



UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS  
TOURS

École Doctorale: Santé, Sciences, et Technologies

Année Universitaire : 2007-2008



THESE pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**David M. FOUREAU**

Le 23 juin 2008

Mécanismes cellulaires et moléculaires TLR9-dépendants  
activés par *Toxoplasma gondii* dans le système lymphoïde  
associé à la muqueuse intestinale

---

Directeur de thèse

**Madame Dominique BUZONI-GATEL**

**JURY**

|                       |                  |                          |                                        |
|-----------------------|------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| <b>BUZONI-GATEL</b>   | <b>Dominique</b> | Directeur de recherche   | INRA, Tours                            |
| <b>BROSSIER</b>       | <b>Fabien</b>    | Chargé de recherche      | INRA, Tours                            |
| <b>DIMIER-POISSON</b> | <b>Isabelle</b>  | Professeur               | Université François<br>Rabelais, Tours |
| <b>DUBOIS</b>         | <b>Bertrand</b>  | Chargé de recherche      | INSERM U851, Lyon                      |
| <b>RYFFEL</b>         | <b>Bernhard</b>  | Directeur de recherche   | CNRS, Orléans                          |
| <b>WINTER</b>         | <b>Nathalie</b>  | Chargé de recherche, HDR | Institut Pasteur, Paris                |





## REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail : Madame Isabelle Dimier-Poisson qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Madame Nathalie Winter et Madame Dimier-Poisson qui ont bien voulu mobiliser leur temps et leurs compétences pour être rapporteurs de ce travail. Monsieur Bertrand Dubois et Monsieur Fabien Brossier qui ont accepté d'y porter un regard critique. Madame Dominique Buzoni-Gatel et Monsieur Lloyd Kasper ont assuré la direction de ces recherches avec beaucoup d'attention et d'efficacité. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude et ma profonde estime.

Ce travail de thèse a pu aboutir dans les meilleures conditions grâce au talent de Dominique. Malgré la distance, ses conseils, ses critiques et son soutien m'ont guidé au-delà des difficultés rencontrées. Son dévouement sans limites, les innombrables heures passées à analyser mes énormes fichiers Powerpoint, résumant souvent trop de résultats en une seule fois, et à corriger mes écrits. Merci d'avoir eu confiance en moi Dominique et pour toute l'aide que tu m'as apporté.

Thank you Lloyd for giving me the opportunity to work on my PhD in your lab. The past 3 years taught me so much. I will probably keep in mind for a long time the first question you've asked me when I arrived in the lab : "ok so what do you want to work on for the next 3 years?". You have always kept an eye on my work, and helped me to put all the time my results in perspective ("what next?"). On a personal level, thank you for your understanding and moral support. Thank you boss.

Je tiens également à remercier Jacques Louis pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire et de pouvoir passer quelques semaines autours avec Dominique chaque année, et de me rapprocher de ma famille et de mes amis Français. Merci à Sylvie Darche pour les précieux conseils techniques sans lesquels je n'aurais pu démarrer cette thèse et pour mon baptême de grattage d'intestin. Merci à Catherine Werts pour son énergie communicative et ses précieux conseils.

Thanks to all of you guys either from the "Toxo team" or the "IML team". It has been a great experience to work with you, to learn from you and to laugh so much. Thank you a lot Dan, you have been so helpful and a true friend since I moved in Hanover, I hope you will not miss my daily "Dan ! I have a question for you". Thank you Laurence, Laurie, Rachel, Franck, Sakhina for all your advices and your help when I needed some extra hands. Thank you John to have been able to work with a cheese eater surrender monkey.

Un grand merci enfin à ma famille qui a toujours été présente lors des moments difficiles. Thanks to the Hanover family, I already miss our Wednesday night at the 5'olde. And thank you a lot Anna for sharing my dreams and your precious support.

Ce travail de thèse a été réalisé au département de microbiologie et Immunology à Dartmouth Medical School (Lebanon, New Hampshire, USA) dans le laboratoire du professeur Lloyd Kasper, et au département de parasitologie à l'institut Pasteur de Paris dans le laboratoire du professeur Jacques Louis.

## **Mécanismes cellulaires et moléculaires TLR9-dépendants activés par *Toxoplasma gondii* dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale.**

Lors de l'infection orale par le parasite *T. gondii*, la réponse immunitaire intestinale fait intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires initiateurs de l'inflammation servant à combattre l'infection. Cette réponse inflammatoire requiert l'intervention de mécanismes immuno-régulateurs pour permettre le maintien de l'homéostasie intestinale.

Nous avons étudié le rôle du TLR9 dans l'initiation de la réponse immunitaire à *T. gondii*. Ce récepteur de l'immunité innée est largement distribué dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale, à la fois par les cellules constituant la barrière épithéliale et dans la *lamina propria*. L'expression du TLR9 est requise dans ces différents compartiments pour initier une réponse immunitaire protectrice contre l'infection par *T. gondii*. L'activation des voies de signalisation du TLR9, par la reconnaissance directe de motifs moléculaires exprimés par *T. gondii*, induit la production d'interférons (IFNs) de type I  $\alpha$  et  $\beta$  dans l'intestin grêle des souris infectées. Ces cytokines stimulent la production de Cryptdines (Crp-3 et -5) par les cellules de Paneth et leur libération dans la lumière intestinale. Au-delà de leur activité antimicrobienne, les Crps participent au recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteurs d'IFN- $\gamma$  en renforçant la production de chimiokines inflammatoires comme CCL2, CCL3 et CCL5. Dans la *lamina propria*, les cellules dendritiques initient la réponse inflammatoire au parasite par des mécanismes TLR9-dépendants. L'engagement de ce récepteur par *T. gondii* polarise la réponse immunitaire au parasite, induite par les cellules dendritiques, vers un profil Th1.

Les lymphocytes B, bien qu'exprimant le TLR9, ne participent pas à l'initiation de la réponse inflammatoire à *T. gondii*. En revanche consécutivement à l'infection orale par le parasite, les cellules B activées amplifient d'une part le recrutement de cellules T CD4<sup>+</sup> dans la *lamina propria* par la production de la chimiokine CCL3. D'autre part renforcent la production de la cytokine inflammatoire IFN- $\gamma$ , par les cellules T effectrices, par des interactions de contact faisant intervenir leur TNF- $\alpha$  membranaire. La réponse immunitaire à *T. gondii* dégénère chez les souris C57BL/6 en iléite létale. Les lymphocytes T régulateurs sont naturellement générés au cours de l'infection. La sensibilisation des cellules T regs par des antigènes de *T. gondii*, préalablement à l'infection par le parasite, protège dans notre modèle de la génération de l'iléite. Les T regs sensibilisés ont une expression renforcée des marqueurs de domiciliation intestinale CCR5 et  $\alpha 4\beta 7$ . Ils rééquilibrent la balance cytokinique dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale des souris infectées en limitant la production de cytokines Th1 par les lymphocytes purifiés de la *lamina propria* et renforçant leur production de cytokines Th2 et Th3.

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b>                                                             | <b>1</b>  |
| <b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                                             | <b>3</b>  |
| <hr/>                                                                                    |           |
| <b>CHAPITRE 1 : L'INTESTIN GRELE</b>                                                     | <b>4</b>  |
| <b>1.1. La muqueuse intestinale</b>                                                      | <b>5</b>  |
| 1.1.1. L'épithélium intestinal                                                           | 5         |
| 1.1.2. Le chorion où <i>lamina propria</i>                                               | 6         |
| 1.1.3. La <i>muscularis mucosae</i>                                                      | 7         |
| <b>1.2. La sous muqueuse</b>                                                             | <b>8</b>  |
| <b>1.3. La musculaire externe</b>                                                        | <b>9</b>  |
| <b>1.4. La séreuse ou <i>adventitia</i></b>                                              | <b>9</b>  |
| <b>CHAPITRE 2 : ORGANISATIONS DU TISSU LYMPHOÏDE MUQUEUX ASSOCIE A L'INTESTIN (GALT)</b> | <b>10</b> |
| <b>2.1. Les sites inducteurs de la réponse immunitaire de l'intestin</b>                 | <b>11</b> |
| 2.1.1. Les plaques de Peyer                                                              | 11        |
| 2.1.2. Les ganglions mésentériques                                                       | 12        |
| <b>2.2. Les sites effecteurs de la réponse immunitaire de l'intestin</b>                 | <b>14</b> |
| 2.2.1. Les cellules épithéliales                                                         | 14        |
| 2.2.1.1. La barrière physique épithéliale                                                | 14        |
| 2.2.1.2. Agents microbicides et antiviraux sécrétés                                      | 15        |
| 2.2.1.3. Les défensines                                                                  | 18        |
| 2.2.1.4. Les molécules d'adhésion cellulaire                                             | 21        |
| 2.2.1.5. Les molécules de présentation antigénique                                       | 23        |
| 2.2.1.6. Les molécules de costimulation lymphocytaire                                    | 24        |
| 2.2.1.7. Cytokines produites par les cellules épithéliales de l'intestin                 | 26        |
| 2.2.1.8. Récepteurs aux cytokines et immunoglobuline                                     | 28        |
| 2.2.1.9. Les chimiokines                                                                 | 29        |
| 2.2.2. Les Lymphocytes Intra-Épithéliaux (LIE)                                           | 31        |
| 2.2.3. La <i>lamina propria</i>                                                          | 32        |
| 2.2.3.1. Les cellules dendritiques                                                       | 32        |
| 2.2.3.2. Les macrophages                                                                 | 35        |
| 2.2.3.3. Les lymphocytes B                                                               | 35        |
| 2.2.3.4. Les lymphocytes T                                                               | 36        |
| 2.2.3.5. Les cellules T régulatrices (Tregs)                                             | 39        |
| 2.2.3.6. Les cellules NK et NK-T                                                         | 41        |
| <b>2.3. Conclusion : structure et fonctions du GALT</b>                                  | <b>43</b> |

## **CHAPITRE 3 : TOLL-LIKE RECEPTEUR-9 ET INTERFERONS DE TYPE I** **44**

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1. La famille des Toll-Like Récepteurs (TLRs)</b>                                      | <b>44</b> |
| 3.1.1. Rôle des TLRs dans la reconnaissance de composants microbiens                        | 45        |
| 3.1.2. Distribution cellulaire des TLRs                                                     | 52        |
| 3.1.3. Régulation de l'expression des TLRs                                                  | 52        |
| <b>3.2. Voies de signalisation des Toll-Like Récepteurs</b>                                 | <b>54</b> |
| 3.2.1. La cascade de signalisation induite par les TLRs                                     | 54        |
| 3.2.2. Molécules adaptatrices de la signalisation TLR                                       | 56        |
| 3.2.3. Facteurs de transcription activés par les voies de signalisation TLRs                | 57        |
| <b>3.3. Les Interférons de type I et leur récepteur</b>                                     | <b>61</b> |
| 3.3.1. La famille des IFNs de type I                                                        | 62        |
| 3.3.2. Le récepteur IFNAR                                                                   | 63        |
| 3.3.3. Mécanismes d'actions anti-microbiennes des IFNs                                      | 64        |
| <b>3.4. Conclusion : origine des IFNs de type I et modulation de la réponse immunitaire</b> | <b>65</b> |

## **CHAPITRE 4 : LES MECANISMES DE LA REPOSE IMMUNITAIRE CONTRE TOXOPLASMA GONDII** **66**

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.1. Cycles infectieux de <i>T. gondii</i></b>                                             | <b>67</b> |
| <b>4.2. Les Différentes souches de <i>T. gondii</i></b>                                       | <b>70</b> |
| 4.2.1. Génotype de <i>T. gondii</i> et virulence                                              | 70        |
| 4.2.2. Migration de <i>T. gondii</i> et virulence                                             | 71        |
| 4.2.3. Multiplication intracellulaire de <i>T. gondii</i> et virulence                        | 71        |
| <b>4.3. L'immunité anti-toxoplasmique</b>                                                     | <b>71</b> |
| 4.3.1. Mécanismes innés de la réponse immunitaire à <i>T. gondii</i>                          | 72        |
| 4.3.2. Mécanismes adaptatifs de la réponse immunitaire à <i>T. gondii</i>                     | 74        |
| 4.3.2.1. Mécanismes adaptatifs pro inflammatoires induits par le toxoplasme                   | 74        |
| 4.3.2.2. L'infection orale par le toxoplasme induit une iléite fatale chez les souris C57BL/6 | 75        |
| 4.3.2.3. Mécanismes régulateurs de la réponse immunitaire à <i>T. gondii</i>                  | 76        |
| <b>4.4. Conclusion : immunité anti-toxoplasmique et conséquences</b>                          | <b>77</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESULTATS</b>                                                                                                                                                                                                                   | <b>78</b>  |
| <b>BUT DES ETUDES REALISEES</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>79</b>  |
| <b>1. ARTICLE 1 : le TLR9 est nécessaire à la réponse du tissu lymphoïde associé à l'intestin lors de l'infection par <i>Toxoplasma gondii</i></b>                                                                                 | <b>81</b>  |
| 1.1. Le TLR9 exprimé par les cellules épithéliales de l'intestin et dans la <i>lamina propria</i> , est requis pour l'initiation d'une réponse pro inflammatoire contre <i>Toxoplasma gondii</i>                                   | 82         |
| 1.2. Les cellules dendritiques de la <i>lamina propria</i> expriment TLR9 et orientent la réponse adaptative à <i>T. gondii</i> vers un type Th1                                                                                   | 83         |
| 1.3. L'activation des voies de signalisation TLR9 lors de l'infection par <i>T. gondii</i> génère la production d'Interférons (IFNs) de type I                                                                                     | 89         |
| <u>Article</u> : TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of <i>Toxoplasma gondii</i>                                                                                             | 94         |
| <b>2. ARTICLE 2 : <i>Toxoplasma gondii</i> induit la production d'alpha-défensines (ou cryptdines) par des mécanismes TLR9-dépendants</b>                                                                                          | <b>103</b> |
| 2.1. Le toxoplasme augmente la production et induit la sécrétion de cryptdines chez la souris                                                                                                                                      | 103        |
| 2.2. Les cryptdines produites en réponse à l'infection par <i>T. gondii</i> ont une activité anti-parasitaire lors des phases précoces de l'infection, mais ne contribuent pas au déclenchement de l'iléite létale par le parasite | 108        |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3. <i>Toxoplasma gondii</i> induit la production et la sécrétion de cryptdines chez la souris par des mécanismes TLR9-dépendant, via la production d'IFNs de type I                                      | 110 |
| <u>Article</u> : TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by <i>Toxoplasma gondii</i> .                                                                                                      | 112 |
| 3. ARTICLE 3 : les cellules B amplifient la réponse pro inflammatoire des cellules T en réponse à l'infection par <i>Toxoplasma gondii</i>                                                                 | 147 |
| 3.1. Les cellules B matures, générées dans la rate et les ganglions mésentériques lors de l'infection par <i>Toxoplasma gondii</i> , activent la production d'IFN- $\gamma$ par les cellules T effectrices | 148 |
| 3.2. L'activation des cellules T effectrices par les cellules B matures requiert un contact direct entre les deux types cellulaires                                                                        | 150 |
| 3.3. Les cellules B matures stimulent la réponse pro inflammatoire par la production de TNF- $\alpha$ et de CCL3                                                                                           | 154 |
| <u>Article</u> : B cells amplify IFN- $\gamma$ production by T cells via a TNF- $\alpha$ mediated mechanism                                                                                                | 112 |
| 4. Résultats complémentaires: les cellules T régulatrices (CD4+, CD25+, FoxP3+) régulent la réponse inflammatoire des souris C57BL/6 oralement infectées par <i>T. gondii</i>                              | 166 |
| 4.1. Les cellules T régulatrices sensibilisées générées lors de l'infection par <i>T. gondii</i> protègent les souris contre l'iléite                                                                      | 167 |

|                                                                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.2. Les cellules T régulatrices sensibilisées expriment des marqueurs de trafic intestinal et produisent de l'IL-10 et du TGF-<math>\beta</math></b> | <b>181</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

---

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> | <b>188</b> |
|------------------------------------|------------|

|                                                                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1- Initiation de la réponse immunitaire contre <i>T. gondii</i> par TLR9</b>                                   | <b>189</b> |
| <b>2- Amplification de la réponse inflammatoire par les cellules B et activité immuno-régulatrices des T regs</b> | <b>198</b> |

---

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> | <b>198</b> |
|----------------------|------------|



## INTRODUCTION GENERALE

La muqueuse intestinale fournit à la fois une barrière physiologique et immunologique contre une grande variété d'éléments antigéniques d'origine microbienne ou alimentaire. Malgré la stimulation antigénique permanente du système immunitaire intestinal, la réponse immunologique est généralement homéostatique et conduit à un état de tolérance.

L'infection par le parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est asymptomatique chez les personnes immunocompétentes, mais génère des troubles neurologiques graves voir létaux chez un hôte immunodéprimé. La route naturelle d'infection par *T. gondii* passe par l'ingestion de kystes contenus dans de la viande crue ou mal cuite, ou par la contamination féco-orale par des oocystes présents dans les excréments de chats. L'intestin constitue donc un point d'entrée de ce parasite chez son hôte. Des études réalisées sur des modèles murins ont montré que *T. gondii* infecte la muqueuse intestinale en pénétrant directement dans les cellules épithéliales de l'intestin, puis initie sa dissémination dans l'organisme grâce aux cellules dendritiques (CD11c+) de la *lamina propria* qui le véhiculent.

La réponse immunitaire systémique, ou locale dans l'intestin, de souris oralement infectées par *T. gondii* a été intensivement étudiée. Elle se caractérise par la production de médiateurs inflammatoires (chimiokines, IFN- $\gamma$ , oxyde nitrique), tuant le parasite ou provoquant son enkystement. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire au toxoplasme n'ont cependant pas encore été totalement élucidés. Les récepteurs Toll-like (TLRs) sont des senseurs microbiens largement distribués dans l'intestin grêle, à la fois dans les cellules de la barrière épithéliale et de la *lamina propria*. L'inactivation des voies de signalisation des TLRs rend les souris incapables de contrôler l'infection par *T. gondii*, ce qui indique un rôle prépondérant de ces récepteurs dans la reconnaissance du parasite. Nous décrirons dans ce manuscrit les mécanismes moléculaires et cellulaires TLR9-dépendants, requis pour initier la réponse immunitaire intestinale au toxoplasme.

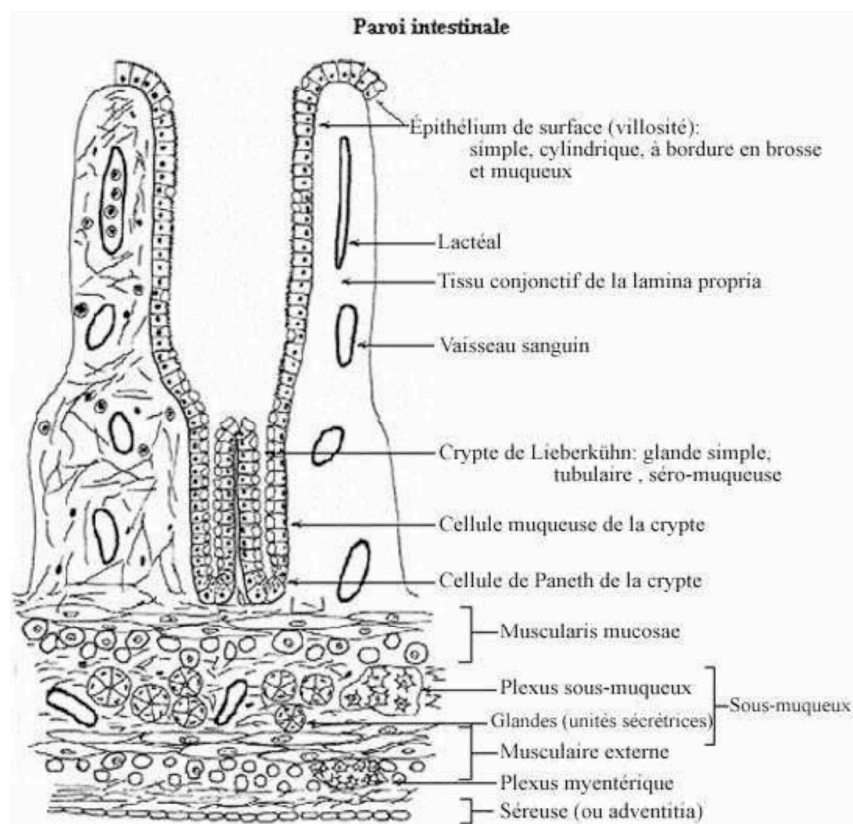
Quand un déséquilibre apparaît dans la régulation de la réponse immunitaire, les fonctions de la barrière intestinale sont alors modifiées, conduisant au développement de maladies inflammatoires de l'intestin. Les souris C57BL/6 infectées oralement par *T. gondii* ne parviennent pas à contrôler la réponse immunitaire intestinale contre le toxoplasme et développent une iléite létale. Cette pathologie, présentant des caractéristiques histologiques communes aux maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme, se caractérise par un recrutement massif de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  dans la *lamina propria* entraînant une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale. C'est dans ce modèle d'inflammation aiguë de l'intestin, induite par le pathogène *T. gondii*, que nous étudierons la contribution des cellules B dans l'amplification de la réponse inflammatoire contre le parasite. La génération d'une iléite létale impliquant un défaut de régulation de la réponse immunitaire, il est important d'étudier la génération et la migration des populations cellulaires régulatrices dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale de souris infectées. Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous analyserons dans ce manuscrit la physiologie des cellules T régulatrices générées lors de l'infection orale par *T. gondii*.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE 1 : L'INTESTIN GRELE

L'intestin grêle s'étend du pylore de l'estomac au côlon. Il est composé de trois parties distinctes : le **duodénum**, segment initial de trajet horizontal chez l'homme, formant un angle droit descendant aboutissant au **jéjunum** puis à l'**iléum**, portions mobiles repliées en une quinzaine d'anses intestinales dans la cavité abdomino-pelvienne.

Les différentes parties de l'intestin grêle sont colonisés par une flore intestinale de composition variable en fonction des segments. Bien que l'intestin dans son ensemble présente de considérables variations de structure, la paroi du tube digestif garde cependant un plan d'organisation histologique conservé divisé en quatre couches principales : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculaire externe et la séreuse (figure 1).



*Figure 1 : organisation histologique de la paroi intestinale (Stevens, 1993).*

## 1.1. La muqueuse intestinale

La structure de l'intestin grêle reflète ses fonctions principales : la digestion de macromolécules alimentaires en éléments de faible poids moléculaire, suivie par leur absorption. La surface absorbante de l'intestin grêle est largement augmentée par des repliements complexes. La muqueuse intestinale est constituée d'une série successive de **villosités**, projections en doigts de gants d'environ 0,5 à 1 mm de long, chacune de ces villosités étant entourée d'étroites fosses appelées **cryptes de Lieberkühn**. La muqueuse intestinale se compose de trois couches : l'épithélium intestinal, la *lamina propria* et la *muscularis mucosae*.

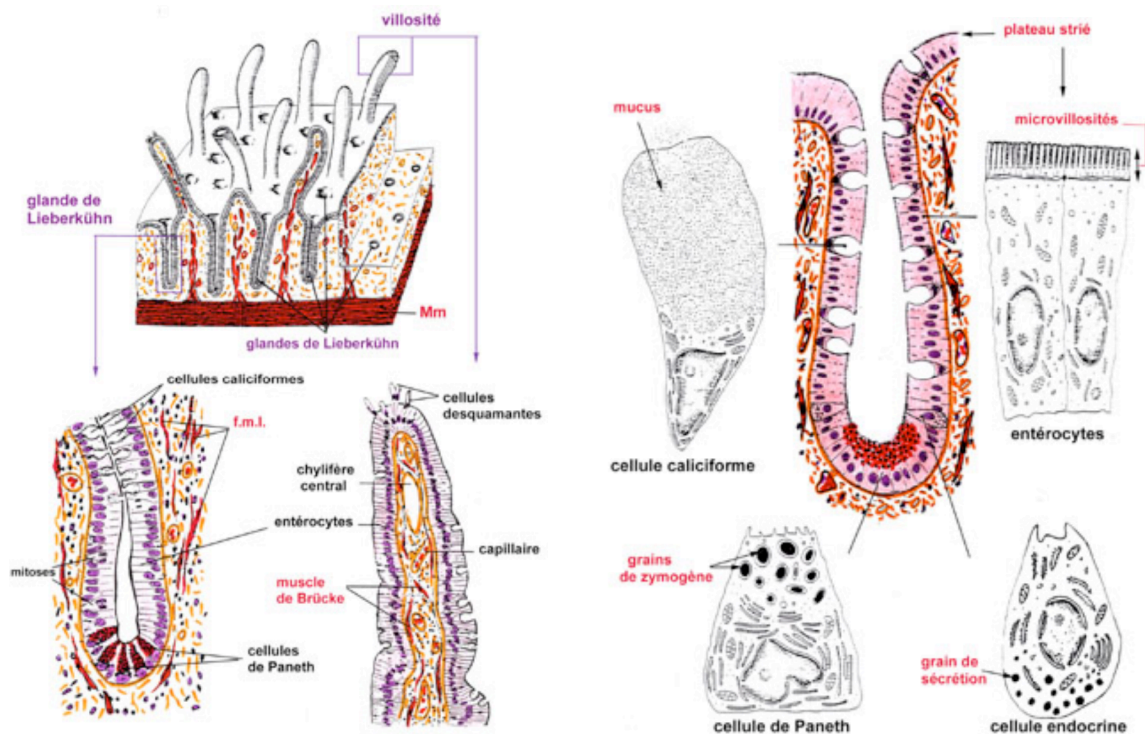
### 1.1.1. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est une monocouche de cellules non hématopoïétiques constituant une barrière physique et immunologique entre le milieu extérieur (le lumen) et le milieu interne de l'organisme (figure 2).

