrophages, where blood is filtered and old erythrocytes are removed. The marginal zone (MZ) located between the white pulp and the red pulp constitutes a specialized filtering area for blood content. The MZ contains specialized macrophage populations, various DC subsets and MZ B cells. The marginal metallophilic macrophages (MMMs) form an inner ring between the MZ and white pulp, whereas MZ macrophages (MZMs) are situated at the outer boundary of the MZ, adjacent to the red pulp. Numerous reports document the filtering capacity of both MMMs and MZMs and their role in clearing pathogens from the systemic circulation, based on the expression of a large variety of pathogen receptor molecules (review in (Borges da Silva *et al.,* 2015; Bronte & Pittet, 2013)). MZMs express the C-type lectin CD209 (also known as SIGN-R1 and recognized by ER-TR9 mAb) and the type-1 scavenger receptor MARCO. CD209 binds to the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* (Y.-S. Kang *et al.,* 2004) as well as to the polysaccharide dextran (Y. S. Kang *et al.,* 2003). MARCO binds to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (van der Laan *et al.,* 1999). Depletion experiments have demonstrated that MZMs are crucial for the entrapment of blood-borne pathogens such as *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) (Seiler *et al.,* 1997), *Streptococcus pneumoniae* (Kang *et al.,* 2004) and *Listeria monocytogenes* (Aichele *et al.,* 2003). MMMs display CD169 (also known as Siglec-1 and recognized by MOMA-1 mAb (Kraal & Janse, 1986; Oetke *et al.,* 2006)) that recognizes sialylated lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis* (Jones *et al.,* 2003) and *Campylobacter jejuni* (Heikema *et al.,* 2010) and binds to *Trypanosoma cruzi* (Monteiro *et al.,* 2005). MZM populations also play a key role in antigen delivery to B cells (Martinez-Pomares & Gordon, 2012) and $CD4^+$ T cells (Attanavanich & Kearney, 2004) and regulate tolerance to apoptotic cells (McGaha *et al.,* 2011; Ravishankar *et al.,* 2014).

Given the many functions of the MZ, interference of pathogens with the integrity and functionality of the MZ may render the host particularly vulnerable to secondary infections or affect self-tolerance and promote autoimmune diseases. Systemic infections with viruses (murine cytomegalovirus (MCMV) (Benedict *et al.,* 2006), LCMV (Scandella *et al.,* 2008)), protozoa (*Leishmania donovani* (Engwerda *et al.,* 2002), *Plasmodium berghei* (Carvalho *et al.,* 2007)) and bacteria (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Rosche *et al.,* 2015))

have been reported to induce a dramatic alteration of MZ macrophage populations. Different mechanisms have been described depending on the model. During *L. donovani* infection, MZ alterations are reduced in the absence of TNFα (Engwerda *et al.,* 2002). In MCMV (Benedict *et al.,* 2006) and LCMV (Scandella *et al.,* 2008) models, loss of MZ macrophage populations is linked to alteration of CCL21 chemokine production by stromal cells. It has been also reported that mice presenting the "paucity of lymph node T cells" (*plt*) mutation display a deficiency in both CCL19 and CCL21 and have a reduced number of macrophages in the MZ (Ato *et al.,* 2004). In addition, an *in vitro* study showed that MZMs can migrate in response to CCL19 and CCL21 (Ato *et al.,* 2004). Taken together, these results suggest that CCL19/21 chemokines could be implicated in the location of MMMs and MZMs in homeostatic conditions.

Brucella (alpha-proteobacteria) are facultative intracellular Gram-negative coccobacilli that infect mammals and cause brucellosis, one of the most common bacterial zoonoses (review in (Godfroid *et al.,* 2005; Martirosyan & Gorvel, 2013; Edgardo Moreno, 2014)). Due to its intracellular lifestyle, the weak agonist activity of its lipopolysaccharide and the active suppression of the innate immune response by immuno-regulatory factors, *Brucella* establishes a stealth infection associated with low-grade Th1 inflammatory reactions (reviewed in (Martirosyan & Gorvel, 2013)). In this work, our objective was to characterize the impact of chronic stealth *Brucella melitensis* infection on splenic MZ macrophage subsets in resistant C57BL/6 mice. Our results demonstrated that *Brucella* induces drastic, long-term and selective alteration of splenic MZ macrophage populations.

Materials and Methods

Ethics Statement

The procedures in this study and the mice handling complied with current European legislation (directive 86/609/EEC) and the corresponding Belgian law "Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010" (Royal Decree on the protection of experimental animals of April 6, 2010, published on May 14, 2010). The Animal Welfare Committee of the Université de Namur (UNamur, Belgium) has reviewed and approved the complete protocol (Permit Number: 05-058).

Mice and reagents

Wild-type C57BL/6 mice were purchased from Harlan (Bicester, UK) and were used as the control. IFNγR$^{-/-}$ C57BL/6 mice and TNFαR1 $^{-/-}$ C57BL/6 mice were acquired from Dr. C. De Trez (Vrije Universiteit Brussel, Belgium). CD3e$^{-/-}$ and IL-1R$^{-/-}$ C57BL/6 mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All wild-type and deficient C57BL/6 mice used in this study were bred in the Gosselies animal facility of the Université Libre de Bruxelles (ULB, Belgium). We used a wild-type strain of *Brucella melitensis* 16M. It was grown in biosafety level III laboratory facilities of the Université de Namur (UNamur, Belgium). Cultures were grown overnight with shaking at 37°C in 2YT medium (Luria-Bertani broth with double quantity of yeast extract) and were washed twice in RPMI 1640 (Gibco Laboratories) (3500xg, 10 min) before inoculation of the mice. To prepare heat-killed (HK) *B. melitensis*, bacteria from an overnight liquid culture in 2YT media were washed twice in PBS (3500xg, 10 min) before heating at 80°C for 1 h. To confirm the killing, an aliquot was plated onto 2YT medium.

Mice infection and bacterial count

Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with the 10^5 CFU of live *B. melitensis* or $5x10^7$ CFU of HK *B. melitensis* in 500 µl of PBS. For intranasal (i.n.) infection, mice were anesthetized with a mixture of xylasin (9 mg/kg) and ketamin (36 mg/kg) in PBS before being inoculated i.n. with a drop of 30 µl of PBS containing 10^5 CFU of live *B. melitensis*. Control animals were injected with the same volume of PBS. The infectious doses were validated by plating serial dilutions of the inocula. At selected time points to perform bacterial counts in the spleen, mice were sacrificed and the spleen was harvested, crushed and transferred to PBS/0.1% X-100 triton (Sigma). We performed successive serial dilutions in RPMI to obtain the most accurate bacterial count and plated them on 2YT medium. The CFU were counted after 5 days of culture at 37°C.

Antibiotic treatment

Antibiotic treatment was administered orally for 2 wk. The treatment was a combination of rifampicin (12 mg/kg) and streptomycin (450 mg/kg) prepared fresh daily and given in the drinking water. To ensure that the antibiotic treatment was effective, some mice from each group were sacrificed and the CFU counts were evaluated in the spleen.

Flow cytometry analysis

As described previously (Vitry *et al.,* 2014), spleens were harvested, cut into small pieces and incubated for 30 minutes at 37°C with a mix of DNAse I fraction IX (Sigma-Aldrich Chimie SARL, Lyon, France) (100 µg/ml) and 1.6 mg/ml of collagenase (400 U/ml). Spleen cells were washed and filtered, and then incubated with saturating doses of purified 2.4G2 (anti-mouse Fc receptor, ATCC) in 200 µl PBS, 0.2% BSA, 0.02% NaN_3 (FACS buffer) for 20 minutes at 4°C to prevent antibody binding to the Fc receptor. Various fluorescent mAb combinations in FACS buffer were used to stain 3-5x10^6 cells: Fluorescein (FITC)-coupled 145-2C11 (anti-CD3e, BD Biosciences), FITC-coupled HL3 (anti-CD11c, BD Biosciences), Phycoerythrin (PE)-coupled 53-6.7 (anti-CD8e, BD Biosciences), PE-coupled 1A8 (anti-Ly6G, BD Biosciences), PE-coupled 1B1 (anti-CD1d, BD Biosciences), allophycocyanin (APC)-coupled M1/70 (anti-CD11b, BD Biosciences), APC-coupled RM4-5 (anti-CD4, BD Biosciences), APC-coupled RA3-6B2 (anti-CD45R/B220, BD Biosciences), APC-coupled BM8 (anti-F4/80, Abcam), biotin-coupled I-A/I-E (anti-MHCII, BD Biosciences), biotin-coupled 1B1 (anti-CD1d, BD Biosciences), biotin-coupled AL-21 (anti-Ly-6C, BD Biosciences), PE-coupled streptavidin (BD Biosciences). The cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer. Dead cells and debris were eliminated from the analysis according to size and scatter.

Immunofluorescence microscopy

Spleens were fixed for 2 hours at room temperature in 2% paraformaldehyde (pH 7.4), washed in PBS, and incubated overnight at 4°C in a 20% PBS-sucrose solution. The tissues were then embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura), frozen in liquid nitrogen, and cryostat sections (thickness, 5 µm) were prepared. For the staining, tissue sections were rehydrated in PBS and incubated in a PBS solution containing 1% blocking reagent (Boeringer) (PBS-BR 1%) for 20 minutes before being incubated overnight in PBS-BR 1% containing mAbs or reagents: DAPI for nucleic acid staining, Alexa Fluor® 488 phalloidin (Molecular Probes) for actin staining to visualize the fibrous structure of the organ, and eFluor® 570-coupled RA3-6B2 (anti-CD45R/B220, eBioscience), APC–coupled OX-7 (anti-CD90.1, eBioscience), Alexa Fluor® 647–coupled BM8 (anti-F4/80; Abcam), Alexa Fluor®

647-coupled HL3 (anti-CD11c; eBioscience), Alexa Fluor® 647-coupled RB6-8C5 (anti-Gr1, eBioscience), Biotin-coupled MOMA1 (anti-Marginal Zone Macrophages, BMA Biomedicals), Biotin-coupled ERTR9 (anti-SIGN-R1, BMA Biomedicals) to stain the cells of interest. Incubation with a streptavidin-coupled fluorochrome for 2 hours was necessary for the biotin-coupled Ab: Alexa Fluor® 350 or Alexa Fluor® 647 streptavidin (Molecular Probes). Slides were mounted in Fluoro-Gel medium (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Labeled tissue sections were visualized with an Axiovert M200 inverted microscope (Zeiss, Iena, Germany) equipped with a high-resolution monochrome camera (AxioCam HR, Zeiss). Images (1384x1036 pixels, 0.16µm/pixel) were acquired sequentially for each fluorochrome with A-Plan 10x/0.25, EC Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph2 M27 and LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Corr Ph2 dry objectives and recorded as eight-bit grey-level *.zvi files. The percentage of surface area associated with a signal was quantified using the colocalization module of the AxioVision program (Zeiss). At least 3 slides per organ were analyzed from 3 different animals and the results are representative of 2 independent experiments.

Quantification of marginal zone macrophages in the spleen

To quantify the number of both MZMs and MMMs around the white pulp area, frozen spleen sections were stained with specific markers (CD169, Dextran-FITC, CD209, see supplementary Figure 1.A) as indicated previously. Entire tissue section surface areas were scanned automatically using a Zeiss Axiovert200 fluorescent inverted microscope with a 20x objective and the MosaiX module. Within a same experiment, all images were acquired with the same parameters. Then, the images were processed with the NIS-Elements program (Nikon Instruments) to measure the percentage of positive staining per white pulp area. In practice, the experimenter drew an arbitrary line surrounding a white pulp in the marginal area (see Supplementary Figure 1.B) and the program calculated the total number of pixels per line and the number of pixels positive for the specific staining. This allowed us to calculate the percentage of positive staining per white pulp. Three arbitrary lines were drawn and the percentage shown is the average of these measurements minus the background calculated from three measurements performed in a red pulp (negative) area. For each experimental condition, we analyzed at least ten white pulp areas per frozen spleen section and at least seven frozen spleen sections from three individual mice.

Antigen, microsphere and Salmonella capture assay

To study the filtration capacity of the MZ, 200 µL of FITC-Dextran (100 µg/ml, 500-kDa Dextran, Molecular Probes) were injected i.p. and 200 µL of Fluoresbrite YG (yellow

green) microspheres 0.05µm ($1.82x10^{13}$ beads/ml, Polysciences) or 10^8 CFU of live GFP-expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GFP-*Salmonella*) containing the plasmid pFPV25.1-gfp (Valdivia *et al.,* 1996). *S. typhimurium* was cultivated overnight with shaking at 37°C in Luria-Bertani broth and washed twice in RPMI 1640 (Gibco Laboratories) (3500xg, 10 min) before it was injected intravenously to mice. Mice were sacrificed 20 minutes after injection. The spleen was harvested rapidly and treated for immunofluorescence microscopy as previously described.

RNA purification and real-time RT-PCR

Spleen samples were collected and immediately frozen and stored at -80°C until processing. RNA was then extracted from total frozen tissue using the TriPure isolation reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. DNA contamination in the RNA samples was eliminated by incubation with DNase I (Fermentas). Reverse transcription (RT) and real-time PCRs were carried out using LightCycler 480 RNA master hydrolysis probes (one-step procedure) on a LightCycler 480 real-time PCR system (Roche Diagnostics). SYBR Green PCR master mix kits (Roche) were used for quantification and the specificity of the SYBR Green assays was assessed by melting-point analysis and gel electrophoresis. Results were normalized using the housekeeping gene β-actin. The primer sequences are presented in Table S1 in the supplemental materials.

Statistical analysis

We used a (Wilcoxon-) Mann-Whitney test provided by the GraphPad Prism software to statistically analyze our results. Each group of deficient mice was individually compared to the wild-type mice group. We also compared each group with each other and displayed the results when required. Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. *, **, *** denote $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively.

Supplemental Table 1:

Gene	PCR Primer
β-actin	forward: 5'- ACGGCCAGGTCATCACTATTGG-3' reverse: 5'- GTTTCATGGATGCCACAGGATTCC-3'
CCL21a	forward: 5'-ACAGACACAGCCCTCAA-3' reverse: 5'-CATGAGGTGGCTGCTTT-3'
CXCL13	forward: 5'-GAACAGGCATTTAGTGACAAC-3' reverse: 5'-TTTTGGAAGCCTGCGTTTT-3'
CCL19	forward: 5'-CTGCCTCAGATTATCTGCCAT-3' reverse: 5'-TCATAAGCACCCCCCAGAGT-3'

Results

Chronic *Brucella* infection causes selective alteration of spleen cell populations

In order to characterize the impact of intraperitoneal (i.p.) *Brucella melitensis* infection on the spatial distribution and number of spleen cell populations, wild-type C57BL/6 mice were infected i.p. with 10^5 CFU of *B. melitensis* and the spleens were harvested at 1, 5, 18, 28 and 50 days post-infection and analyzed. The bacterial load (Figure 1.A) and the number of nucleated cells (Figure 1.B) peaked at day 5 in the spleens and the splenomegaly (Figure 1.C) peaked at 18 days. Fluorescence microscopy analysis of frozen spleen sections from infected mice showed that splenomegaly was associated with significant recruitment of various cell types such as $CD90^+$ T lymphocytes (Figure S1.A) and $Gr\text{-}1^+$ neutrophils (Figure S1.B). T lymphocytes, initially located in the T cell area of the white pulp, massively relocated to the red pulp, presumably to participate in granuloma formation induced by *B. melitensis* infection (Copin *et al.,* 2012). The number of neutrophils increased in the red pulp where they form dense aggregates and are frequently found to infiltrate the white pulp T cell area. Spleen cell counting and flow cytometry analysis of the major spleen cell populations was performed to characterize the kinetic evolution of the number of cell populations per spleen during the course of *B. melitensis* infection (Figure 1.C). We observed that all populations analyzed increased in number in response to infection. The number of inflammatory dendritic cells ($CD11b^+$ $CD11c^+$ $Ly\text{-}6C^{high}$), B cells ($CD45R/B220^+$ $MHCII^+$) and both $CD3^+$ $CD4^+$ and $CD3^+$ $CD8^+$ T cells reached a plateau phase at 5 days. Red pulp macrophages ($F4/80^+$ $CD11c^-$ $Ly\text{-}6G^-$), neutrophils ($F4/80^-$ $CD11c^-$ $Ly\text{-}6G^{high}$) and classical dendritic cells ($CD11c^+$ $Ly\text{-}6C^{low}$) peaked later at 18 days.

In striking contrast to other spleen cell populations, fluorescence microscopy analysis showed that the MZ macrophage populations decreased dramatically during the chronic phase of *B. melitensis* infection. Both the MMMs ($CD169^+$, Figure 2.A) and MZMs ($CD209^+$, Figure 2.B) had disappeared from the MZ of the mice 18 days post-infection.

MZ macrophage populations are present in low numbers and are notoriously very difficult to purify (Backer *et al.,* 2010), thus complicating any quantitative analysis of these populations by flow cytometry. To overcome this technical problem, we developed a semi-quantitative approach to estimate the number of both MZMs and MMMs surrounding the white pulp area by microscopy. Briefly (see Materials and Methods and Figure S2), images of spleen sections stained with MZM- and MMM-specific markers were processed using the NIS-Elements program (Nikon Instruments) to determine the percentage of specific signal per

marginal zone. This produced a semi-quantitative estimation of MZMs and MMMs found in the spleen and a comparison between control and infected mice. As shown in Figure 3.A, *Brucella* infection induced a rapid and durable loss of both Dextran^{+} MZMs and CD169^{+} MMMs. Maximal loss was observed at 18 days for both populations. However, while the MMM numbers had recovered partially at 28 days, a major loss of MZMs persisted until 50 days post-infection. Two weeks of antibiotic treatment starting at 18 days post i.p. infection allowed for a partial recovery of both the MMMs and MZMs (Figure 3.A). In agreement with a previously published observation on the different turnovers of the various splenic macrophage populations (Van Rooijen *et al.,* 1989), reconstitution of the MZM population seems to be slower than for the MMMs. We should point out that MZM and MMM loss is very selective, as at the same time MZ B cells (MHCII^{+} B220^{+} CD1d^{+}) increased in number as shown by flow cytometry analysis (Figure 1.C). Intraperitoneal inoculation of $5x10^{7}$ CFU of heat killed (HK) *B. melitensis* induced a more rapid but less drastic loss of MMMs and MZMs (Figure 3.B) with a partial recovery of MMMs that was already observed at 12 days post-infection. These results suggest that recognition by the immune system of *Brucella*-associated molecular patterns alone is able to induce MZ macrophage populations loss and that the cell infection process is not absolutely required for this phenomenon to occur.

Finally, we observed that, like i.p. infection, intranasal (i.n.) infection with 10^{5} CFU of *B. melitensis* induced significant MMM and MZM loss (Figure 3.C), thus demonstrating that this phenomenon is also observed following a more natural route of infection. The phenomenon is delayed and peaked at 28 days post-infection as expected based on delayed infection of the spleen in the i.n. infection model (Hanot Mambres *et al.,* 2016).

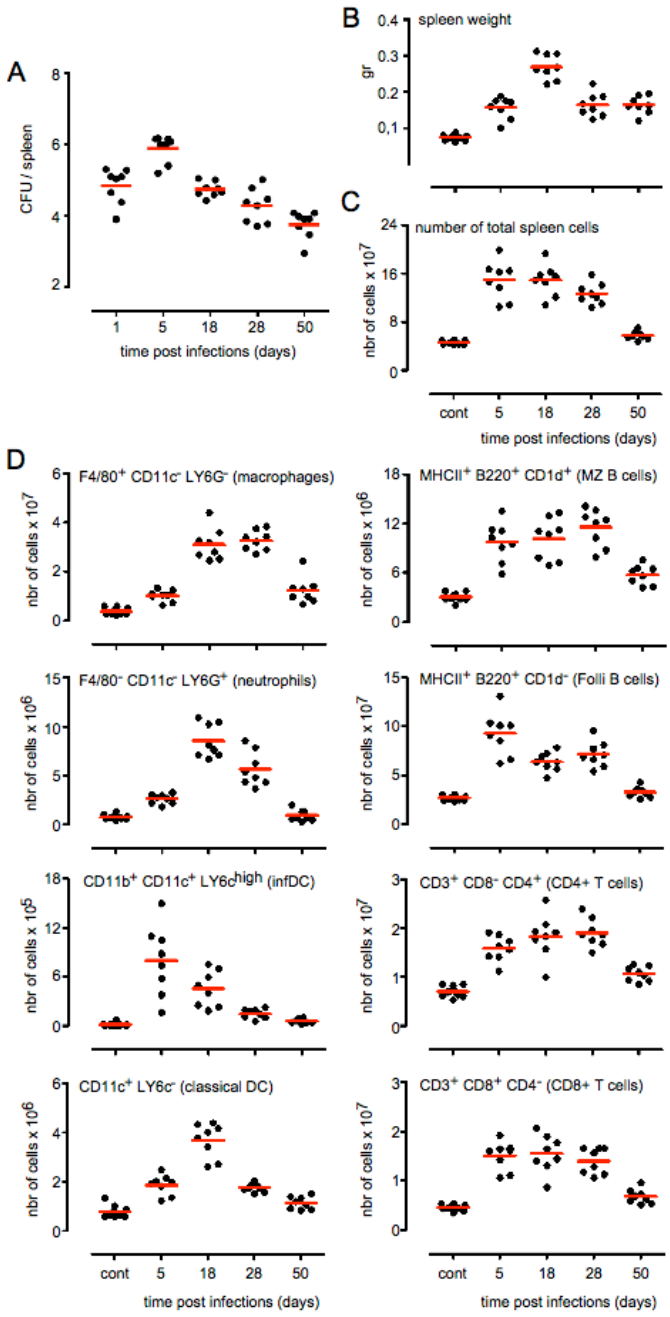


Figure 1: *Brucella melitensis* infection leads to increased numbers of lymphocytes, myeloid and granulocyte cells in the spleen. Wild-type C57BL/6 mice were infected intraperitoneally (i.p.) with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at the indicated times. The data represent (**A**) the number of CFU per spleen, (**B**) the weight of the spleen, (**C**) the number of total cells per spleen and (**D**) the frequency of cells positive for the indicated cell markers determined by flow cytometry. These results are representative of at least two independent experiments.