La surface épithéliale de chaque **villosité** est constituée en majorité d'**entérocytes** (50 à 100 par villosités). Ces cellules sont caractérisées par leur faculté d'absorption, liée à un repliement de leur surface apicale en microvillosités disposées parallèlement, de façon régulière et constituant un plateau strié visible en microscopie optique. Les entérocytes sont liés les uns aux autres par des filaments d'actine formant des jonctions serrées apicales. En raison de leur exposition permanente à la flore intestinale et aux antigènes alimentaires, les entérocytes se renouvellent rapidement (tous les 2 à 3 jours). Distribuées de façon sporadique au sein de la monocouche d'entérocytes, les **cellules de Goblet** ou cellules caliciformes contribuent par leur sécrétion de mucus à lubrifier la lumière intestinale. Le mucus constitue un maillage glycoprotéique, perméable aux macromolécules alimentaires, jouant un rôle essentiel dans la défense de l'organisme face aux bactéries entéropathogènes en limitant leur adhésion à la barrière entérocytaire.

La surface de l'épithélium intestinal s'invagine à la base des villosités pour former les **cryptes de Lieberkühn** renfermant peu ou pas de cellules absorbantes. La base des cryptes est composée de **cellules de Paneth**. Ces cellules sont distribuées de façon hétérogène dans l'intestin grêle, elles ont une faible fréquence (5 à 15 par cryptes) dans la portion initiale (duodénum et jéjunum) et sont plus fréquentes dans l'iléum (15 à 25 par cryptes). Les cellules de Paneth ont une forme pyramidale et ont un cytoplasme rempli de larges granules de sécrétion dans leur portion apicale. Elles sont spécialisées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens, majoritairement les alpha-défensines (ou **cryptdines**), pouvant être libérés dans le lumen en réponse à un stress microbien. Les cellules de Paneth ont un taux de renouvellement largement inférieur aux entérocytes (18 à 23 jours). Dispersées parmi les cellules de Paneth, les **cellules entéroendocrines** intestinales sécrètent des neuropeptides, notamment la sérotonine impliquée dans la motilité intestinale.

À la base des cellules de Paneth se trouvent les **cellules souches pluripotentes** (4 à 16 par cryptes) se multipliant activement. Ces cellules souches peuvent se différencier en chacune des espèces cellulaires non hématopoïétiques de l'épithélium intestinal et migrent vers l'axe cryptovillositaire. Lorsque l'épithélium est détruit par un pathogène ou plus généralement par une rupture de l'homéostasie intestinale, les cellules souches se multiplient pour remplacer les entérocytes endommagés et de ce fait la longueur des cryptes augmente.



**Figure 2 : morphologie et localisation des populations cellulaires formant l'épithélium intestinal (Vacheret N., UCB Lyon).**

### 1.1.2. Le chorion où *lamina propria*

La *lamina propria* est située en dessous de l'épithélium intestinal. Elle est constituée de tissu conjonctif : cellules conjonctives, fibres conjonctives et fibres élastiques. Elle est parcourue par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques permettant de nourrir les cellules épithéliales et de transporter les macromolécules alimentaires digérées (nutriments) et absorbées. La *lamina propria* contient également des cellules hématopoïétiques (lymphocytes, cellules présentatrice d'antigène), libres ou contenues dans des nodules lymphatiques, fournissant une ligne de défense contre les germes microbiens (et autres agents vecteurs de maladie) franchissant la barrière épithéliale.

Les nodules lymphatiques présents dans la *lamina propria* peuvent former après stimulation antigénique des agrégats appelés **plaques de Peyer**. Ces follicules sont composés d'un tissu conjonctif particulièrement riche en lymphocytes T, B, en plasmocytes et macrophages. Au centre des plaques de Peyer, une zone appelée **épithélium associé aux follicules lymphoïdes (FAE)**, est recouverte par un épithélium contenant des cellules entérocytaires spécialisées (**cellules M**). Ces cellules jouent un rôle important dans le passage de l'information antigénique aux structures immunitaires sous-jacentes et dans les maintiens de l'homéostasie intestinale.

### 1.1.3. La *muscularis mucosae*

La *muscularis mucosae* est constituée de deux couches minces de muscles lisses. Elle permet des mouvements localisés de la muqueuse intestinale et des villosités favorisant l'absorption des nutriments. Le plan musculaire le plus interne se compose de fibres musculaires disposées circulairement, le plan le plus externe est quant à lui composé de fibres musculaires longitudinales.

## 1.2. La sous muqueuse

La sous muqueuse contient des vaisseaux sanguins et des plexi nerveux appelés **plexi de Meissner**. Les fibres nerveuses se projettent dans la *muscularis mucosae* pour innerver ses deux couches de muscles lisses. La sous muqueuse du duodénum contient également des **glandes** tubulo-acineuses dite **de Brunner** traversant la *muscularis mucosae* pour sécréter du mucus et des bicarbonates, dans le lumen, servant à protéger l'épithélium intestinale contre l'environnement acide en sortie de l'estomac.



### 1.3. La musculaire externe

Comme la *muscularis mucosae*, **la musculaire externe** comprend deux plans de muscles lisses : un plan interne de fibres épaisses circulaires et un plan externe de fibres longitudinales. Ces deux plans de fibres musculaires induisent les mouvements péristaltiques de l'intestin grêle et sont séparés par le **plexi** nerveux d'**Auerbach**.

### 1.4. La séreuse ou *adventitia*

L'*adventitia* est la partie la plus externe de l'intestin grêle. Elle est constituée de plusieurs couches d'épithélium. À l'interface entre le tube digestif et la cavité péritonéale, l'*adventitia* est recouverte par un mésenchélium supporté par une fine couche de tissu conjonctif.

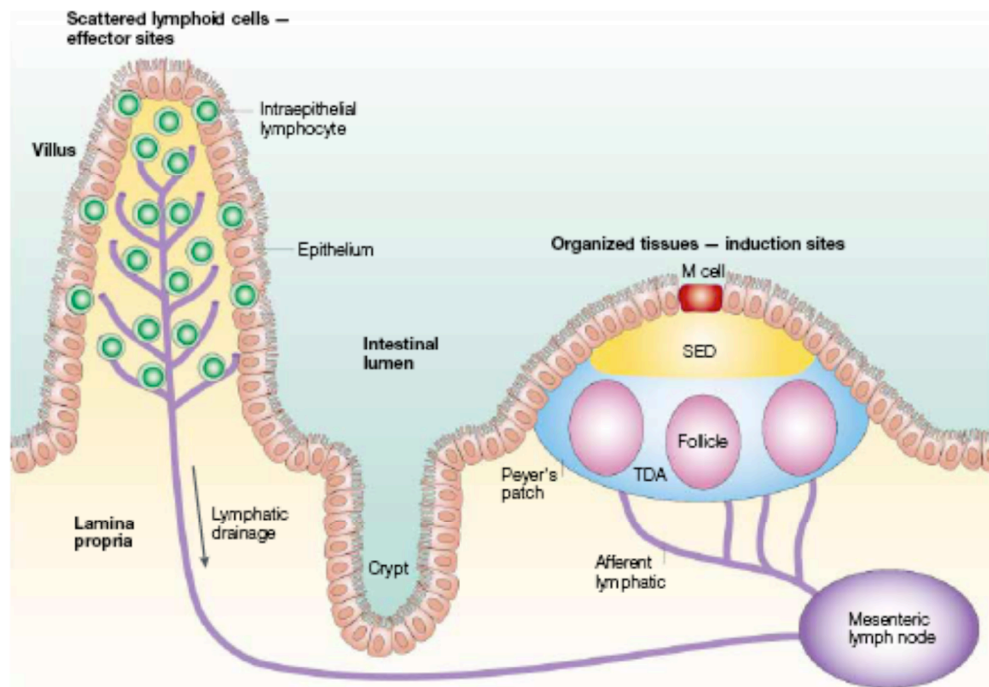
## CHAPITRE 2 : ORGANISATIONS DU TISSU LYMPHOÏDE MUQUEUX ASSOCIE A L'INTESTIN (GALT)

La muqueuse intestinale représente la plus importante surface de contact entre le monde extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. Cette large surface de contact, servant à optimiser l'absorption de macromolécules alimentaires, est par ailleurs exposée en permanence aux risques de l'environnement, les virus, les bactéries, les parasites et les toxines qui entrent en contact avec la muqueuse intestinale par le biais de l'alimentation. Qui plus est, le lumen abrite une flore intestinale endogène abondante ce qui implique la présence de mécanismes de défense capables de distinguer les germes pathogènes dangereux de la flore intestinale nécessaire aux fonctions du tube digestif.

La muqueuse intestinale comporte des éléments spécifiques et non spécifiques de défense contre les agents infectieux. Ces éléments s'ordonnent autour des entérocytes, qui occupent une position centrale, et concourent à sauvegarder l'intégrité de la barrière intestinale. Des tissus lymphoïdes organisés et la barrière épithéliale permettent le transport, l'internalisation et la présentation de l'antigène ainsi que l'expansion clonale de lymphocytes spécifiques.

Le **système lymphoïde muqueux associé à l'intestin (GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue)** est considéré comme le tissu central de la réponse immunitaire de la muqueuse de part sa masse, sa capacité à présenter les antigènes et à influencer le système immunitaire systémique. Le GALT est morphologiquement et fonctionnellement divisé en deux parties (figure 3) :

- Le **tissu lymphoïde organisé** composé par les **plaques de Peyer** et les **ganglions mésentériques** est le site inducteur de la réponse immunitaire.
- Le **tissu lymphoïde diffus** représenté par l'**épithélium intestinal** et la ***lamina propria*** est le site effecteur de la réponse immunitaire.



*Figure 3 : représentation schématique des éléments lymphoïdes composant le système immunitaire de l'intestin {Mowat, 2003}.*

## 2.1. Les sites inducteurs de la réponse immunitaire de l'intestin

### 2.1.1. Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont distribuées chez la souris tout au long de l'intestin grêle. Elles sont composées de trois éléments essentiels : les **follicules lymphoïdes B** (**centre germinatif**) séparés de la lumière intestinale par une simple couche de **cellules épithéliales associées aux follicules** (**F AE** – Follicle Associated Epithelium), ainsi qu'une zone plus diffuse située sous la barrière épithéliale appelée **dôme sub-épithélial** (**SED** – SubEpithelial Dome).

Le **F AE** diffère de l'épithélium des villosités par une faible sécrétion d'enzymes digestives et des cellules épithéliales ayant une bordure en brosse moins prononcée. Il est infiltré par un grand nombre de cellules B et T, de cellules dendritiques et de

macrophages. Au centre du FAE, les entérocytes se différencient en cellules spécialisées, les **cellules M** (Microfold), dépourvues de microvillosité à leur pôle apical et très invaginées à leur pôle basal. Les cellules M sont capables de transporter des bactéries commensales, par un transport vésiculaire transépithélial actif, du lumen vers les cellules lymphoïdes intraépithéliales et les tissus lymphoïdes organisés subépithéliaux.

Les **follicules B** sont entourés par une **zone** riche en cellules **T** (**TDA** – Thymus Dependant Area) dans laquelle les hautes cellules endothéliales des veines (**HEV** – High Endotelial Venule) servent de point d'entrée ou de sortie des cellules circulantes. Les plaques de Peyer ne possèdent pas de système lymphatique afférent, les déplacements cellulaires vers cet environnement lymphoépithélial s'effectuent par voie sanguine via la HEV.

Le **dôme subépithélial** est composé de lymphocytes T et B en constante interaction avec les cellules dendritiques. Cette région est un site privilégié à la fois pour l'initiation de réponses immunitaires adaptatives cellulaires (T) et humorales (B), mais aussi pour le maintien de l'homéostasie intestinale et la tolérisation du système immunitaire face à la flore intestinale endogène par exemple.

### 2.1.2. Les ganglions mésentériques

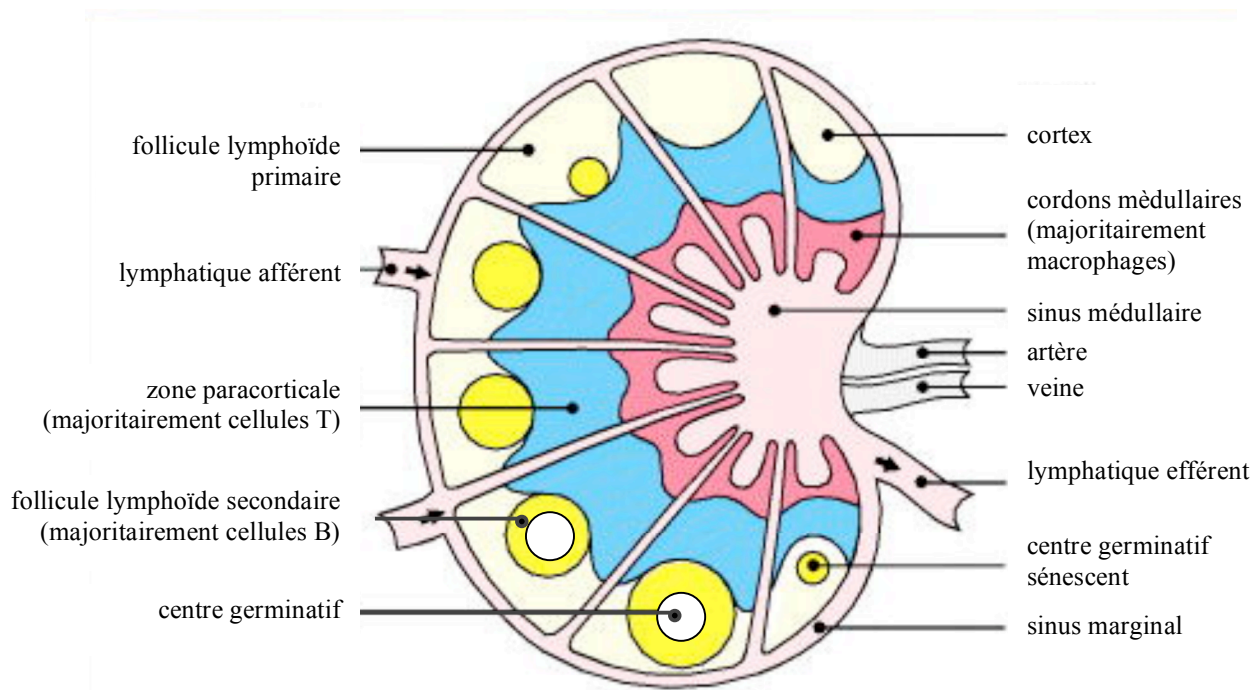
Les **ganglions mésentériques** (MLN – Mesenteric Lymph Nodes) représentent à la fois les plus grands ganglions lymphatiques de l'organisme et un site unique d'interaction entre le système immunitaire périphérique et le GALT. Ils sont constitués de trois régions principales : le **cortex**, le **paracortex** et la **médulla** (figure 4).

Le **cortex** contient des **follicules B**. De même que pour les plaques de Peyer, les follicules B peuvent évoluer en centres germinatifs où les lymphocytes B activées vont opérer une maturation pour produire des anticorps.

Le **paracortex** est majoritairement composé de **lymphocytes T** pouvant maturer en cellules T spécifiques lors de la présentation d'antigènes par des cellules dendritiques provenant de la *lamina propria*.

La **medulla** est irriguée par de larges vaisseaux sanguins. Elle est constituée de cellules présentatrices d'antigènes (**macrophages**, **cellules dendritique**) ainsi que de **plasmocytes**, cellules B activées ayant complété la maturation d'affinité de leurs anticorps et leur commutation de classe.

Les cellules B et T gagnent les MLN via les **HEV**. Les cellules dendritiques activées provenant de la *lamina propria* entrent dans les MLN par les **canaux lymphatiques afférents**. Une fois activés, les plasmocytes et les lymphocytes T quittent les MLN pour rejoindre le système immunitaire périphérique via des **canaux lymphatiques efférents**.



**Figure 4 : structure des ganglions mésentériques (Janeway).**

## 2.2. Les sites effecteurs de la réponse immunitaire de l'intestin

### 2.2.1. Les cellules épithéliales

Le tractus gastro-intestinal est délimité par une monocouche de cellules épithéliales. L'épithélium fournit à la fois une barrière physiologique et immunologique face à une grande variété de microorganismes et de substances étrangères. De manière générale, le GALT est homéostatique malgré une considérable charge antigénique contenue dans l'intestin. Les entérocytes contribuent au maintien d'un degré d'homéostasie suffisant pour minimiser les pertes de fluides et d'électrolytes dans le lumen. Les entérocytes disposent également de mécanismes spécifiques de défense permettant de réduire les risques d'infections par des agents pathogènes.

#### 2.2.1.1. La barrière physique épithéliale

Les entérocytes forment une barrière perméable et sélective permettant l'absorption des nutriments mais prévenant le passage incontrôlé d'antigènes provenant du milieu extérieur {Schneeberger, 1992}. L'interaction entre les différents entérocytes repose au pôle apical sur la formation de **jonctions serrées**. Il s'agit d'une succession étroite d'interactions entre deux cellules adjacentes médiées par des protéines transmembranaires, notamment l'**occludine** et la **claudine-1**, ancrées au cytosquelette {Farquhar, 1963} {Ando-Akatsuka, 1996} {Furuse, 1998}. Les pôles baso-latéraux des entérocytes sont liés par un réseau plus lâche de **desmosomes** et de **jonctions adhérentes** caractérisé également par des interactions homophiliques d'une protéine transmembranaire ancrée au cytosquelette : l'**E-cadhérine** {Horiguchi, 1994}.

La surface de l'épithélium intestinal est recouverte d'une couche de **mucus** sécrétées par les cellules de Goblet. Il s'agit d'un maillage glycoprotéique (mucines) hydraté, perméable aux nutriments mais limitant les interactions entre les cellules épithéliales et le contenu de la lumière intestinale. Les mucines peuvent de plus se fixer aux molécules

d'adhésion bactériennes empêchant leur contact avec la monocouche épithéliale {Specian, 1991}.

La barrière épithéliale repose sur la **lame basale**, une membrane constituée par un assemblage de protéines (laminines et collagène de type IV) et de glycoprotéines (héparane sulfate) sécrétées par les fibroblastes sous-jacents {Timpl, 1989}.

Les entérocytes sont renouvelés tous les deux à trois jours à partir des cellules souches épithéliales migrant vers l'extrémité des villosités. Les cellules de Paneth situées à la base des cryptes produisent les agents mitogènes nécessaires à la différenciation de ces cellules tel l'**EGF** (Epidermal Growth Factor), le **FGF** (Fibroblastic Growth Factor), l'**HGF** (Hepatocyte Growth Factor) {Dignass, 1994} {Dignass, 1994}. L'**ITF** (Intestinal Trefoil Factor) est produit par les entérocytes eux-mêmes et contribue à la migration des cellules épithéliale différenciées {Dignass, 1994}.

#### 2.2.1.2. Agents microbicides et antiviraux sécrétés

La barrière intestinale possède des mécanismes actifs de lutte contre les pathogènes provenant de la lumière intestinale par la production d'agents microbicides et antiviraux. Ainsi, la **lignée humaine entérocytaire** Caco-2 produit et sécrète des composants du complément tels que **C3**, **C4** et le **facteur B** {Andoh, 1993} {Moon, 1997}. La production de ces molécules a été confirmée *in vivo*, et est induite par plusieurs cytokines telles l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$ , de même que par le TGF- $\beta$  {Andoh, 1993} {Andoh, 1996}.

La dernière ligne de défense pour les cellules souches épithéliales est constituée par les cellules de Paneth. Lors de marquages histologiques (Hématoxyline & Éosine ou Phloxine-Tartrazine), les **cellules de Paneth (PCs – Paneth Cells)** apparaissent comme de larges cellules de forme pyramidale, granuleuses, agrégées à la base des cryptes de Lieberkühn {Clark, 1979}. Les granules observés sont des **vésicules de sécrétion cytoplasmiques** concentrées au pôle apical des cellules. Les PCs libèrent les vésicules de

sécrétion dans la lumière intestinale lors de **stress microbien**, de **stimulation hormonale**, **cholinergique** ou **cytokinique** :

- Chez la souris, **l'infection orale** par *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* ou *Giardia*, viables ou inactivées, induit la dégranulation des PCs. Il en est de même lors de traitements par des composants de membrane bactérienne, tels le LPS (LipoPolySaccharide), le LTA (Acide LiPoteichoïque), le Lipide A, le MDP (Muramyl DiPeptides) {Ayabe, 2000} , ou des CpG-ODNs injectés oralement ou de façon systémique (intra péritonéale, intra veineuse) {Rumio, 2004}.
- De plus, le processus de dégranulation des PCs peut être activé lors de prises alimentaires, et régulé par les **hormones gastro-intestinales**. Les vésicules cytoplasmique de sécrétion s'accumulent dans les PCs lors de période de jeun. Consécutivement aux prises alimentaires, il a été montré chez la souris que l'insuline et le glucagon inhibent le processus de dégranulation des PCs alors qu'une exposition prolongée à la cholecystokinine provoque l'effet inverse {Senegas-Balas, 1979}.
- Le **système nerveux parasympathique** peut également induire la sécrétion des granules cytoplasmiques de PCs. Des agonistes cholinergiques incluant le bethanechol, la pilocarpine et le carbamyl-choline active le processus de dégranulation, inhibé par l'atropine (antagoniste cholinergique) chez le rat et la souris {Ahonen, 1975}.
- Enfin, le processus d'exocytose des vésicules de sécrétion peut être initié chez le rat et la souris par l'injection systémique de **TNF- $\alpha$**  {Remick, 1987} ou d'**IFN- $\alpha$**  {Ozcan, 1996} supportant l'idée que les PCs répondent également à des signaux inflammatoires générés lors de processus infectieux.

Certains composants des vésicules cytoplasmiques ont été identifiés par immuno-histochimie et microscopie électronique (tableau 1). Il s'agit pour la plupart de substances **(poly)peptidiques** , telles des défensines, des lysozymes et la phospholipase A2 qui en affectant les parois microbiennes ont un rôle antimicrobien. D'autres substances antimicrobiennes ont été identifiées dans ces granules :



- Le SLPI (Secretory Leukocyte Inhibitor) et des Immunoglobulines A(IgA) peuvent fixer et bloquer des facteurs bactériens de virulence comme les pili d'adhésion ou les toxines {Bergenfeldt, 1996} {Satoh, 1986}.
- Le PAP (Pancreatitis-Associated protein), appartenant à la famille des lectines de type C, fixe les sucres des surfaces bactériennes et agit comme molécule opsonisante {Christa, 1996}.

| Molécule                                                        | Taille et activité                                                            | Espèces |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Défensines                                                      | ~ 3.5kDa ; microbicide ; induction de sécrétion de chlore par les entérocytes | H, S, R |
| Matrilysine (MMP-7)                                             | ~ 27kDa ; maturation des pro-défensines                                       | S       |
| Trypsin                                                         | ~ 24kDa ; maturation des pro-defensines                                       | H, R    |
| Ions métalliques lourds<br>(cadmium, cuivre,<br>sélénium, zinc) | Régulation de l'activité des métalloprotéines                                 | H, S, R |
| Prostaglandine E2                                               | Méiateur précoce de la réponse inflammatoire                                  | R       |
| TNF- $\alpha$                                                   | Cytokine pro inflammatoire                                                    | H, S    |
| Immunoglobuline A                                               | ~ 160kDa ; microbicide, neutralisation de toxines                             | H, R    |
| Lysozymes, phsopholipase<br>A2, SLPI                            | ~ 14.5kDa ; microbicide                                                       | H, S    |
| Phospholipase B                                                 | ~ 150kDa                                                                      | R       |
| DNAse I                                                         | ~ 30kDa                                                                       | H       |
| Échangeur anionique AE2                                         | ~ 140kDa ; échangeur d'ions chlore                                            | S       |
| Lamine récepteur                                                | ~ 67kDa                                                                       | H       |
| Rab3D                                                           | Régulateur des processus d'exocytose                                          | R       |
| Carboxylique ester<br>hydrolase                                 | ~ 100kDa                                                                      | H       |

**Tableau 1 : molécules contenues dans les vésicules de sécrétion des cellules de Paneth {Porter, 2002 modifié}. H : homme, S : souris, R : Rat.**

### 2.2.1.3. Les défensines

Chez les mammifères, les défensines constituent un groupe majeur de peptides antimicrobiens. Il s'agit de petits peptides cationiques contenant six cystéines formant des ponts disulfures intramoléculaires. Les défensines sont subdivisées en trois groupes :  **$\alpha$ -défensines**,  **$\beta$ -défensines** et  **$\theta$ -défensines**. Cette classification est basée sur le positionnement des ponts disulfures, des caractéristiques structurales de leurs gènes et précurseurs (tableau 2) {Ganz, 2003}. Chez la souris, les  $\alpha$ -défensines sont exclusivement exprimées dans le tractus digestif tandis que les  $\beta$ -défensines sont exprimées dans de multiples compartiments de l'organisme (épithélium muqueux, peau, épидидyme) {Salzman, 2007}.

|                      | Taille du<br>précurseur | Taille après<br>maturation                     | Cystéines<br>liées | Sites<br>d'expression                                   | Espèces |
|----------------------|-------------------------|------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------|---------|
| $\alpha$ -défensines | ~ 90-105 aa             | ~ 30-44 aa                                     | 1-6, 2-4, 3-5      | Cellules de<br>Paneth<br>Neutrophiles<br>Macrophages    | P, R    |
| $\beta$ -défensines  | ~ 60-70 aa              | ~ 36-44 aa                                     | 1-5, 2-4, 3-6      | Cellules<br>épithéliales<br>Neutrophiles<br>Macrophages | P, R    |
| $\theta$ -défensines | ~ 90 aa                 | ~ 18 aa<br>(2 héli-peptides<br>de 9 aa chacun) | 1-1', 2-3, 3'-2'   | Neutrophiles                                            | P*      |

**Tableau 2 : comparaisons des différentes défensines exprimées chez les mammifères {Salzman, 2007}. P : primates, R : rongeurs, P\* : primates non-humains.**

Les  $\alpha$ -défensines sont un composant clé des granules sécrétées par les PCs. À ce jour, six isoformes d' **$\alpha$ -défensines humaines** ont été identifiées, quatre exprimés par les neutrophiles : **HNP-1 à 4** (Human Neutrophile Peptides), et deux par les PCs : **HD-5 et 6**

(Human Defensin) {Ericksen, 2005}. Chez la **souris**, six isomères d' $\alpha$ -défensines (ou Cryptidines – Crp) ont été caractérisés: **Crp-1 à 6**, exclusivement produites par les cellules de Paneth voir les entérocytes pour Crp-4 (figure 5) {Ouellette, 2000}. Les  $\alpha$ -défensines produites par les PCs sont exprimées chez les souris axéniques et par les fœtus humains indiquant que leur expression ne nécessite pas la présence d'une flore microbienne intestinale {Putsep, 2000} {Mallow, 1996}. La transcription des  $\alpha$ -défensines produites par les PCs est dirigée en partie par des facteurs liés à la différenciation cellulaire tel Tcf-L2 (Transcription factor 7-like 2), autrement appelé TCF-4, régulé par la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine {Wehkamp, 2007}. Des études récentes montrent également que l'expression de NOD-2 (Nucleotide Oligomerisation Domaine -2) est requise pour la dégranulation des PCs et la modulation des Crps chez la souris, en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*, indiquant que d'autres voies de signalisation sont susceptibles de réguler la transcription des  $\alpha$ -défensines {Kobayashi, 2005}.



**Figure 5 : structures primaires des  $\alpha$ -défensines humaines (HNP) et cryptidins murines (Crps) {Ouellette, 2000 modifié}.**

Les  $\alpha$ -défensines sont initialement exprimées sous la forme de pré-propeptides de 90-100 acides aminés. Après le retrait d'une séquence signalale N-terminale, les propetptides des  $\alpha$ -défensines produites par les PCs requièrent l'action d'une endoprotéase pour leur transformation en peptides actifs. Cette étape de maturation marque une différence importante entre les primates et les rongeurs. La Matrice Métalloprotéase-7 (**MMP-7** ou

Matrylisin), une endoprotéase produite par les PCs chez la souris et le rat, est essentielle pour la maturation des pro-Crps en Crps actives {Wilson, 1999}. Pro-Crp-4 est clivé à son extrémité N-terminale à Ile-44 pour maturer en Crp-4 {Shirafuji, 2003}. Cependant, MMP-7 n'est pas exprimée par les PCs humaines. Chez l'homme et le macaque, l'endoprotéase responsable de la maturation des formes pro-peptidiques d' $\alpha$ -défensines est la **trypsine** {Ghosh, 2002}. Les propeptides d' $\alpha$ -défensines sont clivés à leur extrémité C-terminale à l'Arg-62 pour HD-5 et Arg-68 pour HD-6 {Porter, 1998} {Ghosh, 2002}. Les  $\alpha$ -défensines produites par les PCs humaines sont stockées dans les granules de sécrétion, sous la forme de propeptides, avec le trypsinogène. Après sécrétion dans le lumen, le trypsinogène est activé en trypsine pouvant transformer pro-HD-5 et pro-HD-6 en HD-5 et -6 {Cunliffe, 2001}. Chez la souris, les Crps sont stockées dans les vésicules de sécrétion sous leur forme mature puisqu'elles sont en contact avec MMP-7 avant leur libération dans le lumen {Ouellette, 2005}.

Les défensines ont une activité bactéricide contre les bactéries Gram + et Gram - ; certaines sont également actives contre certains *champignons*, virus et protozoaires {Lehrer, 1993} {Ganz, 2003}. Comme la plupart des peptides cationiques antimicrobiens, l'activité bactéricide des défensines est liée à la rupture de l'intégrité membranaire de la cible par le mécanisme appelé "**modèle de Shai-Matsuzaki-Hang**" {Zasloff, 2002}. Selon ce modèle, les défensines interagissent avec les charges négatives des groupes phospholipides des membranes des cellules cibles et s'accumulent sur la surface membranaire en repoussant les lipides. Cette accumulation affaiblit la membrane, en provoquant des tensions de la bicouche membranaire phospholipidique, puisque la surface du feuillet externe de la membrane augmente par rapport à celle du feuillet interne. Une transition de phase réduit ensuite ces tensions permettant de réorienter les peptides cationiques à travers la bicouche lipidique et de former des pores toroïdaux. Au fur et à mesure de l'avancement de ce processus, la membrane commence à se désintégrer en petites vésicules {Shai, 1999} {Matsuzaki, 1999}.

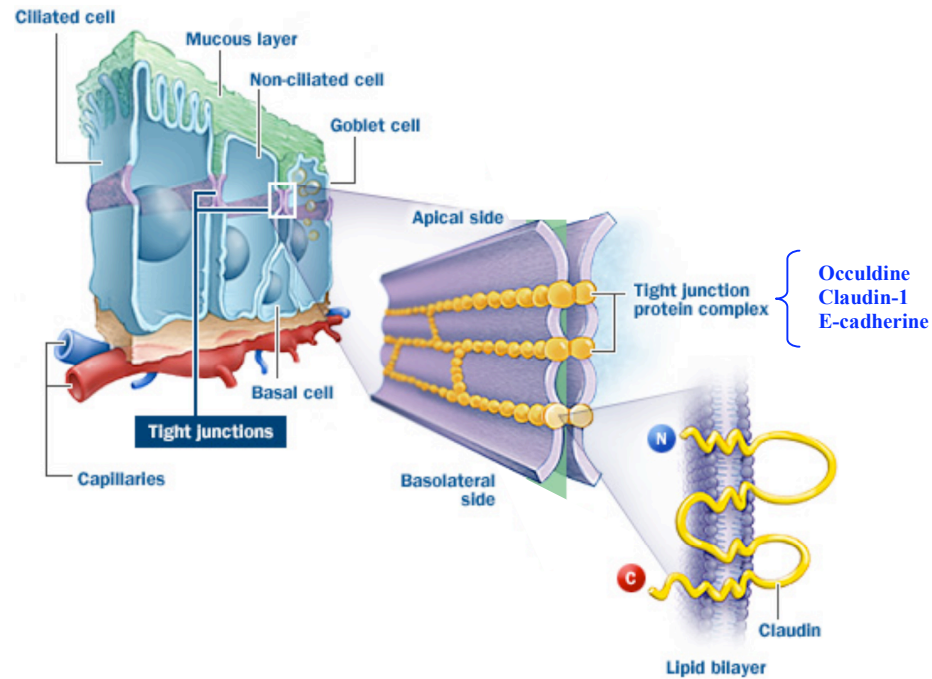
Au-delà de leur activité antimicrobienne, les défensines peuvent agir comme molécules de signalisation pour les cellules de l'hôte. Par exemple, HBD-1 et HBD-2 ont une

activité chimiotactique pour les cellules exprimant le récepteur de CCR-6 (telles les cellules dendritiques) {Yang, 1999}. Chez la souris Crp-2 et Crp-3 génèrent un efflux chlorique par les entérocytes {Lencer, 1997} {Yue, 2002}. Crp-3 induit également la sécrétion d'IL-8 (Interleukin-8 ou CXCL8) par la lignée cellulaire épithéliale humaine T84 {Lin, 2004}. Le rôle primordial des  $\alpha$ -défensines produites par les PCs dans la défense de l'organisme contre les pathogènes intestinaux a été mis en évidence *in vivo* dans des modèles murins. L'inactivation du gène codant pour MMP-7 bloque la maturation des pro-Crps en Crps. Les souris MMP-7<sup>-/-</sup> ne peuvent pas éliminer efficacement la bactérie non invasive *Escherichia coli* injectées oralement, et ont succombent rapidement lors de l'infection par une faible dose de la bactérie pathogène *Salmonella enterica* sérovar Thypimurium {Wilson, 1999}.

#### 2.2.1.4. Les molécules d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaires sont des protéines localisées à la surface des cellules épithéliales impliquées dans l'interaction avec la matrice extracellulaire et les cellules adjacentes.

Les cellules épithéliales sont liées entre elles par des jonctions serrées apicales, formées majoritairement par l'interaction entre protéines transmembranaires ancrées au cytosquelette : l'**occludine**, la **claudine-1** et l'**E-cadhérine** {Farquhar, 1963} {Ando-Akatsuka, 1996} {Furuse, 1998}. Les pôles basolatéraux des cellules épithéliales sont reliés entre eux par des jonctions plus lâches (jonctions adhérentes et desmosomes) d'**E-cadhérine** {Horiguchi, 1994}. L'**E-sélectine** (CD62E) exprimée par la face apicale des cellules épithéliales se lie aux mucines sécrétées par les cellules de Goblet retenant ainsi le maillage glycoprotéique externe {Koizumi, 1992}. L'expression d'intégrines par les cellules épithéliales permet leur rattachement à la membrane basale. Ainsi, l'**intégrine  $\alpha 2 \beta 1$**  se fixe à la laminine-1, -2, -5 et le collagène de type IV {Carloni, 1996} {Colognato, 1997} {Orian-Rousseau, 1998}, l'intégrine  **$\alpha 6 \beta 4$**  interagit avec la laminine-5 {Gil, 1994}.



**Figure 6 : localisation et organisation des jonctions serrées intercellulaires {Nastech Pharmaceutical company Inc., 2007 modifié}**

La barrière épithéliale développe par ailleurs des interactions avec les cellules hématopoïétiques contenues dans la *lamina propria* :

- Les cellules épithéliales expriment de façon constitutive la glycoprotéine **ICAM-1** (Intercellular Adhesion Molecule-1 ou CD54) pouvant interagir avec l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen-1 ou  $\alpha$ L $\beta$ 2). Bien que constitutive, l'expression d'ICAM-1 est renforcée par l'action de cytokines pro-inflammatoires : IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  {Kaiserlian, 1991} {Kvale, 1992} {Albelda, 1994}. L'augmentation d'expression d'ICAM-1 est corrélée à une liaison croissante des neutrophiles, macrophages, lymphocytes B et T {Simmons, 1995}.
- Au-delà de la formation des jonctions serrées et adhérentes, l'**E-cadhérine** peut interagir avec l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 exprimée par les cellules T CD8 $^{+}$  et CD4 $^{+}$  {Cepek, 1996}.

- Enfin, la glycoprotéine **BGP** (Biliary GlycoProtein ou CD66a) est un ligand de l'E-sélectine exprimée constitutivement par les cellules épithéliales {Stocks, 1996}. L'expression d'E-sélectine par les monocytes, les granulocytes et les lymphocytes T est induite par environnement pro inflammatoire (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) {Ruco, 1990} {Leeuwenberg, 1990}.

#### 2.2.1.5. Les molécules de présentation antigénique

La surface basolatérale de l'épithélium intestinal est directement en contact avec les cellules hematopoïétiques de la *lamina propria*. En plus du recrutement de ces cellules par les molécules d'adhésion qu'elles expriment, les cellules épithéliales possèdent à leur surface des molécules leur conférant des propriétés de **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)** capables de moduler la prolifération des lymphocytes, leur activité cytolytique et leur production de cytokines.

Les cellules épithéliales expriment à leur surface les molécules de présentation antigénique dites classiques : **CMH de classe I et II** (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) {Bland, 1988}. Ceci suggère que l'épithélium intestinal peut à la fois présenter des motifs antigéniques de source endogène (CMH-I) et exogène (CMH-II) au TCR de la population cellulaire T locale {Spencer, 1986}. Ainsi, des cellules épithéliales purifiées provenant de l'intestin grêle de la souris peuvent présenter *in vitro* l'antigène soluble KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) à un hybridome T (L3T4) CMH-II restreint, induisant la production d'IL-2 par ces cellules. Cette présentation antigénique est inhibée lors d'un traitement par un anticorps monoclonal anti-CMH-II {Kaiserlian, 1989}.

Les cellules épithéliales de l'intestin expriment également la molécule **CD1d** appartenant à la famille des **CMH de classe Ib** non classiques {Bleicher, 1990} {Campbell, 1999}. CD1d est capable de présenter des molécules glycolipidiques ou des peptides hydrophobiques aux cellules NK-T exprimant un TCR semi invariant contenant une chaîne V $\alpha$ 14 conservée {Porcelli, 1999}. Aucun ligand naturel de CD1d n'a été identifié

à ce jour, cependant un glycolipide provenant de l'éponge marine *Agielas mauritanus*, l' $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -GalactosylCeramide) permet d'étudier l'interaction entre CD1d et le TCR semi invariant des NK-Ts {Kawano, 1997}. Il a ainsi été montré que la présentation d' $\alpha$ -GalCer par CD1.1 active la prolifération des lymphocytes intra-épithéliaux CD8+ *in vivo* via la production d'IL-4 et d'IL-13 par les NKTs {Ueda, 2006}.

#### 2.2.1.6. Les molécules de costimulation lymphocytaire

L'activation antigène spécifique des cellules T CD4+ et CD8+ de la *lamina propria* par les cellules épithéliales de l'intestin module de manière significative la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale puisque dans ce contexte, les cellules T activées ont d'avantage une activité régulatrice que cytolytique.

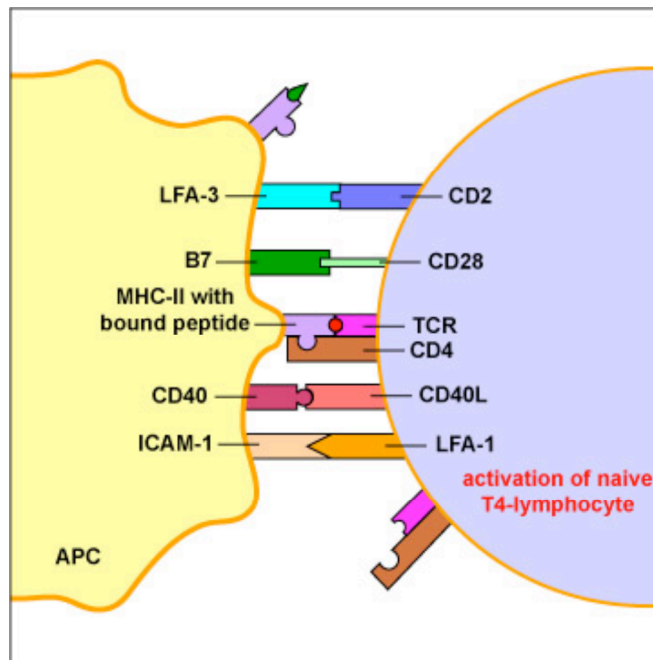
La glycoprotéine **gp180** (ou CD45), exprimées par les cellules épithéliales intestinales joue un rôle important dans l'activation des cellules T CD8+ {Canchis, 1993},. Des anticorps monoclonaux dirigés contre gp180 inhibent l'activation de la protéine-tyrosine kinase p56lck associée à la molécule CD8 lors de la présentation antigénique par CMH-I {Yio, 1997}. La molécule gp180, est une molécule costimulatrice se liant à CD8, et est requise pour l'activation antigène spécifique CMH-I-dépendante des cellules T CD8+ par les cellules épithéliales intestinales {Hoang, 1992} {Campbell, 2002}. Lors de la présentation d' $\alpha$ -GalCer par CD1.1, gp180 peut s'associer au complexe immunitaire  $\alpha$ -GalCer-CD1.1 et directement interagir avec le CD8 exprimé par les lymphocytes T intra-épithéliaux CD8+ induisant une réponse proliférative de ces cellules {Allez, 2002}.

**LFA-3** (Lymphocyte Function associated Antigen-3 ou CD58) est une glycoprotéine constitutivement exprimée par les cellules épithéliales de l'intestin chez l'homme (pas chez la souris) {Framson, 1999}, dont l'expression est augmentée par l'IFN- $\alpha$  {Upadhyaya, 1991}. LFA-3 contribue à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T intra-épithéliaux CD8+ et des lymphocytes T CD4+ de la *lamina propria*. La liaison avec son ligand CD2 pourrait permettre de stabiliser la synapse immunologique {Qiao, 1991} {Targan, 1995}.



Les entérocytes expriment la protéine membranaire **CD40**. Cette molécule de costimulation en se liant à son récepteur CD154 (ou CD40L), exprimé par les cellules T, induit leur prolifération et leur différenciation. Lors de l'infection de souris C57BL/6 par le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii*, la molécule CD40 exprimée par les entérocytes mais aussi les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B est impliquée dans la génération d'une réponse Th1 en induisant la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4+ {Li, 2002}.

Les molécules de costimulation B7-1 (**CD80**) et B7-2 (**CD86**) sont faiblement exprimées par les entérocytes {Martin-Villa, 1997} comparées aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles tels les macrophages ou les cellules dendritiques. La molécule CD80 est exprimée de façon constitutive à la surface des APCs, son expression augmente cependant lors de stress infectieux. La molécule CD86 quant à elle est uniquement exprimée par les APCs activées. CD80 et CD86 partagent un même ligand : CD28 exprimé par les cellules T {Van Gool, 1996}. A la suite de l'engagement CD80/86-CD28, les cellules T activées expriment à leur surface le marqueur d'activation CD25 et son ligand, la cytokine IL-2. Il est à noter que les entérocytes expriment également à leur surface la molécule **CD28** induisant la libération de cytokines et chimiokines pro inflammatoires par ces cellules lors d'interactions avec les APCs activées présentes dans la *lamina propria*. Lors de phases plus tardives de la réponse adaptative, les cellules T activées possèdent à leur surface un second ligand reconnu par les molécules CD80 et CD86 : CTLA-4 (ou CD152), délivrant un signal inhibiteur en diminuant l'expression du TCR et de la molécule CD28 {Carreno, 2002}.



*Figure 7 : molécules d'adhésion et de costimulation formant une synapse immunologique autour d'une molécule MHC-II présentant un antigène à une cellule T (Kaiser G. University of Washington)*

La glycoprotéine **BGP** (Biliary GlycoProtein ou CD66a) est exprimée à la fois par les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes intra-épithéliaux {Stocks, 1996} {Morales, 1999}. Elle forme des homodimères, liés par interactions homophiliques, inhibant l'activité cytolytique des lymphocytes intra-épithéliaux notamment par l'internalisation de la molécule CD3 {Morales, 1999}.

#### 2.2.1.7. Cytokines produites par les cellules épithéliales de l'intestin

Les cellules épithéliales de l'intestin sont capables de produire plusieurs cytokines pouvant polariser la réponse immunitaire.

Les entérocytes synthétisent les cytokines **IL-1 $\alpha$**  et  **$\beta$**  jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire aux pathogènes et les pathologies hyperimmunes de l'intestin

{Radema, 1991} {Eckmann, 1993} {Stadnyk, 1995}. Lorsqu'elles sont secrétées, ces cytokines augmentent l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans la formation de la barrière épithéliale et le recrutement des cellules immunitaires de la *lamina propria* {Lammers, 1994} {Ohno, 1997} {Rodriguez-Juan, 2001}. Une autre cytokine pro inflammatoire est exprimée par les entérocytes et les cellules de Paneth : le **TNF- $\alpha$**  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) {Ruemmele, 2002} {Lala, 2003}. Lors de stress microbiens, cette cytokine peut-être présente soit sous forme membranaire sur les cellules épithéliales ou secrétée {Aggarwal, 2003}.

La lignée de cellules épithéliales humaines T84 produit *in vitro* une cytokine anti-inflammatoire : l'**IL-10** {Colgan, 1999}. D'autre part, la lignée entérocytaire Caco-2 produit du **TGF- $\beta$**  *in vitro* lors de l'infection par *Cryptosporidium parvum* {Maillot, 2000}. L'IL-10 et le TGF- $\beta$  ont une activité suppressive des réponses pro inflammatoires et contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale lors d'infections.

Les IFNs de type I (**IFN- $\alpha$**  et **IFN- $\beta$** ) sont également des cytokines immuno régulatrices produites par les cellules épithéliales de l'intestin {Arany, 2001}. Ces IFNs stimulent notamment les réponses anti-virales des macrophages et des cellules NK {Le Page, 2000}. Lors de stress microbiens, les IFNs de type I ont une activité pro ou anti-inflammatoire en renforçant la production d'IL-12p70 ou d'IL-4 par les cellules T CD4+ de la *lamina propria* {Decker, 2005}. Un sous-type d'IFN- $\beta$  : l'IFN- $\beta$ 2 (ou **IL-6**) produit par les entérocytes possède un fort pouvoir amplificateur de la réponse immunitaire de l'intestin {Jones, 1993}. Dans un contexte pro inflammatoire (ou Th1), l'IL-6 contribue à la diminution d'expression d'IL-10 {Wang, 2001}, alors que dans un complexe anti-inflammatoire (ou Th2) cette cytokine au contraire participe à la diminution de l'expression d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  {Barton, 1996} {Xing, 1998}. En combinaison avec le TGF- $\beta$  (une cytokine dite de type Th3), l'IL-6 active une réponse pro inflammatoire de type Th17 en induisant la production d'IL-17 par les cellules T CD4+ de la *lamina propria* {Bettelli, 2006}. La production d'IL-6 par les entérocytes est induite dans de nombreuses conditions notamment lors de stress microbien ou par des cytokines pro

inflammatoires telle IL-1 $\beta$  {McGee, 1993} {Meyer, 1995} {Parikh, 1997} {Wang, 1998}.

L'**IL-15** est produite par les cellules épithéliales de l'intestin lors d'infections virales, bactériennes ou par des protozoaires {Eckmann, 1993} {Hirose, 1998} {Tovey, 1999} {Li, 2007}. Cette cytokine est nécessaire à la survie des lymphocytes de la *lamina propria* et active l'activité cytotoxique des cellules T CD8+ {Mueller, 2003} {Di Sabatino, 2006}. De plus, l'IL-15 induit la différenciation des cellules dendritiques en DC1 pro inflammatoires. *In vivo*, le traitement oral de souris C57BL/6 par des CpG-ODNs (agoniste du TLR-9 – Toll Like Receptor-9) induit la production d'IL-15 par les entérocytes et l'expression de la molécule de costimulation CD40 par ces cellules dendritiques conventionnelles (cDC – conventional Dendritic Cells). L'interaction entre le CD40 et son récepteur CD154 exprimé par les cellules dendritiques plasmocytoides (pDC – plasmocytoid Dendritic Cells) est nécessaire pour la production d'IL12p70 par ces dernières cellules lors de la stimulation par des CpG-ODNs *in vitro* {Kuwajima, 2006}.

#### 2.2.1.8. Récepteurs aux cytokines et immunoglobulines

Les cellules épithéliales de l'intestin expriment les ARNm des chaînes gamma et alpha communes aux **récepteurs IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15** {Reinecker, 1995} {Reinecker, 1996}. L'**IFN- $\gamma$**  active par ailleurs l'expression par les entérocytes de la molécule de présentation antigénique CMH-II et de la molécule d'adhésion ICAM-1 {Kvale, 1992} {Lowes, 1992}. Le récepteur au TNF- $\alpha$ , **TNF-R1**, est présent à la surface des entérocytes {Piguet, 1998}.

Les trois sous-groupes d'**IL-1R** sont également exprimés par les cellules épithéliales de l'intestin {Varilek, 1994} {McGee, 1996}. Les IL-1R de type I (IL-1RI) contiennent un domaine extracellulaire contenant des domaines immunoglobuline-like (Ig-like) et nécessitent l'hétérodimérisation avec la molécule accessoire IL1-RACp (Interleukin-1 Receptor Accessory Protein). Les IL-1R de type II (IL-1RII) contiennent trois domaines

Ig-like extracellulaires et sont homomériques. Les IL-1R possèdent un même domaine intracellulaire appelé domaine TIR (Toll/Interleukin Receptor) partagé par les récepteurs aux IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  mais également par les **TLRs** (Toll-Like Receptors) {Boraschi, 2006}. Les TLRs sont des récepteurs de l'immunité innée reconnaissant des motifs conservés associés aux pathogènes. Les cellules épithéliales de l'intestin expriment les TLR-2, TLR-4, TLR-3, TLR-7 et TLR-9 {Gewirtz, 2003}.