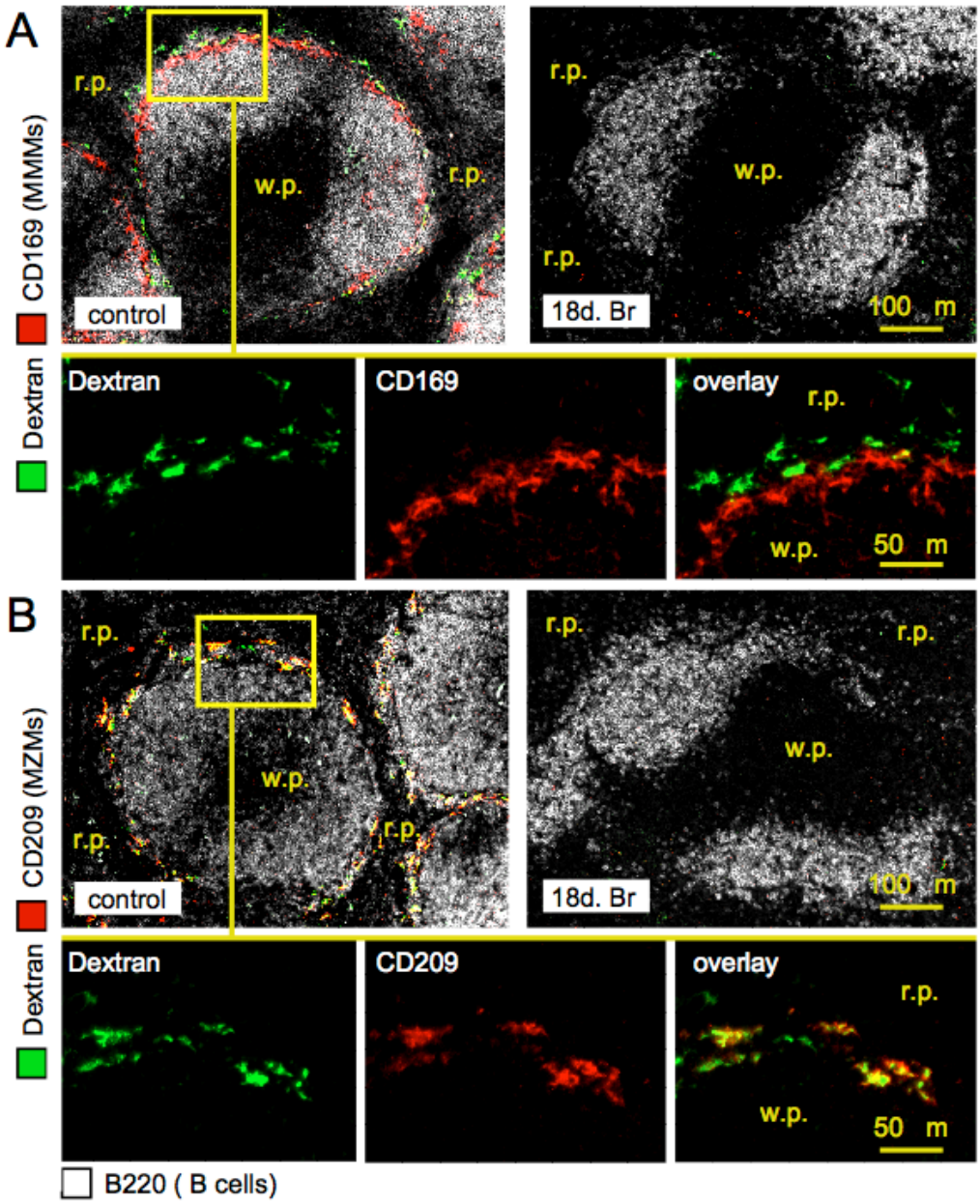


Figure 2: Loss of marginal zone macrophage populations following *Brucella melitensis* infection. Wild-type C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at 18 days post-infection. 30 minutes before sacrifice, mice were injected i.p. with FITC-coupled dextran, as indicated in the Materials and Methods section. The panels represent the localization by immunofluorescence of CD45R/B200$^+$ B cells and (**A**) CD169$^+$ and FITC-coupled Dextran$^+$ cells, (**B**) CD209$^+$ and FITC-coupled Dextran$^+$ cells in the spleens of naive (control) and infected mice. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Scale bar = 50 µm and 100 µm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. The data are representative of at least two independent experiments.

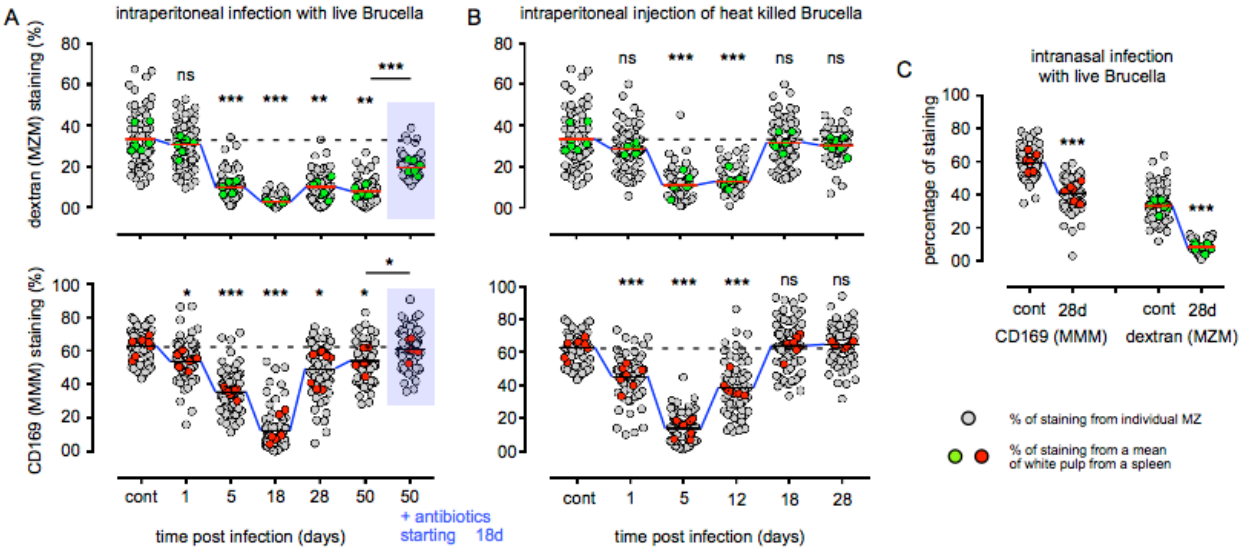


Figure 3: Quantification of MZM and MMM loss induced by *Brucella* infection in the spleen. Wild-type C57BL/6 mice were (**A**) infected i.p. with 10^5 CFU of live *B. melitensis*, (**B**) injected i.p. with $5x10^7$ CFU of heat-killed (HK) *B. melitensis* or (**C**) infected intranasally (i.n.) with 10^5 CFU of live *B. melitensis.* Mice were sacrificed at the indicated times. Spleens were harvested, fixed, frozen and stained as indicated in the Materials and Methods section to detect MZM and MMM populations. The panels represent a semi-quantitative estimation of the presence of MZMs and MMMs in the spleens of control and infected mice. Grey circles show the percentage of positive staining of individual white pulp areas from naive (control) or infected mice. Green and red circles show the mean of positive staining of at least ten white pulp areas from one frozen spleen section and constitute the mean of positive staining per spleen. For each condition, at least seven frozen spleen section from three individual mice were analyzed. The horizontal bar indicates the global median. The statistical analysis was performed on the mean of positive staining per spleen. These results are representative of at least two independent experiments. Significant differences between infected and control mice are marked with asterisks. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

***Brucella* infection reduces the filtration capability of the splenic marginal zone**

As CD209 expressed by MZMs is known to bind to the dextran antigen (Kang *et al.,* 2003), we injected FITC-coupled dextran i.p. to control mice and *Brucella* infected mice at 18 days post-infection to examine MZM-dependent antigen uptake in the spleen. Fluorescence microscopy analysis showed that dextran staining co-localized closely with CD209 (Figure 2.B) in the control mice and was absent in the mice at 18 days post-infection, thus confirming the loss of MZMs and demonstrating that the ability of the spleen to take up circulating antigen is reduced during *Brucella* infection.

Fluorescent microspheres were taken up preferentially by $CD209^+$ MZMs (Aoshi *et al.,* 2009), as confirmed by the co-localization of fluorescent microspheres and CD209 in the spleens of control mice (Figure 4.A). In the absence of MZMs in the mice at 18 days post *Brucella* infection, we observed that the density of fluorescent microspheres was reduced and that they were located mainly in the red pulp area (Figure 4.A and 4.B for a low magnification view).

Overall, the inability of the MZ to take up dextan antigens and microspheres suggests that the capture of blood-borne pathogens by the MZ could be reduced during chronic *Brucella* infection. In order to test this possibility, we injected 10^8 CFU of live GFP-expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GFP-*Salmonella*) intravenously to control mice and mice at 18 days post *Brucella* infection. In the control mice, microscopic analysis of the spleen section confirmed the previously published data (S. Salcedo *et al.,* 2001) which reported that *S. Typhimurium* is captured by both $CD209^+$ MZMs and $CD169^+$ MMMs (Figure 5.A), as well as by red pulp macrophages (data not shown). As expected, in the absence of both MZMs and MMMs in mice at 18 days post *Brucella* infection, we observed a drastic reduction of the ability of the spleen to capture GFP-*Salmonella* (Figure 5.B and Figure 5.C), thus suggesting that control of systemic unrelated bacterial infection could be affected in mice with chronic *Brucella* infection.

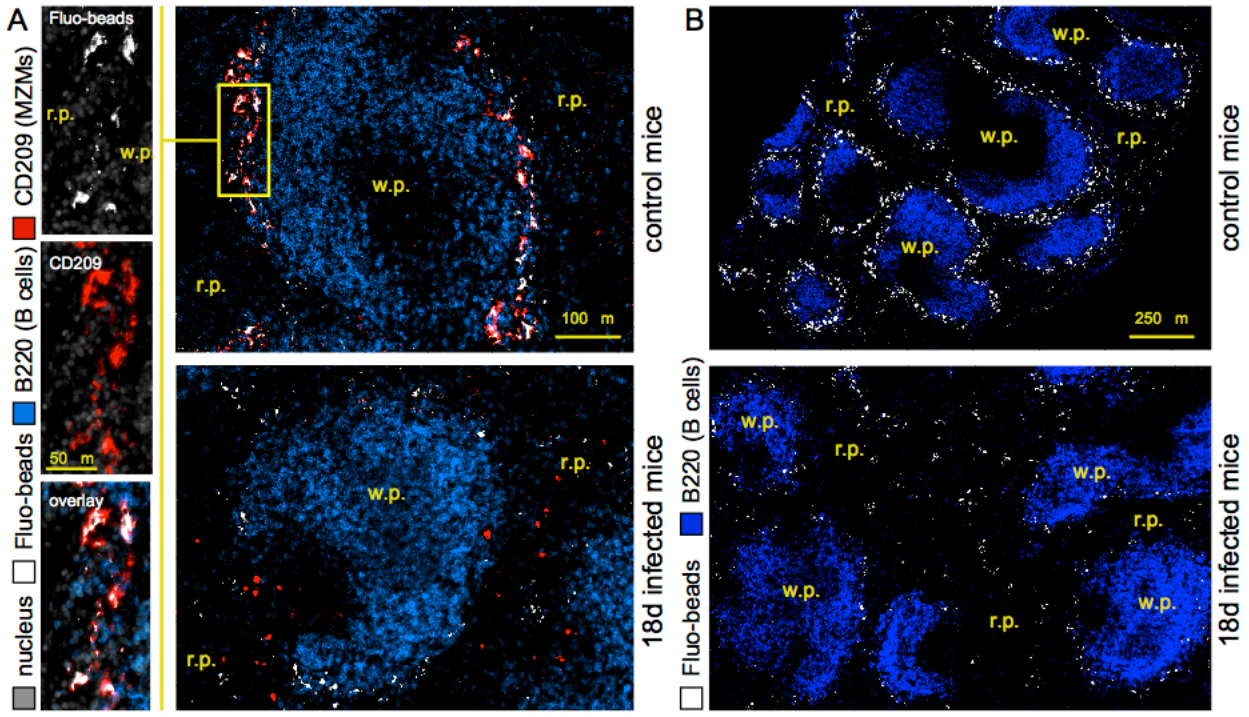


Figure 4: Reduction of the ability of the marginal zone to take up blood-borne fluorescent microspheres during chronic *Brucella melitensis* infection. Wild-type C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at 18 days post-infection. 30 minutes before sacrifice, mice were injected intravenously with FITC-coupled fluorescent microspheres (Fluo-beads), as indicated in the Materials and Methods section. Panel **A** represents the localization by immunofluorescence of CD45R/B200$^+$ B cells, CD209$^+$ MZMs and Fluo-beads in the spleens of naive (control) and infected mice. Panel **B** represents the localization of CD45R/B220$^+$ and FITC-coupled beads$^+$ cells on a large spleen section. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Scale bar = 50 µm, 100 µm and 250 µm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. The data are representative of at least two independent experiments.

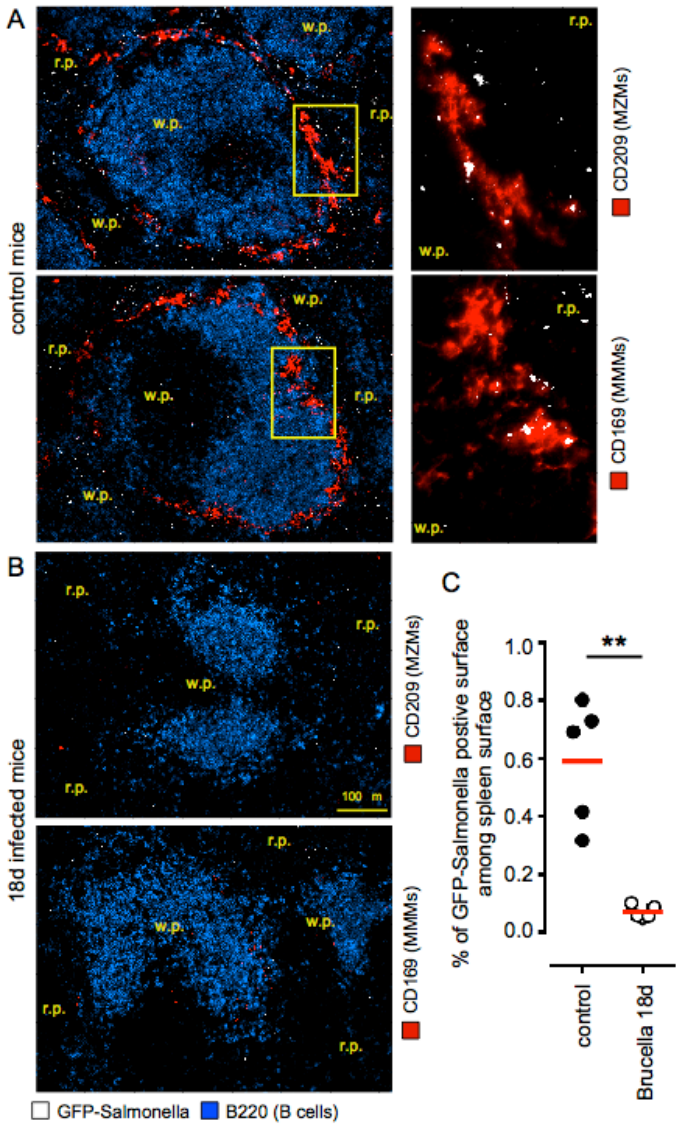


Figure 5: *Brucella melitensis* infection reduces the capture of blood-borne bacteria by the spleen. Wild-type C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at 18 days post-infection. 20 minutes before sacrifice, mice were injected intravenously with 10^8 CFU of live GFP-expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GFP-*Salmonella*), as indicated in the Materials and Methods section. Panels **A** and **B** represent the localization by immunofluorescence of CD45R/B200$^+$ B cells, GFP-*Salmonella* and CD209$^+$ MZMs or CD169$^+$ MMMs in the spleens of naive (control) (**A**) and infected (**B**) mice. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Panel **C** represents the percentage of GFP-*Salmonella* positive surface out of the total spleen surface for 5 spleens from control mice and mice at 18 days post-infection. This quantification was performed using the colocalization module of the AxioVision program (Zeiss). Scale bar = 100 µm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. The data are representative of at least two independent experiments.

The IFNγ-dependent immune response controlling *Brucella* infection induces the loss of marginal zone macrophage populations

Brucella is well known to induce the development of cytotoxic IFNγ-producing $CD4^+$ T (Th1) cells (Martirosyan *et al.,* 2013) that play a key role in the control of infection in the spleen (Copin *et al.,* 2007; Vitry *et al.,* 2012). However, IFN-γ production (S. Mueller *et al.,* 2007) and activated cytotoxic T cells (Matter *et al.,* 2011; Scandella *et al.,* 2008) have been described in several infection models to alter the cellular architecture of the spleen by affecting CCL21 production by stromal cells. Other inflammatory cytokines produced during *Brucella* infection, such as TNFα, have also been linked with MZ alteration in a *Leishmania donovani* infection model (Engwerda *et al.,* 2002). Therefore, we compared the *Brucella*-induced MZM and MMM loss in wild-type, $TNF\alpha R1^{-/-}$, $IFN\gamma R^{-/-}$ and $CD3^{-/-}$ (T cell-deficient) C57BL/6 mice. $IL\text{-}1R^{-/-}$ mice, deficient for IL-1-mediated innate inflammation, were used as internal controls in these experiments. As expected, the course of infection was similar in the wild-type and $IL\text{-}1R^{-/-}$ mice, but the $TNF\alpha R1^{-/-}$, $IFN\gamma R^{-/-}$ and $CD3^{-/-}$ mice displayed significantly enhanced CFU loads in the spleen at 18 days post-infection compared to wild-type mice (Figure 6.A). Fluorescence microscopy analysis showed that, as expected, IL-1R deficiency does not affect MZM and MMM loss (Figure 6.B). In contrast, IFNγR deficiency allows for the maintenance of both MZM and MMM populations during *Brucella* infection (Figure 6.B and 7) or after HK *Brucella* injection (Figure 6.C). Surprisingly, we observed that neither neutralization of the TNFα signaling pathway nor the complete absence of T cells in $CD3^{-/-}$ mice favored the retention of MMMs during *Brucella* infection (Figure 6.B and Figure 7). We should note that, in $CD3^{-/-}$ mice, IFNγ production is still assured by natural killer T cells during *Brucella* infection, as observed by flow cytometry analysis (data not shown). In summary, these results suggest that IFNγ plays a critical role in MZM and MMM loss, but that TNFα and T cells are not absolutely required for this phenomenon to occur.

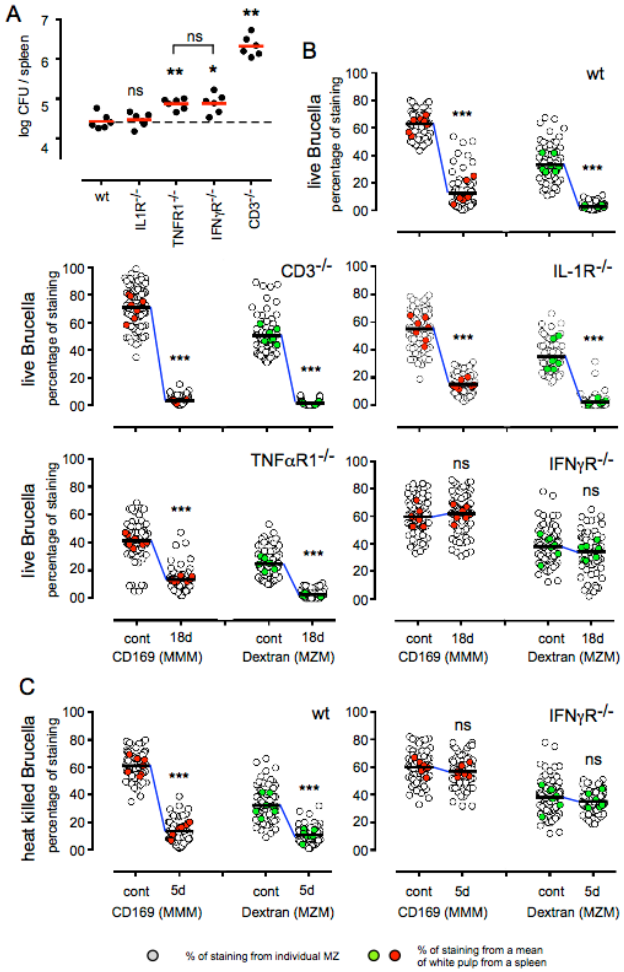


Figure 6: The IFNγR signaling pathway is required for *Brucella*-mediated MZM and MMM loss. Wild-type and IL-1R$^{-/-}$, TNFαR1$^{-/-}$, IFNγR$^{-/-}$ and CD3$^{-/-}$ C57BL/6 mice received 10^5 CFU of live *B. melitensis* (**A**, **B**) or $5x10^7$ CFU of HK *B. melitensis* (**C**) by i.p. route and were sacrificed at the indicated time. Panel **A** represents the number of CFU per spleen for each group of infected mice at 18 days post-infection. Panels **B** and **C** represent a semi-quantitative estimation of the presence of MZMs and MMMs in the spleens of naive (control) mice and mice at 18 days post-infection. White circles indicate the percentage of positive staining of individual white pulp areas from naive (control) or infected mice. Green and red circles show the mean of positive staining of at least ten white pulps from one frozen spleen section and constitute the mean of positive staining per spleen. For each condition, at least seven frozen spleen sections from three individual mice were analyzed. The horizontal bar indicates the global median. The statistical analysis was performed on the mean of positive staining per spleen. These results are representative of at least two independent experiments. Significant differences between infected and control mice are marked with asterisks. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

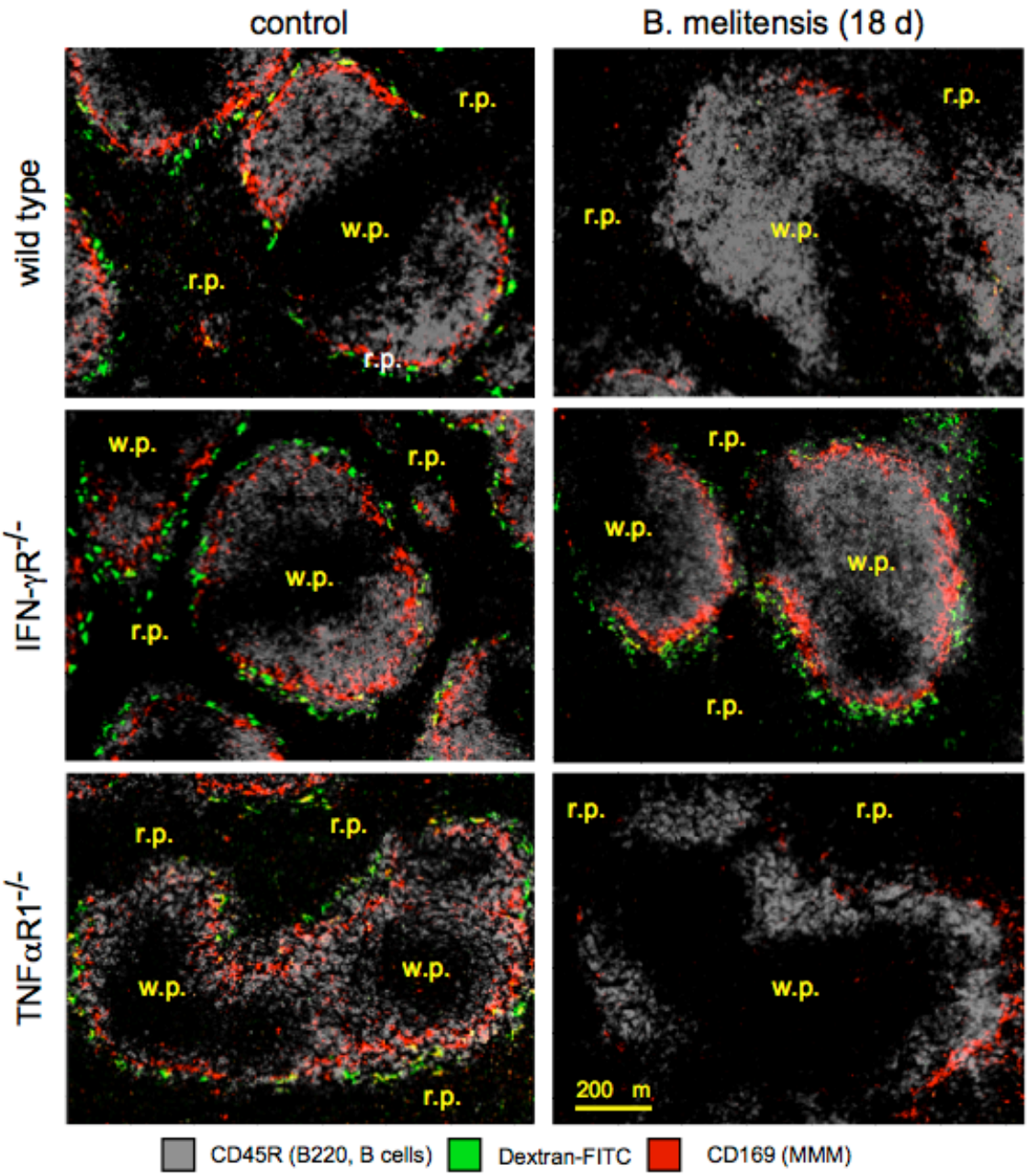


Figure 7: Visualization of marginal zone macrophage populations in control and infected wild-type and deficient mice. Wild-type, TNFαR1$^{-/-}$ and IFNγR$^{-/-}$ C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at the indicated time post-infection. The panels show the localization of CD45R/B220^{+} B cells, CD169^{+} cells (MMMs) and FITC-coupled Dextran^{+} cells (MZMs) on spleen sections from PBS-treated mice (control) and mice at 18 days post-infection. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Scale bar = 100 µm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. These results are representative of at least two independent experiments.