Les cellules épithéliales intestinales expriment le récepteur commun aux IFNs de type I (IFN- $\alpha$ s et IFN- $\beta$ 1) appelé **IFNAR** {Constantinescu, 1995} {Yang, 2000}. Il s'agit d'un récepteur hétérodimérique constitué des chaînes IFNAR1 et IFNAR2 {Pestka, 1997}.

Des IgA dimériques et/ou polymériques et les IgM, produits par les plasmocytes de la *lamina propria*, traversent (transcytose) la monocouche épithéliale via leur interaction avec des **pIgR** (polymeric Immunoglobulin Receptors) exprimés par les cellules épithéliales de l'intestin {Phalipon, 2003}. Ces Ig sont libérées dans la lumière intestinale, adhèrent aux toxines et/ou aux pathogènes pour limiter leur interaction avec la barrière intestinale {Phalipon, 2003}.

#### 2.2.1.9. Les chimiokines

Les cellules épithéliales par leurs molécules d'adhésion retiennent les cellules immunitaires de la *lamina propria* lors de l'infection par des pathogènes. Elles contribuent également au recrutement de ces cellules vers les sites infectieux. Ce recrutement s'effectue très rapidement, dans les heures suivant l'infection et est médié par un groupe de cytokines chimiotactiques : les chimiokines {MacDermott, 1998} {MacDermott, 1999}. Certaines chimiokines, synthétisées constitutivement par les cellules épithéliales de l'intestin, ont également un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale en contribuant à la circulation des cellules immunitaires de la *lamina propria*.

L'infection de la barrière épithéliale par des pathogènes tels que *Toxoplasma gondii*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* ou *Yersinia enterocolitica*, provoque la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales {Eckmann, 1993}. Bien que le processus invasif de ces pathogènes soit différent, les entérocytes infectés produisent les mêmes chimiokines. L'IL-8 (Interleukin-8 ou **CXCL8**), induite chez l'homme lors de processus infectieux {McCormick, 1995} {Crowe, 1995} {Jung, 1997}, recrute des neutrophiles {Brennan, 1990}. D'autres chimiokines de la famille CXC, impliquées dans le recrutement des neutrophiles, sont sécrétées dans de larges proportions par les cellules épithéliales infectées : GRO $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Growth-Regulated Oncogene ou **CXCL1-3**) de même que ENA-78 (Epithelial Neutrophil Attractant-78 ou **CXCL5**) {Eckmann, 1993} {Dwinell, 1999}. Les chimiokines appartenant à la famille CCL attirent une grande variété de cellules immunitaires : monocytes/macrophages, basophiles, éosinophiles, cellules NK, cellules dendritiques et cellules T. Lors de stress infectieux, les entérocytes peuvent produire des quantités variables de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou **CCL2**), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  ou **CCL3**), MIP-1 $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$  ou **CCL4**) et RANTES (Regulated on Activation Normal T Cells Expressed and Secreted ou **CCL5**) {Agace, 2000} {Kunkel, 2000} {Luangsay, 2003}. La production de chimiokines par les cellules épithéliales de l'intestin est également modulée par leur environnement cytokinique. L'IFN- $\gamma$  synthétisé par les cellules T CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria*, modifie l'expression d'IP-10 ( $\gamma$ -Interferon-induced Protein-10 ou **CXCL10**), Mig (Monokine induced by  $\gamma$ -interferon ou **CXCL9**) et I-TAC (Interferon Inducible T Cell  $\alpha$ -Chemoattractant ou **CXCL11**) {Dwinell, 2001}. Ainsi les cellules épithéliales de l'intestin contribuent au développement de la réponse par les cellules T aux pathogènes en les recrutant et les retenant dans la barrière intestinale, et réciproquement réagissent aussi aux cytokines que les cellules recrutées produisent.

### 2.2.2. Les Lymphocytes Intra-Épithéliaux (LIE)

Les lymphocytes sont majoritairement présents aux sites inducteurs de la réponse immunitaire, à la fois dans les structures lymphoïdes organisées (plaques de Peyer, ganglions mésentériques) et dans la *lamina propria*. Les cellules épithéliales de l'intestin co-existent avec une population cellulaire T spécifique, présente le long de l'épithélium : les **lymphocytes intra-épithéliaux (LIE)**. Lors de l'infection par des pathogènes, les LIE sécrètent rapidement des cytokines en réponse aux chimiokines et cytokines produites par les cellules épithéliales intestinales. Les LIEs ont une activité cytolytique à l'encontre des entérocytes infectés, et certaines sous populations de LIE possèdent un fort pouvoir immuno-modulateur contribuant au maintien de l'homéostasie intestinale {Lefrancois, 1991} {Guy-Grand, 1993} {Buzoni-Gatel, 1997}.

Les LIEs sont de grandes cellules granuleuses résidant à la surface baso-latérale de l'épithélium {Ferguson, 1977}. Plus de 70% des LIEs de l'intestin grêle sont CD4-CD8+, 10% sont doubles négatives (CD4 -CD8-). Les LIEs CD8+ sont répertoriés en deux sous-types 'a' et 'b'. Les **LIEs de type 'a' CD8 $\alpha\beta$** , représentant 60% des LIE CD8+, expriment un **TCR $\alpha\beta$**  et sont activés par la voie classique de présentation antigénique {Pereira, 1991}. Les **LIEs de type 'b' CD8 $\alpha\alpha$** , exprimant un **TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$** , présents chez des souris athymiques sont activés via des molécules non classiques de CMH-I : MIC-A et MIC-B, interagissant avec la molécule NKG2D exprimée par les cellules NK {Rocha, 1994} {Hue, 2004}.

Les LIEs ont été initialement décrites comme pro inflammatoires (**Th1**). Lors de l'infection de la barrière intestinale par des pathogènes invasifs, les LIEs produisent des chimiokines pro inflammatoires (**CCL3, CCL4, CCL5**) {Boismenu, 1996}, des cytokines pro inflammatoires (**TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A**) {Taguchi, 1991} {Kearsey, 1996} {Hong, 2006} et des médiateurs cytolytiques (**Granzyme B, Perforine, Lymphotoxine- $\beta$ , Fas-Ligand**) {Beagley, 1998}. Cependant les LIEs produisent également, constitutivement ou de manière inductible, des molécules anti-inflammatoires (**Th2 et Th3**). Ainsi, les LIE sécrètent un taux élevé de **prothymosine  $\beta$ 4**, inhibiteur de

la migration des neutrophiles {Young, 1999}, des cytokines anti-inflammatoires (**IL-10**, **TGF- $\beta$** ) {Buzoni-Gatel, 1999} {Buzoni-Gatel, 2001} {Wang, 2001} et de l'**IL-2**, une molécule impliquée dans la génération des cellules T régulatrices (Tregs) {Fujihashi, 1996}.

### 2.2.3. La *lamina propria*

Directement localisée sous la barrière épithéliale, la *lamina propria* contient des tissus conjonctifs (fibroblastes) et des leucocytes. La *lamina propria* est décrite comme étant un organe T constituée majoritairement chez la souris de lymphocytes T et une grande quantité de lymphocytes B. Elle contient également des cellules NK, NK-T et des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques).

#### 2.2.3.1. Les cellules dendritiques

Les **cellules dendritiques** (DC- Dendritic Cells) jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire aux pathogènes de la lumière intestinale. Les DC expriment des récepteurs reconnaissant des motifs conservés exprimés par les pathogènes (TLR – Toll-Like Receptors) {Rescigno, 2001} {Iwasaki, 2004}. Une fois activées, ces cellules augmentent l'expression de leur récepteur de chimiokine **CCR7** initiant leur migration des sites infectieux vers les structures lymphoïdes où elles entrent en contact avec les cellules T naïves pour les activer {Kobayashi, 2004}. Lors de leur transit vers les structures lymphoïdes, les DC mûrissent et expriment à leur surface la molécule de présentation antigénique **CMH-II** et les molécules de co-stimulation telles que **CD40**, **CD80**, **CD86** {Hart, 1997} {Hart, 1997}. Les DCs de la *lamina propria* expriment l'intégrine **CD11c** et constituent un groupe hétérogène de cellules de phénotypes et fonctions distinctes. Elles sont classiquement divisées en 2 sous-groupes : les DCs myéloïdes ou mDC (CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) et les DC plasmocytoïdes ou pDC (tableau 3) {Shortman, 2002} {Sato, 2007}.



Les **DCs myéloïdes** ont un rôle central dans l'induction de la réponse immunitaire spécifique aux pathogènes, la tolérance à la flore endogène du lumen et la tolérance aux macromolécules alimentaires et autoantigènes {Maldonado-Lopez, 1999} {den Haan, 2000} {Belz, 2002}. Classiquement, les mDCs internalisent les agents microbiens ayant franchi la barrière épithéliale, et envahissant la *lamina propria*. En reconnaissant des motifs conservés associés aux pathogènes (ou PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns) via leurs TLRs (principalement **TLR2** et **TLR4**), les mDCs mûrent en CPA et produisant principalement des cytokines pro-Th1 tel l'**IL-12** (phénotype **mDC1**) {Huang, 2003} {Uehori, 2003}. Les mDCs "testent" également le contenu de la lumière intestinale en étirant leurs dendrites au travers de la monocouche de cellules épithéliales. La formation des dendrites trans-épithéliales requiert l'expression du récepteur chimiokinique **CX<sub>3</sub>CR1** par les mDCs et s'effectue principalement dans l'iléum où le ligand CX<sub>3</sub>CL1 est abondant {Rescigno, 2001} {Rescigno, 2001} {Niess, 2005}. Une sous-population de mDCs (CD4- OX41-) transporte des corps apoptotiques de cellules épithéliales de l'intestin vers les ganglions mésentériques et présente des auto-antigènes aux cellules T {Liu, 1998} {Huang, 2000}. Cependant elles expriment faiblement les molécules de co-stimulation et tolèrent les cellules rencontrées. Lors du traitement oral de souris avec de l'ovalbumine (OVA), les mDCs ont un phénotype de type **mDC2** (pro-Th2) et synthétisent constitutivement de l'IL-10 réduisant l'intensité de la réponse inflammatoire au LPS {Chirido, 2005}.

Les **DCs plasmacytoïdes** expriment majoritairement le senseur viral **TLR7** chez la souris (TLR8 chez l'homme) et le récepteur aux motifs CpG bactériens **TLR9** {Kadowaki, 2001} {Okada, 2003}. En plus de l'intégrine **CD11c** commune aux mDCs et pDCs, les pDCs sont positives également pour les antigènes de surface **CD8 $\alpha$** , **B220**, **Gr-1** et **Ly6C** {Nakano, 2001} {Martin, 2002}. Les pDCs constituent un réservoir cellulaire spécialisé dans la production d'IFNs de type I (**IFN- $\alpha$**  et **IFN- $\beta$** ) modulant la réponse immunitaire {Asselin-Paturel, 2001}.

| Sous<br>population de<br>DCs | DCs Myéloïdes              |               |               |                            |               | DCs Plasmocytoïdes                     |
|------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------------------|
|                              | Rate et ganglions          |               |               | Ganglions                  |               | IPCs                                   |
|                              | mésentériques              |               |               | mésentériques              |               |                                        |
|                              | CD4-<br>CD8α <sup>hi</sup> | CD4-<br>CD8α- | CD4+<br>CD8α- | CD4-<br>CD8α <sup>lo</sup> | CD4-<br>CD8α- |                                        |
| Phénotype                    |                            |               |               |                            |               |                                        |
| CD8α                         | +++                        | -             | -             | Var.                       | -             | Var.                                   |
| CD4                          | -                          | -             | ++            | -                          | -             | Var.                                   |
| CD11b                        | -                          | Var.          | ++            | ++                         | ++            | -                                      |
| CD11c                        | +++                        | Var.          | +++           | +++                        | +++           | ++                                     |
| CD205                        | +++                        | -             | -             | +++                        | +             | +                                      |
| 33D1                         | -                          | -             | ++            | -                          | -             | -                                      |
| B220                         | -                          | -             | -             | -                          | -             | ++                                     |
| Gr-1                         | -                          | -             | -             | -                          | -             | ++                                     |
| 128G                         | -                          | -             | -             | -                          | -             | +++                                    |
| 440c                         | -                          | -             | -             | -                          | -             | +++                                    |
| mPDCA-1                      | -                          | -             | -             | -                          | -             | +++                                    |
| CD40                         | +                          | Var.          | +             | +++                        | ++            | -                                      |
| CD80                         | +                          | Var.          | +             | +++                        | ++            | -                                      |
| CD86                         | +                          | Var.          | +             | +++                        | ++            | -                                      |
| CMH-II                       | -                          | -             | -             | +++                        | -             | -                                      |
|                              |                            |               |               |                            |               |                                        |
| Localisation                 | Z.T.                       | Z.M.          | Z.M.          | L.N. de<br>la peau         | L.N.          | Dissémination dans<br>tout l’organisme |

**Tableau 3 : hétérogénéité des cellules dendritiques murines. Z.T. : Zone T, Z.M. : Zone Marginale, L.N. : ganglions mésentériques (Lymph Nodes). - : non exprimé, + : faiblement exprimé, ++ : expression intermédiaire, +++ : fortement exprimé, Var. : expression hétérogène {Sato, 2007 modifié}.**

#### 2.2.3.2. Les macrophages

La muqueuse gastro-intestinale constitue le plus grand réservoir de **macrophages** provenant de la circulation sanguine. Les macrophages de la *lamina propria*, bien que repartis de manière diffuse, se concentrent à l'apex des villosités {Lee, 1985} {Allison, 1988} {Grimm, 1995}. Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes, capables de processus actifs d'endocytose, présentant des antigènes exogènes aux cellules T via la molécule **CMH-II** {Svensson, 1997}. Ils sécrètent différentes chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, telles le **CCL8**, l'**IL-1**, l'**IL-12**, et le **TNF- $\alpha$** , de même que des cytokines immuno-modulatrices (**IL-6**) {Mahida, 2000}. Ils produisent des **radicaux oxygénés** lors de stress infectieux, puissantes molécules anti-microbiennes délétères pour la barrière épithéliale lorsqu'ils sont abondamment produits {Pacher, 2007}. Les macrophages sécrètent également de l'**IFN- $\gamma$**  lorsqu'ils sont stimulés par l'**IL-12** provenant des cellules présentatrices d'antigènes {Skeen, 1996}.

Les macrophages sont des cellules **CD11b+**. À la différence des macrophages circulatoires, les macrophages résidents de la *lamina propria* n'expriment pas la molécule CD14 (récepteur du LPS) {Smith, 2001}. Leur capacité à ingérer des cellules épithéliales apoptotiques leur confère des propriétés homéostatiques et en font des acteurs du renouvellement de l'épithélium intestinal {Han, 1993}.

#### 2.2.3.3. Les lymphocytes B

Les **lymphocytes B** sont responsables des réponses immunitaires dites humorales. L'une des fonctions des cellules B est de produire des anticorps (ou immunoglobulines – **Ig**) dirigées contre des antigènes solubles. Les cellules B proviennent de la moelle osseuse et circulent par le sang et la lymphe vers les structures lymphoïdes de l'organisme. Dans l'intestin grêle, les cellules B sont majoritairement contenues dans les follicules B des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques. Chaque cellule B possède un récepteur antigénique spécifique à sa surface : le **BCR** (B Cell Receptor). Le BCR est un complexe contenant des Ig membranaires qui, par leur interaction avec des antigènes spécifiques,

activent des cellules B (en recevant des signaux additionnels provenant des cellules T CD4+) {Matsuuchi, 2001}. Une fois activés, les lymphocytes B vont opérer, dans les centres germinatifs des follicules B, des hyper mutations somatiques leur permettant de modifier la classe des Ig qu'elle produisent avant de se disséminer dans l'organisme sous forme de **plasmocytes** (cellules B productrices d'Ig) {Fagarasan, 2000} {Di Noia, 2007}. Les follicules B sont également le lieu de création des **cellules B mémoires**, ayant une plus longue durée de vie que les plasmocytes, répondant rapidement à une seconde exposition à un même antigène {McHeyzer-Williams, 2005}.

Dans l'intestin grêle, 80% des plasmocytes sont **IgA+**. Ils sont générés à partir des cellules B immatures, CD20+ chez l'homme (ou **B220+** chez la souris) et **IgM+**, activées par les cellules présentatrices d'antigènes dans les follicules B des plaques de Peyer via l'interaction entre un complexe immunitaire CMH-II/Antigène présenté au BCR {Fagarasan, 2001}. Après commutation de classe, les cellules matures IgA+ migrent des plaques de Peyer vers les ganglions mésentériques où elles prolifèrent et se différencient en plasmocytes. Les plasmocytes se relocalisent ensuite dans la *lamina propria* via le canal thoracique et la voie sanguine {Fagarasan, 2000}.

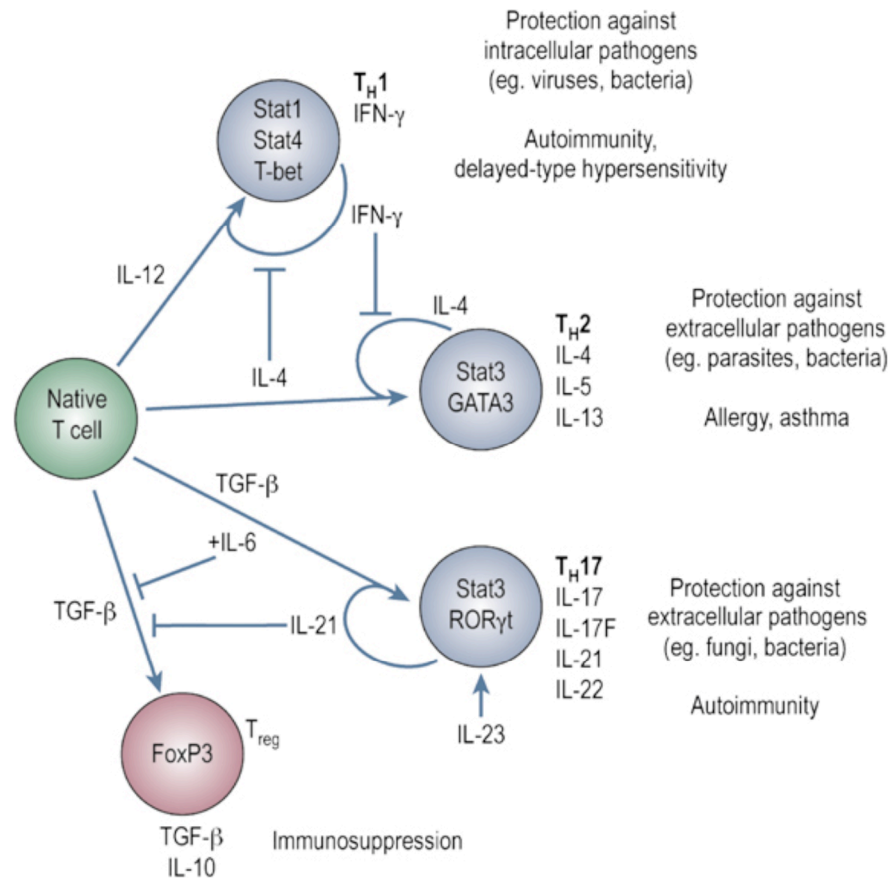
Les cellules B agissent par ailleurs comme des cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes B immatures expriment la molécule de présentation antigénique **CMH-II** et les molécules de co-stimulation **CD40**, **CD80** et **CD86**. En reconnaissant des antigènes solubles par son BCR, les cellules B immatures endocytent activement leur complexe immunitaire membranaire et activent, via des mécanismes CMH-II spécifiques, les cellules T environnantes {Rodriguez-Pinto, 2005}.

#### 2.2.3.4. Les lymphocytes T

Les cellules T stimulées par les cellules présentatrices d'antigènes dans les tissus folliculaires de la muqueuse intestinale migrent hors des sites inducteurs de la réponse immunitaire vers la *lamina propria* par la voie sanguine. Cette relocalisation vers les sites

effecteurs de la réponse immunitaire est dépendante d'interactions complexes avec les molécules d'adhésion et les chimiokines sécrétées par les entérocytes.

Les cellules T résidant dans la *lamina propria* sont majoritairement **CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>** (60 à 70%) et expriment un **TCR $\alpha\beta$**  (cellules T helper – **Th**). À la différence des lymphocytes T du sang périphérique et des organes lymphoïdes, les cellules T CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria* ont un phénotype de cellules mémoires : CD44<sup>hi</sup>, Mel-12<sup>lo</sup>, CD45RB<sup>lo</sup> chez la souris (CD45RO<sup>+</sup> chez l'homme) {James, 1986} {Abreu-Martin, 1996} {Hurst, 1996}, et ne prolifèrent pas ou peu {Zeitzi, 1994}. En l'absence de stimulus microbien, les cellules T CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria* expriment constitutivement des cytokines pro- et anti-inflammatoires : **IFN- $\gamma$** , **IL-4** et **IL-5**, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale {Taguchi, 1990}. Lors de stress microbiens, les cellules T CD4<sup>+</sup> provenant des sites inducteurs de la réponse immunitaire sont recrutées dans la *lamina propria* et modulent une réponse immunitaire spécifique par la production de cytokines **Th1 (IFN- $\gamma$ )**, **Th2 (IL-4, IL-5)** ou **Th17 (IL-17)** en fonction du type d'infection auquel l'intestin grêle doit faire face (figure 8) {Deenick, 2007} {Mudter, 2007}. Les antigènes microbiens sont capturés par les cellules dendritiques soit dans les plaques de Peyer, soit dans la *lamina propria* elle-même, par des processus actifs d'endocytose. Ceci déclenche leur maturation avec l'expression à la surface membranaire de peptides antigéniques couplés à la **molécule CMH-II** et de molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86). Une fois maturées, les cellules dendritiques rejoignent les ganglions mésentériques où elles induisent l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques présentes dans les zones T. Les cellules T activées (**CD4<sup>+</sup> CD25<sup>lo</sup>**) quittent les ganglions mésentériques pour rejoindre la circulation sanguine puis, en exprimant des intégrines et des récepteurs aux chimiokines, deviennent sensibles aux signaux chimiotactiques émis par les entérocytes et migrent vers la *lamina propria* aux sites infectés {Mowat, 2003}.



**Figure 8 : pathogènes et environnements cytokiniques induisant la différenciation des cellules T naïves en cellule effectrices Th1, Th2 ou Th17 {Deenick, 2007}.**

Les cellules T **CD8+** représentent environ 30% des cellules T de la *lamina propria*. Cette population cellulaire contient des cellules à l'activité cytolytique (cellules T cytolytiques – **Tc**) {Shanahan, 1988}. Leur spécificité antigénique est **CMH-I restreinte** ce qui signifie que ces cellules réagissent à la présentation d'antigènes endogènes provenant de pathogènes intracellulaires ou exprimées par des cellules tumorales {Gulzar, 2004} {Gross, 2007}. Une fois activées, les cellules T CD8+ sont potentiellement cytolytiques grâce à la production de molécules cytolytiques comme: **Granzyme B**, **Perforine** ou **Fas-Ligand** {Offit, 1991} {Podack, 1995}.

### 2.2.3.5. Les cellules T régulatrices (Tregs)

Les **cellules T régulatrices (Tregs)** sont une sous population de cellules T contribuant au maintien de l'homéostasie du système immunitaire et à la tolérance aux auto antigènes. Elles représentent une fraction minoritaire de **cellules T CD4+** (respectivement 1-2% et 5-10% des cellules T CD4+ chez l'homme et la souris) possédant constitutivement à leur surface la molécule **CD25** (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) {Suri-Payer, 1998} {Sakaguchi, 2001}. De plus, les Tregs expriment spécifiquement le facteur de transcription **Foxp3** (Forkhead box P3) induisant par des mécanismes encore inconnus la synthèse d'IL-2 et l'expression des molécules CD25 et CTLA-4 par les cellules T régulatrices (Cytotoxic T-Lymphocytes Antigen-4) {Fontenot, 2003} {Hori, 2003} {Sakaguchi, 2005}. La déplétion des cellules T régulatrices par des anticorps anti-CD25 ou chez les souris Foxp3 KO provoque le développement de maladies auto-immunes dans plusieurs organes tels le système nerveux central, l'intestin grêle et le colon ou le foie {Lyon, 1990} {Kohm, 2006}.

#### *Mécanismes suppresseurs des cellules T régulatrices*

Pour devenir suppressives, les cellules T régulatrices requièrent l'activation de leur TCR {Gavin, 2002} {Fisson, 2003} {Klein, 2003}. Cependant, une fois activées, la fonction suppressive de ces cellules est antigène non spécifique et s'opère à la fois par des **mécanismes contacts dépendants** mais aussi par la production de **cytokine immuno-modulatrices**.

L'utilisation d'anticorps neutralisant des molécules de surface des cellules T régulatrices a permis d'identifier de nombreux **mécanismes suppresseurs contact dépendants** de ces cellules contrôlant l'activation des cellules T effectrices mais aussi leur production de cytokines.