Protection against MZM and MMM loss in IFNγR$^{-/-}$ mice is not correlated with maintenance of CCL19, CCL21 and CXCL13 expression in the spleen

In some acute bacterial and viral infection models (S. Mueller *et al.,* 2007), the splenic stromal cell-derived chemokines CCL21 and CXCL13 are transiently down-regulated by a mechanism mainly controlled by IFNγ-producing CD4^{+} T cells, leading to a dramatic alteration of the location of dendritic cells and lymphocytes. To determine the mechanism that protects MZMs and MMMs in *Brucella*-infected IFNγR$^{-/-}$ mice, we analyzed the expression of CCL19, CCL21 and CXCL13 chemokines by quantitative PCR in control mice and mice at 18 days post *Brucella* infection. Our results (Figure 8) showed that chronic *Brucella* infection does not significantly modulate the expression of these chemokines in wild-type mice. In contrast, all of these chemokines were significantly down-regulated in infected IFNγR$^{-/-}$, TNFαR1$^{-/-}$ and CD3$^{-/-}$ mice, thus demonstrating that in our experimental infection model their expression cannot be correlated with the loss or maintenance of MZ macrophage populations.

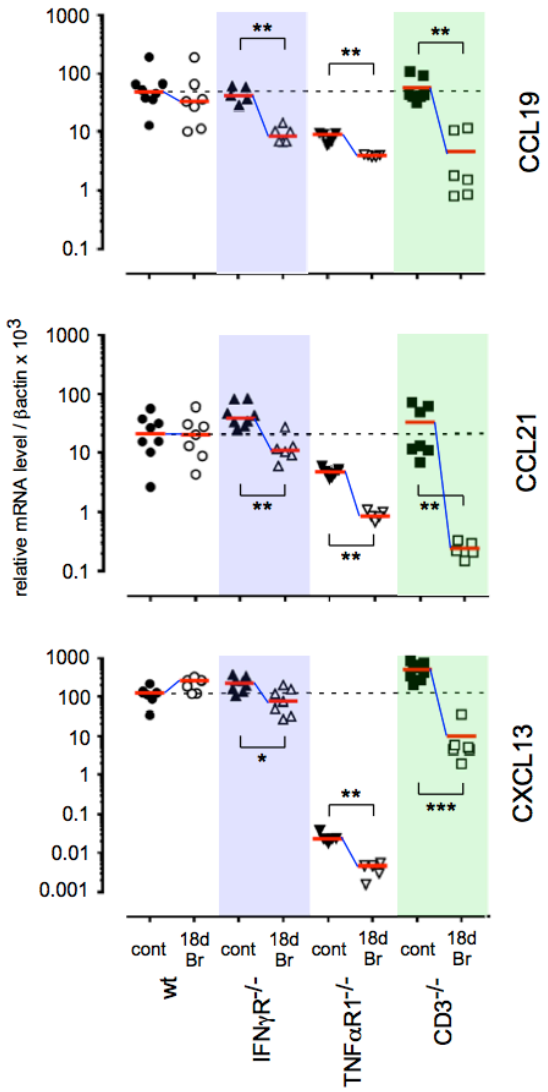


Figure 8: Impact of *Brucella* infection on CCL19, CCL21 and CXCL13 expression in the spleen. Wild-type, IFNγR$^{-/-}$, TNFαR1$^{-/-}$ and CD3$^{-/-}$ C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at 18 days post-infection. Spleen cells were collected and total RNA was extracted and analyzed by quantitative PCR. mRNA levels were normalized using β-actin RNA as the reference and compared with mRNA levels obtained under conditions without infection (control). The panels represent a comparison of CCL19, CCL21, and CXCL13 gene expression in wild-type and deficient C57BL/6 mice in naive (control) mice and mice at 18 days post-infection. Significant differences between infected and control mice are marked with asterisks. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

Discussion

Though many studies have been performed, little real progress in our understanding of the *Brucella*-induced pathology has been reported recently. Whole-genome analysis demonstrated that *Brucella* does not display "classic" virulence factors that can directly harm eukaryotic cells such as exotoxins, exoproteases, cytolysins or other exoenzymes. All identified *Brucella* virulence factors play roles facilitating cell invasion and survival by subverting the innate cellular defense mechanisms (reviewed in (Chain *et al.,* 2005)) and are found in practically all *Brucella* species examined, independently of their pathogenicity for humans (Audic *et al.,* 2009). Despite that, brucellosis can cause a debilitating chronic disease in humans, characterized by relapses of an undulant fever and lifelong severe complications, such as arthritis, meningitis, hepatitis and endocarditis. We and others have demonstrated that *Brucella* infection induces a protective (Copin, Vitry *et al.,* 2012; Vitry *et al.,* 2012) but damaging (Corsetti *et al.,* 2013) low-grade IFNγ-mediated inflammatory (Th1) response in mice. A common characteristic of all localized *Brucella*-induced complications is the presence of inflammatory infiltrates in the lesions (Baldi & Giambartolomei, 2013), suggesting that the incessant Th1 inflammation generated by *Brucella* persistence could be the main source of the complications observed during brucellosis. Increasing evidence indicates that persistent low-grade Th1 can contribute to insulin resistance, type-2 diabetes, cardio-metabolic disease, autoimmune diseases (Minihane *et al.,* 2015) and cancer development (Chiba *et al.,* 2012). However, the consequences of chronic low-grade Th1 inflammation on immune-mediated resistance to infection remain largely unknown.

In this work, we analyzed the impact of chronic stealth *Brucella* infection on the specialized MZ macrophage populations of the spleen. Our results showed that *Brucella* infection leads to a drastic loss of both $CD169^+$ MMMs and $CD209^+$ MZMs. We have previously observed (Copin *et al.,* 2012; Hanot Mambres *et al.,* 2015b) that $CD169^+$ and $CD209^+$ spleen cells can be infected *in vivo* by *Brucella*. However, injection of HK *Brucella* is also able to induce a transient loss of both MZMs and MMMs in the spleen, which suggests that the infection process is not crucial to the induction of MZ macrophage populations loss. Alteration of MZM and MMM populations appears to be highly selective during brucellosis, as all other lymphoid and myeloid populations analyzed increased in number during the course of infection. By comparing wild-type and $IFN\gamma R^{-/-}$ infected mice, we demonstrated that *Brucella*-mediated loss of MMMs and MZMs is impaired in the absence of IFNγ signaling, suggesting that MMM and MZM loss is a direct consequence of a sustained IFNγ-

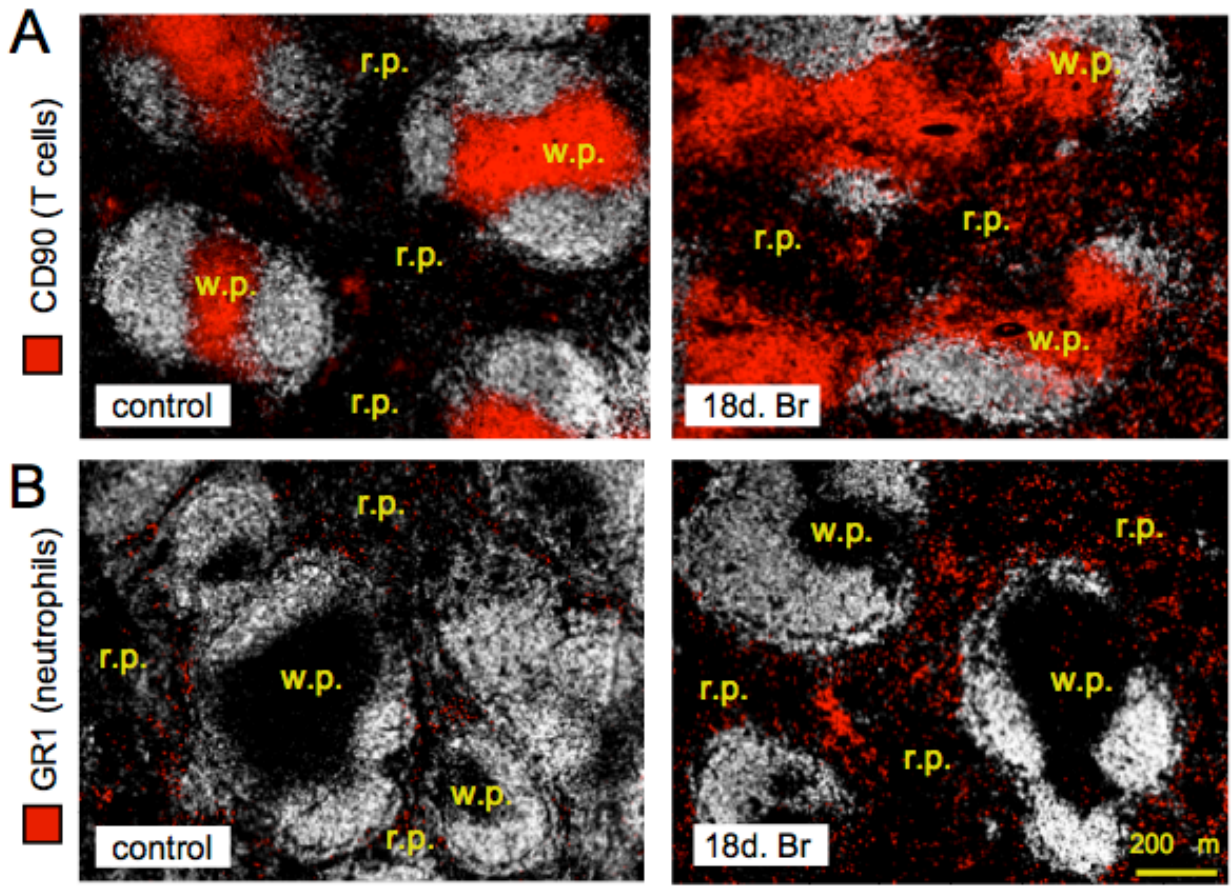
dependent Th1 protective response. MZMs seem to be particularly sensitive to IFNγ-mediated inflammation as this population had not recovered at 50 days post-infection in the absence of detectable IFNγ production (data not shown), which indicates that very low levels of IFNγ are sufficient to induce MZM loss.

The structure of the spleen is supported by a network of stromal cells producing chemokines, such as CCL19, CCL21 and CXCL13 (Mueller & Germain, 2009). Acute inflammatory reactions have been associated with a drastic reduction of the expression of these chemokines in the spleen and severe disorganization of T and B cell segregation in the white pulp (Benedict *et al.,* 2006; Mueller *et al.,* 2007; Scandella *et al.,* 2008). Loss of splenic MZ macrophage populations has been also reported in experimental infection models characterized by intense acute inflammation (Benedict *et al.,* 2006; Carvalho *et al.,* 2007; Engwerda *et al.,* 2002; Scandella *et al.,* 2008). In MCMV and LCMV infection models (Benedict *et al.,* 2006; Scandella *et al.,* 2008), these alterations have been linked to a reduction of CCL19 and CCL21 chemokine expression. MCMV infection caused specific, but transient transcriptional suppression of CCL21 (Benedict *et al.,* 2006). During LCMV infection, the virus preferentially infects CCL21-producing stroma cells that become the target of an intense T cell-mediated cytotoxic response (Scandella *et al.,* 2008). In contrast, in our experimental model, MZ alterations induced by *Brucella* culminated at 18 days post-infection, long after the peak of infection occurring in the spleen at 5 days. In infected wild-type mice, we did not observe a general perturbation of the T and B cell areas following *Brucella* infection. The B cell follicles were dense and normal in appearance and, while some T cells relocated to the red pulp area, they did not invade the B cell areas, suggesting that the balance of chemokines located at the boundaries of the B and T cell areas in the white pulp remained effective during *Brucella* infection. In keeping with this hypothesis, quantitative PCR did not reveal a significant decrease in the expression of stromal cell-derived chemokines known to regulate the location of B cells (CXCL13) and T cells (CCL19, CCL21) during the chronic phase of *Brucella* infection in wild-type mice. However, the expression of these chemokines was significantly reduced in *Brucella*-infected IFNγR$^{-/-}$ mice that displayed higher bacteria levels in the spleen but conserved the MZM and MMM populations. Other factors affecting MZ population maintenance have been reported previously. In the *L. donovani* infection model (Engwerda *et al.,* 2002), TNFα did mediate MZM and MMM loss. However, the absence of TNFα signaling did not impair MZM and MMM populations disappearance in our model. B cells appeared to be crucial for MZM and MMM development and maintenance (Nolte *et al.,* 2004) as their absence in B cell-deficient

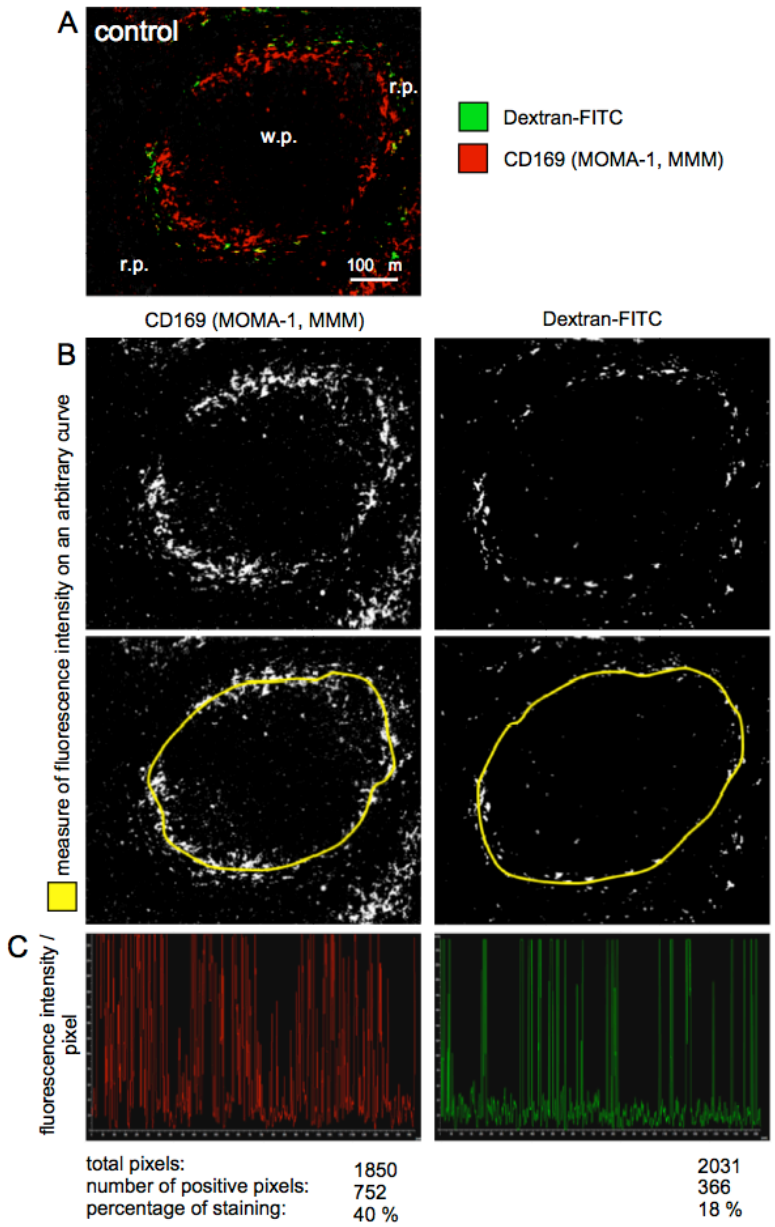
mice was correlated with reduced counts of these cells. However, in our model, flow cytometry analysis showed that both follicular and MZ B cells remained present and even increased in number during *Brucella* infection, suggesting they are not implicated in the *Brucella*-induced MZM and MMM loss in wild-type mice. Taken together, our results suggest that, in our chronic infection model, MZM and MMM loss is not correlated with reduced expression of CCL19, CCL21 and CXCL13, is not due to a B cell deficiency and does not required TNFα signaling.

A growing body of experimental and epidemiological data suggests that the efficiency of the host immune response to fight infectious microorganisms can be affected by past or chronic unrelated infection (reviewed in (Muraille, 2016)). MZMs and MMMs are highly specialized cells that play a key role in clearing pathogens from the systemic circulation (Aichele *et al.,* 2003; Borges da Silva *et al.,* 2015; Bronte & Pittet, 2013; Kang *et al.,* 2004; Seiler *et al.,* 1997). Our work demonstrated that low-grade IFNγ-mediated sustained inflammation generated by i.p. or i.n. *B. melitensis* infection leads to a drastic and durable loss of MZ macrophage populations in the spleens of infected mice. A direct consequence of the loss of MMMs and MZMs is the reduced ability of the spleen of *Brucella*-infected mice to capture blood-borne soluble antigens, microspheres or unrelated bacteria, which suggests that *Brucella* persistence could significantly affect the host's ability to control unrelated infections, to develop protective immunity following vaccination or to maintain self-tolerance and prevent autoimmune disease. The occurrence of human brucellosis is high and probably underestimated in regions where *Brucella* is endemic in domestic animals (Pappas *et al.,* 2006). Based on our work, it would be profitable and interesting to examine the impact of brucellosis on other infectious and non-infectious diseases in the regions where it is common. It has been recently reported (Rosche *et al.,* 2015) that, like *Brucella*, chronic infection of mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces a significant decline in the proportions of $CD169^+$ MMMs, suggesting that MZ alteration by chronic bacterial infection could be a common occurrence.

On the whole, our results could improve the understanding of the complex consequences for the immune system of low-grade Th1 inflammation associated with pathogen persistence, and provide further insight about diseases that could arise within the context of chronic infection.



Supplementary Figure 1: Location of B cells, T cells and granulocytes in the spleen during chronic *Brucella melitensis* infection. Wild-type C57BL/6 mice were infected i.p. with a dose of 10^5 CFU of *B. melitensis* and sacrificed at 18 days post-infection. The panels represent the localization by immunofluorescence of CD45R/B200$^+$ B cells and (**A**) CD90$^+$ T cells, (**B**) GR1$^+$ neutrophils in the spleens of naive (control) and infected mice. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Scale bar = 200 μm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. The data are representative of at least two independent experiments.



Supplementary Figure 2: Quantification of marginal zone macrophage populations around white pulp follicles. The panels represent (**A**) the localization by immunofluorescence of CD169^{+} and Dextran-FITC^{+} cells in the spleens of naive (control) wild-type C57BL/6 mice. The panels are color-coded with the text for the antigen examined. Scale bar = 100 µm, as indicated. r.p.: red pulp; w.p.: white pulp. **B, C**. Example of quantification of marginal zone macrophage populations around a white pulp area. The experimenter defined an arbitrary line covering the marginal area (**B**), then the images were processed using the NIS-Elements program (Nikon Instruments) (**C**) to measure the percentage of positive staining per white pulp area.

References

Aichele, P., J. Zinke, L. Grode, R. a Schwendener, S. H. E. Kaufmann, and P. Seiler. 2003. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. J. Immunol. 171: 1148–1155.

Aoshi, T., J. A. Carrero, V. Konjufca, Y. Koide, E. R. Unanue, and M. J. Miller. 2009. The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. Eur. J. Immunol. 39: 417–425.

Ato, M., H. Nakano, T. Kakiuchi, and P. M. Kaye. 2004. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. J. Immunol. 173: 4815–4820.

Attanavanich, K., and J. F. Kearney. 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. J. Immunol. 172: 803–811.

Audic, S., M. Lescot, J.-M. Claverie, and H. C. Scholz. 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. BMC Genomics 10: 352.

Backer, R., T. Schwandt, M. Greuter, M. Oosting, F. Jüngerkes, T. Tüting, L. Boon, T. O'Toole, G. Kraal, A. Limmer, and J. M. M. den Haan. 2010. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 216–221.