- La molécule **CTLA-4** lie avec une forte affinité les molécules costimulatrices CD80 et CD86 des **cellules présentatrices d'antigènes**. Des études *in vitro* ont montré que l'interaction entre Tregs et ces cellules limite la présentation

d'antigènes aux cellules T effectrices positives pour la molécule CD28 liant les molécules de costimulation CD80 et CD86 avec une affinité plus faible que CTLA-4 {Takahashi, 2000}. Par ailleurs, les souris CTLA-4 KO possèdent des cellules T régulatrices ce qui montre que la molécule CTLA-4 n'est pas uniquement une molécule accessoire intervenant dans l'activation de ces cellules. Cependant les Tregs générés sont incapables de sécréter du TGF- $\beta$  après stimulation antigénique dans ce modèle {Read, 2000}.

- Une fois activées, les **cellules T effectrices** restent sensibles à l'action suppressive des Tregs. Les cellules T régulatrices expriment à leur surface membranaire du **TGF- $\beta$ 1** inhibant *in vivo* et *in vitro* la production de cytokine Th1 et Th2 par les cellules T CD4+ {Nakamura, 2001} {Chen, 2003}.
- Les cellules T régulatrices sont également suppressives pour les **cellules NK-T** humaines (V $\alpha$ 24+). La réalisation de co-cultures a montré que les Tregs inhibent la prolifération des cellules NK-T et leur production de cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13) par des mécanismes **ICAM-1** ( $\alpha_L\beta_2$ ) dépendants {Azuma, 2003}.

Au-delà des interactions de contact, des **cytokines immuno-modulatrices** permet aux cellules T régulatrices d'exercer leur activité suppressive de façon paracrine. Les Tregs activés sécrètent les **cytokines immunosuppressives IL-10** (Th2) et **TGF- $\beta$**  (Th3) (figure 8) {Dieckmann, 2002} {Jonuleit, 2002} {Mekala, 2005}.

### ***Origine des cellules T régulatrices***

Deux sous populations de cellules T régulatrices ont été identifiées chez l'homme et la souris : les **Tregs naturels** et les **Tregs adaptatifs**. Ces sous populations diffèrent de part leur origine mais aussi de part les mécanismes supresseurs privilégiés.

Les **cellules T régulatrices naturelles** sont générées dans le thymus en même temps que les cellules T effectrices et proviennent des cellules souches hématopoïétiques. L'IL-2 est un élément clé dans leur différenciation et leur maintien. Cette cytokine induit



l'expression de Foxp3 *in vitro* et *in vivo*. Les Tregs naturels se disséminent ensuite dans les organes lymphoïdes et contrôlent l'homéostasie du système immunitaire en privilégiant les mécanismes suppresseurs de contact {Schwartz, 2005}.

Les **cellules T régulatrices adaptatives** sont générées en périphérie et proviennent de la conversion de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices. Il a été récemment montré *in vitro* que le traitement des cellules effectrices Th0 avec du TGF- $\beta$  induit Foxp3 et confère à ces cellules une activité suppressive {Benson, 2007} {Elias, 2008}. L'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A. Cette vitamine provient majoritairement de la prise alimentaire, mais est également produite par les cellules Stellates du foie {Maden, 2007}. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'acide rétinoïque intervient d'une part dans le renforcement et la stabilisation d'expression de Foxp3, et d'autre part dans la relocalisation des cellules T régulatrices vers la *lamina propria* en induisant la synthèse du récepteur chimiokinique CCR5 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  {Benson, 2007}.

#### 2.2.3.6. Les cellules NK et NK-T

Les cellules **NK** (Natural Killer) exprimant à leur surface les marqueurs **NK1.1**, Fc $\gamma$ RIII (Fc  $\gamma$  Receptor III ou **CD16**) et la molécule d'adhésion NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule ou **CD56**) sont également des cellules cytolytiques {Cooper, 2001}. Peu nombreuses chez l'homme, leur fréquence est plus abondante chez les primates non humains et la souris {James, 1985}. Comme les cellules T CD8<sup>+</sup>, leur activité cytolytique cible des cellules tumorales ou infectées par des virus via des mécanismes CMH-I dépendants. Les cellules NK expriment de plus des chimiokines et cytokines pro inflammatoires telles que **CCL8** ou le **TNF- $\alpha$**  leur conférant un rôle de régulateur de l'immunité intestinale {Pang, 1993}.

Les cellules T "Natural Killer" (**NKT**) sont des lymphocytes possédant à la fois des caractéristiques de cellules T et de cellules NK. Elles co-expriment un **TCR $\alpha\beta$  semi invariant (V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281)** et des marqueurs associés aux cellules NK : **NK1.1**, **CD16**, **CD56** {Exley, 2004}. L'activation des NK-T se fait par la reconnaissance de motifs

lipidiques et glycolipidiques présentés par la molécule CD1d appartenant à la famille des CMH de classe I-b non classiques {Kronenberg, 2005} {Mattner, 2005} {Kinjo, 2005} {Kinjo, 2006}. Une fois activées, les cellules NK-T synthétisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  ou d'IL-4 polarisant ainsi la réponse immunitaire {Pal, 2001} {Schmieg, 2003}.

|                                          | <b>NKT Type 1</b>                                               | <b>NKT Type 2</b>                                          | <b>NKT-like</b>                            |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Autres noms                              | NKT classiques<br>Invariant NKT<br>(iNKT)<br>V $\alpha$ 14i NKT | NKT non classique<br>Divers NKT                            | Cellules T NK1.1+<br>Cellules T CD3+ CD56+ |
| TCR<br>répertoire                        | V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281<br>V $\beta$ 8.2, 7, 2             | V $\alpha$ 3.2 - J $\alpha$ 9<br>V $\alpha$ 8, V $\beta$ 8 | Divers                                     |
| Réactivité<br>$\alpha$ -GalCer           | +                                                               | -                                                          | -                                          |
| Molécule<br>présentatrice<br>d'antigènes | CD1d                                                            | CD1d                                                       | CMH-I                                      |
| Localisation                             | Thymus, foie, rate<br>et moelle osseuse                         | Foie, rate                                                 | Foie, rate et moelle<br>osseuse            |

**Tableau 4 : catégories de cellules NKT murines {Godfrey, 2004 modifié}.**

### **2.3. Conclusion : structure et fonctions du GALT**

Le système immunitaire intestinal est structurellement et fonctionnellement divisé en sites inducteurs, où s'effectue la présentation par des cellules présentatrice d'antigènes de motifs antigéniques aux cellules T et B, et sites effecteurs où ces cellules une fois activées sont recrutées. Face au grand nombre d'antigènes contenus dans la lumière intestinale, le système immunitaire de l'intestin doit être tolérant, mais doit aussi être capable d'initier une réponse immunitaire B et T spécifique des pathogènes. Devant une telle spécificité de fonction, le système immunitaire associé aux muqueuses de l'intestin réagit de manière très agressive contre des pathogènes bactériens ou provenant d'autres sources microbiennes. Cependant, lorsque ces réponses inflammatoires viennent à se déréguler, la rupture de l'homéostasie intestinale peut entraîner des maladies auto-immunes chroniques de l'intestin.

## CHAPITRE 3 : TOLL-LIKE RECEPTEUR-9 ET INTERFERONS DE TYPE I

L'une des fonctions du système immunitaire est de détecter et éliminer les microorganismes pathogènes invasifs. Les cellules présentatrices d'antigènes reconnaissent par leurs Toll-Like Récepteurs (TLR) des motifs conservés exprimés par les pathogènes ou **PAMPs** (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

### 3.1. La famille des Toll-Like Récepteurs (TLRs)

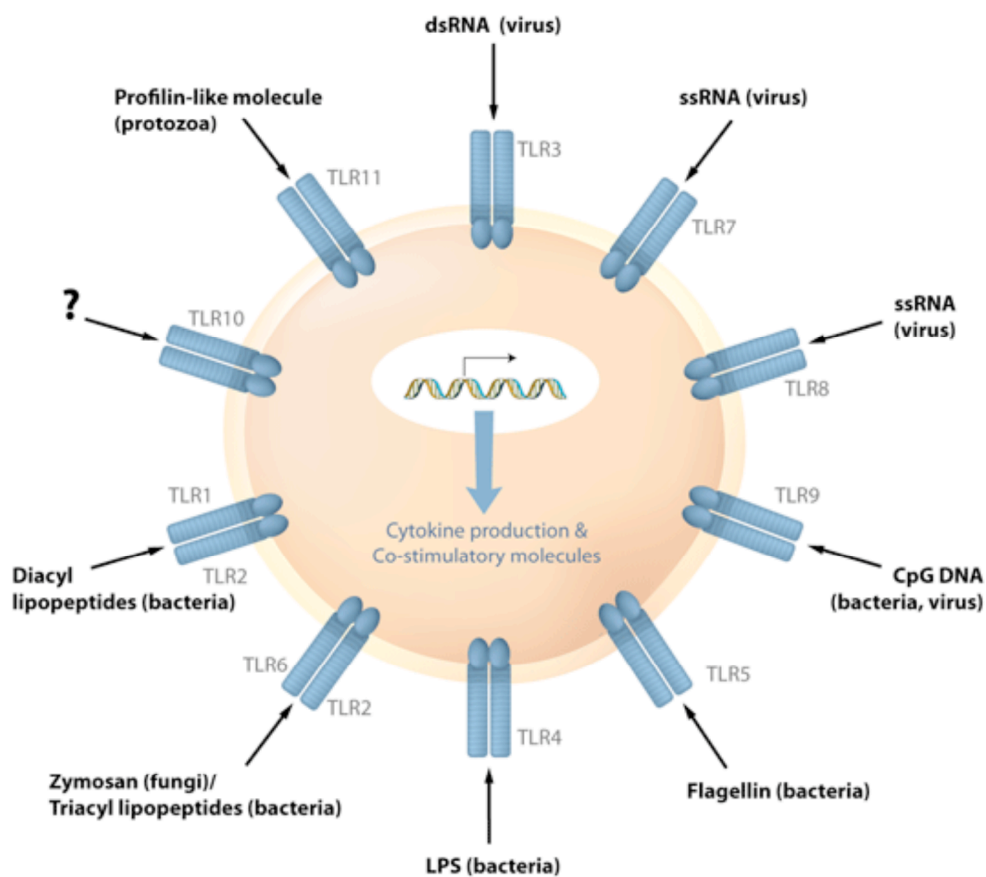
Le rôle des TLRs dans les processus d'immunité innée a été initialement décrit chez la Drosophile. La molécule Toll des Drosophiles est une protéine transmembranaire requise pour l'établissement de la polarité dorso-ventrale lors du développement embryogénique {Hashimoto, 1988}. La voie de signalisation du Toll des drosophiles présente de grandes similarités avec la voie de signalisation IL-1R des mammifères, conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans la production de cytokines pro inflammatoires. {Belvin, 1996} En effet, les domaines cytoplasmiques des molécules Toll chez la drosophile et IL-1R chez les mammifères, le domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor), est hautement conservé. Cette similitude a suggéré que la voie de signalisation Toll peut être impliquée dans des mécanismes d'immunité innée. Ainsi, l'inactivation de la voie de signalisation Toll rend les Drosophiles très sensibles aux infections fongiques à cause de l'absence de production du peptide anti-fongique Drosomycine {Lemaitre, 1996}. La voie de signalisation Toll est également impliquée chez la Drosophile dans des mécanismes de défense aux bactéries Gram positives et négatives {Rutschmann, 2002}.

Des homologues de la molécule Toll des Drosophiles ont été identifiés chez les mammifères. Ces molécules ont été nommées Toll-Like Receptors (TLRs) et constituent une famille de 13 membres (TLR1-13) exprimés chez l'homme et la souris {Carpenter, 2007} {El-Omar, 2008}. Les TLRs constituent une famille de récepteur aux PAMPs caractérisés structurellement par un domaine extracellulaire contenant de nombreuses Leucine (ou **LRR**- Leucine-Rich Repeats) et un domaine intracellulaire TIR commun

avec l'IL-1R (ou **TIR** - Toll/IL-1 Receptor). Chez la souris, seuls les **TLR1-7, TLR9, TLR11-13** sont exprimés {Carpenter, 2007}.

### 3.1.1. Rôle des TLRs dans la reconnaissance de composants microbiens

Les TLRs sont impliqués dans les mécanismes d'initiation de la réponse immunitaire. Leur structure conservée reflète leur fonction commune de reconnaissance de motifs conservés exprimés par les microorganismes pathogènes (figure 9) (tableau 5).



*Figure 9 : TLRs exprimés par les mammifères et leurs ligands respectifs (Kobayashi K., Harvard Medical School)*

## TLR4

Le TLR4 reconnaît les Lipopolysaccharides bactériens (**LPS**). Deux lignées de souris, C3H/HeJ et C57BL10/ScCr, sont connues pour leur absence de réponse au LPS. Il a été identifié chez ces souris des mutations dans le gène *tlr4*, bloquant la signalisation ou l'expression du TLR4, indiquant que ce récepteur est un élément clé dans la reconnaissance du LPS {Poltorak, 1998} {Qureshi, 1999} {Hoshino, 1999}. La reconnaissance du LPS requiert d'autres molécules en plus du TLR4. Le **LBP** (LPS-Binding Protein), présent dans le sérum peut se lier au LPS en interagissant avec son récepteur **CD14**, une glycoprotéine membranaire exprimée préférentiellement par les monocytes/macrophages et les neutrophiles. La stimulation par le LPS provoque une dimérisation des molécules TLR4 et CD14, requise pour induire les voies de signalisation sous-jacentes. Par ailleurs, la lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) ne répond pas au LPS {Jiang, 2000} {da Silva Correia, 2001}. Il a été identifié que ces cellules avaient une mutation dans le gène *MD-2*. Les souris **MD-2** déficientes conservent des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules B immatures lors d'une exposition au LPS. La molécule MD-2 s'associe au TLR4 dans l'appareil de Golgi, et forme un complexe qui migre ensuite à la surface des cellules. Alors que le TLR4 est un récepteur membranaire, les cellules MD-2 déficientes conservent leur TLR4 dans l'appareil de Golgi indiquant que la molécule MD-2 est essentielle pour la distribution membranaire du TLR4 {Schromm, 2001} {Visintin, 2001} {Nagai, 2002}. Une autre molécule de surface, **RP105**, est également impliquée dans la reconnaissance du LPS. RP105 contient un domaine LRR, similaire au domaine extracellulaire du TLR4, et est exprimé préférentiellement par les cellules B. Les cellules B provenant de souris RP105 déficientes répondent faiblement au LPS. Ainsi le TLR4 forme un large complexe multimérique permettant une optimisation de la réponse au LPS {Miyake, 1995} {Ogata, 2000}.

Le TLR4 reconnaît également les **HSPs** (Heat Shock Proteins) pouvant être produites par les bactéries mais aussi les mammifères et ayant une structure très conservée. La fonction primaire des HSP est de contribuer au repliement des protéines en structures

tertiaires. Les HSP peuvent également activer les macrophages et cellules dendritiques {Gallucci, 2001}. Les souris TLR4 déficientes ont une production réduite de cytokines pro inflammatoires en réponse à HSP-60 et HSP-70 {Ohashi, 2000} {Vabulas, 2001} {Vabulas, 2002} {Dybdahl, 2002}. De plus, le TLR4 reconnaît des composants de la matrice extracellulaire (**Fibronectine, Acide Hyaluronique, Héparan Sulfate**) libérés lors de lésions tissulaires {Okamura, 2001 #296} {Termeer, 2002 #297} {Johnson, 2002}.

## **TLR2, TLR1 et TLR6**

Le TLR2 reconnaît une **grande variété de composant microbien**. Ceux-ci incluent des lipoprotéines provenant de bactéries Gram négatif, mycoplasmes et spirochètes {Aliprantis, 1999} {Lien, 1999}, le peptidoglycan et l'acide lipotéichoïque provenant de bactéries Gram positif {Schwandner, 1999}, le lipoarabinomannan provenant de mycobactéries {Underhill, 1999}, le glycoinositolphospholipide de *Trypanosoma cruzi* {Campos, 2001}, le zymozan provenant de champignons {Underhill, 1999}, des glycolipides de *Treponema maltophilum* {Opitz, 2001} et les porines de la membrane externe de *Neisseria sp.* {Massari, 2002}.

La ligation du TLR2 à ses ligands implique la coopération avec d'autres TLRs, notamment TLR6 et TLR1. Ainsi, le peptidoglycan et les modulines secrétées par la bactérie Gram + *Staphylococcus aureus* sont des ligands du TLR2 et induisent la production de TNF- $\alpha$  par la lignée de macrophages RAW264.7. Cette réponse peut être supprimée par l'inactivation du **TLR6** {Ozinsky, 2000} {Hajjar, 2001}. L'étude de souris TLR6 déficientes montre que le TLR6 coopère fonctionnellement avec les TLR2 pour reconnaître des lipopeptides microbiens. Par exemple, les macrophages purifiés de souris IL-6 déficientes n'initient aucune réponse inflammatoire lors de leur stimulation par MALP-2 (Macrophage-Activating LipoPeptides-2) {Takeuchi, 2001}. **TLR1** peut également s'associer fonctionnellement au TLR2. Les macrophages purifiés de souris TLR1 déficientes ne produisent pas de cytokines pro inflammatoire en réponse aux triacyl lipopeptides et lipoprotéines de mycobactéries {Alexopoulou, 2002}.

## TLR5

Les cellules CHO exprimant le TLR5 peuvent répondre au surnageant de culture de *Listeria monocytogenes* {Hayashi, 2001}. La purification du surnageant de culture a permis d'identifier la **flagelline** comme agoniste du TLR5. La flagelline est le composant principale des flagelles, structure complexe attaché à la membrane externe des bactéries Gram -. Les flagelles servent au déplacement des bactéries, mais aussi permettent leur attachement aux cellules de l'hôte. La flagelline est une protéine de structure conservée parmi les bactéries Gram - {Baker, 1997} {Eaves-Pyles, 2001} {Gomez-Gomez, 2002}.

## TLR3 et TLR7

**Les ARNs doubles ou simples brins** sont produits par de nombreux virus lors de leurs phases répliquatives intracellulaires, soit comme intermédiaire dans la synthèse d'ARN ou lors de la transcription symétrique de l'ADN du génome viral. Les ARNs viraux sont des inducteurs de la production d'IFNs de type I, possédant des capacités anti-virales et immuno-modulatrices, par les cellules dendritiques. Des ARNs synthétiques doubles brins tel le poly(I :C) (polyInosinic-polyCytidylic acid) possèdent une activité similaire {Yang, 1995} {Chu, 1999}. L'expression du TLR3 par la lignée cellulaire HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293) permet la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B en réponse à la stimulation de ces cellules par du poly(I :C), indiquant que le TLR3 est un récepteur intra-cellulaire reconnaissant les ARN doubles brins {Alexopoulou, 2001}. Le TLR7 (et le TLR8 chez l'homme), exprimé également dans le compartiment intracellulaire, reconnaît des ARN simples brins et des ligands synthétiques appartenant à la famille des imidazoquilonines {Hemmi, 2002} {Martin, 2007} {Forsbach, 2008}.



## TLR9

Le TLR9 est essentiel pour la reconnaissance des **motifs CpG d'ADN bactériens hypométhylés** {Wang, 2005} {Watson, 2006}. Les CpG-ODNs sont des **OligoDéocyNucléotides synthétiques** agonistes du TLR9 dont les ponts phosphodiesters, liant les bases nucléotidiques, ont été remplacés par des ponts phosphotioates augmentant ainsi leur résistance aux nucléases {Zhao, 1993}. Le traitement *in vitro* de cellules dendritiques ou de cellules B immatures par des **CpG-ODNs agonistes** en complément de la molécule CD154 (ligand du CD40) active la production d'IL-12 polarisant ainsi la réponse immunitaire vers un type Th1 {Wagner, 1999} {Wagner, 2001}. Cependant les CpG-ODNs sont classiquement répartis en 3 classes en fonction de leur structure nucléotidique et de leur action *in vitro*. Ainsi, les CpG-ODNs de classe A possèdent un motif polyG à leur extrémité 3' et activent les cellules dendritiques. Les CpG-ODNs de classe B sans motif polyG à leur extrémité 3' vont quant à eux activer préférentiellement les cellules B {Verthelyi, 2001}. Enfin, les CpG-ODNs de classe C ont à leur extrémité 5' un motif TCG unique ou répété 2 fois et ont une activité stimulatrice des cellules dendritiques et des cellules B identique {Marshall, 2003}. Il est à noter que l'**hémazoïne**, un pigment protéique produit par le parasite *Plasmodium falciparum*, est également un agoniste des voies de signalisation TLR9 et joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire au *Plasmodium* {Coban, 2005}.

Les cellules immunitaires humaines et murines sont activées par des motifs CpG différents, ceci pouvant être expliqué par un léger polymorphisme entre les TLR9 exprimés par les deux espèces. Quand les cellules HEK293 sont transfectées par les TLR9 humains ou murins, ces cellules acquièrent la capacité de répondre à leurs motifs CpG respectifs {Krieg, 2000} {Bauer, 2001}. Le TLR9 est exprimé dans les endosomes des cellules présentatrices d'antigène. Plusieurs études ont montré que le TLR9 reconnaît directement les motifs CpG des ADN bactériens lors de la fusion entre les vésicules d'endocytose (contenant les bactéries) et les endosomes (contenant le TLR9) {Wagner, 1999} {Wagner, 2001} {Ahmad-Nejad, 2002}.

L'administration orale *in vivo* de CpG-ODNs agonistes du TLR9 est suffisante pour protéger des souris contre les infections par les pathogènes intracellulaires *Leishmania major* et *Listeria monocytogenes* {Krieg, 1998} {Zimmermann, 1998} {Elkins, 1999} mais constitue également un élément amplificateur de l'inflammation chronique intestinale dans le modèle de colite induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) chez la souris {Obermeier, 2005}. Les CpG-ODNs sont actuellement considérés comme une alternative à l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant vaccinal. La génération et l'étude approfondie d'une grande variété de CpG-ODNs a permis d'identifier certaines de ces molécules aux propriétés anti-inflammatoires (**CpG-ODNs antagonistes**) {Ho, 2005}. L'activité immuno-régulatrice du probiotique *E. coli* DH5 alpha chez la souris a été corrélée à la présence de motifs CpG antagoniste dans le génome de cette bactérie {Rachmilewitz, 2004}.

## TLR11

Le TLR11 est exprimé en surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les souris TLR11 KO ont un défaut de production d'IL-12 par les cellules dendritiques et de façon générale, ont une réponse Th1 diminuée lors de l'infection par *Toxoplasma gondii* {Plattner, 2008}. Le fractionnement moléculaire des antigènes solubles de *T. gondii* a permis d'identifier les **profilines** comme étant un agoniste du TLR11 chez la souris {Yarovinsky, 2005}.

|                                   | TLR1-2                                 | TLR2-6                                 | TLR3                        | TLR4                                              | TLR5       | TLR7                  | TLR9                               | TLR11                          |
|-----------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Hôte</b>                       |                                        |                                        | ARNm                        | HSPs <sup>3</sup> ,<br>Matrice<br>extracellulaire |            | ARNm                  |                                    |                                |
| <b>Parasites</b>                  | Protéine à<br>ancrage GPI <sup>1</sup> | Protéine à<br>ancrage GPI <sup>1</sup> |                             |                                                   |            |                       | Hemozoïne ( <i>P. falciparum</i> ) | Profiline ( <i>T. gondii</i> ) |
| <b>Champignons</b>                | Zymosan                                | Zymosan                                |                             |                                                   |            |                       |                                    |                                |
| <b>Virus</b>                      |                                        |                                        | ARN<br>double<br>brins      | Protéine F                                        |            | ARN<br>simple<br>brin | ADN viral<br>(Herpes)              |                                |
| <b>Bactérie</b>                   | Triacyl<br>Lipopeptides                | Diacyl<br>Lipopeptides                 |                             | LPS <sup>4</sup>                                  | Flagelline |                       | CpG-ADN                            | Bactéries uro-<br>pathogènes   |
| <b>Agonistes<br/>synthétiques</b> |                                        |                                        | Poly<br>(I :C) <sup>2</sup> |                                                   |            | Resi-<br>quimod       | CpG-ODN <sup>5</sup>               |                                |

**Tableau 5 : agonistes naturels, ou synthétiques, activateurs des voies de signalisation TLR chez la souris.**

<sup>1</sup>Glycosylphosphatidylinositol, <sup>2</sup>PolyriboInosinic polyriboCytidylic acid, <sup>3</sup>Heat Shock Proteins,

<sup>4</sup>Lipopolysaccharide, <sup>5</sup>CpG-OligoDeoxyNucleotides

### 3.1.2. Distribution cellulaire des TLRs

Les TLRs sont exprimés dans la plupart des compartiments cellulaires de l'organisme. Les **monocytes/macrophages** expriment la plupart des ARNm des TLRs mis à part pour TLR3 {Muzio, 2000}. L'expression des TLRs par les cellules dendritiques varie en fonction de leur sous-type. Les **mDCs** expriment TLR1, 2, 4, 5, 7, 9 et 11 tandis que les **pDCs** expriment exclusivement les TLR7 et 9 {Jarrossay, 2001} {Ito, 2002}. L'engagement des TLRs avec leurs PAMPs respectifs induit la maturation des cellules dendritiques, modulant leur expression des TLRs. Les cellules dendritiques immatures diminuent l'expression des TLR1, 2, 4 et 5 lors de leur maturation. Le TLR3 est exprimé uniquement par les cellules dendritiques matures {Mellman, 2001}. Les **cellules B immatures** expriment les mêmes TLRs que les mDCs, à l'exception de TLR7, et diminuent progressivement l'expression de ces TLRs lors de leur maturation en plasmocytes {Zarembek, 2002}. Enfin, en ce qui concerne les cellules immunitaires, les **mastocytes** expriment TLR2, 4, 6 et 7 mais pas TLR5 intervenant dans la libération de cytokines inflammatoires lors de stress microbien {McCurdy, 2001} {Supajatura, 2002}.