Baldi, P. C., and G. H. Giambartolomei. 2013. Immunopathology of *Brucella* infection. Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 8: 18–26.

Benedict, C. A., C. De Trez, K. Schneider, S. Ha, G. Patterson, and C. F. Ware. 2006. Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. PLoS Pathog. 2: e16.

Borges da Silva, H., R. Fonseca, R. M. Pereira, A. dos A. Cassado, J. M. Álvarez, and M. R. D'Império Lima. 2015. Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. Front. Immunol. 6: 1–9.

Bronte, V., and M. J. Pittet. 2013. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. Immunity 39: 806–818.

Carvalho, L. J. M., M. F. Ferreira-da-Cruz, C. T. Daniel-Ribeiro, M. Pelajo-Machado, and H. L. Lenzi. 2007. Germinal center architecture disturbance during Plasmodium berghei ANKA infection in CBA mice. Malar. J. 6: 59.

Chain, P. S. G., D. J. Comerci, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. a. Malfatti, L. M. Vergez, F. Aguero, M. L. Land, R. a. Ugalde, and E. Garcia. 2005. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *brucellae*. Infect. Immun. 73: 8353–8361.

Chiba, T., H. Marusawa, and T. Ushijima. 2012. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. Gastroenterology 143: 550–563.

Copin, R., M.-A. Vitry, D. Hanot Mambres, A. Machelart, C. De Trez, J.-M. Vanderwinden, S. Magez, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. PLoS Pathog. 8: e1002575.

Copin, R., P. De Baetselier, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2007. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. J. Immunol. 178: 5182–5191.

Corsetti, P. P., L. A. de Almeida, N. B. Carvalho, V. Azevedo, T. M. A. Silva, H. C. Teixeira, A. C. Faria, and S. C. Oliveira. 2013. Lack of Endogenous IL-10 Enhances Production of Proinflammatory Cytokines and Leads to *Brucella abortus* Clearance in Mice. PLoS One 8.

Engwerda, C. R., M. Ato, S. E. J. Cotterell, T. L. Mynott, A. Tschannerl, P. M. a Gorak-Stolinska, and P. M. Kaye. 2002. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. Am. J. Pathol. 161: 429–437.

Godfroid, J., A. Cloeckaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji, and J. J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 36: 313–326.

Hanot Mambres, D., A. Machelart, G. Potemberg, C. De Trez, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2016. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. J. Immunol. 196: 3780–3793.

Heikema, A. P., M. P. Bergman, H. Richards, P. R. Crocker, M. Gilbert, J. N. Samsom, W. J. B. van Wamel, H. P. Endtz, and A. van Belkum. 2010. Characterization of the specific interaction between sialoadhesin and sialylated *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. Infect. Immun. 78: 3237–46.

Jones, C., M. Virji, and P. R. Crocker. 2003. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. Mol. Microbiol. 49: 1213–1225.

Kang, Y. S., S. Yamazaki, T. Iyoda, M. Pack, S. a. Bruening, J. Y. Kim, K. Takahara, K. Inaba, R. M. Steinman, and C. G. Park. 2003. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. Int. Immunol. 15: 177–186.

Kang, Y.-S., J. Y. Kim, S. a Bruening, M. Pack, A. Charalambous, A. Pritsker, T. M. Moran, J. M. Loeffler, R. M. Steinman, and C. G. Park. 2004. The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 215–220.

Kraal, G., and M. Janse. 1986. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. Immunology 58: 665–669.

Mambres, D. H., A. Machelart, J. M. Vanderwinden, C. De Trez, B. Ryffel, J. J. Letesson, and E. Muraille. 2015. In situ characterization of splenic *Brucella melitensis* reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice. PLoS One 10: 1–20.

Martinez-Pomares, L., and S. Gordon. 2012. CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. Trends Immunol. 33: 66–70.

Martirosyan, A., and J.-P. Gorvel. 2013. *Brucella* evasion of adaptive immunity. Future Microbiol. 8: 147–54.

Martirosyan, A., K. Von Bargen, V. A. Gorvel, W. Zhao, S. Hanniffy, J. Bonnardel, S. Méresse, and J. P. Gorvel. 2013. In vivo identification and characterization of CD4+ cytotoxic T cells induced by virulent *Brucella abortus* infection. PLoS One 8: 1–10.

Matter, M. S., T. Hilmenyuk, C. Claus, R. Marone, C. Schorch, M. Tinguely, L. Terracciano, S. A. Luther, and A. F. Ochsenbein. 2011. Destruction of lymphoid organ architecture and hepatitis caused by CD4 + T cells. PLoS One 6.

McGaha, T. L., Y. Chen, B. Ravishankar, N. Van Rooijen, and M. C. I. Karlsson. 2011. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. Blood 117: 5403–5412.
Minihane, A. M., S. Vinoy, W. R. Russell, A. Baka, H. M. Roche, K. M. Tuohy, J. L. Teeling, E. E. Blaak, M. Fenech, D. Vauzour, H. J. McArdle, B. H. A. Kremer, L. Sterkman, K. Vafeiadou, M. M. Benedetti, C. M. Williams, and P. C. Calder. 2015. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. Br. J. Nutr. 114: 999–1012.
Monteiro, V. G., C. S. S. Lobato, A. R. Silva, D. V Medina, M. a de Oliveira, S. H. Seabra, W. de Souza, and R. a DaMatta. 2005. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. Parasitol. Res. 97: 380–5.
Moreno, E. 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front. Microbiol. 5: 1–18.
Mueller, S. N., and R. N. Germain. 2009. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. Nat. Rev. Immunol. 9: 618–629.
Mueller, S., K. Hosiawa-Meagher, B. Konieczny, B. Sullivan, M. Bachmann, R. Locksley, R. Ahmed, and M. Matloubian. 2007. Regulation of Homeostatic Chemokine Expression and Cell Trafficking During Immune Responses. Science (80-.). 317: 670–674.
Muraille, E. 2016. The Unspecific Side of Acquired Immunity Against Infectious Disease: Causes and Consequences. Front. Microbiol. 6: 1–11.
Nolte, M. A., R. Arens, M. Kraus, M. H. J. van Oers, G. Kraal, R. A. W. van Lier, and R. E. Mebius. 2004. B Cells Are Crucial for Both Development and Maintenance of the Splenic Marginal Zone. J. Immunol. 172: 3620–3627.
Oetke, C., G. Kraal, and P. R. Crocker. 2006. The antigen recognized by MOMA-I is sialoadhesin. Immunol. Lett. 106: 96–8.
Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V Tsianos. 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 6: 91–99.
Ravishankar, B., R. Shinde, H. Liu, K. Chaudhary, J. Bradley, H. P. Lemos, P. Chandler, M. Tanaka, D. H. Munn, A. L. Mellor, and T. L. McGaha. 2014. Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. 111: 4215–4220.
Rosche, K. L., A. T. Aljasham, J. N. Kipfer, B. T. Piatkowski, and V. Konjufca. 2015. Infection with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Leads to Increased Proportions of F4/80+ Red Pulp Macrophages and Decreased Proportions of B and T Lymphocytes in the Spleen. PLoS One 10: e0130092.
Salcedo, S., M. Noursadeghi, J. Cohen, and D. Holden. 2001. Intracellular replication of *Salmonella* typhimurium strain in specific subsets of splenis macrophages in vivo. Cell. Microbiol. 3: 587–597.
Scandella, E., B. Bolinger, E. Lattmann, S. Miller, S. Favre, D. R. Littman, D. Finke, S. a Luther, T. Junt, and B. Ludewig. 2008. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. Nat. Immunol. 9: 667–675.

Seiler, P., P. Aichele, B. Odermatt, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and R. a Schwendener. 1997. Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophils in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. Eur. J. Immunol. 27: 2626–33.

Valdivia, R. H., a E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan, and S. Falkow. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. Gene 173: 47–52.

van der Laan, L. J., E. a Döpp, R. Haworth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C. D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason, and G. Kraal. 1999. Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. J. Immunol. 162: 939–947.

Van Rooijen, N., N. Kors, and G. Kraal. 1989. Macrophage Subset Repopulation in the Spleen: Differential Kinetics After Liposome-Mediated Elimination. J. Leukoc. Biol. 45: 97–104.

Vitry, M.-A., C. De Trez, S. Goriely, L. Dumoutier, S. Akira, B. Ryffel, Y. Carlier, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2012. Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. Infect. Immun. 80: 4271–80.

Vitry, M.-A., D. Hanot Mambres, C. De Trez, S. Akira, B. Ryffel, J.-J. Letesson, and E. Muraille. 2014. Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*. J. Immunol. 192: 3740–52.

VIII. Discussion et perspectives

5. Rappel de la problématique

Le plus souvent, la capacité d'un individu en condition naturelle à contrôler une infection est largement imprédictible. Identifier les paramètres qui influencent le statut immunitaire de l'hôte, et donc sa capacité à résister à une infection, constitue un véritable challenge et permettrait de prédire les capacités de l'hôte à contrôler l'infection et de ce fait d'améliorer le suivi médical des individus à risque ainsi que de mieux contrôler la dissémination d'une épidémie au sein d'une population.

Dans la littérature, de nombreux paramètres sont décrits pour moduler le statut immunologique de l'hôte et sa capacité à contrôler une infection. L'impact de différents facteurs environnementaux (co-infection, médicament, tabac) et liés à l'hôte (fond génétique, régime alimentaire) sont aujourd'hui bien documentés. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la capacité des infections par *Trypanosoma* et de l'asthme allergique à moduler la capacité de l'hôte à contrôler une infection par la bactérie *Brucella*. Il s'agit d'une stratégie sans *a priori*, aucune donnée sur ces pathologies croisées n'étant disponible dans la littérature. Néanmoins, cette approche expérimentale se veut réaliste puisque l'état immunologique naturel d'un individu est l'infection. Contrairement aux modèles infectieux expérimentaux classiques où le statut immunitaire des animaux est considéré comme naïf, nous sommes en condition naturelle tous sous l'influence de pathologies immunitaires et/ou d'infections latentes.

Brucella est une bactérie intracellulaire facultative responsable de la brucellose, une zoonose mondiale avec 500.000 nouveaux cas humains diagnostiqués chaque année. *Brucella* constitue un excellent modèle pour étudier l'impact d'une pathologie croisée sur le contrôle d'une infection bactérienne.

- La brucellose est une infection chronique. En l'absence de traitement, la bactérie va persister tout au long de la vie de l'hôte infecté. Les chances pour qu'un individu infecté par *Brucella* contracte une seconde infection ou développe une pathologie immunitaire sont donc élevées.

- La brucellose se caractérise par une grosse variabilité des symptômes et des complications laissant suggérer que de nombreux paramètres (comme une co-infection) pourraient en influencer le développement.
- Il n'existe pas de traitement ou de vaccin pleinement efficace. Notre étude pourrait donc mettre en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans la résistance ou la susceptibilité face aux agents pathogènes et donc d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Notre groupe a développé un modèle « quasi » physiologique d'infection par *Brucella* chez la souris. Les animaux sont infectés par voie intra-nasale avec $2x10^4$ CFU de l'espèce *B. melitensis*, la plus souvent isolée chez l'homme. La cinétique d'infection de la bactérie et la réponse immunitaire protectrice chez la souris sont analysées en détail dans ce modèle. L'infection intra-nasale se caractérise par la persistance de la bactérie dans le poumon jusqu'à 12 jours, une colonisation de la rate et le foie à partir de 5 jours et par une persistance de la bactérie dans la rate à très long terme (plus de 50 jours). La réponse protectrice tardive dans le poumon et la rate est principalement dépendante de la production d'IFN-γ par les lymphocytes T $CD4^+$ (réponse de type Th1). Une réponse immunitaire dépendante des cellules T gd^+, cellules T $CD8^+$ et de l'IL-17RA est impliquée dans le contrôle pulmonaire précoce de l'infection (Hanot Mambres *et al.*, 2016).

Durant ces quatre années de thèse, nous avons tenté de déstabiliser cette réponse protectrice en utilisant deux modèles de pathologies inflammatoires forts (l'asthme et l'infection par *T. brucei,* caractérisé par une réponse Th2 (dominée par l'IL-4) et Th1 (dominée par l'IFN-γ), respectivement) afin d'étudier l'impact de ces deux pathologies croisées sur les capacités de la souris à contrôler l'infection intra-nasale par *B. melitensis*.

6. L'asthme exacerbe l'infection par *Brucella*

Nos études ont démontré que la sensibilisation asthmatique induite par injection intra-nasale d'extrait d'acariens ou de moisissure augmentait considérablement la multiplication et la persistance de *Brucella* dans les poumons mais pas dans les autres organes étudiés (rate et foie). Notons que les modèles d'asthme utilisés ne dégradent pas l'état clinique des souris. Les animaux ne présentent aucun signe de détresse respiratoire ou de faiblesse physique tout

au long des expériences réalisées. Les résultats obtenus dans ce modèle sont remarquables, les niveaux de CFU atteints dans les poumons étant supérieur à ce que l'on observe chez les souris génétiquement déficientes décrites aujourd'hui comme les plus susceptibles à l'infection par *Brucella* (par exemple les souris IFN-γR déficientes). Ce qui suggère que l'asthme fait plus qu'inhiber la réponse immune contre *Brucella*, il crée des conditions favorisant sa croissance qui n'existe sans doute pas dans une souris contrôle. Notons de plus que, malgré les niveaux de CFU très élevés obtenus, les souris ne présentent aucune mortalité alors que les souris IFN-$\gamma R^{-/-}$ ne survivent qu'une vingtaine de jours après l'infection, principalement suite aux dégâts tissulaires induits par une hyper-neutrophilie (Hanot Mambres *et al.,* 2016). Nous avons également observé que l'asthme augmentait également la susceptibilité d'autres espèces du genre *Brucella* pathogènes pour l'homme (*B. suis* et *B. abortus*).

Nous avons aussi observé que la susceptibilité à l'infection par *Brucella* induite par l'asthme était majoritairement dépendante de la réponse Th2. Les souris déficientes pour l'IL-4 et STAT-6 ne présentent pas d'augmentation de la charge bactérienne malgré les instillations allergiques. Ces données nous permettent de rediscuter le rôle de la réponse Th2 dans le contrôle de l'infection par *Brucella*. Les souris déficientes pour l'IL-4 ou STAT-6 infectées par *Brucella* ne présentent aucune différence de susceptibilité par rapport aux souris wild-type, suggérant que l'absence de réponse Th2 ne modifie pas le contrôle de l'infection (Vitry *et al.,* 2012). Par contre, induire une réponse inflammatoire Th2 par un protocole de sensibilisation asthmatique réduit considérablement les capacités de l'hôte à contrôler l'infection. Une réponse Th2 chronique peut donc bien influencer le contrôle de la l'infection par *Brucella*.

Nous avons observé que l'asthme inhibe les mécanismes effecteurs de la réponse protectrice contre *Brucella* de manière IL-10 dépendante. Les souris déficientes pour cette cytokine présentent une susceptibilité liée à l'asthme très inférieure aux souris wild-type. Nous avons identifié par cytométrie de flux les cellules productrices d'IL-10 dans les souris asthmatiques. Les lymphocytes T $CD4^{+}$ seraient l'une des principales populations productrices d'IL-10.

Dans notre modèle d'infection pulmonaire, nous avons observé que la majorité des cellules infectées par *Brucella* dans les poumons étaient des macrophages alvéolaires (Hanot Mambres *et al.*, 2016). Nous nous sommes donc demandé si dans notre modèle de pathologie

croisée le phénotype des cellules infectées était modifié. Les premières observations réalisées en microscopie sur coupe de tissu pulmonaire révèlent que le phénotype des cellules infectées par *Brucella* dans les poumons des souris asthmatiques est hétérogène. Certaines cellules sont positives pour GR1 (marqueur de neutrophile) et d'autres pour MHCII, CD11c et F4/80 marqueurs de macrophages alvéolaires). Les cellules présentant le plus grand nombre de bactéries sont de larges cellules $CD11c^+$ et $F4/80^+$, leur morphologie et ces marqueurs nous laisse penser qu'il pourrait s'agir de macrophages alvéolaires. La réponse Th2 (IL-4/STAT-6 dépendante) est décrite pour moduler le métabolisme des macrophages et orienter leur polarisation vers un phénotype M2 caractérisé par une expression élevée d'arginase 1 (reviewed in Muraille *et al.,* 2014). Il s'agit d'un marqueur de macrophages M2 qui entre en compétition avec l'enzyme iNOS impliquée dans la production de NO (reviewed in Muraille *et al.,* 2014) et le contrôle de *Brucella* (Copin *et al.,* 2011). Des études *in vitro* ont montré que la croissance de *Brucella* était accrue dans les macrophages M2 par comparaison aux macrophages M1 (Xavier *et al.,* 2013). Nous avons observé que l'asthme augmentait l'activité de l'enzyme arginase dans les poumons. Notre analyse en cytométrie de flux des cellules pulmonaires d'animaux asthmatiques montre que les principales cellules productrices d'arginase 1 dans les poumons de souris asthmatique sont les éosinophiles ($CD11c^-$ $SIGLEC\text{-}F^+$). Cela suggère que l'augmentation de l'activité arginase dans les poumons est associée au recrutement d'éosinophiles et pas à la polarisation des macrophages. La neutralisation de l'IL-5 (impliquée dans le recrutement des éosinophiles) et de l'arginase n'influence pas l'impact de l'asthme sur la charge bactérienne. Ces résultats démontrent que l'asthme augmente la susceptibilité à l'infection par *Brucella* par des mécanismes indépendants de la polarisation des macrophages vers un profil M2 et du recrutement des éosinophiles.

Nous avons ensuite investigué l'impact de notre modèle d'asthme sur les capacités de la souris à controler l'infection par *S. pneumoniae*. De manière surprenante, les résultats montrent que l'asthme entraine une résistance des souris à l'infection. Cela montre que la même forme d'asthme peut en fonction de l'agent pathogène être favorable ou défavorable à son contrôle par l'hôte. De plus les mécanismes impliqués sont différents. La susceptibilité induite par l'asthme lors de l'infection par *Brucella* est dépendante de la voie STAT-6 alors que la résistance à l'infection par *S. pneumoniae* est STAT-6 indépendante. Il est donc difficile de prédire le comportement d'un hôte asthmatique lorsqu'il contracte une infection. Nous envisageons aussi d'étudier l'impact de l'asthme sur une troisième infection pulmonaire, l'infection par *M. tuberculosis*. Une étude récente a montré qu'un environnement

Th2 induit par une infection helminthique favorisait la croissance de *M. tuberculosis* suggérant que la réaction asthmatique pourrait avoir un effet similaire (Potian *et al.*, 2011).

Les observations réalisées dans ce modèle nous offrent de nouvelles perspectives:
- À l'heure actuelle, aucun cas de transmission orale (par éternuement ou expectoration) de *Brucella* n'a été décrit. Lorsque l'on observe que l'asthme augmente la charge bactérienne pulmonaire et la persistance de la bactérie dans l'organe, il serait intéressant de savoir s'il ne pourrait pas être responsable d'une nouvelle source de transmission de la bactérie. On pourrait envisager d'ajouter des souris « sentinelles » dans une cage de souris asthmatiques infectées et après un certain délai de cohabitation, voir si une transmission s'est produite. Les quelques cas de transmission interhumaine décrits sont associés à une transmission sexuelle (Meltzer *et al.,* 2010). Avec nos observations il pourrait être intéressant d'investiguer cette voie comme source de transmission de la bactérie.
- Nos résultats nous ont aussi appris qu'après seulement 1 jour d'infection, l'asthme augmente d'un facteur 10 la charge bactérienne dans les poumons. Ces observations suggèrent que l'environnement Th2 pourrait favoriser/accélérer la multiplication de *Brucella* dans les premières heures d'infection. Il pourrait être intéressant d'investiguer le cycle cellulaire de la bactérie et son trafic intracellulaire.

En conclusion, ce modèle de pathologie croisée nous aura permis de démontrer que l'asthme est un facteur qui influence négativement le contrôle de l'infection par *Brucella*. Il induit une très importante susceptibilité à l'infection, jamais observée auparavant. Il est donc envisageable que les individus asthmatiques infectés, présentant un très haut niveau de bactéries dans le poumon, constituent dans la nature des super-disséminateurs, pouvant participer plus activement à la propagation d'une épidémie. Identifier les mécanismes impliqués dans cette susceptibilité accrue permettrait de prédire la manière dont l'hôte pourrait répondre lors d'une infection et d'envisager, par exemple, la mise en quarantaine du patient pour limiter son potentiel disséminateur.

7. La co-infection par *T. brucei* favorise l'élimination de *Brucella*

La co-infection de souris, préalablement infectées par *B. melitensis*, avec le protozoaire *T. brucei* améliore les capacités de la souris à éliminer l'infection bactérienne. Nos résultats

montrent que l'infection par *T. brucei* induit une forte réaction inflammatoire Th1 caractérisée par une importante fréquence de cellules T CD4$^+$ IFN-γ$^+$. La co-infection de souris déficientes pour l'IL-12 (nécessaire à la production d'IFNγ) n'entraine pas l'élimination de la bactérie, ce qui suggère que cette réponse Th1 est impliquée dans l'élimination de *Brucella*. Il est surprenant qu'une infection secondaire par *Brucella* induise l'activation d'une réponse de mémoire protectrice spécifique de *Brucella*, associée à une production accrue d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4$^+$, qui n'est pas capable d'éliminer la primo infection. Ceci suggère que l'infection par le trypanosome apporte un élément supplémentaire à la réponse Th1 qui permet l'élimination de *Brucella*.

Nos travaux précédents (Copin *et al.,* 2012; Hanot Mambres *et al.,* 2015) suggèrent que durant la phase chronique d'infection *Brucella* réside dans une niche cellulaire spécifique, peu accessible aux mécanismes effecteurs induits lors d'une infection secondaire par *Brucella*. L'infection par le trypanosome induirait une réponse capable de déstabiliser cette niche cellulaire et rendrait la bactérie accessible pour la réponse immunitaire. Par exemple, le trypanosome est très inflammatoire et induit une forte altération tissulaire qui pourrait perturber l'environnement des cellules réservoirs et les rendre plus « accessibles ». Il pourrait être intéressant d'investiguer par imagerie la micro-architecture des organes des souris co-infectées et la localisation de la bactérie.

Pour évaluer la spécificité de l'élimination de *B. melitensis* par *T. brucei*, nous avons répété notre expérience de co-infection avec une autre espèce de protozoaire, *T. cruzi*. Il s'agit d'un parasite complètement différent de *T. brucei* : *T. cruzi* est intracellulaire, ne présente pas d'antigènes en commun avec *T. brucei* et présente un cycle infectieux différent. Ces deux infections n'ont en commun que la forte réponse inflammatoire Th1 qu'elles induisent. Nous avons observé que la co-infection par *T. cruzi* améliore également l'élimination de la bactérie en induisant une forte production d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4$^+$. Ce résultat démontre que l'élimination bactérienne n'est pas dépendante d'une cross-réaction entre les antigènes de *Brucella* et ceux du parasite mais qu'il s'agit plutôt d'un effet non spécifique associé à la forte réponse Th1. Pour vérifier cette hypothèse il serait intéressant de transférer des lymphocytes T CD4$^+$ producteurs d'IFN-γ induit par l'infection avec *T. brucei* dans une souris uniquement infectée avec *Brucella* pour vérifier si les cellules Th1 seules peuvent améliorer le contrôle de *Brucella*.

L'IFN-γ est une cytokine clé de la réponse protectrice contre *Brucella*. Nous aimerions connaître les effecteurs induits par cette cytokine qui sont impliqués dans l'élimination de la bactérie. On sait par exemple que la réponse Th1 est associée à une augmentation de la production de TNF-α et de NO. Nous envisageons de tester notre modèle de co-infection dans des souris déficientes pour le récepteur au TNF-α ou pour l'enzyme iNOS. Nous envisageons aussi de répéter l'expérience dans des souris wild-type traitées quotidiennement avec un inhibiteur de l'iNOS pour évaluer son implication dans l'élimination de *Brucella* lors de la co-infection.

Durant cette étude, nous nous sommes principalement focalisés sur l'impact de la co-infection par *T. brucei* sur la charge bactérienne splénique. Il serait intéressant de savoir si l'observation est généralisable à tous les organes de la souris. Certaines données montrent que *Brucella* persiste dans d'autres organes que la rate comme le système reproducteur, les articulations et la base de la queue chez la souris lors d'une infection intra-péritonéale (Rajashekara *et al.,* 2005). Lors de l'infection intra-nasale, des observations préliminaires montrent que les organes infectés sont beaucoup moins nombreux que dans un modèle d'infection systémique par voie intra-péritonéale. Après infection intra-nasale chez la souris, *Brucella* n'est détectée que dans les poumons, le ganglion lymphatique drainant ces derniers, le foie, et la rate. De plus la bactérie ne persiste à long terme que dans la rate et le ganglion lymphatique. Il serait donc intéressant d'étudier en cinétique l'impact de l'infection par *T. brucei* sur la charge bactérienne de ces différents organes.

Nous avons aussi observé que l'infection par *T. brucei* diminuait aussi la charge bactérienne lors de l'infection par *B. abortus* et *B. suis*. Nous n'observons pas d'éradication dans ces souris-là peut-être parce que le niveau de bactérie est plus élevé dans la rate des souris infectées avec *B. abortus* et *B. suis* par comparaison avec *B. melitensis*. Dans le but de déterminer si *T. brucei* pouvait affecter d'autres bactéries intracellulaires que *Brucella,* nous avons évalué l'impact de l'infection par *T. brucei* sur la capacité de la souris à contrôler l'infection par *M. tuberculosis*. Dans ce modèle, le « boost » de Th1 n'améliore absolument pas les capacités de la souris à éliminer les mycobactéries. Ce résultat confirme les travaux (Sakai *et al.,* 2016) suggérant que l'IFN-γ seul n'est pas suffisant pour lutter contre la tuberculose.

Ce deuxième modèle de pathologie croisée aura permis, par opposition au premier, de mettre en évidence des effets bénéfiques d'une co-infection induisant une réponse Th1 sur le contrôle de *Brucella*. L'infection avec *T. brucei* est généralement associée à une réponse immunosuppresive forte. Dans notre cas, nous montrons qu'elle peut aussi être bénéfique pour la réponse immunitaire. Il est intéressant de noter qu'avec *T. brucei* nous parvenons à atteindre des niveaux de CFU plus faible que dans les souris IL-$10^{-/-}$ hautement résistantes à l'infection (Xavier *et al.,* 2013). Identifier clairement les mécanismes impliqués dans le contrôle de la pathologie permettrait de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

8. Relevance des deux modèles étudiés

Une question redondante au cours de notre travail portait sur la relevance de nos modèles expérimentaux de cross-pathologie dans la nature. Existe-t-il des animaux et des hommes qui peuvent être infectés par *Brucella* et souffrir d'asthme ou de trypanosomiase africaine. Avant de discuter ce point, il est important de noter que nous avons avant tout sélectionné ces deux pathologies comme des outils induisant une inflammation forte Th1 ou Th2 et sur base de la disponibilité de collaborateurs disposant de l'expertise sur ces modèles. L'idée initiale était d'utiliser des modèles bien établis d'inflammation forte pour déstabiliser le statut immunitaire de la souris et étudier ses capacités à contrôler une infection bactérienne chronique. La brucellose est une zoonose mondiale. Le nombre d'hommes infectés est extrêmement important (500.000 nouveaux cas par année (Pappas *et al.,* 2006) et sans doute supérieur à ce qui est signalé). Chez l'homme la variabilité des symptômes et le manque de diagnostic rendent l'incidence de la pathologie difficilement mesurable. Nous n'avons que peu d'information sur la fréquence d'animaux infectés dans la faune sauvage. La brucellose est donc une pathologie très répandue chez l'homme et l'animal, ce qui maximise les chances de trouver des hôtes infectés par *Brucella* et atteints d'une pathologie croisée.

L'asthme allergique est une pathologie mondiale dont l'incidence est en constante augmentation. La **Figure 15A** montre une superposition des cas de brucellose et d'asthme chez l'homme. Sur la surface terrestre, on peut observer que la majorité des pays présentant des cas de brucellose présentent aussi des cas d'asthme. Ces observations suggèrent que des cas de pathologie croisée entre l'asthme et la brucellose peuvent exister chez l'homme. Avec

l'incidence croissante de l'asthme, ils risquent même de se faire de plus en plus nombreux. Chez l'animal, on peut noter que l'asthme est une maladie émergente chez les animaux domestiques et d'élevage (Kirschvink, 2008). Ce modèle de pathologie croisée peut donc également présenter une certaine relevance dans la nature.

Si l'on s'attarde sur les répartitions de la brucellose et la trypanosomiase africaine (**Figure 15,B**), on observe que les pays largement touchés par le protozoaire sont négatifs pour la brucellose. Ce qui pourrait être expliqué par nos résultats qui montrent que l'infection par *T. brucei* réduit fortement *Brucella*. Mais cette observation est discutable. La prévalence de la brucellose dans les régions touchées par la trypanosomiase est probablement diminuée parce qu'il s'agit de régions qui vivent beaucoup moins de l'élevage puisqu'il y a des risques accrus d'infection avec le trypanosome. Là où il y a la trypanosomiase, il y a peu d'élevage et donc peu de brucellose. Si l'élimination de *Brucella* est associée à la sur-infection avec différentes espèces de protozoaires cela maximise les chances d'être co-infecté. Les protozoaires sont présents dans toutes les régions du monde. Chez les bovins il existe aussi des espèces de protozoaires qui infectent les animaux de manière asymptomatique. Les cas de co-infection avec *Brucella* et un protozoaire sont donc élevés.

En résumé, nous avons avant tout utilisé l'asthme et l'infection avec *T. brucei* comme modèles expérimentaux d'induction d'une inflammation Th1 ou Th2 forte. La relevance naturelle des deux modèles de pathologies croisées reste discutable mais il est vraisemblable que des situations proches doivent exister dans la nature. Des études épidémiologiques permettraient de répondre à ces questions et aussi de déterminer s'il est envisageable que l'asthme et l'infection avec *T. brucei* induisent bien, respectivement, une susceptibilité ou une résistance à l'infection par *Brucella*.

Dans les deux modèles de co-pathologies développés dans ce travail, il est intéressant de discuter le choix des cinétiques d'infections utilisées. Dans le modèle de co-infection nous avons d'abord infectée avec *T. brucei* avant *Brucella* alors que nous avons d'abord induit l'asthme avant d'infecter avec *Brucella*. Le modèle d'infection avec *T. Brucei* induit la mort de la souris à partir de 35 jours d'infection. Si nous avions choisi de d'abord infecter les animaux avec le parasite, la fenêtre de temps disponible pour étudier les capacités de la souris à contrôler l'infection bactérienne était faible. De plus, dans le modèle d'infection intra-nasale, les bactéries ne sont détectées dans la rate qu'à partir de 6 jours. Dans notre modèle

court d'étude (7 jours infection IN avant l'infection IP avec *T. brucei*), les deux pathogènes arrivent quasi simultanément dans la rate, l'organe étudié dans ce modèle. C'est pour cette raison que nous avons d'abord choisi de l'étudier dans ce sens là.

En ce qui concerne l'étude de l'impact de l'asthme sur les capacités de la souris à contrôler *Brucella*, la plupart des modèles décrits dans la littérature ont visé à d'abord infecter les souris avec l'agent pathogène afin d'étudier sont influence sur le développement de l'asthme. Dans notre cas, nous avons préféré d'abord induire l'asthme et étudier son impact sur le contrôle de la brucellose. Statistiquement on a plus de chance de développer de l'asthme avant d'être infecté par *Brucella*. De plus, la prévalence croissante de l'asthme suggère qu'il est essentiel de pouvoir prédire le comportement de l'hôte asthmatique lorsqu'il contracte une infection. Après l'infection, nous continuons de sensibiliser les souris avec les allergènes. On a pu observer que cela augmentait l'effet sur la charge bactérienne. De plus cela mime davantage un asthme chronique, plus représentatif de la réalité chez l'humain.

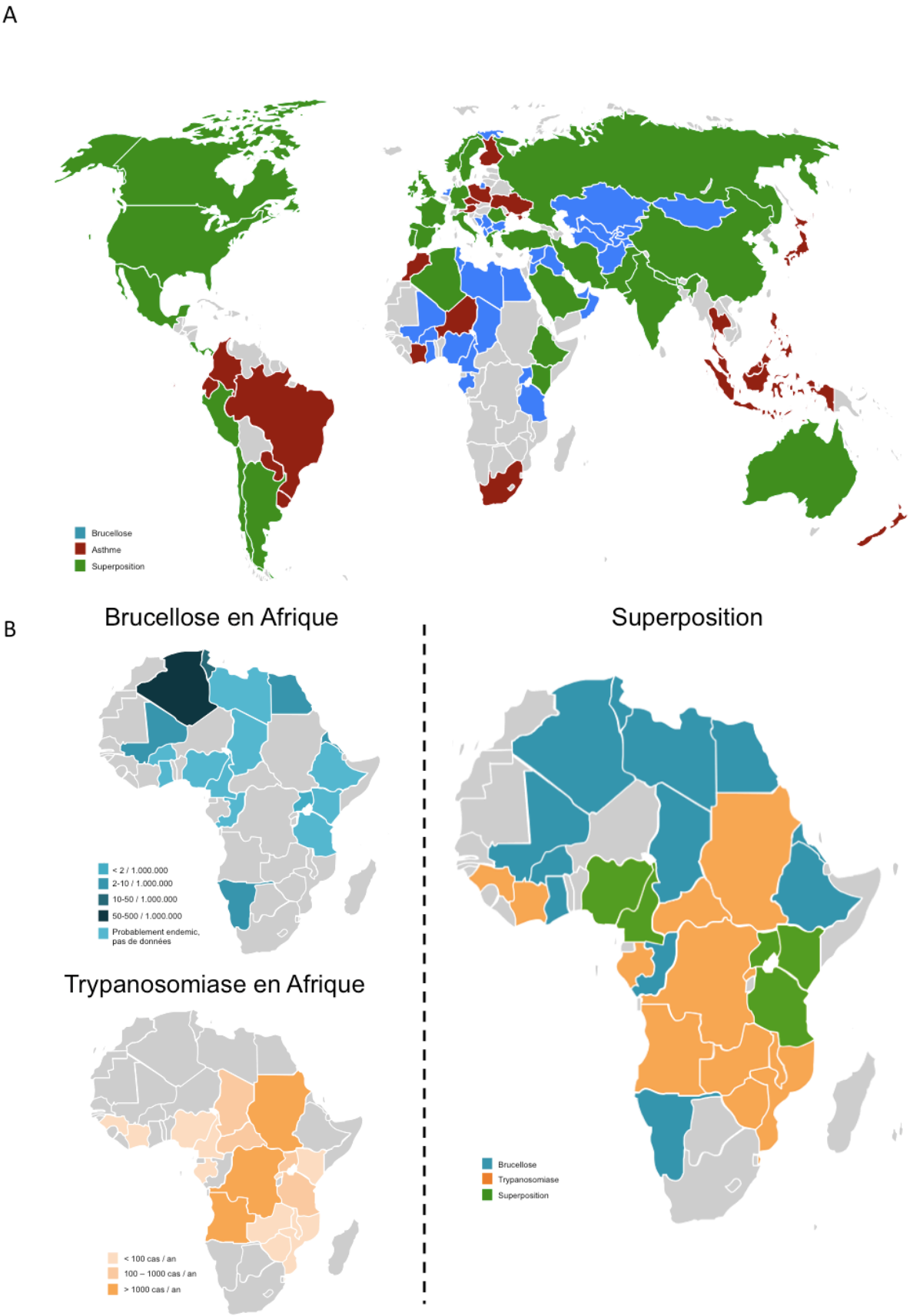


Figure 15 : Superposition de l'incidence de la brucellose avec l'asthme (A) et la trypanosomiase africaine (B).

9. La brucellose altère aussi le statut immunologique de l'hôte

L'asthme et l'infection par *T. brucei* sont deux pathologies qui modulent les capacités de l'hôte à faire face à une infection. Il s'agit de deux pathologies qui induisent des réponses immunitaires très fortes. Il est légitime de se demander si des pathologies moins inflammatoires, causées par des agents pathogènes furtifs, pourraient aussi modifier le statut immunologique de l'hôte. *Brucella* a la particularité d'être peu inflammatoire et de déclencher une réponse immunitaire de faible intensité. La furtivité de la bactérie repose sur le fait qu'elle limite l'expression ou la structure de certains PAMPs pour diminuer sa détection par les PRRs et diminuer l'activation de la réponse immunitaire. En plus de modifier la structure de ses PAMPs, *Brucella* a développé d'autres stratégies pour inhiber le développement de la réponse immunitaire lorsqu'elle est rentrée dans la cellule hôte. Par exemple, des protéines de *B. abortus* (*Brucella Tir-containing protein* (Btp1 et Btp2)) présentent des homologies de séquence avec les récepteurs de la famille des domaines *Toll/Interleukin receptors* (TIR) et vont interférer avec les voies de signalisation des TLR 2 et 4. Cela aura pour conséquence une diminution de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques infectées se traduisant par une diminution de l'expression des marqueurs d'activation et de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-12 (Cirl *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2008).

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons investigué l'impact de l'infection par *B. melitensis* sur les fonctions spléniques. Nos travaux ont montré que l'infection entraine un recrutement des cellules immunitaires dans la rate et une relocalisation des lymphocytes T vers la pulpe rouge. De manière intéressante, nous avons aussi observé que l'infection induisait une chute drastique des deux populations de macrophages spécialisées (les macrophages metallophiliques et les macrophages de la zone marginale) présents dans la zone marginale entourant la pulpe blanche. La fonction de cette zone marginale est d'assurer la filtration du sang en captant les particules étrangères. Nous avons montré que l'infection par *Brucella* réduisait la capture d'antigènes (dextran-FITC), de particules fluorescentes et de bactéries (*Salmonella*-GFP). Cela suggère que l'infection bactérienne pourrait altérer les capacités de la rate à détecter et/ou contrôler une infection par un autre agent pathogène. Nous envisageons de vérifier cette hypothèse en évaluant l'impact de l'infection par *Brucella* sur la charge bactérienne (par comptage CFU) de *Salmonella* afin de vérifier si l'altération de la zone marginale peut être associée à une diminution de la rétention splénique d'un agent

infectieux. Cette partie de notre travail a permis de mettre en évidence que même les infections peu inflammatoires pourraient altérer la capacité du système immunitaire à contrôler l'infection par un autre agent pathogène.

10. En guise de conclusion

Les modèles expérimentaux développés durant ma thèse soulignent l'importance de prendre en compte l'impact des pathologies croisées sur les capacités de l'hôte à contrôler une infection. L'asthme et la trypanosomiase africaine modulent considérablement le contrôle de la brucellose chez la souris. Connaître les facteurs qui pourraient influencer le contrôle d'une infection permettrait de prédire au niveau individuel le développement de la pathologie. Chez l'hôte, le développement d'une infection va dépendre des éléments qui l'entourent. Il est important de connaître ces paramètres pour mieux comprendre la pathologie et faciliter le contrôle des épidémies. Par exemple, identifier les individus hyper-susceptibles à une infection (phénotype de super-disséminateur) permettrait de contenir la propagation de l'épidémie en limitant leur contact avec la population. D'autre part, connaître les éléments favorisant l'élimination de l'agent pathogène permettrait de développer de nouvelles thérapies pour faciliter l'élimination du micro-organisme. En plus des pathologies croisées, il serait intéressant d'investiguer l'impact d'autres facteurs sur les capacités d'un individu à contrôler une infection comme la brucellose. Par exemple, il serait intéressant d'étudier le rôle du système nerveux et plus particulièrement des cellules PNECS (*pulmonary neuroendocrin cells*) sur les capacités de la souris à contrôler l'infection par *Brucella*. Certaines souris déficientes présentent une diminution du nombre de ces cellules induisant une modification de l'homéostasie cellulaire du poumon qui se caractérise par une diminution du nombre de macrophages et une augmentation du nombre de neutrophiles et d'éosinophiles (reviewed in Bordon, 2016). On pourrait aussi s'intéresser à l'impact du régime alimentaire sur le contrôle de la brucellose chez la souris. De nombreux modèles montrent qu'une alimentation riche en graisse module le contrôle des infections par l'hôte. Par exemple, un régime alimentaire riche en graisse induit un recrutement de neutrophiles dans les poumons qui rend les souris plus susceptible à l'infection par *Influenza* (Moorthy *et al.,* 2016).

IX. Bibliographie personnelle

1. Publications comme premier ou co-premier auteur

Hanot Mambres D, **Machelart A**, Potemberg G, De Trez C, Ryffel B, Letesson JJ, Muraille E. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. *J Immunol*. 196(9) :3780-93. **2016**.

Machelart A, Khadrawi A, Willemart K, Demars A, De Trez C, Letesson JJ, Muraille E. Chronic low-grade Th1 inflammation generated by *Brucella* infection induces selective alterations of marginal zone macrophages in spleen. *Submit in J Immunol*.

Machelart A, Potemberg G, Van Maele L, Lagneaux M, De Trez C, Sabatel C, Bureau F, De Prins S, Lehebel P, Denis O, Jurion F, Romano M, Letesson JJ, Muraille E. Allergic asthma affect bacterial growth and persistence in lung via multiples pathways. *En preparation*.

Machelart A, Van Vyve M, Potemberg G, Demars A, De Trez C, Tima HG, Vanwallegem G, Romano M, Truyens C, Letesson JJ, Muraille E. *Trypanosoma* infection favor *Brucella* elimination via IL-12/IFNγ dependent pathways. *En preparation*.

2. Associations à d'autres publications

Hanot Mambres D, **Machelart A**, Vanderwinden JM, De Trez C, Ryffel B, Letesson JJ, Muraille E. In Situ Characterization of Splenic *Brucella melitensis* Reservoir Cells during the Chronic Phase of Infection in Susceptible Mice. *PLoS One*. 10(9) :e0137835. **2015**.

Vitry MA, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, **Machelart A**, Lhomme F, Vanderwinden JM, Vermeersch M, De Trez C, Pérez-Morga D, Letesson JJ, Muraille E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect Immun*. 82(9) :3927-38. **2014**.

Copin R, Vitry MA, Hanot Mambres D, **Machelart A**, De Trez C, Vanderwinden JM, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog*. 8(3) :e1002575. **2012**.

Barbier T, **Machelart A**, Zuniga-Ripa A, Plovier H, Hougardy C, Lobet E, Willemart K, Muraille E, De Bolle X, Van Schaftingen E, Moriyon I, Letesson JJ. Erythritol availability in bovine, murine and human models highlights a potential role for the host aldose reductase during *Brucella* infection. *En preparation*.

…

X. Références

Aaby, P., Ravn, H., Roth, A., Rodrigues, A., Lisse, I. M., Diness, B. R., … Benn, C. S. (2012). Early diphtheria-tetanus-pertussis vaccination associated with higher female mortality and no difference in male mortality in a cohort of low birthweight children: an observational study within a randomised trial. *Archives of Disease in Childhood*, *97*(8), 685–91. http://doi.org/10.1136/archdischild-2011-300646

Abou El Azm, A. R., Abou-Ali, L., Kobtan, A. R., Mansour, N., & Tawfik, S. (2013). Can brucellosis influence the course of chronic hepatitis C in dual infection? *Archives of Virology*, *158*(3), 543–547. http://doi.org/10.1007/s00705-012-1524-3

Actor, J. K., Marshall, M. A., Eltoum, I. A., Buller, R. M. L., Berzofsky, J. A., & Sher, A. (1994). Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: Association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur.J.Immunol.*, *24*, 3050–3056.

Actor, J. K., Shirai, M., Kullberg, M. C., Buller, R. M., Sher, A., & Berzofsky, J. A. (1993). Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc Natl Acad Sci USA*, *90*(3), 948–52. http://doi.org/10.1073/pnas.90.3.948

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R. a, Kaufmann, S. H. E., & Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *171*(3), 1148–1155. http://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1148

Akimoto, T., Numata, F., Tamura, M., Takata, Y., Higashida, N., Takashi, T., … Akira, S. (1998). Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *187*(9), 1537–1542. http://doi.org/10.1084/jem.187.9.1537

Alhaji, N. B., & Kabir, J. (2015). Influence of Pastoralists ' Sociocultural Activities on Tsetse – Trypanosome – Cattle Reservoir Interface : The Risk of Human African Trypanosomiasis in North-Central Nigeria, *234*(0), 1–10. http://doi.org/10.1111/zph.12226

Anandan, C., Nurmatov, U., Schayck, O. C. P. Van, & Sheikh, A. (2010). Is the prevalence of asthma declining ? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy*, *65*, 152–167. http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02244.x

Anastasio, R. D., Zipfel, B., Moggi-cecchi, J., Stanyon, R., & Capasso, L. (2009). Possible Brucellosis in an Early Hominin Skeleton from Sterkfontein , South Africa, *4*(7). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006439

Anderson, T. D. (1986). Ultrastructural Morphometric *Brucella* Experimental Placentitis Bacterial Replication Occurs in Rough Endoplasmic Reticulum, 226–237.