Les TLRs sont également exprimés par les cellules des surfaces épithéliales. Dans l'intestin grêle, les **cellules épithéliales** n'expriment pas de TLRs sur leur face apicale évitant une constante activation par la flore microbienne. Cependant, les surfaces basolatérales de ces cellules expriment TLR2, TLR4 et TLR5 {Thieblemont, 1999} {Hornef, 2002} {Wolfs, 2002}. Les cellules épithéliales de l'intestin expriment également les TLRs intracellulaires : TLR3, 7 et 9 {Cario, 2000} {Pedersen, 2005} {Uehara, 2007}.

### 3.1.3. Régulation de l'expression des TLRs

L'expression des TLRs est modulée par le degré d'activation des cellules par certaines cytokines ou composants microbiens. L'infection par *Mycobacterium avium* augmente l'expression des ARNm codant pour le TLR2 et 4 des macrophages {Wang, 2000}. Certaines **infections virales** provoquent également l'augmentation de l'expression des ARNm codant pour TLR1, 2, 3 et 7 par les macrophages. Dans ce dernier cas, le

traitement avec des anticorps anti-IFNs de type I inhibe l'augmentation des TLRs suggérant que **les IFNs de type I** peuvent directement moduler l'expression de ces récepteurs {Miettinen, 2001}. Le LPS augmente l'expression du TLR2 des macrophages et des adipocytes, mais diminue l'expression du TLR4 et de MD-2. Ceci pourrait constituer un mécanisme de tolérance au LPS {Matsuguchi, 2000} {Lin, 2000}.

Certaines cytokines régulent l'expression des TLRs. **CSF-1** (Colony-Stimulating Factor-1) est induit *in vivo* lors d'infection ou lors d'exposition au LPS. Cette cytokine diminue l'expression du TLR9 par les macrophages supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires induites par les motifs CpG bactériens {Sweet, 2002}. Les cytokines pro-inflammatoires **MIF** (Macrophage Migration Inhibitory Factor), **IL-1 $\beta$** , **IL-2**, **IL-15**, **TNF- $\alpha$**  et **IFN- $\gamma$**  renforcent l'expression du TLR2 et TLR4 par les monocytes/macrophages {Bozza, 1999} {Matsuguchi, 2000} {Roger, 2001} {Bosisio, 2002}.

## 3.2. Voies de signalisation des Toll-Like Récepteurs

### 3.2.1. La cascade de signalisation induite par les TLRs

Après ligation au PAMP, les TLRs forment des complexes homo ou hétéro-dimériques induisant des modification conformationnelles requises pour le recrutement de molécules adaptatrices intracellulaires incluant MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88), IRAKs (IL-1R-Associated Kinase), TAK1 (TGF- $\beta$ -Activated Kinase-1), TAB-1 (TAK-1 Binding protein-1), TAB-2 et TRAF-6 (TNF-Receptor-Associated Factor-6) (figure 10).

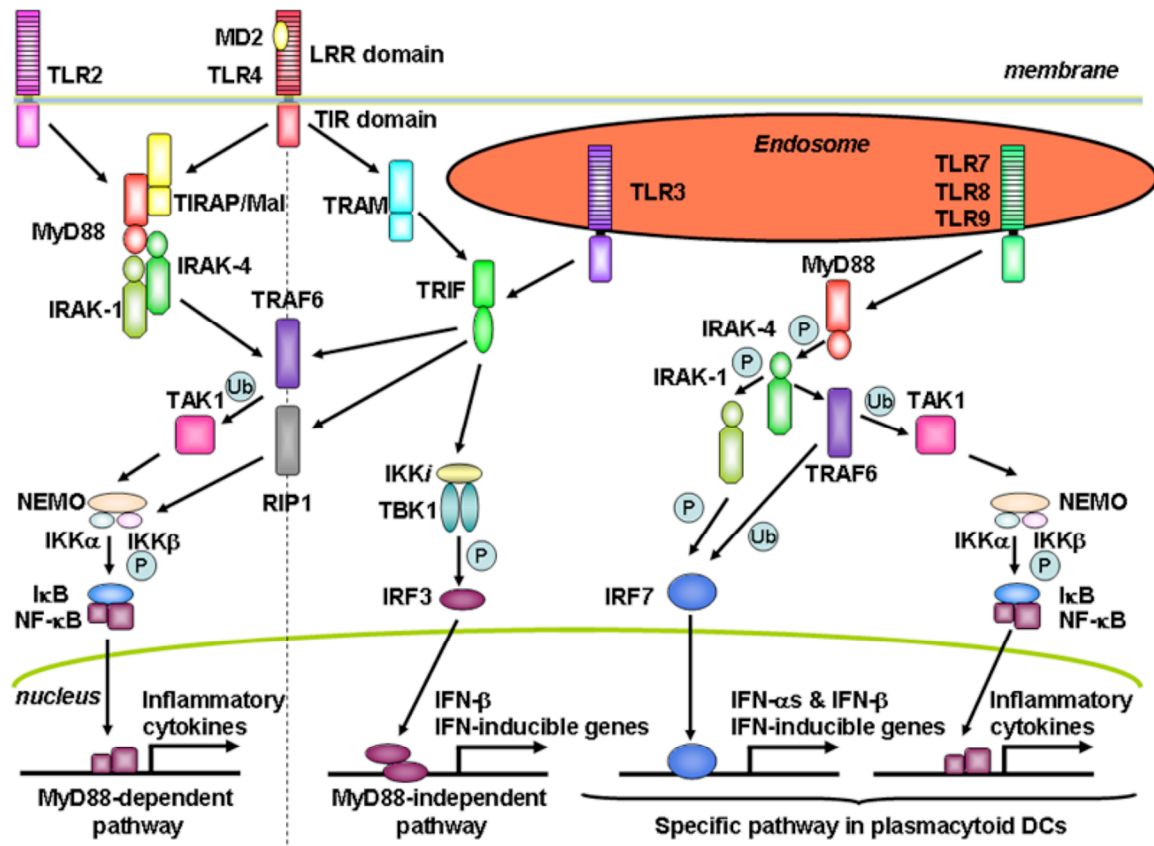


Figure 10 : voies de signalisation des TLRs {Akira, 2006}.

La molécule MyD88 a été identifiée comme étant une molécule adaptatrice recrutant la molécule IRAK vers l'IL-1R consécutivement à une stimulation par l'IL-1. L'association entre MyD88 et IRAK se fait par les Death Domain (DD) que possèdent les deux molécules. MyD88 forme des homodimères en se liant par ses DD et ses domaines TIR et fonctionne comme une molécule adaptatrice entre les TLRs et les molécules possédants des DD {Muzio, 1997} {Wesche, 1997} {Burns, 1998}.

Les TLRs transmettent leurs signaux via MyD88 et les sérine/thréonine kinases de la famille **IRAK** {Dunne, 2003}. Les molécules IRAK possédant un **DD** N-terminal regroupent deux kinases actives : IRAK1 et IRAK4, et deux kinases inactives : IRAK2 et IRAK-M. Lors de l'activation des TLRs, l'activité kinase d'IRAK1 et d'IRAK4 est fortement augmentée et induit *in fine* la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. À la différence d'IRAK4, l'activité kinase d'IRAK1 n'est cependant pas requise pour cette translocation nucléaire {Li, 1999} {Janssens, 2003}. IRAK-M régule négativement les voies de signalisation des TLRs en empêchant IRAK4 de se détacher de MyD88, après activation, bloquant ainsi la cascade de signalisation intracellulaire {Li, 2005}.

Les molécules **TRAFs** constituent une famille de six membres, identifiés chez les mammifères, et caractérisés par la présence d'un domaine en doigt de zinc N-terminal (ou TRAF-N), et d'un domaine C-terminal conservé (ou TRAF-C) interagissant avec les molécules IRAKs {Bradley, 2001}. **TRAF6** est une molécule de signalisation intervenant dans les voies de signalisation des TNF-R, IL-1R et TLRs. Le domaine TRAF-C reconnaît une séquence consensus D-E-F-W-Y exprimée par le CD40 et les molécules IRAK1, IRAK2 et IRAK-M {Ye, 2002}.

La translocation par TRAF6 des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 requiert **TAK1** et les deux molécules adaptatrices **TAB1** et **TAB2**. TAK1 appartient à la famille des MAPKKK (Mitogen-Associated Protein Kinase Kinase Kinase) {Yamaguchi, 1995} {Takaesu, 2003}. TAB1 fonctionne comme un activateur de l'activité kinase de TAK1 tandis que TAB2 est un adaptateur liant TAK1 à TRAF6 {Shibuya, 1996} {Takaesu,

2000}. Il a été montré que des processus d'ubiquitination ont un rôle important dans l'activation de TAK1, le domaine TRAF-N de TRAF6 intervenant comme une ubiquitine-ligase {Deng, 2000}.

### 3.2.2. Molécules adaptatrices de la signalisation TLR

L'activation des TLRs induit différents profils d'expression de gènes. MyD88 est une molécule adaptatrice commune initiant les voies de signalisation des TLR1, 2, 4, 5, 7, 9 et 11 {Adachi, 1998} {Takeda, 2003} {Yarovinsky, 2005}. Cependant, les souris MyD88 KO gardent leur capacité à répondre aux ARN viraux double brins et au LPS suggérant l'existence des voies parallèles de signalisation, MyD88-indépendantes, pour le TLR3 et le TLR4 {Kawai, 1999} {Alexopoulou, 2001}. Ces voies de signalisation contiennent des molécules adaptatrices contenant des domaines TIR tel : TIRAP (TIR-domain-containing Adaptator Protein), TRIF (TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN- $\beta$ ) et TRAM (TRIF-Related Adaptator Protein) (figure 10).

À la différence de MyD88, **TIRAP** ne contient pas de DD. Les souris TIRAP KO produisent peu réduite de cytokines pro inflammatoires en réponse au LPS. Ce phénotype est similaire à ce qui est observé chez les souris MyD88 KO {Fitzgerald, 2001} {Yamamoto, 2002}. Il est à noter que les souris TIRAP KO ont également une production réduite de cytokines pro inflammatoires en réponse à des agonistes du TLR2, montrant que TIRAP est essentiel dans les **voies de signalisation MyD88-dépendantes du TLR2 et TLR4** {Yamamoto, 2002} {Horng, 2002}.

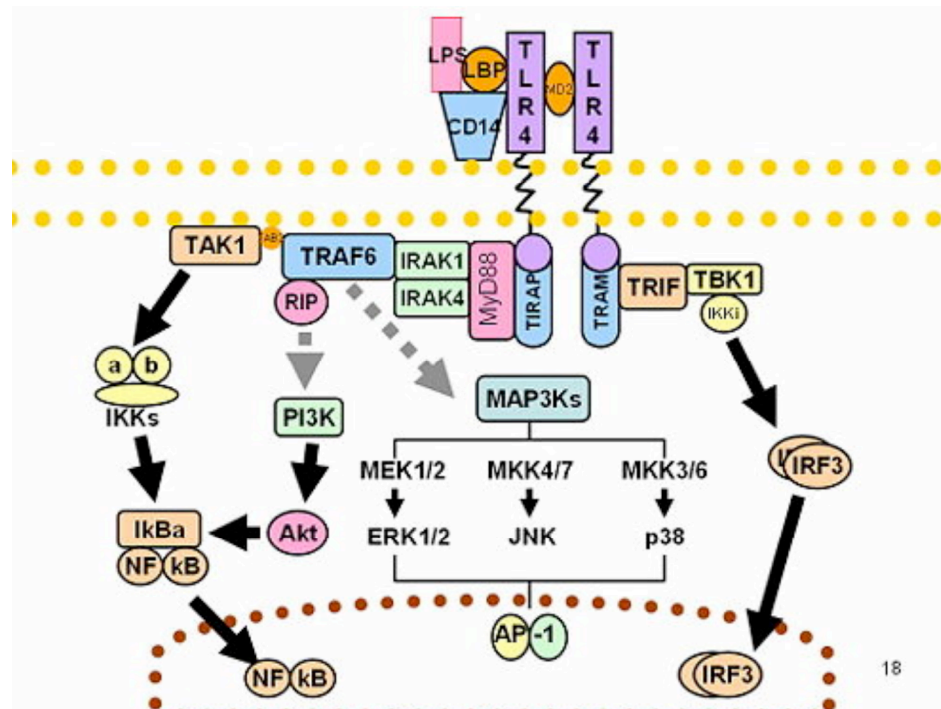
La surexpression de la molécule **TRIF** conduit à l'activation du promoteur IFN- $\beta$  dans les cellules HEK293 {Yamamoto, 2003}. *In vivo*, les souris TRIF KO n'opèrent pas de translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) et IRF5 lors de la stimulation respective par des ARN doubles brins et du LPS. TRIF est ainsi identifié comme intervenant dans les signalisations **TLR3** et **TLR4** par des mécanismes **MyD88-indépendants**, induisant la production d'IFNs de type I {Yamamoto, 2003} {Hoebe, 2003}.



La molécule **TRAM** constitue une troisième molécule exprimant un domaine TIR. Il a été montré *in vitro et in vivo* que TRAM s'associe à TRIF dans les voies de signalisation **TLR4 MyD88-indépendantes**, ce qui n'est pas le cas pour les voies de signalisation TLR3 {Fitzgerald, 2003} {Oshiumi, 2003}. En réponse au LPS, les souris TRAM KO n'opèrent pas la translocation nucléaire d'IRF3 et ont une production limitée d'IFN- $\beta$  {Yamamoto, 2003}.

### 3.2.3. Facteurs de transcription activés par les voies de signalisation TLRs

L'activation des voies de signalisation TLRs par des mécanismes MyD88-dépendants ou indépendants induit la translocation nucléaire de facteurs de transcription pro inflammatoires (**NF- $\kappa$ B**), pro mitotiques (**AP-1**) et/ou immuno modulateurs (**IRFs** – Interferon Regulatory Factors) (figure 11).



**Figure 11 : facteurs de transcription dont la translocation nucléaire est induite par l'activation des voies de signalisation TLR4 (Kobayashi K., Harvard Medical School)**

La famille des facteurs de transcription **NF-κB** est composée de 5 membres : p65 (REL-A), REL-B, cREL, P50 et p52 pouvant former des homo ou hétérodimères {Gilmore, 2006}. Les dimères NF-κB sont séquestrés dans le cytoplasme sous forme inactive, liés aux molécules de la famille IκB (Inhibitor of NF-κB) {Scheidereit, 2006}. L'activation de NF-κB implique la phosphorylation et le détachement des protéines IκB permettant la translocation nucléaire du facteur de transcription. Ce processus d'activation est médié par la kinase IKK (IκB Kinase) constituée de deux sous unités catalytiques (IKK1 et IKK2) et d'une sous unité régulatrice (IKK-γ ou NEMO). Lors de l'activation de la protéine kinase TAK1, IKK phosphoryle les protéines IκB permettant leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome {Bonizzi, 2004} {Hayden, 2004} {Minakhina, 2006}. NF-κB est un facteur de transcription majeur régulant la production de cytokines pro inflammatoires comme **IL-1β**, **IL-6**, **IL-12**, **TNF-α**, **IFN-γ**, et de chimiokines pro inflammatoires telle **CXCL8** chez l'homme, **CCL2**, **CCL3** et **CCL4** en réponse aux infections {Balkwill, 2001} {Karin, 2005}. NF-κB intervient également dans l'expression de molécules d'adhésion dont l'intégrine **ICAM** {Hang, 2005}.

Les MAP-kinases intervenant lors de l'activation des voies de signalisation TLRs convergent vers l'activation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et de la MAP-kinase p38 {Huang, 2004} {Matsuzawa, 2005}. Une fois activées, ces deux sérine/thréonine kinases peuvent phosphoryler c-Jun lui permettant de former des complexes hétérodimériques avec c-Fos : **AP-1** (Activation Protein -1), ou homodimériques : ATF-2 {Shaulian, 2002}. Le facteur de transcription AP-1 est généralement décrit comme un facteur de régulation de l'activité proliférative des cellules. Ainsi AP-1 stimule la production de **cycline D1** initiant la phase G1 du processus mitotique et inhibe dans le même temps les facteurs anti-oncogènes p53 et p21 {Xiong, 1993} {el-Deiry, 1993} {Schreiber, 1999}. AP-1 également active la prolifération cellulaire locale en induisant la production de facteurs de croissances : **GM-CSF**, **KGF**, **EGF**, et de molécules de remodelage de la matrice extracellulaire : **MMP-7** et **MMP-9** {Asahara, 1997}. Le facteur de transcription AP-1 intervient dans l'expression des cytokines pro inflammatoires induites par NF-κB en **régulant négativement** l'expression d'**IL12** et de **TNF-α** {Ray, 2006}. AP-1 inhibe

par ailleurs la transcription de l'**iNOS** (Inducible Nitric Oxide Synthase) limitant la production d'oxyde nitrique par les macrophages {Okada, 2003}.

Une dernière famille de facteur de transcription est induite par les signalisations TLRs : les **IRFs** (Interferon Regulatory Factors). La famille des IRFs comprend 9 membres (IRF1-9) contenant dans leur région N-terminale un motif de reconnaissance de l'ADN {Taniguchi, 2001} {Lohoff, 2005}. Ce motif reconnaît une séquence ADN consensus appelée ISRE (Interferon Stimulated Response Element) portée par les gènes codant pour les **IRFs** eux-mêmes, des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (**IL-12**, **IL-15**, **IL-4**), des chimiokines pro-inflammatoires (**CXCL10**), des facteurs de transcription anti-inflammatoires (**Gata-3**) ou encore les **IFNs de type I** modulateur de la réponse immunitaire {Taki, 1997} {Scharton-Kersten, 1997} {Lohoff, 2000 #409} {Sato, 2000} {Rengarajan, 2002} {Takaoka, 2005}. Chaque IRF induit l'expression d'un profil d'expression de cytokines et de chimiokines particulier (tableau 6). Certaines voies de signalisation TLRs aboutissent à la phosphorylation des IRFs étape requise pour leur translocation nucléaire {Honda, 2006} (tableau 6).

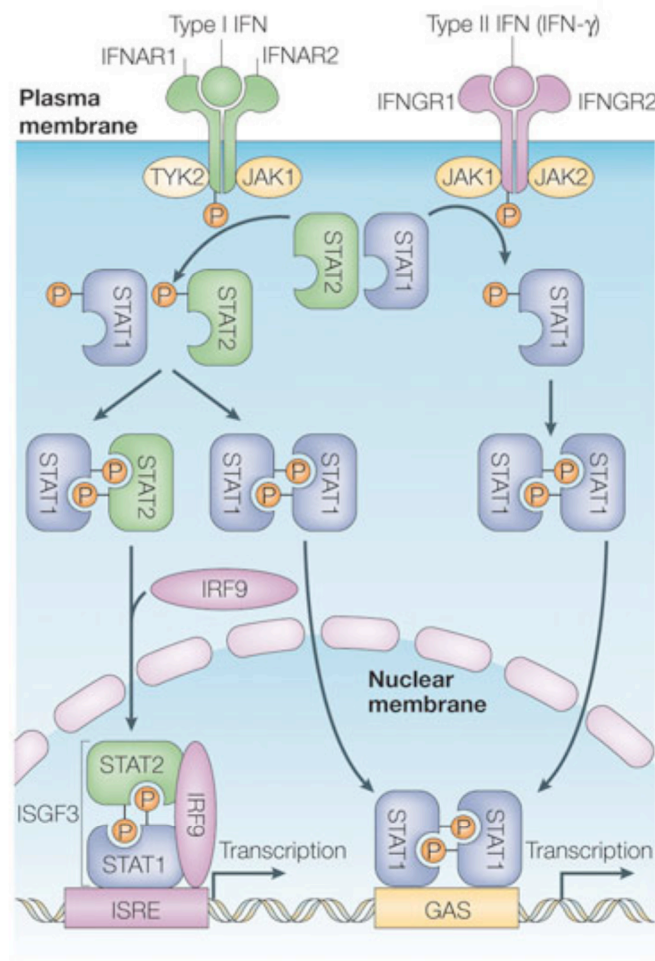
| IRF  | Expression                                                                                    | Gènes cibles                                       |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| IRF1 | Constitutive<br>Inductible par IFN $\gamma$                                                   | IL-12                                              |
| IRF2 | Constitutive                                                                                  | IL-12                                              |
| IRF3 | Constitutive<br>Inductible par ligation des TLR 3 et 4                                        | IFN $\alpha$ 4, IFN $\beta$<br>CCL5, CXCL9, CXCL10 |
| IRF4 | Inductible par ligation des TLRs                                                              | IL-4                                               |
| IRF5 | Constitutive<br>Inductible par IFNs de type I<br>Inductible par ligation des TLR 4, 5 et 9    | IL-6, IL-12, TNF $\alpha$<br>CXCL2                 |
| IRF6 | ND                                                                                            | ND                                                 |
| IRF7 | Constitutive<br>Inductible par IFNs de type I<br>Inductible par ligation des TLR 3, 4, 7 et 9 | IFN $\alpha$ , IFN $\beta$                         |
| IRF8 | Constitutive<br>Inductible par IFNs de type I<br>Inductible par ligation des TLR 4 et 9       | IL-12                                              |
| IRF9 | Constitutive                                                                                  | IL-12                                              |

**Tableau 6 : régulation de l'expression des membres de la famille de IRF (Interferon Regulatory factors) et cytokines/chimiokines induites {Honda, 2006 modifié}**

Les IRFs sont capables d'**interactions avec d'autres molécules**. Ainsi, les IRF3 et 7 forment un complexe initiateur de transcription comprenant NF- $\kappa$ B et AP-1 contribuant à la synthèse d'IFN- $\beta$ . IRF3 interagit également avec la sous unité p65 du NF- $\kappa$ B agissant comme un cofacteur renforçant l'expression des gènes NF- $\kappa$ B-dépendants {Lenardo, 1989} {Wathelet, 1998}. Enfin, IRF9 peut se complexer aux molécules STAT1 et STAT2 pour former le facteur de transcription ISGF3 (Interferon Stimulated Genes Factor-3) induisant l'expression de gène codant pour IRF7 et l'IFN- $\beta$  {Decker, 2005}.

### 3.3. Les Interférons de type I et leur récepteur

Les interférons (IFNs) ont été initialement identifiés comme des molécules stimulant la synthèse d'un large panel de molécules anti-virales limitant ainsi la réplication et la dissémination des particules virales {Isaacs, 1957} {Katze, 2002}. Leur classification en deux groupes distincts repose sur les récepteurs qu'ils reconnaissent : les **IFNs de type I** reconnaissent le récepteur IFNAR (Type I IFN Receptor) comprenant 2 sous-unités (IFNAR1 et IFNAR 2) ; l'**IFN de type II** ou IFN- $\gamma$  reconnaît le récepteur IFNGR comprenant également deux chaînes (IFNGR1 et IFNGR2) {Stark, 1998} (figure 12). Les récepteurs aux IFNs régulent l'expression de gènes selon des mécanismes identiques en activant les molécules de signalisation **JAK** (Janus Kinase) et les facteurs de transcription **STAT** (Signal Transducer and Activator of Transduction) {Levy, 2002}. Classiquement, l'IFN- $\gamma$  active les propriétés antimicrobiennes (principalement anti-bactérienne et anti-parasitaire) des macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales. La production d'IFNs de type I quant à elle intervient rapidement dans les processus d'immunité innée déclenchés par les bactéries, les parasites, les champignons mais aussi les virus {Decker, 2002} {Hertzog, 2003} {Schroder, 2004} {Bogdan, 2004}.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

**Figure 12 : voies de signalisation des récepteurs aux interférons {Decker, 2002}.**

### 3.3.1. La famille des IFNs de type I

La famille des IFNs de type I est constituée de 20 membres pouvant être exprimés spécifiquement par certaines espèces. Les génomes de mammifères contiennent les gènes codant pour les IFN-α, IFN-β, IFN-ω, IFN-κ et IFN-ε. De plus, l'IFN-ζ a été spécifiquement identifié chez la souris, les IFN-τ et IFN-δ sont exprimés chez le porc. Tous les IFNs de type I possèdent une certaine homologie de séquence et de structure, mais n'ont aucune ressemblance avec l'IFN-γ de type II {Hardy, 2004} {van Pesch, 2004} {Pestka, 2004}.

Lors d'infections virales et bactériennes, les principaux IFNs de type I produits sont les IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  {Bogdan, 2004}. Deux types d'**IFN- $\beta$**  sont produits chez l'homme et la souris : l'IFN- $\beta$ 1 (communément appelé IFN- $\beta$ ) et l'IFN- $\beta$ 2 (ou IL-6). Bien que l'IL-6 possède des activités immuno-modulatrices similaires à l'IFN- $\beta$ , elle ne partage pas le même récepteur et, est de ce fait considérée comme une cytokine indépendante n'appartenant pas à la famille des IFNs de type I {van Pesch, 2004} {Mitsuyama, 2006}. La sous-famille des **IFN- $\alpha$**  est constituée de 13 membres fonctionnels chez l'homme et 14 chez la souris (IFN- $\alpha$ 1-13/14) {van Pesch, 2004}. Bien que les différents IFN- $\alpha$  possèdent des activités biologiques propres, notamment en terme d'activation des cellules NK, ils conservent une activité commune anti-virale {Pestka, 2004}. La production d'IFNs de type I n'est pas limitée à un réservoir cellulaire spécifique puisque toute cellule infectée par des virus peut produire ces cytokines. Cependant, certaines cellules telles les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont spécialisées dans la production d'IFNs de type I et sont de ce fait capables d'induire une réponse systémique {Levy, 2002} {Prakash, 2005}.

### 3.3.2. Le récepteur IFNAR (figure 12)

Les chaînes **IFNAR1** et **IFNAR2** sont ancrées à la surface membranaire et associées par leur domaine intra cytoplasmique à des membres de la famille des Janus Kinase (JNK) : TYK2 (Tyrosine Kinase 2) et JAK1 respectivement {Novick, 1994} {Russell-Harde, 1995} {Cohen, 1995}. La fixation des IFNs de type I à ce récepteur induit la phosphorylation des JNKs nécessaire pour le recrutement des molécules STAT1 et STAT2 {Velazquez, 1995} {Krishnan, 1996}. Les STATs ensuite phosphorylées forment des hétérodimères **STAT1-STAT2** capables de se complexer à la molécules **IRF9** pour former le facteur de transcription **ISGF3**, induisant la synthèse d'IFNs de type I. STAT1 peut également former des homodimères **STAT1-STAT1** qui migrent dans le noyau et activent la synthèse de cytokines et chimiokines pro inflammatoires {Haque, 1994} {Li, 1996} {Decker, 2005}.

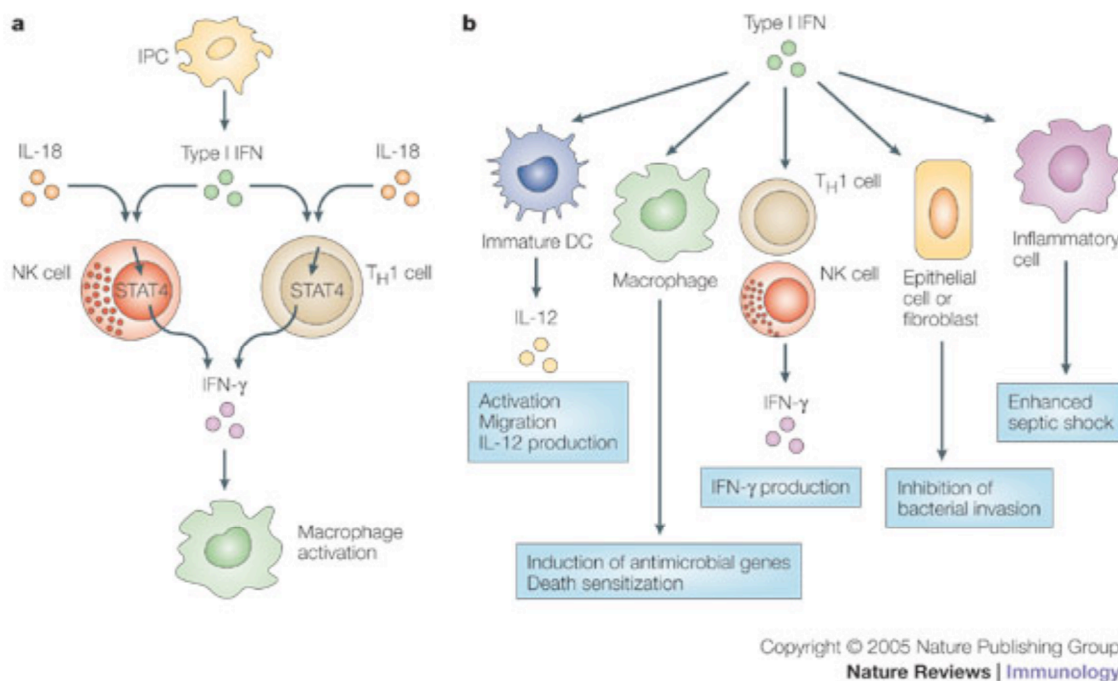
### 3.3.3. Mécanismes d'actions anti-microbiennes des IFNs

Les IFNs de type I sont des molécules immuno modulatrices ayant un spectre d'action très large sur les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs.

Les IFNs de type I inhibent directement la réplication de virus. Ils empêchent la dissémination de ces virus en rendant les cellules infectées plus sensibles à l'apoptose. Les corps apoptotiques ainsi générés renforcent la présentation des antigènes viraux par les cellules présentatrices d'antigènes. L'un des mécanismes par lequel les IFNs de type I pourraient déclencher les processus apoptotiques, en réponse aux infections virales, est l'activation de la sérine/thréonine kinase PKR (Protein Kinase R) impliquée dans l'expression du récepteur de mort Fas {Balachandran, 2000} {Ohyama, 2004}. Les IFNs de type I contrôlent également la réplication de pathogènes bactériens en induisant la production d'oxyde nitrique et d'indoléamine-2, 3-dioxygénase (IDO) par les cellules infectées {Carlin, 1989} {Devitt, 1996} {Schiavoni, 2004}.

Les IFNs de type I constituent par ailleurs un lien entre l'immunité innée et adaptative lors d'infections bactériennes (figure 13). Ils contribuent à la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et permettent leur migration vers les organes lymphoïdes régulant ainsi les processus de présentation antigénique aux cellules T. L'infection *in vitro* de cellules de Langherans humaines par *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* induit leur maturation par des mécanismes dépendants des IFNs de type I {Flacher, 2006}. Il en est de même pour des cellules dendritiques et des macrophages humains infectés par *Salmonella enterica* sérovar Thyphimurium (*S. Thyphimurium*) {Pietila, 2005}. Par ailleurs, lors de l'infection de souris par *S. Thyphimurium*, les IFN- $\alpha$  et - $\beta$  générés agissent en synergie avec l'IL-18 pour induire la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et les cellules T CD4<sup>+</sup> par des mécanismes IL-12 indépendants {Freudenberg, 2002}. Enfin, des études *in vitro* utilisant des macrophages humains ont montré que l'IFN- $\beta$  stimule la production d'IFN- $\gamma$  et d'indoléamine-2, 3-dioxygénase (IDO) par ces cellules renforçant leur capacité à inhiber la réplication intracellulaire du parasite *Toxoplasma gondii* et à tuer le parasite {Schmitz, 1989} {Orellana, 1991}.





**Figure 13 :** stimulations des mécanismes d'immunité innée et adaptative par les IFNs de type I {Decker, 2002}.

### 3.4. Conclusion : origine des IFNs de type I et modulation de la réponse immunitaire

Les récepteurs Toll-like (TLRs) jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée aux agents pathogènes et dans l'initiation d'une réponse adaptative efficace. La grande variété de motifs microbiens qu'ils reconnaissent ainsi que leur expression dans les compartiments cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques font des TLRs un senseur microbien privilégié dans l'intestin grêle. Lors de processus infectieux, l'activation des voies de signalisation TLRs induit la production de cytokines et chimiokines pro inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules épithéliales. Les interférons de type I (IFNs de type I) sont également produits lors de l'activation des voies de signalisation TLRs et contribuent, par des mécanismes de stimulation autocrines ou paracrines, à amplifier les mécanismes immuns nécessaires à l'élimination des pathogènes notamment intestinaux.

## CHAPITRE 4 : LES MECANISMES DE LA REPONSE IMMUNITAIRE CONTRE *TOXOPLASMA GONDII*

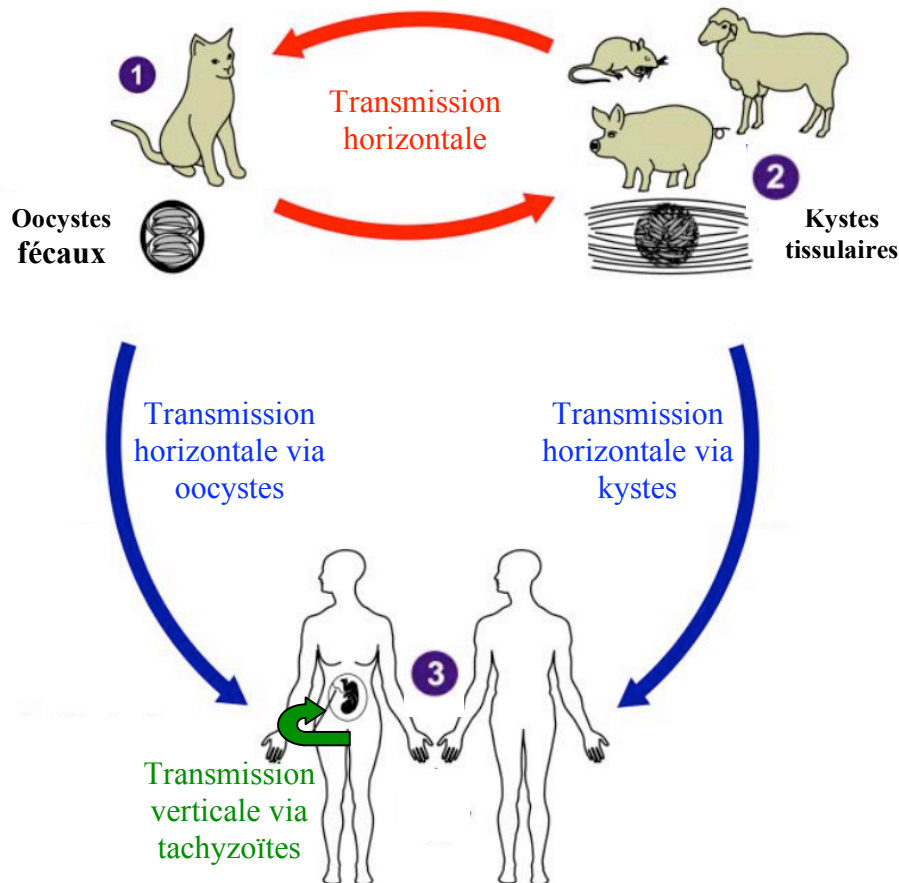
L'infection par *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est très répandue chez l'homme et existe partout dans le monde. L'incidence de cette infection varie en fonction de la zone géographique. En Europe, la séroprévalence est élevée, allant jusqu'à 54% dans les pays du sud de l'Europe, mais est plus faible dans les pays Nordiques telle la Suède ou la Norvège (5-10%) {Jenum, 1998} {Evengard, 2001}. Sur le continent Américain, la **séroprévalence** de *T. gondii* reste limité aux Etats-Unis (16-40%) tandis qu'elle représente 50 à 80% de la population dans les pays d'Amérique centrale et d'Amérique du sud {Jones, 2003} {Bahia-Oliveira, 2003}. De façon générale, la probabilité et la fréquence de contact avec le parasite est élevée parmi les populations vivant dans des milieux socio-économiques pauvres pouvant êtres contaminés par des eaux souillées {McQuillan, 2004}. La France, avec une séroprévalence de l'ordre de 55%, fait figure d'exception. Dans ce dernier cas, la forte séroprévalence de *T. gondii* est probablement due à des habitudes alimentaires notamment la consommation de viande saignante {Zuber, 1995} {Berger, 2007}.

La plupart des infections à *T. gondii* chez l'homme sont asymptomatiques, mais entraînent dans certains cas une maladie dévastatrice : la toxoplasmose. L'une des formes sévères de l'infection est la **toxoplasmose congénitale**, provoquant des avortements, des anomalies de développement du système nerveux central ou des cécités des fœtus {Petersen, 2007}. La voie d'infection naturelle de *T. gondii* est la voie orale, le parasite étant ensuite capable de se disséminer et de se multiplier dans tous les organes {Dubey, 1996} {Dubey, 2000}. Il peut, sous forme de kystes, résider dans les cellules musculaires ou rétiennes, ainsi que dans le cerveau {Gilbert, 1999} {Hill, 2002}. L'enkystement permet au parasite de survivre face aux attaques du système immunitaire et de se maintenir durant toute la vie des individus infectés. À la faveur d'immuno-dépression (SIDA, chimio et radiothérapies, greffes), *T. gondii* ré-initie sa réplication en particulier dans le cerveau et engendre une **toxoplasmose cérébrale** mortelle {Frenkel, 1975} {Holtkamp, 2004} {Hung, 2005}. À ce jour, aucun traitement n'est disponible

pour se prévenir de l'infection par le toxoplasme sous sa forme kystique. Seules de bonnes conditions d'hygiène et une cuisson suffisante des aliments peuvent limiter les risques de contamination.

#### 4.1. Cycles infectieux de *T. gondii*

*T. gondii* est un protozoaire appartenant au phylum *Apicomplaxa*. Ce phylum est constitué entre autres de *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Eimeria*, parasites intracellulaires pour lesquels l'invasion d'une cellule hôte est une étape obligatoire du cycle biologique et un composant essentiel de leur pathogénicité {Black, 2000} {Kim, 2004}. Le cycle de vie de *T. gondii* est constitué de deux phases (figure 14).



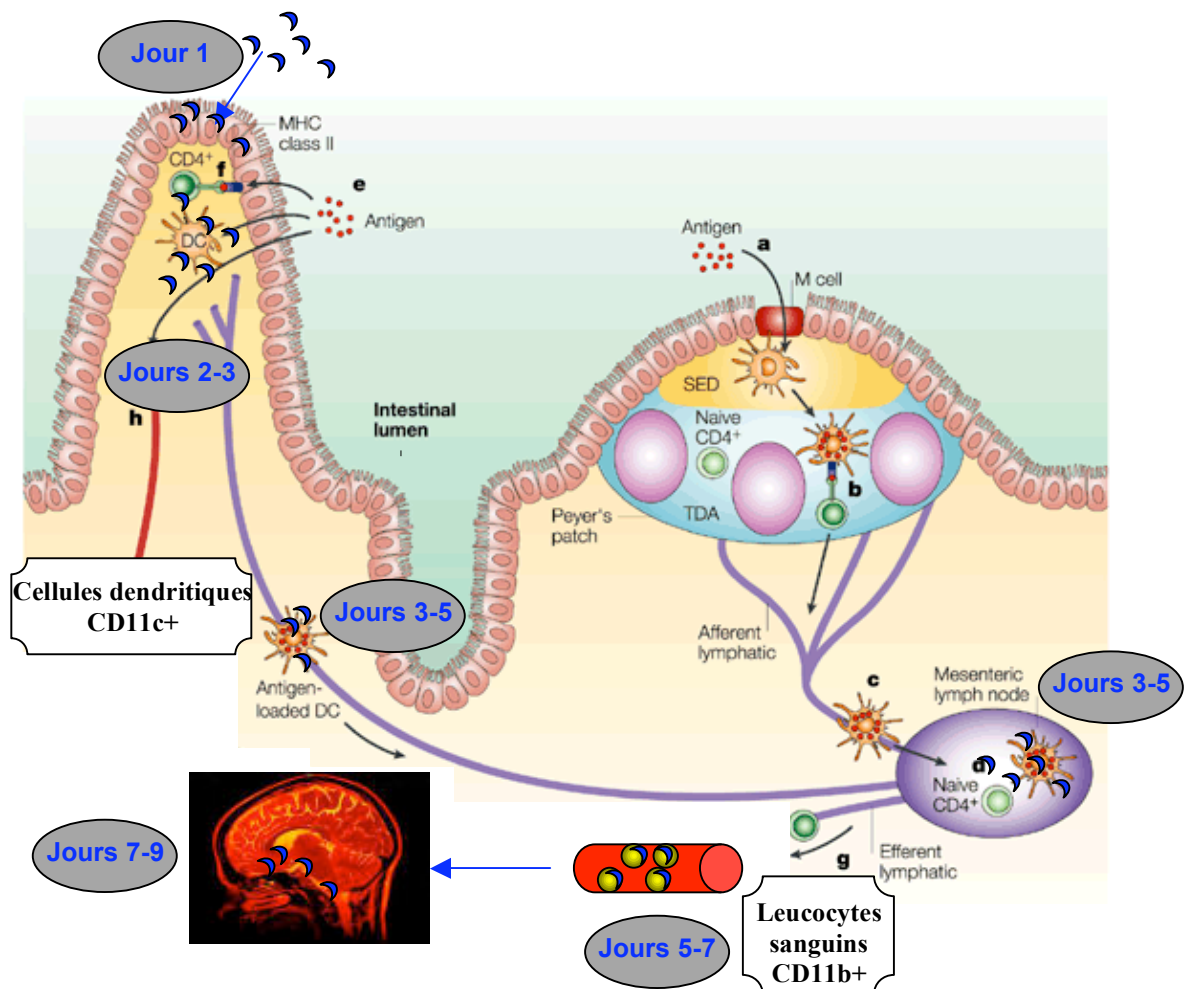
**Figure 14 : cycles infectieux de *Toxoplasma gondii*.** ① Hôte primaire du parasite  
② ③ Hôtes secondaires du parasite {Tenter, 2000 modifié}.

La **phase sexuée** a lieu uniquement chez les membres de la famille des *Felidae* (chats sauvages et domestiques), hôtes primaires pour le parasite {Dubey, 1976 #469}. Après ingestion de kystes provenant de source fécale ou tissulaire, *T. gondii* envahit les cellules épithéliales de l'intestin des *Felidae* et se multiplie de manière asexuée dans des vésicules parasitophores sous forme de bradyzoïtes {Freyre, 1989}. Après quelques jours de reproduction rapide, le parasite acquiert sa forme sexuée. Pendant les deux semaines que dure la phase sexuée intestinale, des millions d'oocystes vont être libérés dans la lumière intestinale, et excrétés dans le fèces de l'hôte. Ces oocystes survivent pendant plusieurs mois dans le sol et constituent une source d'infection importante des hôtes secondaires. Après sporulation, qui intervient dans le milieu extérieur en 1 à 21 jours, en fonction des conditions hygrométriques, de température et d'aération du milieu, les oocystes renferment deux sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes {Lindsay, 1991} {Lindsay, 1993} {Dubey, 1998}. Les sporozoïtes sont infectieux et contaminent l'homme et les animaux après leur ingestion. Les sporozoïtes ingérés par l'homme ou par des herbivores comme les moutons, se transforment en tachyzoïtes, formes répliquatives du parasite.

La **phase asexuée** se produit lorsque *T. gondii* infecte des animaux à sang chaud comme les mammifères ou les oiseaux {Wong, 1993} {Dubey, 1998}. Lorsque ces hôtes dits intermédiaires ingèrent des oocystes, *T. gondii* pénètre activement les cellules de la barrière épithéliale de l'intestin, forme une vésicule parasitophore où le parasite évolue en sa forme répliquative asexuée : les tachyzoïtes {Smith, 1995}. Le parasite se multiplie par des mécanismes de fission binaire induisant *in fine* l'éclatement des vacuoles parasitophores puis des cellules hôtes elles-mêmes permettant aux **tachyzoïtes** de migrer vers les cellules adjacentes et de les infecter {Radke, 1998}.

Chez ses hôtes intermédiaires, *T. gondii* n'initie pas de phases d'enkystement dans l'intestin grêle. Ainsi, la transmission du parasite ne peut s'effectuer directement de personne à personne, mis à part dans le cas de la mère à son fœtus. Cependant, le parasite

se dissémine dans l'organisme à partir de la barrière intestinale vers différents tissus de l'hôte comme les poumons, la rate ou le foie. Les principaux réservoirs tissulaires connus contenant le parasite restent néanmoins le système nerveux central et les muscles squelettiques ou cardiaques. Durant les trois premiers jours, *T. gondii* infecte et se multiplie dans les **entérocytes**. Après une phase intensive de réplication asexuée, des tachyzoïtes sont libérés et réinfectent les cellules adjacentes dont celles de la **lamina propria**, point de départ de leur migration vers le cerveau {Dubey, 1997} {Speer, 1998} {Bout, 1999} (Figure 15).



**Figure 15 : différentes phases de migration des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* de la lamina propria vers le cerveau {Mowat, 2003} {Courret, 2006}.**

Les tachyzoïtes infectent les **cellules dendritiques** CD11c+ pour migrer vers les **ganglions mésentériques** au jour 5 post-infection. À partir des ganglions, le toxoplasme rejoint la **circulation sanguine** au jour 7 pour se disséminer dans l'organisme par l'intermédiaire des leucocytes CD11b+ qu'il infecte. Enfin, par des mécanismes non encore élucidés, *T. gondii* atteint, 9 jours après infection, le **cerveau** où il initie une phase d'enkystement {Courret, 2006}. La forme kystique du parasite et sa localisation intracellulaire expliquent en grande partie la persistance de *T. gondii* dans les tissus périphériques malgré l'intervention de nombreux mécanismes de défense, innés ou adaptatifs. Ceci explique également les échecs de traitements par des antibiotiques à ce stade du cycle parasitaire.

#### 4.2. Les Différentes souches de *T. gondii*

L'analyse de marqueurs génotypiques, l'habileté du parasite à induire une encéphalite ou à induire tout un panel de cytokines sont des critères qui ont été pris en compte pour classer *T. gondii* en trois groupes majeurs : les souches de type **I** (RH et GT-1), **II** (ME49) et **III** (CEP et VEG) {Saeij, 2005}.

##### 4.2.1. Génotype de *T. gondii* et virulence

*T. gondii* exprime des facteurs de virulence constitués par des **antigènes de surface** permettant l'adhésion du parasite aux cellules de l'hôte (**SAGs**), des **facteurs solubles sécrétés** contribuant aux processus actifs d'invasion cellulaire (**ROPs**) et au relargage des tachyzoïtes après la réplication du parasite dans des vacuoles parasitophores (**MICs**, **GRAs**) {Lingelbach, 1998}.

La virulence du toxoplasme est mesurée par une DL<sub>50</sub> (Dose Létale 50%) chez la souris. Ainsi, les souches de type I sont très virulentes comparées aux souches de type II et III chez la souris. Les souches de type I sont également associées chez les patients immunocompétents à des toxoplasmoses oculaires et congénitales {Howe, 1997} {Grigg, 2001} {Boothroyd, 2002}. L'élaboration de mutants knockout a permis d'identifier

certaines gènes liés à la virulence fortement exprimés par les souches de type I : SAG1, SAG3, ROP1, MIC1, MIC3 et GRA2 {Mercier, 1998} {Dzierszynski, 2000} {Cerede, 2005}.

#### 4.2.2. Migration de *T. gondii* et virulence

Le franchissement de la barrière épithéliale, de la barrière méningée ou du placenta sont des éléments clés pour la propagation du parasite dans l'organisme. Ainsi, au-delà de sa capacité à envahir les cellules de l'hôte, la **motilité de *T. gondii*** permet la dissémination du parasite. Il a été montré *in vitro* que les souches de type I ont une plus grande motilité que les souches de types II et III {Barragan, 2002} {Barragan, 2003 #487}.

#### 4.2.3. Multiplication intracellulaire de *T. gondii* et virulence

La vitesse de **multiplication intracellulaire du parasite** conditionne à la fois la dissémination du parasite dans l'organisme mais aussi l'intensité de la réponse immunitaire développée par l'hôte {Kaufman, 1958} {Kaufman, 1959}. La charge parasitaire est hautement corrélée à la pathogénie de *T. gondii* chez la souris, régulant le taux de production de cytokines Th1 en réponse à l'infection, augmentant les phénomènes d'apoptose et les dommages tissulaires {Kaufman, 1959} {Mordue, 2001} {Gavrilescu, 2001}. Les souches de type I ont une vitesse de multiplication *in vitro* supérieure aux souches de types II et III {Radke, 2001} {Sibley, 2002}. *In vivo*, la charge parasitaire de *T. gondii* RH dans la *lamina propria* est supérieure à celle de ME49 lors d'injections intra iléale d'une quantité identique de tachyzoïtes {Burg, 1988}.

### 4.3. L'immunité anti-toxoplasmique

L'infection par *T. gondii* induit des mécanismes immunitaires innés et acquis contrôlant la réplication et la dissémination du parasite, et détruisant les tachyzoïtes avant qu'ils n'infectent de nouvelles cellules. Des modèles murins ont été largement utilisés afin

d'identifier les différents composants de la réponse immunitaire intervenant dans l'immunité anti-toxoplasmique.