Aoshi, T., Carrero, J. A., Konjufca, V., Koide, Y., Unanue, E. R., & Miller, M. J. (2009). The cellular niche of *Listeria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *European Journal of Immunology*, *39*(2), 417–425. http://doi.org/10.1002/eji.200838718

Aparicio, D. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev Sci Tech*, *43*, 53–60.

Apiwattanakul, N., Thomas, P. G., Kuhn, R. E., Herbert, D. B. R., & McCullers, J. A. (2014). Helminth infections predispose mice to pneumococcal pneumonia but not to other pneumonic pathogens. *Medical Microbiology and Immunology*, *203*(5), 357–364. http://doi.org/10.1007/s00430-014-0344-3

Archambaud, C., Salcedo, S. P., Lelouard, H., Devilard, E., De Bovis, B., Van Rooijen, N., … Malissen, B. (2010). Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling

initial pulmonary *Brucella* infection. *European Journal of Immunology*, *40*(12), 3458–3471. http://doi.org/10.1002/eji.201040497

Arnold, I. C., Dehzad, N., Reuter, S., Martin, H., Becher, B., Taube, C., & M\"uller, a. (2011). *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest*, *121*(8), 3088–3093. http://doi.org/10.1172/JCI45041DS1

Arora, S., Hernandez, Y., Erb-downward, J. R., Mcdonald, R. A., Toews, G. B., Gary, B., … Huffnagle, G. B. (2016). Role of IFN- γ in Regulating T2 Immunity and the Development of Alternatively Activated Macrophages during Allergic Bronchopulmonary Mycosis. http://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6346

Atluri, V. L., Xavier, M. N., Jong, M. F. De, & Hartigh, A. B. Den. (2011). Interactions of the Human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. http://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905

Ato, M., Nakano, H., Kakiuchi, T., & Kaye, P. M. (2004). Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(8), 4815–4820. http://doi.org/173/8/4815 [pii]

Atochina, O., & Harn, D. (2006). Prevention of psoriasis-like lesions development in fsn/fsn mice by helminth glycans. *Experimental Dermatology*, *15*(6), 461–468. http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00431.x

Attanavanich, K., & Kearney, J. F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(2), 803–811. http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.803

Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.-M., & Scholz, H. C. (2009). *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*, *10*, 352. http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-352

Backer, R., Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jüngerkes, F., Tüting, T., … den Haan, J. M. M. (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(1), 216–221. http://doi.org/10.1073/pnas.0909541107

Bai, H., Cheng, J., Gao, X., Joyee, A. G., Fan, Y., Wang, S., … Yang, X. (2009). IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(9), 5886–95. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0901584

Baldi, P. C., & Giambartolomei, G. H. (2013). Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, *8*(1), 18–26. http://doi.org/10.2174/157489113805290737

Baldwin, C. L., & Parent, M. (2002). Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: What the mouse model has revealed about control of infection. *Veterinary Microbiology*, *90*(1-4), 367–382. http://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00222-5

Barquero-Calvo, E., Martirosyan, A., Ordoñez-Rueda, D., Arce-Gorvel, V., Alfaro-Alarcón, A., Lepidi, H., … Moreno, E. (2013). Neutrophils Exert a Suppressive Effect on Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathogens*, *9*(2). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003167

Barrett, N. A., & Austen, K. F. (2009). Review Innate Cells and T Helper 2 Cell Immunity in Airway Inflammation. *Immunity*, *31*(3), 425–437. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.014

Barrionuevo, P., Delpino, M. V., Pozner, R. G., Velásquez, L. N., Cassataro, J., & Giambartolomei, G. H. (2013). *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+ T cell responses. *Cellular Microbiology*, *15*(4), 487–502. http://doi.org/10.1111/cmi.12058

Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., … Virgin, H. W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, *447*(7142), 326–329. http://doi.org/10.1038/nature05762

Benedict, C. A., De Trez, C., Schneider, K., Ha, S., Patterson, G., & Ware, C. F. (2006). Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. *PLoS Pathogens*, *2*(3), 0164–0174. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020016

Bertotto, Gerli, Spinozzi, Muscat, Scalise, Castellucci, … Vaccaro. (1993). Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol*, *23*, 1177–80.

Beschin, a, Brys, L., Magez, S., Radwanska, M., & De Baetselier, P. (1998). *Trypanosoma brucei* infection elicits nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent suppressive mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, *63*(4), 429–39.

Bessoles, S., Dudal, S., Besra, G. S., Sanchez, F., & Lafont, V. (2009). Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *European Journal of Immunology*, *39*(4), 1025–1035. http://doi.org/10.1002/eji.200838929

Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., … Xi, Z. (2013). *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi*. *Science*, *340*(May), 748–751. http://doi.org/10.1126/science.1236192

Billard, E., Cazevieille, C., Dornand, J., & Gross, A. (2005). High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *Brucella abortus*, and *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*, *73*(12), 8418–8424. http://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8418

Billard, E., Dornand, J., & Gross, A. (2008). VirB type IV secretory system does not contribute to *Brucella suis* ' avoidance of human dendritic cell maturation, *53*, 404–412. http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00441.x

Bishop, C. M., Simpson, A., Tan, V. Y. F., Winn, J., Svense, M., Heckerman, D. E., … Custovic, A. (n.d.). Beyond Atopy Multiple Patterns of Sensitization in Relation to Asthma in a Birth Cohort Study, (10). http://doi.org/10.1164/rccm.200907-1101OC

Blanden, B. Y. R. V, Lefford, M. J., & Mackaness, A. G. B. (1969). THE HOST RESPONSE TO CALMETTE-GUERIN BACILLUS INFECTION IN MICE * (From the Trudeau Institute , MedicaZ Research Laboratories , Saranac Lake , New York 12983) In the present studies , *Listerla monocytogenes* and *Salmonella lypkimuriura* have been used.

Blanden, R. V, Lefford, M. J., & Mackaness, G. B. (1969). The host response to Calmette-Guérin bacillus infection in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *129*(5), 1079–1107.

Bordon, Y. (2016). Mucosal immunology: Neuroendocrine cells regulate lung inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *16*(2), 76–77. http://doi.org/10.1038/nri.2016.7

Borges da Silva, H., Fonseca, R., Pereira, R. M., Cassado, A. dos A., Álvarez, J. M., & D'Império Lima, M. R. (2015). Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. *Frontiers in Immunology*, *6*(September), 1–9. http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00480

Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., Van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., … Gouvras, G. (2004). Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. *Euro Surveill*, *9*, 15–6.

Bronte, V., & Pittet, M. J. (2013). The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*, *39*(5), 806–818. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010

Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., & Burri, C. (2010). Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, *375*(9709), 148–159. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1

Buonomo, E. L., Cowardin, C. A., Wilson, M. G., Saleh, M. M., Pramoonjago, P., & Petri, W.

A. (2016). Microbiota-Regulated IL-25 Increases Eosinophil Number to Provide Protection during *Clostridium difficile* Infection. *Cell Reports*, *16*(2), 432–443. http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.007

Burnet, & White. (1972). Natural History of Infectious Diseases. *Cambridge Univ Press*, *4th Ed.*

Burton, Samuel, & Steven. (1976). Ultrastructural studies of the placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, *61*(275-86).

Bush, R. K., & Prochnau, J. J. (2004). Case study *Alternaria* -induced asthma, 227–234. http://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.11.023

Busse, W. W., & Rosenwasser, L. J. (2003). Mechanisms of asthma. http://doi.org/10.1067/mai.2003.158

Capasso, L. (1999). Bacteria in Two-millennia-old Cheese , and Related Epizoonoses in Roman Populations, 122–127. http://doi.org/10.1053/jinf.2002.0996

Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, *5*, 13. http://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13

Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., & Sacks, D. L. (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(2), 515–526.

Caruso, A. M., Serbina, N., Klein, E., Bloom, B. R., Flynn, J. L., Caruso, A. M., … Flynn, J. L. (1999). Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished Levels of IFN- γ , Yet Succumb to Tuberculosis. *Journal of Immunology*, *162*(9), 5407–5416.

Carvalho, L. J. M., Ferreira-da-Cruz, M. F., Daniel-Ribeiro, C. T., Pelajo-Machado, M., & Lenzi, H. L. (2007). Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice. *Malaria Journal*, *6*, 59. http://doi.org/10.1186/1475-2875-6-59

Cecchi, G., Paone, M., Herrero, R. A., Vreysen, M. J. B., & Mattioli, R. C. (2015). Developing a continental atlas of the distribution and trypanosomal infection of tsetse flies (Glossina species). http://doi.org/10.1186/s13071-015-0898-y

Cerf-Bensussan, & Gaboriau-Routhiau. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*, 735–44.

Chain, P. S. G., Comerci, D. J., Tolmasky, M. E., Larimer, F. W., Malfatti, S. a., Vergez, L. M., … Garcia, E. (2005). Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *brucellae*. *Infection and Immunity*, *73*(12), 8353–8361. http://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005

Chapman MD, Wünschmann S, P. A. (2007). Proteases as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep.*, *7*, 363–7.

Charbit, A., Gavrilin, M. A., Zughaier, S. M., Liu, Z.-F., Ahmed, W., & Zheng, K. (2016). Establishment of Chronic Infection: *Brucella*'s Stealth Strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, *6*(6), 303389–30. http://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00030

Charlie G. Buffie, & Pamer, E. G. (2013). Pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(11), 790–801. http://doi.org/10.1038/nri3535.Microbiota-mediated

Chase-Topping, M. E., McKendrick, I. J., Pearce, M. C., MacDonald, P., Matthews, L., Halliday, J., … Woolhouse, M. E. J. (2007). Risk factors for the presence of high-level shedders of *Escherichia coli* O157 on Scottish farms. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(5), 1594–1603. http://doi.org/10.1128/JCM.01690-06

Cheers. (1984). Pathogenesis and cellular immunity in experimental murine brucellosis. *Dev Biol Stand*, *237-46*.

Chen, & Elberg. (1970). Immunization against *Brucella* infections: immune response of mice, guinea pigs, and *Cynomolgus philipinensis* to live and killed *Brucella melitensis* strain Rev. I administered by various methods. *J Infec Dis*, *122*, 489–500.

Chiba, T., Marusawa, H., & Ushijima, T. (2012). Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology*, *143*(3), 550–563. http://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.009

Christensen, G. J. M., & Breggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, *5*(2), 201–215. http://doi.org/10.3920/BM2012.0062

Cirl, Wieser, Duerr, Schubert, Fischer, Stappert, … Miethke. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med*, *14*, 399–406.

Clement, C. G., Evans, S. E., Evans, C. M., Hawke, D., Kobayashi, R., Reynolds, P. R., … Tuvim, M. J. (2008). Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *177*(12), 1322–1330. http://doi.org/10.1164/rccm.200607-1038OC

Clement, C. G., Tuvim, M. J., Evans, C. M., Tuvin, D. M., Dickey, B. F., & Evans, S. E. (2009a). Allergic lung inflammation alters neither susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection nor inducibility of innate resistance in mice, *8*, 1–8. http://doi.org/10.1186/1465-9921-10-70

Clement, C. G., Tuvim, M. J., Evans, C. M., Tuvin, D. M., Dickey, B. F., & Evans, S. E. (2009b). Allergic lung inflammation alters neither susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection nor inducibility of innate resistance in mice. *Respiratory Research*, *10*, 70. http://doi.org/1465-9921-10-70 [pii] 10.1186/1465-9921-10-70

Clinical, T., & Journal, R. (2010). Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. http://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2009.00179.x

Colmenero, J. D., Reguera, J. M., Martos, F., Sánchez-De-Mora, D., Delgado, M., Causse, M., … Juárez, C. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases., 75 Medicine 195–211 (1996). http://doi.org/10.1097/00005792-199607000-00003

Cooke, a, Tonks, P., Jones, F. M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, a J., & Dunne, D. W. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology*, *21*(4), 169–176. http://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00213.x

Copin, R., Baetselier, P. De, Carlier, Y., Letesson, J., & Muraille, E. (2011). MyD88-Dependent Activation of B220 − CD11b + LY-6C + Dendritic Cells during *Brucella melitensis* Infection.

Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(8), 5182–5191. http://doi.org/178/8/5182 [pii]

Copin, R., Vitry, M. A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., de Trez, C., Vanderwinden, J. M., … Muraille, E. (2012). In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathogens*, *8*(3). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002575

Copin, R., Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J.-M., … Muraille, E. (2012). In Situ Microscopy Analysis Reveals Local Innate Immune Response Developed around *Brucella* Infected Cells in Resistant and Susceptible Mice. *PLoS Pathog*, *8*(3), e1002575. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002575

Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: An Overview. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(2), 213–221.

Corne, J. M., Marshall, C., Smith, S., Schreiber, J., Sanderson, G., & Holgate, S. T. (2002). Frequency , severity , and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals : a longitudinal cohort study, *359*, 831–834.

Corsetti, P. P., de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Azevedo, V., Silva, T. M. A., Teixeira, H. C., … Oliveira, S. C. (2013). Lack of Endogenous IL-10 Enhances Production of Proinflammatory Cytokines and Leads to *Brucella abortus* Clearance in Mice. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–11. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074729

Cosgrove, D., Gray, D., Dierich, A., Kaufman, J., Lemeur, M., Benoist, C., & Mathis, D. (1991). Mice lacking MHC class II molecules. *Cell*, *66*(5), 1051–1066. http://doi.org/0092-8674(91)90448-8 [pii]

Couper, K., Blount, D., & Riley, E. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*, *180*(9), 5771–5777. http://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771

Cunningham, D. S., Grogl, M., & Kuhn, R. E. (1980). Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, *30*(2), 496–499.

Current, T. H. E., & Bernstein, D. I. (n.d.). ABCs of Asthma, *8*(4).

Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., & Stewart, T. A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted Interferon-g genes. *Science*, *259*(March), 1739–1742.

Dasgupta, P., & Keegan, A. D. (2012). Contribution of Alternatively Activated Macrophages to Allergic Lung Inflammation : A Tale of Mice and Men, 478–488. http://doi.org/10.1159/000336025

Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2009). The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell*, *136*(1), 37–49. http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.014

de La Vega, M. A., Stein, D., & Kobinger, G. P. (2015). Ebolavirus Evolution: Past and Present. *PLoS Pathogens*, *11*(11), 1–10. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005221

Debeuf, N., Haspeslagh, E., van Helden, M., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2016). Mouse Models of Asthma. *Current Protocols in Mouse Biology*, *6*(June), 169–184. http://doi.org/10.1002/cpmo.4

Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J.-F., Francis, N., Laloux, G., Dotreppe, D., … De Bolle, X. (2014). G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nature Communications*, *5*, 4366. http://doi.org/10.1038/ncomms5366

Delpino, M. V., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2009). Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and Osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infection and Immunity*, *77*(3), 984–995. http://doi.org/10.1128/IAI.01259-08

Denis, O., Vincent, M., Havaux, X., De Prins, S., Treutens, G., & Huygen, K. (2013). Induction of the specific allergic immune response is independent of proteases from the fungus *Alternaria alternata*. *European Journal of Immunology*, *43*(4), 907–917. http://doi.org/10.1002/eji.201242630

Deshpande, P., Lucas, M., & Gaudieri, S. (1997). Genetic Variation of Host Immune Response Genes and Their Effect on Hepatitis C Infection and Treatment Outcome.

Detilleux, P. G., Deyoe, B. L., & Cheville, N. F. (1990). Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infection and Immunity*, *58*(7), 2320–2328.

Dias, A. T., de Castro, S. B. R., Alves, C. C. S., Rezende, A. B., Rodrigues, M. F., Machado, R. R. P., … Ferreira, A. P. (2011). Lower production of IL-17A and increased

susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfected with *Strongyloides venezuelensis*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(5), 617–619. http://doi.org/S0074-02762011000500015 [pii]

Dubos, B. Y. R. E. N. J., & Ph, D. (1955). OF ALBINO MICE TO EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS several polycarboxylic acids and keto compounds favor the multiplication and survival of the bacilli under the same conditions (12-14). It appeared possible therefore that physiological disorders could affect .

Ducrotoy, M. J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M., & Moriyón, I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *171*, 81–102. http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002

Durward, M., Radhakrishnan, G., Harms, J., Bareiss, C., Magnani, D., & Splitter, G. A. (2012). Active Evasion of CTL Mediated Killing and Low Quality Responding CD8+ T Cells Contribute to Persistence of Brucellosis. *PLoS ONE*, *7*(4), e34925. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0034925

Elias, D., Akuffo, H., Pawlowski, A., Haile, M., Schön, T., & Britton, S. (2005). *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine*, *23*(11), 1326–1334. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.038

Elmore, S. A. (2006). Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicologic Pathology*, *34*(5), 656–665. http://doi.org/10.1080/01926230600978458

Engwerda, C. R., Ato, M., Cotterell, S. E. J., Mynott, T. L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P. M. a, & Kaye, P. M. (2002). A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *The American Journal of Pathology*, *161*(2), 429–437. http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64199-5

Enyaru, J. C. K., Matovu, E., Nerima, B., Akol, M., & Sebikali, C. (2006). Detection of *T . b . rhodesiense* Trypanosomes in Humans and Domestic Animals in South East Uganda by Amplification of Serum Resistance-Associated Gene, *319*, 311–319. http://doi.org/10.1196/annals.1373.041

Esmail, H., Barry, C. E., Young, D. B., & Wilkinson, R. J. (2014). The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1645), 20130437–20130437. http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0437

Fahy, J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Immunology*, *15*(January), 57–65. http://doi.org/10.1038/nri3786

Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, *379*(9835), 2489–2499. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2

Feng, C. G., Jankovic, D., Kullberg, M., Cheever, A., Scanga, C. a, Hieny, S., … Sher, A. (2005). Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *Journal of Immunology*, *174*(7), 4185–92. http://doi.org/174/7/4185 [pii]

Fèvre, E. M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S. C., & Maudlin, I. (2006). Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, *61*(05), 167–221. http://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61005-6

Ficht, T. A., Kahl-McDonagh, M. M., Arenas-Gamboa, A. M., & Rice-Ficht, A. C. (2009). Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*, *27*(SUPPL. 4).

Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2000). Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *165*, 5202–5210. http://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5202

Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J., & Gorvel, J. P. (1999). Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(11), 6784–91. Retrieved from http://www.jimmunol.org/content/162/11/6784.full

Freud, S., Jauregg, J. W. V. O. N., Tandler, J., Libbey, J., & Eurotext, L. (2013). Sigmund Freud , Julius Wagner von Jauregg , Arnold Durig , Julius Tandler, *89*. http://doi.org/10.1684/ipe.2013.1099

Furman, Jojic, Sharma, Shen-orr, Angel, Onengut-Gumuscu, … Davis. (2015). Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med*, 281–43.

Furmonaviciene, R. Ã., Ghaemmaghami, A. M. Ã., Boyd, S. E., Jones, N. S., Bailey, K. Ã., Willis, A. C., … Mitchell, D. A. (2007). The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR : experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses Clinical and Experimental Allergy, 231–242.

Gabanyi, I., Muller, P. A., Feighery, L., Oliveira, T. Y., Costa-pinto, F. A., & Mucida, D. (2016). Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages Article Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell*, 1–14. http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023

Garcia-Yoldi, Marin, DeMiguel, Munoz, Vismanos, & Lopez-Gonl. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all Brucella species and the vaccine strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1. *Clin Chem*, *52*, 779–81.

Godfrey, D. I., Pellicci, D. G., Patel, O., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2010). Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Seminars in Immunology*, *22*(2), 61–67. http://doi.org/10.1016/j.smim.2009.10.004

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., … Letesson, J. J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*.

Goenka, R., Guirnalda, P. D., Black, S. J., & Baldwin, C. L. (2012). B lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium brucella abortus. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(1), 91–98. http://doi.org/10.1093/infdis/jis310

Goenka, R., Parent, M. A., Elzer, P. H., & Baldwin, C. L. (2011). B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus. *Journal of Infectious Diseases*, *203*(8), 1136–1146. http://doi.org/10.1093/infdis/jiq171

Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1408*(2-3), 79–89. http://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00060-X

Gopinath, S., Lichtman, J. S., Bouley, D. M., Elias, J. E., & Monack, D. M. (2014). Role of disease-associated tolerance in infectious superspreaders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(44), 15780–5. http://doi.org/10.1073/pnas.1409968111

Gorvel, J. P. (2008). Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes and Infection*, *10*(9), 1010–1013. http://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.007

Grill??, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriy??n, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, *43*(1). http://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29

Guo, S., Wu, L. X., Jones, C. X., Chen, L., Hao, C. L., He, L., & Zhang, J. H. (2016). Allergic airway inflammation disrupts interleukin-17 mediated host defense against streptococcus

pneumoniae infection. *International Immunopharmacology*, *31*, 32–38. http://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.010

Hajiabdolbaghi, M., Rasoulinejad, M., Abdollahi, A., Paydary, K., Valiollahi, P., Seyedalinaghi, S., … Jafari, S. (2011). Brucella infection in HIV infected patients. *Acta Medica Iranica*, *49*(12), 801–805.

Hakansson, A., Kidd, A., Wadell, G., Sabharwal, H., & Svanborg, C. (1994). Adenovirus infection enhances in vitro adherence of Streptococcus pneumoniae. *Infection and Immunity*, *62*(7), 2707–2714.

Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, L. B. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med.*, *15*, 410–6.

Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*, *43*(1), 29–40. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A. M., Kool, M., … Lambrecht, B. N. (2010). Inflammatory dendritic cells — not basophils — are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *Journal of Experimental Medecine*, *207*(10), 2097–2112. http://doi.org/10.1084/jem.20101563

Hanot Mambres, D., Machelart, A., Potemberg, G., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2016). Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with Brucella melitensis in Mice. *The Journal of Immunology*, *196*(9), 3780–3793. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1502265

Harris, T. H., Cooney, N. M., Mansfield, J. M., & Paulnock, D. M. (2006). Signal Transduction , Gene Transcription , and Cytokine Production Triggered in Macrophages by Exposure to Trypanosome DNA, *74*(8), 4530–4537. http://doi.org/10.1128/IAI.01938-05

Havaux, X., Zeine, A., & Dits, A. (2004). A new mouse model of lung allergy induced by the spores of Alternaria alternata and Cladosporium herbarum molds. *Clinical and Experimental Immunology*, *139*, 179–188. http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02679.x

Heikema, A. P., Bergman, M. P., Richards, H., Crocker, P. R., Gilbert, M., Samsom, J. N., … van Belkum, A. (2010). Characterization of the specific interaction between sialoadhesin and sialylated Campylobacter jejuni lipooligosaccharides. *Infection and Immunity*, *78*(7), 3237–46. http://doi.org/10.1128/IAI.01273-09

Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, *169*(1), 59–72. http://doi.org/10.1084/jem.169.1.59

Herelds, D., Krakow, J. L., Bangs, J. D., Hart, G. W., & Englundn, P. T. (1986). A Phospholipase C from Trypanosoma brucei which Selectively Cleaves the Glycolipid on the Variant Surface Glycoprotein *, *261*(29), 13813–13819.

Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4 + T-cell subsets in inflammatory diseases : beyond the T h 1 / T h 2 paradigm, *28*(4), 163–171. http://doi.org/10.1093/intimm/dxw006

Hofer, E., Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., … Aistleitner, K. (2016). Brucella vulpis sp. nov., a novel Brucella species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes) in Austria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(5), 2090–2098. http://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998

Hsieh, C., Macatonia, S. E., Garra, A. O., & Murphy, K. M. (1995). T Cell Genetic Background Determines Default T Helper Phenotype Development In Vitro. *Journal of Experimental Medecine*, *181*(February), 713–721.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., … Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *259*(5102), 1742–1745.

Ibañez, A. E., Smaldini, P., Coria, L. M., Delpino, M. V., Pacífico, L. G. G., Oliveira, S. C., … Cassataro, J. (2013). Unlipidated Outer Membrane Protein Omp16 (U-Omp16) from Brucella spp. as Nasal Adjuvant Induces a Th1 Immune Response and Modulates the Th2 Allergic Response to Cow's Milk Proteins. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–13. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0069438

JimenezDeBagues, Marin, Barberan, & Blasco. (1993). Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for Brucella ovis. *Vaccine*, *11*, 61–6.

Jones, C., Virji, M., & Crocker, P. R. (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Molecular Microbiology*, *49*(5), 1213–1225. http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03634.x

Jong, M. F. De, Sun, Y., Hartigh, A. B. Den, Dijl, J. M. Van, & Tsolis, R. M. (2008). Identification of VceA and VceC , two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system, *70*(October), 1378–1396. http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x

Joubert, D. A., Walker, T., Carrington, L. B., De Bruyne, J. T., Kien, D. H. T., Hoang, N. L. T., … O'Neill, S. L. (2016). Establishment of a Wolbachia Superinfection in Aedes aegypti Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance Management. *PLOS Pathogens*, *12*(2), e1005434. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005434

Jounio, U., Juvonen, R., Bloigu, A., Silvennoinen-Kassinen, S., Kaijalainen, T., Kauma, H., … Leinonen, M. (2010). Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. *Clinical Respiratory Journal*, *4*(4), 222–229. http://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2009.00179.x

Juhn, Y. J. (2012). Influence of Asthma Epidemiology on the Risk for Other Diseases. *Allergy Asthma Immunol Res.*, *4*(3), 122–131.

Juhn, Y. J., Kita, H., Yawn, B. P., Boyce, T. G., Yoo, K. H., Mcgree, M. E., … Jacobson, R. M. (1983). Editors ' choice article Increased risk of serious pneumococcal disease in patients with asthma Study subjects, 719–723. http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.029

Juhn, Y. J., Kita, H., Yawn, B. P., Boyce, T. G., Yoo, K. H., McGree, M. E., … Jacobson, R. M. (2008). Increased risk of serious pneumococcal disease in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *122*(4), 719–723. http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.029

K??hler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M., & Liautard, J. P. (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella? *Trends in Microbiology*, *11*(5), 215–219. http://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00078-7

Kang, C. I., Rouse, M. S., Patel, R., Kita, H., & Juhn, Y. J. (2009). Allergic airway inflammation and susceptibility to pneumococcal pneumonia in a murine model with real-time in vivo evaluation. *Clinical and Experimental Immunology*, *156*(3), 552–561. http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03925.x

Kang, Y. S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S. a., Kim, J. Y., … Park, C. G. (2003). SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *International Immunology*, *15*(2), 177–186. http://doi.org/10.1093/intimm/dxg019

Kang, Y.-S., Kim, J. Y., Bruening, S. a, Pack, M., Charalambous, A., Pritsker, A., … Park, C. G. (2004). The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of

Streptococcus pneumoniae in the marginal zone of mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 215–220. http://doi.org/10.1073/pnas.0307124101

Kato, C. D., Matovu, E., Mugasa, C. M., Nanteza, A., & Alibu, V. P. (2016). The role of cytokines in the pathogenesis and staging of Trypanosoma brucei rhodesiense sleeping sickness. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, *12*, 1. V. A, C. RD, E. JD, in Essentials of Glycobiolo. http://doi.org/10.1186/s13223-016-0113-5

Kawano, Kayama, Nakama, Hashimoto, Umemoto, & Takeda. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int Immunol*.

Kim, S., Lee, D. S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H., & Watarai, M. (2005). Interferon-gamma promotes abortion due to Brucella infection in pregnant mice. *BMC Microbiology*, *5*, 22. http://doi.org/10.1186/1471-2180-5-22

Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., & Makino, S. (2004). Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of Brucella abortus, *37*, 11–19. http://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.04.002

Kirschvink N, R. P. (2008). Use of alternative animals as asthma models. *Curr Drug Targets*, *9*, 470–84.

Kitano, H., & Oda, K. (2006). Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Mol Syst Biol*, *2*, 2006 0022. http://doi.org/10.1038/msb4100039

Klemets, P., Lyytika, O., Ruutu, P., Ollgren, J., & Kaijalainen, T. (2010). Risk of invasive pneumococcal infections among working age adults with asthma, 698–703. http://doi.org/10.1136/thx.2009.132670

Klugman, K. P., & Feldman, C. (2001). Streptococcus pneumoniae respiratory tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *14*(2), 173–9.

Knippenberg, S., Brumshagen, C., Aschenbrenner, F., Welte, T., & Maus, U. A. (2015). Arginase 1 activity worsens lung-protective immunity against Streptococcus pneumoniae infection. *European Journal of Immunology*, 1716–1726. http://doi.org/10.1002/eji.201445419

Kouzaki, H., Grady, S. M. O., Christopher, B., Kouzaki, H., Grady, S. M. O., Lawrence, C. B., & Kita, H. (2016). Proteases Induce Production of Thymic Stromal Lymphopoietin by Airway Epithelial Cells through Protease-Activated Receptor-2. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0900904

Kraal, G., & Janse, M. (1986). Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology*, *58*(April), 665–669.

Kuriakose, S., Muleme, H. M., Onyilagha, C., Singh, R., Jia, P., & Uzonna, J. E. (2012). Diminazene Aceturate (Berenil) Modulates the Host Cellular and Inflammatory Responses to Trypanosoma congolense Infection. *PLoS ONE*, *7*(11), 1–8. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048696

Lamour, S. D., Gomez-romero, M., Vorkas, P. A., Alibu, V. P., Saric, J., Holmes, E., & Sternberg, J. M. (2015). Discovery of Infection Associated Metabolic Markers in Human African Trypanosomiasis, 1–17. http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004200

Leonardi, I., Frey, I., & Rogler, G. (2015). Helminth therapy for organic diseases? *Translational Research*, *166*(6), 586–601. http://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.016

Li, J., Blakeley, D., & Smith, R. J. (2011). The Failure of R 0, *2011*. http://doi.org/10.1155/2011/527610

Liu, G., Sun, D., Wu, H., Zhang, M., Huan, H., Xu, J., … Shi, M. (2015). Distinct Contributions of CD4 □ and CD8 □ T Cells to Pathogenesis of Trypanosoma brucei Infection in the Context of Gamma Interferon, *83*(7), 2785–2795. http://doi.org/10.1128/IAI.00357-15

Lloyd, C. M., & Hessel, E. M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(12), 838–48. http://doi.org/10.1038/nri2870

Locksley, R. M. (2010). Essay Asthma and Allergic Inflammation, 777–783. http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.004

Lokken, K. L., Mooney, J. P., Butler, B. P., Xavier, M. N., Chau, J. Y., Schaltenberg, N., … Tsolis, R. M. (2014). Malaria Parasite Infection Compromises Control of Concurrent Systemic Non-typhoidal Salmonella Infection via IL-10-Mediated Alteration of Myeloid Cell Function. *PLoS Pathogens*, *10*(5). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004049

Louis FJ, S. P. (2005). Rough start for the fight against sleeping sickness in French equatorial Africa. *Med Trop*, *65*, 251–1.

Lowry, J. E., Leonhardt, J. A., Yao, C., Belden, E. L., & Andrews, G. P. (2014). INFECTION OF C57BL/6 MICE BY *TRYPANOSOMA MUSCULI* MODULATES HOST IMMUNE RESPONSES DURING *BRUCELLA ABORTUS* COCOLONIZATION. *Journal of Wildlife Diseases*, *50*(1), 11–20. http://doi.org/10.7589/2013-03-080

Macedo, G. C., Magnani, D. M., Carvalho, N. B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T., & Oliveira, S. C. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control Brucella abortus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(2), 1080–1087. http://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1080

MACKANESS, G. B. (1964). the Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, *120*(3), 105–20. http://doi.org/10.1084/jem.120.1.105

Macleod, E. T., Darby, A. C., Maudlin, I., & Welburn, S. C. (2007). Factors Affecting Trypanosome Maturation in Tsetse Flies, (2). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000239

Macrophages, A., Sanfilippo, A. M., Furuya, Y., Roberts, S., Salmon, S. L., & Metzger, D. W. (2015). Allergic Lung Inflammation Reduces Tissue Invasion and Enhances Survival from Pulmonary Pneumococcal Infection in Mice , Which Correlates with Increased Expression of Transforming Growth Factor, *83*(7), 2976–2983. http://doi.org/10.1128/IAI.00142-15

Magez, S., Schwegmann, A., Atkinson, R., Claes, F., Drennan, M., De Baetselier, P., & Brombacher, F. (2008). The role of B-cells and IgM antibodies in parasitemia, anemia, and VSG switching in Trypanosoma brucei-infected mice. *PLoS Pathogens*, *4*(8). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000122

Magram, J., Connaughton, S. E., Warrier, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., … Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN-g production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, *4*(5), 471–481.

Makala, L. H., Mangani, P., Fujisaki, K., & Nagasawa, H. (2003). The current status of major tick borne diseases in Zambia. *Veterinary Research*, *34*(1), 27–45. http://doi.org/10.1051/vetres

Mambres, D. H., Machelart, A., Vanderwinden, J. M., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J. J., & Muraille, E. (2015a). In situ characterization of splenic brucella melitensis reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–20. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0137835

Mambres, D. H., Machelart, A., Vanderwinden, J. M., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J. J., & Muraille, E. (2015b). In situ characterization of splenic brucella melitensis reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice. *PLoS ONE*, *10*(9).

Mansfield, & Bagasra. (1978). Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. I. B cell responses to helper T cell-independent and -dependent antigens. *J Immunol*, *120*, 759–65.

Marcello, L., & Barry, J. D. (2007). Analysis of the VSG gene silent archive in Trypanosoma

brucei reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure, 1344–1352. http://doi.org/10.1101/gr.6421207.This

Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Salcedo, S. P., Gorvel, J. P., & Comerci, D. J. (2011). In search of Brucella abortus type iv secretion substrates: Screening and identification of four proteins translocated into host cells through virb system. *Cellular Microbiology*, *13*(8), 1261–1274. http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01618.x

Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Goriely, S., Trottein, F., … Desmet, C. J. (2010). Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(4). http://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.009

Martinez-Pomares, L., & Gordon, S. (2012). CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends in Immunology*, *33*(2), 66–70. http://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.001

Martirosyan, A., & Gorvel, J.-P. (2013). Brucella evasion of adaptive immunity. *Future Microbiology*, *8*(2), 147–54.

Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunological Reviews*, *240*(1), 211–234. http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x

Martirosyan, A., Von Bargen, K., Gorvel, V. A., Zhao, W., Hanniffy, S., Bonnardel, J., … Gorvel, J. P. (2013). In vivo identification and characterization of CD4+ cytotoxic T cells induced by virulent Brucella abortus infection. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–10. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082508

Masocha, W., & Kristensson, K. (2012). Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence*, *3*(2), 192–202. http://doi.org/10.4161/viru.19178

Masocha, W., Robertson, B., Rottenberg, M. E., Mhlanga, J., Sorokin, L., & Kristensson, K. (2004). Cerebral vessel laminins and IFN- γ define Trypanosoma brucei brucei penetration of the blood-brain barrier, *114*(5). http://doi.org/10.1172/JCI200422104.The

Masocha, W., Rottenberg, M. E., & Kristensson, K. (2007). Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiology and Behavior*, *92*(1-2), 110–114. http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.045

Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., & Beasley, R. (2004). Review article The global burden of asthma : executive summary of the GINA Dissemination Committee Report, 469–478.

Mathews, J. a., Kasahara, D. I., Ribeiro, L., Wurmbrand, A. P., Ninin, F. M. C., & Shore, S. a. (2015). γδ T Cells Are Required for M2 Macrophage Polarization and Resolution of Ozone-Induced Pulmonary Inflammation in Mice. *Plos One*, *10*(7), e0131236. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0131236

Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, H., Yamada, H., Kitamura, A., & Yamada, T. (2000). Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin induces protective immunity against infection by Plasmodium yoelii at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine*, *19*(7-8), 779–787. http://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00257-7

Matter, M. S., Hilmenyuk, T., Claus, C., Marone, R., Sch??rch, C., Tinguely, M., … Ochsenbein, A. F. (2011). Destruction of lymphoid organ architecture and hepatitis caused by CD4 + T cells. *PLoS ONE*, *6*(9). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024772

McCullough, & Beal. (1951). Growth and manometric studies on carbohydrate utilization of Brucella. *J Infect Dis*, *89*, 266–71.

McGaha, T. L., Chen, Y., Ravishankar, B., Rooijen, N. Van, & Karlsson, M. C. I. (2011). Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood*, *117*(20), 5403–5412. http://doi.org/10.1182/blood-2010-11-320028

McGill, J. L., Sacco, R. E., Baldwin, C. L., Telfer, J. C., Palmer, M. V., & Ray Waters, W.

(2014). The role of gamma delta T cells in immunity to Mycobacterium bovis infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *159*(3-4), 133–143. http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.010

McLaren, P. J., & Carrington, M. (2015). The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. *Nature Immunology*, *16*(6), 577–583. http://doi.org/10.1038/ni.3147

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *449*(October), 819–826. http://doi.org/10.1038/nature06246

Meltzer, E., Sidi, Y., Smolen, G., Banai, M., Bardenstein, S., & Schwartz, E. (2010). Sexually Transmitted Brucellosis in Humans, *51*. http://doi.org/10.1086/653608

Mense, Borschel, Wilhelmsen, Pitt, & Hoover. (2004). Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (Macaca mulatta). *Am J Vet Res*, *65*, 644–52.

Mika, L. A., Pirsch, J. B., & Pollok, N. L. (1959). Studies on mixed infections. V. Effect of stressor compounds in combined infection with *Brucella suis* and *Coxiella burnetii*. *Journal of Bacteriology*, *77*, 189–193.

Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., … Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, *114*(07), 999–1012. http://doi.org/10.1017/S0007114515002093

Mjihdi, A., Truyens, C., Detournay, O., & Carlier, Y. (2004). Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. *Experimental Parasitology*, *107*(1-2), 58–64. http://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.03.016

Monin, L., Griffiths, K. L., Lam, W. Y., Gopal, R., Kang, D. D., Ahmed, M., … Khader, S. A. (2015). Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(12), 4699–4713. http://doi.org/10.1172/JCI77378

Monteiro, V. G., Lobato, C. S. S., Silva, A. R., Medina, D. V, de Oliveira, M. a, Seabra, S. H., … DaMatta, R. a. (2005). Increased association of Trypanosoma cruzi with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitology Research*, *97*(5), 380–5.

Moorthy, A. N., Tan, K. B., Wang, S., Narasaraju, T., & Kaplan, M. J. (2016). Effect of High-Fat Diet on the Formation of Pulmonary Neutrophil Extracellular Traps during Influenza Pneumonia in BALB/c Mice, *7*(August), 1–7. http://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00289

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., … O'Neill, S. L. (2009). A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, *139*(7), 1268–1278. http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042

Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, *5*(MAY), 1–18. http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213

Moreno, E., & Moriyon, I. (2006). The genus Brucella. In The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. *Springer New York, New York*, 315–456.

Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2009). Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *Journal of Infectious Diseases*, *198*(March 2007), 962–970. http://doi.org/10.1086/591708.Predominant

Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, *28*(SUPPL. 3), 2–13. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022

Mosser, & Edwards. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, *8*, 958–69.

Mueller, S., Hosiawa-Meagher, K., Konieczny, B., Sullivan, B., Bachmann, M., Locksley, R., … Matloubian, M. (2007). Regulation of Homeostatic Chemokine Expression and Cell Trafficking During Immune Responses. *Science*, *317*(August), 670–674. http://doi.org/10.1126/science.1144830

Mueller, S. N., & Germain, R. N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(9), 618–629.

Mugnier, M. R., Cross, G. A. M., & Papavasiliou, F. N. (2015). The in vivo dynamics of antigenic variation in Trypanosoma brucei. *Science (New York, N.Y.)*, *347*(6229), 1470–1473. http://doi.org/10.1126/science.aaa4502

Mulenga, C., Mhlanga, J. D. M., Kristensson, K., & Robertson, B. (2001). Trypanosoma brucei brucei crosses the blood ± brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model, 77–85.

Munder, M. (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system: REVIEW. *British Journal of Pharmacology*, *158*(3), 638–651. http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x

Muñoz, N., Van Maele, L., Marqués, J. M., Rial, A., Sirard, J. C., & Chabalgoity, J. A. (2010). Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. *Infection and Immunity*, *78*(10), 4226–4233. http://doi.org/10.1128/IAI.00224-10

Muraille, E. (2016). The Unspecific Side of Acquired Immunity Against Infectious Disease: Causes and Consequences. *Frontiers in Microbiology*, *6*(January), 1–11. http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01525

Muraille, E., Leo, O., & Moser, M. (2014a). Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in Immunology*, *5*(NOV). http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603

Muraille, E., Leo, O., & Moser, M. (2014b). Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in Immunology*, *5*(NOV), 1–12. http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603

Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B., & Baldwin, C. L. (2001). Interferon-?? is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, *103*(4), 511–518. http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01258.x

Mutolo, M. J., Jenny, L. L., Buszek, A. R., Fenton, T. W., & Foran, D. R. (2012). Osteological and Molecular Identification of Brucellosis in Ancient Butrint , Albania, *263*(July 2011), 254–263. http://doi.org/10.1002/ajpa.21643

Nair, M. G., Cochrane, D. W., & Allen, J. E. (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation ha v e a no v el phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in v itro, *85*(v), 173–180.

Nair, M. G., Guild, K. J., Artis, D., & Alerts, E. (2016). Novel Effector Molecules in Type 2 Inflammation: Lessons Drawn from Helminth Infection and Allergy. http://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1393

Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., … Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in Il-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, *17*(3), 375–387.

Naroeni, A., & Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of Brucella suis in murine macrophages. *Infect Immunol*, *70*, 1640–4.

Nascimento, W. C., Silva, R. P., Fernandes, E. S., Silva, M. C., Holanda, G. C., Santos, P. A., … Souza, V. O. (2014). Immunomodulation of liver injury by Ascaris suum extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitology Research*, *113*(9), 3309–3317. http://doi.org/10.1007/s00436-014-3994-6

Nathan, A. T., Peterson, E. A., Chakir, J., & Wills-karp, M. (n.d.). Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through b -glucan – dependent pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *123*(3), 612–618. http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.006

Noland, G. S., Chowdhury, D. R., Jr, J. F. U., Zavala, F., & Kumar, N. (2010). Helminth infection impairs the immunogenicity of a Plasmodium falciparum DNA vaccine, but not irradiated sporozoites, in mice. *Vaccine*, *28*(17), 2917–2923. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.055.Helminth

Nolte, M. A., Arens, R., Kraus, M., van Oers, M. H. J., Kraal, G., van Lier, R. A. W., & Mebius, R. E. (2004). B Cells Are Crucial for Both Development and Maintenance of the Splenic Marginal Zone. *The Journal of Immunology*, *172*(6), 3620–3627. http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3620

Oetke, C., Kraal, G., & Crocker, P. R. (2006). The antigen recognized by MOMA-I is sialoadhesin. *Immunology Letters*, *106*(1), 96–8. http://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.04.004

Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A., & Carvalho, N. B. (2008). The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection*, *10*(9), 1005–1009. http://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.005

Oliveira, S. C., Giambartolomei, G. H., & Cassataro, J. (2011). Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. *Expert Review of Vaccines*, *10*(9), 1291–1305. http://doi.org/10.1586/erv.11.110

On, S., & Infections, M. (1958). Brscella suis AND Coxiella burnetii, 185–188.

Pabst, Binns, & Westermann. (1989). What is the function of peripheral lymphocytes migrating to the thymus and of B lymphocytes proliferating in the thymus? *Thymus*, *13*, 149–56.

Page, K. R., Jedlicka, A. E., Fakheri, B., Noland, G. S., Kesavan, A. K., Scott, A. L., … Manabe, Y. C. (2005). Mycobacterium-induced potentiation of type 1 immune responses and protection against malaria are host specific. *Infection and Immunity*, *73*(12), 8369–8380. http://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8369-8380.2005

Paixão, T. A., Roux, C. M., Den Hartigh, A. B., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Santos, R. L., & Tsolis, R. M. (2009). Establishment of systemic Brucella melitensis infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infection and Immunity*, *77*(10), 4197–4208. http://doi.org/10.1128/IAI.00417-09

Paper, O. (2004). Cellular expression of murine Ym1 and Ym2 , chitinase family proteins , as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry, 473–482. http://doi.org/10.1007/s00418-004-0654-4

Pappas, G., & Papadimitriou, P. (2007). Challenges in Brucella bacteraemia, 30–32. http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.06.011

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *6*(2), 91–99. http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6

Pasquali, P., Rosanna, A., Pistoia, C., Petrucci, P., & Ciuchini, F. (2003). Brucella abortus RB51 induces protection in mice orally infected with the virulent strain B. abortus 2308. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2326–2330. http://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2326-2330.2003

Pasquevich, K. A., Estein, S. M., Samartino, C. G., Zwerdling, A., Coria, L. M., Barrionuevo, P., … Cassataro, J. (2009). Immunization with Recombinant Brucella Species Outer Membrane Protein Omp16 or Omp19 in Adjuvant Induces Specific CD4 ♂ and CD8 ♂ T

Cells as Well as Systemic and Oral Protection against Brucella abortus Infection □, *77*(1), 436–445. http://doi.org/10.1128/IAI.01151-08

Pasquevich, K. A., Ibañez, A. E., Coria, L. M., Samartino, C. G., Estein, S. M., Zwerdling, A., … Cassataro, J. (2011). An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against B. abortus mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS ONE*, *6*(1). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016203

Patella, V., Bocchino, M., & Steinhilber, G. (2015). Asthma is associated with increased susceptibility to infection. *Minerva Med.*, *106*(4), 1–7.

Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P., & Pérez-Morga, D. (2006). The trypanolytic factor of human serum. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(6), 477–486. http://doi.org/10.1038/nrmicro1428

Peltola, & McCullers. (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J*, *23*, 87–97.

Pirsch, J. B. (1958). Coxiella burmetii INFECTION, 437–441.

Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R. G., Van Der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goñi, I., … Gorvel, J. P. (1998). Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity*, *66*(12), 5711–5724.

Poehling, K. A., Schaffner, W., Craig, A. S., & Griffin, M. R. (2005). Asthma as a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease, 2082–2090.

Poester, F. P., Lage, A. P., Santos, R. L., Xavier, M. N., & Paixa, T. A. (2009). Pathological , Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with Brucella abortus, *140*, 149–157. http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.10.004

Pomés, A., Chapman, M. D., & Wünschmann, S. (2016). Indoor Allergens and Allergic Respiratory Disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, *16*(6), 43. http://doi.org/10.1007/s11882-016-0622-9

Portnoy J, Olson I, Pacheco F, B. C. (1990). Affinity purification of a major Alternaria allergen using a monoclonal antibody. *Ann Allergy*, *65*, 109–14.

Potian, J. a, Rafi, W., Bhatt, K., McBride, A., Gause, W. C., & Salgame, P. (2011). Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(9), 1863–1874. http://doi.org/10.1084/jem.20091473

Powellis, N. (1995). Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from, *13*(2), 151–154.

Puertollano, M. A., Cruz-Chamorro, L., Puertollano, E., Perez-Toscano, M. T., Alvarez de Cienfuegos, G., & de Pablo, M. A. (2005). Assessment of interleukin-12, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha secretion in sera from mice fed with dietary lipids during different stages of Listeria monocytogenes infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, *12*(9), 1098–1103. http://doi.org/10.1128/CDLI.12.9.1098-1103.2005

Puertollano, M. A., Puertollano, E., Ruiz-bravo, A., Jiménez-valera, M., Pablo, M. A. D. E., & Cienfuegos, G. Á. D. E. (2004). Changes in the immune functions and susceptibility to Listeria monocytogenes infection in mice fed dietary lipids. *Immunol Cell Biol*, *82*(4), 370–376. http://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01262.x

Radwanska, M., Guirnalda, P., De Trez, C., Ryffel, B., Black, S., & Magez, S. (2008). Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. *PLoS Pathogens*, *4*(5). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000078

Raes, G., Baetselier, P. De, Noe, W., Beschin, A., & Brombacher, F. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages

Abstract : Alternatively activated macrophages, *71*(April), 597–602.
Rafi, W., Bhatt, K., Gause, W. C., & Salgame, P. (2015). Neither primary nor memory immunity to Mycobacterium tuberculosis infection is compromised in mice with chronic enteric helminth infection. *Infection and Immunity*, *83*(3), 1217–1223. http://doi.org/10.1128/IAI.03004-14
Rajashekara, G., Glover, D. A., Krepps, M., & Splitter, G. A. (2005). Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent Brucella melitensis infections. *Cellular Microbiology*, *7*(10), 1459–1473. http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00570.x
Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, *12*(5), 352–366. http://doi.org/10.1038/nri3211
Randall. (2010). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*, *107*, 187–214.
Ravishankar, B., Shinde, R., Liu, H., Chaudhary, K., Bradley, J., Lemos, H. P., … McGaha, T. L. (2014). Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(11), 4215–20. http://doi.org/10.1073/pnas.1320924111
Rifkin, M. R., & Landsberger, F. R. (1990). Trypanosome variant surface glycoprotein transfer to target membranes: a model for the pathogenesis of trypanosomiasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *87*(0027-8424 (Print)), 801–805.
Riley, L. K., & Robertson, D. C. (1984). abortus in human and bovine Ingestion and Intracellular Survival of Brucella abortus in Human and Bovine Polymorphonuclear Leukocytes, *46*(1), 1–8.
Robinson, D. S. Ã. (2009). Regulatory T cells and asthma Experimental Allergy, 1314–1323. http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x
Rol??n, H. G., & Tsolis, R. M. (2007). Mice lacking components of adaptive immunity show increased Brucella abortus virB mutant colonization. *Infection and Immunity*, *75*(6), 2965–2973. http://doi.org/10.1128/IAI.01896-06
Rosche, K. L., Aljasham, A. T., Kipfer, J. N., Piatkowski, B. T., & Konjufca, V. (2015). Infection with Salmonella enterica Serovar Typhimurium Leads to Increased Proportions of F4/80+ Red Pulp Macrophages and Decreased Proportions of B and T Lymphocytes in the Spleen. *Plos One*, *10*(6), e0130092. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130092
Rurangirwa FR, Musoke AJ, Nantulya VM, T. H. (1983). Immune depression in bovine trypanosomiasis: effects of acute and chronic Trypanosoma congolense and chronic Trypanosoma vivax infections on antibody response to Brucella abortus vaccine. *Parasite Immunology*, *5*(267), 76.
Rurangirwa, F. R., Tabel, H., Losos, G. J., & Tizard, I. R. (1979). Suppression of antibody response to Leptospora biflexa and Brucella abortus and recovery from immunosuppression after Berenil treatment. *Infection and Immunity*, *26*(3), 822–826.
Sabin, E. a, Araujo, M. I., Carvalho, E. M., & Pearce, E. J. (1996). Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with Schistosoma mansoni. *The Journal of Infectious Diseases*, *173*(1), 269–272.
Saenz, S. A., & Taylor, B. C. (2008). Welcome to the neighborhood : epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites, 172–190.
Sakai, S., Kauffman, K. D., Sallin, M. A., Sharpe, A. H., Young, A., Ganusov, V. V, & Barber, D. L. (2016). CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease, 1–22. http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005667
Salcedo, S., Noursadeghi, M., Cohen, J., & Holden, D. (2001). Intracellular replication of Salmonella typhimurium strain in specific subsets of splenis macrophages in vivo.

Cellular Microbiology, *3*, 587–597.
Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., … Gorvel, J. P. (2008). Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathogens*, *4*(2). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040021
Salmon, D., Vanwalleghem, G., Morias, Y., Denoeud, J., Krumbholz, C., Lhomme, F., … Pays, E. (2012). Adenylate Cyclases of Trypanosoma brucei Inhibit the Innate Immune Response of the Host. *Science*, *337*(6093), 463–466. http://doi.org/10.1126/science.1222753
Sandulache, & Marx. (1978). Immunochemical studies on a Yersinia enterocolitica O:9 lipopolysaccharide cross-reacting with Brucella abortus and Vibrio cholerae extracts. *Ann Microbiol*, *425-35*.
Sanfilippo, A. M., Furuya, Y., Roberts, S., Salmon, S. L., & Metzger, D. W. (2015). Allergic Lung Inflammation Reduces Tissue Invasion and Enhances Survival from Pulmonary Pneumococcal Infection in Mice: Correlation with Increased Expression of TGF-β1 and SiglecFlow Alveolar Macrophages. *Infection and Immunity*, *83*(May), 2976–2983. http://doi.org/10.1128/IAI.00142-15
Sathiyaseelan, J., Goenka, R., Parent, M., Benson, R. M., Murphy, E. A., Fernandes, D. M., … Baldwin, C. L. (2006). Treatment of Brucella-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cellular Immunology*, *243*(1), 1–9. http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.10.003
Scandella, E., Bolinger, B., Lattmann, E., Miller, S., Favre, S., Littman, D. R., … Ludewig, B. (2008). Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nature Immunology*, *9*(6), 667–75. http://doi.org/10.1038/ni.1605
Scheer, S., Krempl, C., Kallfass, C., Frey, S., Jakob, T., Mouahid, G., … Lamers, M. C. (2014). S. Mansoni bolsters anti-viral immunity in the murine respiratory tract. *PLoS ONE*, *9*(11). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112469
Schleifer, Filutowicz, Schopf, & Mansfield. (1993). Characterization of T helper cell responses to the trypanosome variant surface glycoprotein.No Title. *J Immunol*, *150*, 2910–9.
Schneider, M. C., Aguilera, X. P., Smith, R. M., Moynihan, M. J., Barbosa, J., Aldighieri, S., & Almiron, M. (2011). Importance of animal / human health interface in potential Public Health Emergencies of International Concern in the Americas, *29*(1), 371–379.
Schnoeller, C., Rausch, S., Pillai, S., Avagyan, A., Wittig, B. M., Loddenkemper, C., … Hartmann, S. (2008). A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(6), 4265–72. http://doi.org/180/6/4265 [pii]
Scrimshaw, & SanGiovanni. (1997). Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Nutr*, *66*, 464–477.
Scudamore, & Mclnnes. (2014). Histopathological analysis of the respiratory tract. *Curr Protoc Mouse Biol*, *11*, 189–96.
Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., & Schwendener, R. a. (1997). Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophils in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *European Journal of Immunology*, *27*(10), 2626–33. http://doi.org/10.1002/eji.1830271023
Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis : A re-emerging zoonosis, *140*, 392–398. http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021
Selin, L. K., Nahill, S. R., & Welsh, R. M. (1994). Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(6), 1933–43. http://doi.org/10.1084/jem.179.6.1933

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*.

Sher, A., Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E. J., … Morse, H. C. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunological Reviews*, *127*(127), 183–204. http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1992.tb01414.x

Sher, N. A., Chaparas, S. D., Greenberg, L. E., & Bernard, S. (1975). Effects of BCG, Corynebacterium parvum, and methanol extraction residue in the reduction of mortality from Staphylococcus aureus and Candida albicans infections in immunosuppressed mice. *Infection and Immunity*, *12*(6), 1325–1330.

Shoda, L. K. M., Kegerreis, K. A., Suarez, C. E., Roditi, I., Corral, R. S., Bertot, G. M., … Brown, W. C. (2001). T . brucei Is Mitogenic for B Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12 , Tumor Necrosis Factor Alpha , and Nitric Oxide Downloaded from http://iai.asm.org/ on April 12 , 2016 by BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE, *69*(4), 2162–2171. http://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2162

Sieve, A. N., Meeks, K. D., Bodhankar, S., Lee, S., Kolls, J. K., Simecka, J. W., & Berg, R. E. (2009). A novel IL-17-dependent mechanism of cross protection: Respiratory infection with mycoplasma protects against a secondary listeria infection. *European Journal of Immunology*, *39*(2), 426–438. http://doi.org/10.1002/eji.200838726

Simo, G., Asonganyi, T., Nkinin, S. W., Njiokou, F., & Herder, S. (2006). High prevalence of Trypanosoma brucei gambiense group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon, *139*, 57–66. http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.026

Simon, B., & Kandler, D. (1995). MOLECULAR CLONING OF MAJOR AND MINOR ALLERGENS, *32*(3), 213–227.

Skyberg, J. A., Thornburg, T., Rollins, M., Huarte, E., Jutila, M. A., & Pascual, D. W. (2011). Murine and bovine ???? T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections. *PLoS ONE*, *6*(7). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021978

Smaldini, P. L., Ibañez, A. E., Fossati, C. A., Cassataro, J., Docena, G. H., Lorena, P., … Docena, G. H. (2015). U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy Oral delivery of Brucella spp . recombinant protein U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy, *5515*(April 2016). http://doi.org/10.4161/hv.28845

SMITH H, WILLIAMS AE, PEARCE JH, KEPPIE J, HARRIS-SMITH PW, FITZ-GEORGE RB, W. K. (1962). Foetal erythritol: a cause of the localization of Brucella abortus in bovine contagious abortion. *Nature*, *193*, 47–9.

Smith, A. and. (1965). THE METABOLISM OF ERYTHRITOL BY BRUCELLA ABORTUS. *J Gen Microbiol*, *38*, 109–24.

Smith, D. H., Pepin, J., & Stich, A. H. R. (1998). Human African trypanosomiasis : an emerging public health crisis, *54*(2), 341–355.

Soroosh, P., & Taylor, A. (2009). Th 9 and allergic disease, 450–458. http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03114.x

SS, B. (2006). The global burden of asthma. *Chest.*, *130*, 4S–12S.

Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., L??pez-Otin, C., … Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. *Cell Host and Microbe*, *11*(1), 33–45. http://doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002

Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A., & Celli, J. (2008). Brucella Intracellular Replication Requires Trafficking Through the Late Endosomal / Lysosomal Compartment, (9), 678–694. http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x

Stein, R. A. (2011). Super-spreaders in infectious diseases. *International Journal of Infectious*

Diseases IJID Official Publication of the International Society for Infectious Diseases, *15*(8), e510–e513.

Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, *6*(4), 318–328. http://doi.org/10.1038/nri1810

Sternberg, J., & McGuigan, F. (1992). Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine Trypanosoma brucei infection. *Eur. J. Immunol.*, *22*, 2741–2744.

Stevens, M. G., Olsen, S. C., Pugh, G. W., & Palmer, M. V. (1994). Immune and pathologic responses in mice infected with Brucella abortus 19, RB51, or 2308. *Infection and Immunity*, *62*(8), 3206–3212.

Steverding, D. (2008). Parasites & Vectors The history of African trypanosomiasis, *8*, 1–8. http://doi.org/10.1186/1756-3305-1-3

Stiemsma, L. T., Reynolds, L. A., Turvey, S. E., & Finlay, B. B. (2015). The hygiene hypothesis : current perspectives and future therapies. *ImmunoTargets and Therapy*, *4*, 143–157.

Stijlemans, B., Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Van Ginderachter, J. A., Magez, S., & De Trez, C. (2016). Immune Evasion Strategies of Trypanosoma brucei within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. *Frontiers in Immunology*, *7*(June). http://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00233

Summers, Elliot, Qatir, Urban, Thompson, & Weinstock. (2003). Trichuris suis seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, *98*, 2034–41.

Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2005). Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*, *54*(1), 87–90. http://doi.org/10.1136/gut.2004.041749

Sztein, M. B., & Kierszenbaum, F. (1993). Mechanisms of development of immunosuppression during Trypanosoma infections. *Parasitology Today*, *9*(11), 424–428. http://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90053-I

Talbot, T. R., Hartert, T. V., Mitchel, E., Halasa, N. B., Arbogast, P. G., Poehling, K. A., … R. Griffin, M. (2005). Asthma as a Risk Factor for Invasive Pneumococcal Disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *24*(9), 854–63. http://doi.org/10.1097/01.inf.0000178067.63225.e8

Tam, M. F., & Chou, H. (2006). Original article Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells, (15), 382–388. http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00958.x

Taran, & Rybasov. (1971). Comparative study of the susceptibility and infectious sensitivity of laboratory animals and sheep to different species of the causative agent of brucellosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, *48*(97-101).

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2010). Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)*, *125 Suppl* , 16–26.

Taylor, J. E., & Rudenko, G. (2006). Switching trypanosome coats : what ' s in the wardrobe ?, *22*(11). http://doi.org/10.1016/j.tig.2006.08.003

Terwagne, M., Ferooz, J., Rol??n, H. G., Sun, Y. H., Atluri, V., Xavier, M. N., … Tsolis, R. M. (2013). Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of Brucella. *Cellular Microbiology*, *15*(6), 942–960. http://doi.org/10.1111/cmi.12088

Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., … Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, *461*(7265), 798–801. http://doi.org/10.1038/nature08463

Topham, N. J., & Hewitt, E. W. (2009). Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? *Immunology*, *128*(1), 7–15. http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x

Tramonti, Rhodes, Martin, Dalton, Andrew, & Carding. (2008). gammadeltaT cell-mediated regulation of chemokine producing macrophages during Listeria monocytogenes infection-induced inflammation. *J Pathol*, *216*, 262–70.

Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Critical Care (London, England)*, *7*(4), 315–323. http://doi.org/10.1186/cc2183

Traves SL, D. L. (2008). Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med.*, *8*, 416–26.

Trinchieri, G. (2007). Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine*, *00*(2), 239–243. http://doi.org/10.1084/jem.20070104

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., Madan, R., … Karp, C. L. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, *457*(7229), 585–589. http://doi.org/10.1038/nature07548

Trotta, A., Mercogliano, M. F., Pozner, R. G., Schillaci, R., Elizalde, P. V, Guillermo, H., … Barrionuevo, P. (2016). Inhibition of MHC-I by Brucella abortus is an early event during infection and involves EGFR pathway, (August). http://doi.org/10.1038/icb.2016.111

Tsay, C. J. (2013). Julius Wagner-Jauregg and the legacy of malarial therapy for the treatment of general paresis of the insane. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *86*(2), 245–254.

Turner, A. K., Begon, M., Jackson, J. A., Bradley, J. E., & Paterson, S. (2011). Genetic diversity in cytokines associated with immune variation and resistance to multiple pathogens in a natural rodent population. *PLoS Genetics*, *7*(10). http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002343

Valdivia, R. H., Hromockyj, a E., Monack, D., Ramakrishnan, L., & Falkow, S. (1996). Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*, *173*, 47–52. http://doi.org/0378111995007067 [pii]

Van Blijswijk, J., Schraml, B. U., & Sousa, C. R. e. (2013). Advantages and limitations of mouse models to deplete dendritic cells. *European Journal of Immunology*.

van der Laan, L. J., Döpp, E. a, Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., … Kraal, G. (1999). Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(22), 939–947.

van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*, *374*(9700), 1543–1556. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4

Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., & Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell*, *71*(7), 1205–1214.

Van Rooijen, N., Kors, N., & Kraal, G. (1989). Macrophage Subset Repopulation in the Spleen: Differential Kinetics After Liposome-Mediated Elimination. *Journal of Leukocyte Biology*, *45*, 97–104.

Vanhamme, L., & Pays, E. (2004). The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness, *34*, 887–898. http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.008

Vitry, M. A., Mambres, D. H., Deghelt, M., Hack, K., Machelart, A., Lhomme, F., … Muraille, E. (2014). Brucella melitensis invades murine erythrocytes during infection. *Infection and Immunity*, *82*(9), 3927–3938. http://doi.org/10.1128/IAI.01779-14

Vitry, M. A., Trez, C. De, Goriely, S., Dumoutier, L., Akira, S., Ryffel, B., … Murailleg, E. (2012). Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of cd8+ t cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of Brucella melitensis infection in mice. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4271–4280. http://doi.org/10.1128/IAI.00761-12

Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., De Trez, C., Akira, S., Ryffel, B., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2014). Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with Brucella melitensis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*, 3740–52. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1302561

Von Bargen, K., Gagnaire, A., Arce-Gorvel, V., De Bovis, B., Baudimont, F., Chasson, L., … Gorvel, J. P. (2015). Cervical lymph nodes as a selective niche for brucella during oral infections. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–26. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0121790

Wang, J.-Y. (2013). The innate immune response in house dust mite-induced allergic inflammation. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *5*(2), 68–74. http://doi.org/10.4168/aair.2013.5.2.68

Weatherall, D. J., & Clegg, J. B. (2002). Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes and Immunity*, *3*, 331–337. http://doi.org/10.1038/sj.gene.6363878

Webb, D. C., McKenzie, a N., Koskinen, a M., Yang, M., Mattes, J., & Foster, P. S. (2000). Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *Journal of Immunology*, *165*(1), 108–113. http://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.108

Welsh, & Selin. (2002). No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*, *2*, 417–26.

Woolhouse, M. E., Dye, C., Etard, J. F., Smith, T., Charlwood, J. D., Garnett, G. P., … Anderson, R. M. (1997). Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(1), 338–342. http://doi.org/10.1073/pnas.94.1.338

Xavier, M. N., Winter, M. G., Spees, A. M., Den Hartigh, A. B., Nguyen, K., Roux, C. M., … Tsolis, R. M. (2013). PPAR??-mediated increase in glucose availability sustains chronic brucella abortus infection in alternatively activated macrophages. *Cell Host and Microbe*, *14*(2), 159–170. http://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.009

Xavier, M. N., Winter, M. G., Spees, A. M., Nguyen, K., Atluri, V. L., Silva, T. M. A., … Tsolis, R. M. (2013). CD4+ T Cell-derived IL-10 Promotes Brucella abortus Persistence via Modulation of Macrophage Function. *PLoS Pathogens*, *9*(6). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003454

Yilmaz, B., Portugal, S., Tran, T. M., Gozzelino, R., Ramos, S., Gomes, J., … Soares, M. P. (2014). Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, *159*(6), 1277–1289. http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.053

Yingst, S. L., Huzella, L. M., Chuvala, L., & Wolcott, M. (2010). A rhesus macaque (Macaca mulatta) model of aerosol-exposure brucellosis (Brucella suis): Pathology and diagnostic implications. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(6), 724–730. http://doi.org/10.1099/jmm.0.017285-0

Yumuk, Z., Ozdemirci, S., Erden, B. F., & Dundar, V. (2001). The effect of long-term ethanol feeding on Brucella melitensis infection of rats. *Alcohol Alcohol.*, *36*(4), 314–317. http://doi.org/10.1093/alcalc/36.4.314

Zeng, M. Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, H. S., Cascalho, M., … Núñez, G. (2016). Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity*, *44*(3), 647–658. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006

Zevit, N., Balicer, R. D., Cohen, H. A., Karsh, D., Niv, Y., & Shamir, R. (2012). Inverse Association Between Helicobacter pylori and Pediatric Asthma in a High-Prevalence Population. *Helicobacter*, *17*(1), 30–35. http://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00895.x

Zhang, A. J. X., To, K. K. W., Li, C., Lau, C. C. Y., Poon, V. K. M., Chan, C. C. S., … Yuen, K. Y. (2013). Leptin mediates the pathogenesis of severe 2009 pandemic influenza

A(H1N1) infection associated with cytokine dysregulation in mice with diet-induced obesity. *Journal of Infectious Diseases*, *207*(8), 1270–1280. http://doi.org/10.1093/infdis/jit031

Zhao, J., Lv, Z., Wang, F., & Wei, J. (2013). Ym1 , an eosinophilic chemotactic factor , participates in the brain inflammation induced by Angiostrongylus cantonensis in mice, 2689–2695. http://doi.org/10.1007/s00436-013-3436-x

Zimmermann, N., Mishra, A., King, N. E., Fulkerson, P. C., Doepker, M. P., Nikolaidis, N. M., … Rothenberg, M. E. (2004). Transcript signatures in experimental asthma: identification of STAT6-dependent and -independent pathways. *Journal of Immunology*, *172*(3), 1815–1824. http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1815

Zuniga, E., Acosta-Rodriguez, E., Merino, M. C., Montes, C., & Gruppi, A. (2005). Depletion of immature B cells during Trypanosoma cruzi infection: Involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. *European Journal of Immunology*, *35*(6), 1849–1858. http://doi.org/10.1002/eji.200526005