#### 4.3.1. Mécanismes innés de la réponse immunitaire à *T. gondii*

Les **entérocytes** bordant les villosités intestinales produisent de nombreuses cytokines et chimiokines pro inflammatoires lors de l'infection par de nombreux pathogènes. Rapidement après infection les entérocytes libèrent dans la lumière intestinale de l'**oxyde nitrique** inhibant la réplication du parasite et sa pénétration dans la barrière intestinale {Hayashi, 1996} {Yap, 1999}. L'analyse de tissus, provenant de l'intestin grêle de souris oralement infectées par *Toxoplasma gondii*, montre par ailleurs une augmentation importante de la production **des chimiokines pro inflammatoires** CCL2 et CXCL10 (et dans une moindre proportion des chimiokines CXCL2, CCL3, CCL4 et CCL5) {Mennechet, 2002}. *In vitro*, l'infection des lignées entérocytaires murines mIC<sub>cl2</sub>, ou humaines HT-29, par des tachyzoïtes de *T. gondii* induit la production des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2 et CXCL8 ayant des propriétés attractrices pour les cellules polymorphonucléaires, les monocytes macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T {Bens, 1996} {Denney, 1999} {Buzoni-Gatel, 2001}.

La chimiokine CXCL2 sécrétée par les entérocytes permet le recrutement des **neutrophiles** aux sites sites infectés par *T. gondii* via leur récepteur CXCR1 murin ou CXCR2 humain {Del Rio, 2001}. La déplétion des neutrophiles chez la souris est corrélée à une plus grande sévérité des lésions des tissus infectés et à une augmentation de la charge parasitaire soulignant le rôle de ces cellules dans l'immunité anti-toxoplasmique {Bliss, 2001}. Les neutrophiles sont des **cellules phagocytaires** capables de détruire les tachyzoïtes à la fois dans leur compartiment intracellulaire mais aussi par la sécrétion de facteurs microbicides {Thorne, 1983} {Nichols, 1985}. Ces cellules sont également une source importante d'**IL-12 et de TNF- $\alpha$**  lors de l'infection par le toxoplasme, contribuant ainsi à la génération d'une réponse adaptative de type Th1 conduisant à l'élimination du parasite {Denkers, 2003} {Denkers, 2004}.



Les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 partagent un récepteur commun CCR5 exprimé par les **macrophages** et **cellules dendritiques**, cellules phagocytaires internalisant *T. gondii*. De même que pour les neutrophiles, les macrophages sont capables de tuer *T. gondii* dans leur compartiment intracellulaire, consécutive à une endocytose active, et de libérer des facteurs microbicides en réponse à l'infection par le parasite {Murray, 1984} {Denkers, 2003}. La liaison de la cyclophiline-18 du toxoplasme au récepteur chimiokinique CCR5 active également les cellules présentatrices d'antigènes recrutées dans la *lamina propria* et induit la production d'**IL-12** {Aliberti, 2003} {Aliberti, 2003}. L'utilisation de souris MyD88 KO, molécule adaptatrice commune aux voies de signalisation par les TLRs, a permis de montrer que lors de l'infection par *T. gondii*, les macrophages et les cellules dendritiques sont par ailleurs activés par des processus TLR(s) dépendants {Scanga, 2002}. En effet, la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigènes infectées par *T. gondii* requiert d'une part des voies fonctionnelles de signalisation mais aussi l'engagement de la molécule de co-stimulation CD154 avec son ligand CD40 {Scanga, 2002} {Li, 2002}. L'IL-12 produite par les cellules présentatrices d'antigènes lors de l'infection par le toxoplasme induit la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T.

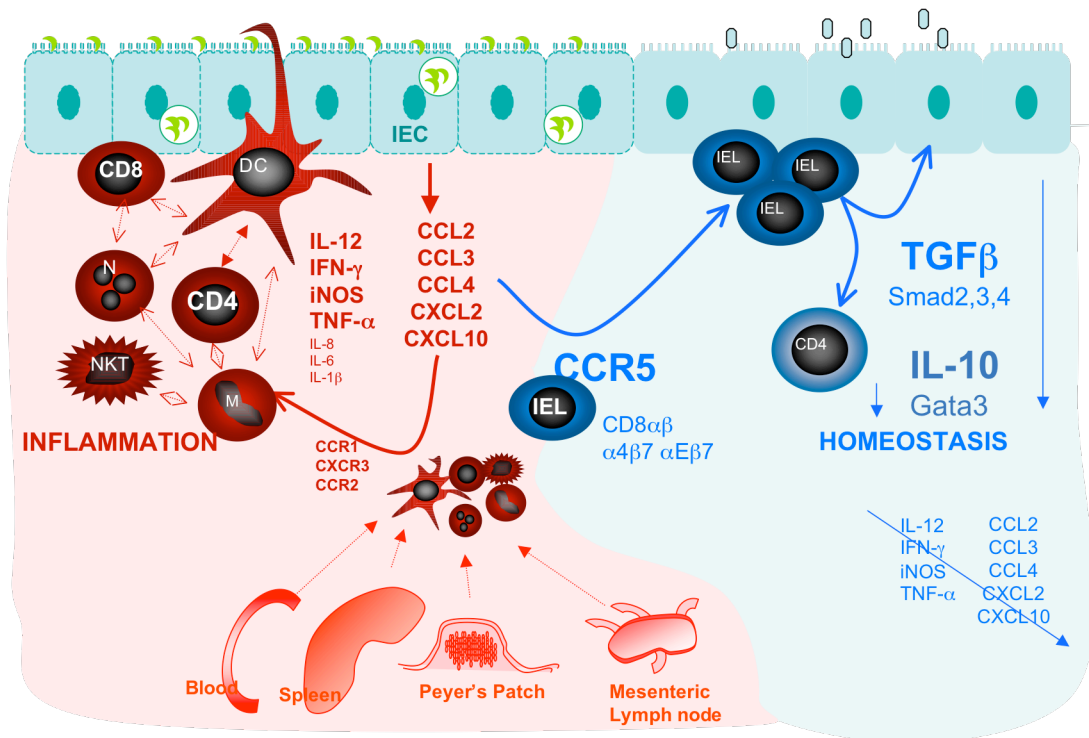
L'IL-15 est une cytokine pro inflammatoire également produite par les macrophages et les cellules dendritiques activés {Khan, 2002} {Lieberman, 2004}. Cette cytokine agit notamment sur les cellules **NK** et **NKT** de la *lamina propria* et induit la libération de grandes quantités d'**IFN $\gamma$**  soutenant ainsi la réponse immunitaire adaptative initiée contre le toxoplasme {Tato, 2003} {Ronet, 2005}.

*T. gondii* pénètre cependant dans les cellules cibles et formes des vésicules parasitophores incapables de fusionner avec les lysosomes des cellules phagocytaires. Dans cette situation, les cellules présentatrices d'antigènes sont utilisées par le toxoplasme pour se disséminer dans l'organisme {Courret, 2006} {Carruthers, 2007}.

### 4.3.2. Mécanismes adaptatifs de la réponse immunitaire à *T. gondii*

#### 4.3.2.1. Mécanismes adaptatifs pro inflammatoires induits par le toxoplasme

Les cellules T CD4<sup>+</sup> activées par les cellules présentatrices d'antigènes représentent la plus grande sous population de lymphocytes T de la *lamina propria*. Lors de l'infection de souris C57BL/6 par *T. gondii*, les lymphocytes T recrutés produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (figure 16). Le défaut de production d'IFN- $\gamma$  par les souris IFN- $\gamma$  KO est corrélé à une réplication incontrôlée du parasite conduisant à la mort des animaux 3 à 4 semaines après infection orale par *T. gondii* {Liesenfeld, 1999}.



**Figure 16 :** mécanismes pro inflammatoires de la réponse immunitaire à *T. gondii* et régulation par les lymphocytes intra-épithéliaux {Kasper, 2004}.

L'infection par le toxoplasme génère un afflux massif de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  dans la *lamina propria* {Mennechet, 2002}. Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont maintenues à l'état naïf dans les ganglions mésentériques, conséquence de leur expression constitutive du récepteur chimiokinique CCR7 et la molécule S1P-R (sphingosine 1-phosphate-receptor). Une fois activées, les cellules T CD4<sup>+</sup> pro inflammatoires d'une part réduisent l'expression des molécules CCR7 et S1P-R et d'autre part augmentent l'expression des récepteurs de chimiokines CCR2, CCR5, CCR9 et CXCR3 interagissant avec les chimiokines produites par les cellules épithéliales infectées, et par les cellules présentatrices d'antigènes activées {Graeler, 2002} {Bachmann, 2006} {observations non publiées}. Les cellules T CD4<sup>+</sup> activées expriment également le récepteur aux intégrines  $\alpha 4\beta 7$  {Kim, 2005} permettant le recrutement de ces lymphocytes vers la muqueuse intestinale {Liesenfeld, 1999} {Kasper, 2004}. Les cellules T productrices d'IFN- $\gamma$  ainsi recrutées dans la *lamina propria* renforcent ainsi la production des chimiokines CCL2, CCL3 et CXCL10 par les cellules épithéliales de l'intestin augmentant l'attraction d'immunocytes inflammatoires {Mennechet, 2002}.

L'IFN- $\gamma$  possède un fort pouvoir anti-parasitaire. En effet, l'activation des entérocytes par l'IFN- $\gamma$  inhibe la réplication intracellulaire de *T. gondii* en limitant la disponibilité des ions Fe<sup>++</sup> libres {Dimier, 1998}. Combiné au TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  active la production d'oxyde nitrique par les macrophages limitant ainsi la réplication du parasite {Adams, 1990} {Langermans, 1992}. Enfin, l'IFN- $\gamma$  induit la dégradation du tryptophane dans les cellules hématopoïétiques ou non hématopoïétiques infectées contrôlant ainsi la croissance du toxoplasme {Silva, 2002}.

#### **4.3.2.2. L'infection orale par le toxoplasme induit une iléite fatale chez les souris C57BL/6**

L'étude *in vivo* de la pathogénicité de *T. gondii* chez son hôte murin a mis en évidence des différences majeures entre les souches de souris utilisées pour ces études. Ainsi les souris C57BL/6 développent une réponse inflammatoire efficace contre le parasite, mais ne sont pas capables de réguler cette réponse et développent une iléite entraînant leur

mort 7 à 10 jours après infection orale par *T. gondii*. Les souris CBA/J en revanche sont particulièrement propices à la réplication du parasite et meurent de toxoplasmose cérébrale 3 semaines à 1 mois après infection. Les souris Balb/c quant à elles s'infectent très faiblement par le toxoplasme et, conservent l'intégrité de leurs tissus intestinaux en réponse à l'infection {McLeod, 1984}

L'iléite observée chez les souris C57BL/6 présente des caractéristiques histologiques et cellulaires communes aux maladies inflammatoires humaines de l'intestin (ou IBD – Inflammatory Bowel diseases) : perte de l'intégrité et raccourcissement des villosités intestinales, infiltration massive de leucocytes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes) dans la *lamina propria*, nécrose tissulaire {Liesenfeld, 1996}. Les cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  sont une population cellulaire clé dans la génération de l'iléite. Les souris athymiques ou ayant subi une déplétion en cellules T CD4<sup>+</sup> survivent à la phase aiguë de l'infection, mais perdent leur aptitude à contrôler la réplication du parasite {Liesenfeld, 1996}. De même, les souris IFN- $\gamma$  KO sont protégées contre l'iléite, mais ne contrôlent plus la réplication du parasite {Liesenfeld, 1999 #519}.

#### **4.3.2.3. Mécanismes régulateurs de la réponse immunitaire à *T. gondii***

La production de chimiokines et cytokines pro inflammatoires est une condition requise pour le contrôle de la réplication intracellulaire de *T. gondii* empêchant la dissémination du parasite et les lésions tissulaires qu'il engendre. Cependant, l'absence de régulation de cette réponse inflammatoire chez les souris C57BL/6 est responsable d'une pathologie inflammatoire de l'intestin grêle des souris infectées.

L'IL-10 a une activité immuno-régulatrice démontrée dans le modèle d'infection par *T. gondii*. Les souris Balb/c IL-10 KO deviennent sensibles à l'iléite intestinale, la production d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  par les macrophages étant très fortement augmentée. Les cellules T CD4<sup>+</sup> purifiées de la rate de ces souris produisent également d'avantage d'IFN- $\gamma$  {Suzuki, 2000}. Chez les souris C57BL/6, l'absence d'IL-10 renforce la sévérité

de l'iléite intestinale et rend les souris sensibles à des doses infectieuses sublétales {Neyer, 1997}.

Certaines sous populations de lymphocytes intraépithéliaux (LIE TCR  $\alpha\beta$ , CD8 $\alpha\beta$ ) localisés sous la barrière épithéliale possèdent une activité immuno-régulatrice chez les souris C57BL/6. Le transfert adoptif de LIE sensibilisés, prélevés de souris infectée et réinjectés dans des souris naïves prévient le développement de l'iléite {Buzoni-Gatel, 1999}. La protection des souris est associée à la production de TGF- $\beta$ , le traitement de souris ayant reçu des LIEs sensibilisés par des anticorps anti-TGF- $\beta$  étant suffisant pour abroger la protection contre l'iléite apportée par ces cellules {Buzoni-Gatel, 2001}. Le TGF- $\beta$  limite la réponse inflammatoire d'une part en inhibant la prolifération des cellules T CD4+ et d'autre part en réduisant la production de chimiokines pro inflammatoires par les entérocytes infectés et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4+ {Mennechet, 2004}.

#### 4.4. Conclusion : immunité anti-toxoplasmique et conséquences

La résistance à l'infection aiguë ou chronique par *T. gondii* requiert la production de cytokines pro inflammatoires par les leucocytes massivement recrutés dans la *lamina propria*. L'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T CD4+ et CD8+, mais aussi par les cellules NK, est une cytokine clé pour le contrôle de l'infection parasitaire. Cette réponse doit être cependant finement régulée afin de ne pas dégénérer en maladie inflammatoire intestinale comme observé chez les souris C57BL/6.

Les cellules dendritiques, par la production d'IL-12 consécutivement à l'endocytose active du toxoplasme, agissent comme initiateurs de la réponse adaptative au parasite. Cependant, *T. gondii* possède des mécanismes de survie intracellulaire dans les cellules phagocytaires et utilise ces cellules pour se disséminer dans l'organisme via les ganglions mésentériques.

## RESULTATS

## BUT DES ETUDES REALISEES

L'infection par *Toxoplasma gondii* génère une réponse pro inflammatoire contribuant au contrôle et à l'élimination du parasite. Les études présentées dans ce manuscrit visent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire contre le parasite *T. gondii* chez son hôte murin. Le système immunitaire intestinal est un système complexe, dynamique et régulé à la fois lors des phases initiatrices de la réponse inflammatoire mais également lors de phases plus tardives de rétablissement de l'homéostasie intestinale.

Les Toll-Like Receptors (TLRs) ont un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire aux pathogènes. Dans l'intestin, leur expression, par les cellules de la barrière épithéliale (entérocytes, cellules de Paneth) et dans la *lamina propria* (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B), fait de ces récepteurs des senseurs privilégiés des agents infectieux invasifs. Plus spécifiquement, l'activation de la voie de signalisation TLR9 induit la production d'interférons (IFNs) de type I, puissantes molécules immuno-modulatrices et la maturation des cellules dendritiques. **L'article 1** (et résultats complémentaires) décrit le rôle du TLR9 lors de l'infection de souris par *T. gondii* et les effets de l'activation des voies de signalisation sous-jacentes tant par les cellules des compartiments hématopoïétiques et non hématopoïétiques.

Au-delà de sa participation à l'initiation d'une réponse adaptative, l'activation des voies de signalisation TLR9 active des mécanismes de défense innée propres à la barrière épithéliale. Parmi ces mécanismes, les alpha-défensines (ou cryptdins chez la souris) sont des peptides anti-microbiens éliminant les agents microbiens pathogènes dans la lumière intestinale mais aussi stimulant la production de chimiokines par les entérocytes. **L'article 2** (et résultats complémentaires) présente une nouvelle activité anti-parasitaire des cryptdins contre *T. gondii* et décrit les mécanismes moléculaires impliqués dans la libération de ces peptides par les cellules de Paneth.

L'élimination de *T. gondii* par son hôte infecté nécessite une réponse adaptative cellulaire de type Th1. Les phases extracellulaires du parasite étant éphémères, la réponse adaptative humorale par les cellules B matures intervient de façon marginale lors de la réponse immunitaire à *T. gondii*, bien que chez la souris des immunoglobulines générées lors de l'infection limitent les processus invasifs du parasite. Cependant, les cellules B immatures agissent comme des cellules présentatrices d'antigènes capables de présenter des antigènes solubles aux cellules T. **L'article 3** identifie un rôle pro inflammatoire des cellules B lors de l'infection *par T. gondii* soutenant la production de cytokines de type Th1 par les cellules T. Dans le modèle murin C57BL/6, la réponse inflammatoire initiée par le toxoplasme conduit à une iléite létale indiquant une rupture dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Des **résultats complémentaires** identifient la génération de cellules T régulatrices naturelles lors de l'infection par *T. gondii*, et mettent en évidence l'importance de l'environnement cytokinique précédant l'infection pour permettre à ces cellules d'intervenir dans la régulation de l'homéostasie intestinale.



## **1. Article 1 : le TLR9 est nécessaire à la réponse du tissu lymphoïde associé à l'intestin lors de l'infection par *Toxoplasma gondii***

Le TLR9 est largement exprimé dans l'intestin grêle. Sa localisation intracellulaire dans les vésicules du réticulum endoplasmique fait du TLR9 un récepteur privilégié pour la reconnaissance des pathogènes intracellulaires {Ahmad-Nejad, 2002}. Les motifs CpG hypométhylés génomiques ou extra génomiques de bactéries invasives, comme les Salmonelles, sont les agonistes de TLR9 les mieux décrits {Totemeyer, 2005} {Magnusson, 2007}. Cependant, un pigment protéique, l'hémozoïne, produit par *Plasmodium falciparum*, un parasite appartenant comme *T. gondii* au phylum *Apicomplexa*, active la voie de signalisation TLR9 indiquant que ce récepteur intervient également dans des mécanismes de défense contre des parasites {Coban, 2005}. Nous avons observé que les souris MyD88 KO ne pouvant pas activer la plupart des voies de signalisation TLRs étaient incapables de développer une réponse inflammatoire efficace pour lutter contre le toxoplasme et succombaient de toxoplasmose cérébrale un mois après infection. Ceci suggère que les TLRs interviennent dans l'initiation de la réponse inflammatoire à *T. gondii*. Nos résultats préliminaires nous ont permis d'éliminer la participation active de TLR4 et TLR2 dans les phénomènes inflammatoires précoces suivant l'infection par le parasite. En revanche, l'absence de signes cliniques intestinaux observés chez les souris TLR9 KO (fond génétique C57BL/6) infectées indique un défaut d'initiation de la réponse immunitaire. Nous avons donc étudié le rôle du TLR9 au cours de l'infection par *T. gondii*.

### 1.1. Le TLR9 exprimé par les cellules épithéliales de l'intestin et dans la *lamina propria*, est requis pour l'initiation d'une réponse pro inflammatoire contre *Toxoplasma gondii*

Les souris TLR9 KO sont un outil permettant d'étudier *in vivo* l'action de TLR9 dans la réponse aux pathogènes {Hemmi, 2000}. Nous avons observé que les souris TLR9 KO n'ont pas ou peu d'infiltration de lymphocytes dans la *lamina propria* en réponse à l'infection par *T. gondii* permettant ainsi au parasite de se répliquer largement dans l'intestin grêle et de se disséminer dans l'organisme (**article 1 ; figure 1 & figure 2**). De plus, la *lamina propria* des souris TLR9 KO infectées présente un défaut de production de cytokines de type Th1 (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) (**article 1 ; figure 2**). Le corollaire de ce défaut de reconnaissance du parasite à son point naturel d'entrée dans l'organisme est la résistance des souris TLR9 KO à l'iléite, mais une plus grande sensibilité face à la forme cérébrale de toxoplasmose (**article 1 ; figure 1**).

Afin de comprendre les rôles respectifs du TLR9 exprimé par la barrière intestinale (compartiment non hématopoïétique) et dans la *lamina propria* (compartiment hématopoïétique) nous avons généré des souris chimères hématopoïétique ayant une déplétion spécifique du TLR9 dans l'un ou l'autre de ces compartiments (**article 1 / résultats complémentaires ; figure A et B**). Nous avons observé que l'absence d'expression de TLR9 par les cellules épithéliales ou les cellules de la *lamina propria* aboutissait à une infiltration réduite de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  dans l'intestin en réponse à l'infection orale par *T. gondii* (**article 1 ; figure 5**).

## 1.2. Les cellules dendritiques de la *lamina propria* expriment TLR9 et orientent la réponse adaptative à *T. gondii* vers un type Th1

Les cellules dendritiques font parties des cellules hématopoïétiques exprimant fortement le TLR9. Nous avons étudié la fréquence et le phénotype des cellules dendritiques présentes et/ou recrutées dans les ganglions mésentériques de souris sauvage (WT – wild type) et TLR9 KO une semaine après infection. Nous avons sélectionné des marqueurs de surface nous permettant de distinguer les cellules dendritiques plasmacytoïdes des cellules dendritiques myéloïdes (**tableau 7**).

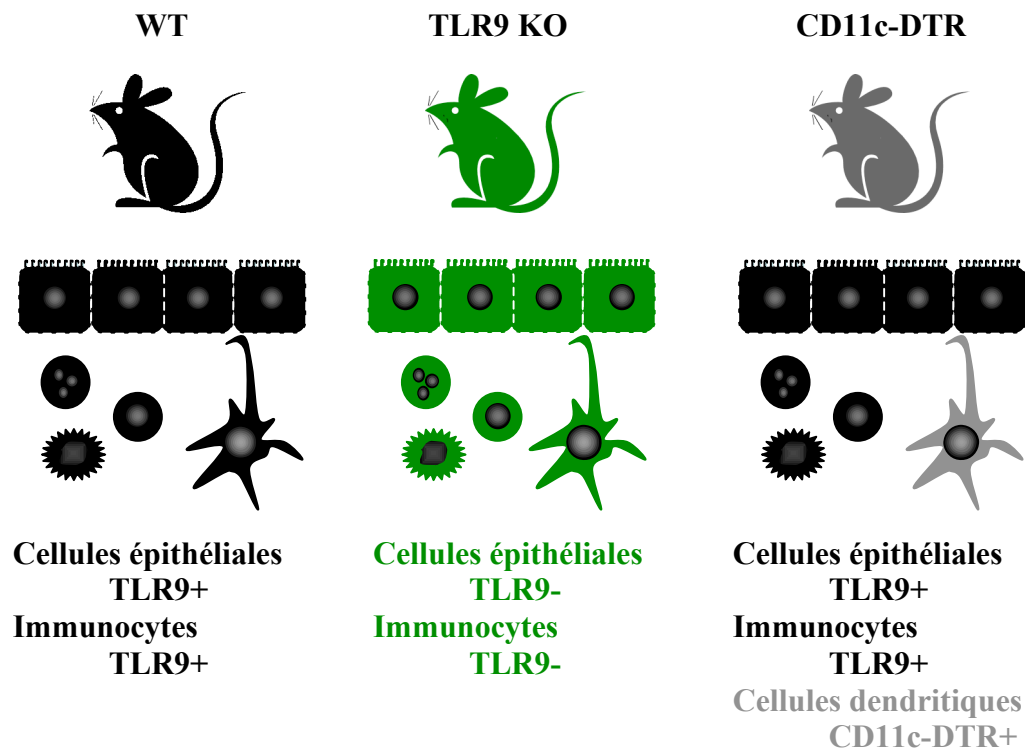
| DC Myéloïdes      | CD11c <sup>high</sup> ,<br>CD8α <sup>var</sup> | CMH-II <sup>var</sup> | CD80 <sup>var</sup> ,<br>CD86 <sup>var</sup> | B220 <sup>low</sup> ,<br>mPDCA <sup>low</sup> |
|-------------------|------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| DC Plasmacytoïdes | CD11c <sup>low</sup> ,<br>CD8α <sup>var</sup>  | CMH-II <sup>low</sup> | CD80 <sup>low</sup> ,<br>CD86 <sup>low</sup> | B220 <sup>var</sup> ,<br>mPDCA <sup>var</sup> |

**Tableau 7 : marqueurs phénotypiques utilisés pour l'étude des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes des ganglions mésentériques de souris sauvages ou TLR9 KO. low : faible expression, high : forte expression, var : expression hétérogène.**

Ainsi, les cellules dendritiques CD11c<sup>high</sup>, CD8α<sup>var</sup>, n'expriment pas les marqueurs B220 et mPDCA, mais possèdent la molécule de présentation antigénique CMH-II et les molécules de co-stimulation CD80 / CD86. Ces cellules ayant un phénotype myéloïde ne sont présentes que chez les souris WT et TLR9 KO naïves. Leur fréquence est inférieure cependant chez les souris TLR9 KO comparées aux souris WT indiquant que le TLR9 joue un rôle dans le recrutement ou le maintien des populations de cellules dendritiques myéloïdes dans les ganglions mésentériques (**article 1 ; figure 4**). Les cellules CD11c<sup>low</sup>, CD8α<sup>var</sup>, ayant un phénotype caractéristique de cellules dendritiques plasmacytoïdes (B220 / mPDCA<sup>var</sup>, CMH-II<sup>low</sup>, CD80 / CD86<sup>low</sup>), constituent une population dynamique au cours de l'infection par *T. gondii* chez les souris WT. En effet, les populations CD11c<sup>low</sup>, CD8α<sup>int</sup>, ayant une expression très hétérogène des marqueurs B220 et mPDCA à l'état naïf, opèrent un changement de phénotype 7 jours après infection par *T. gondii* et

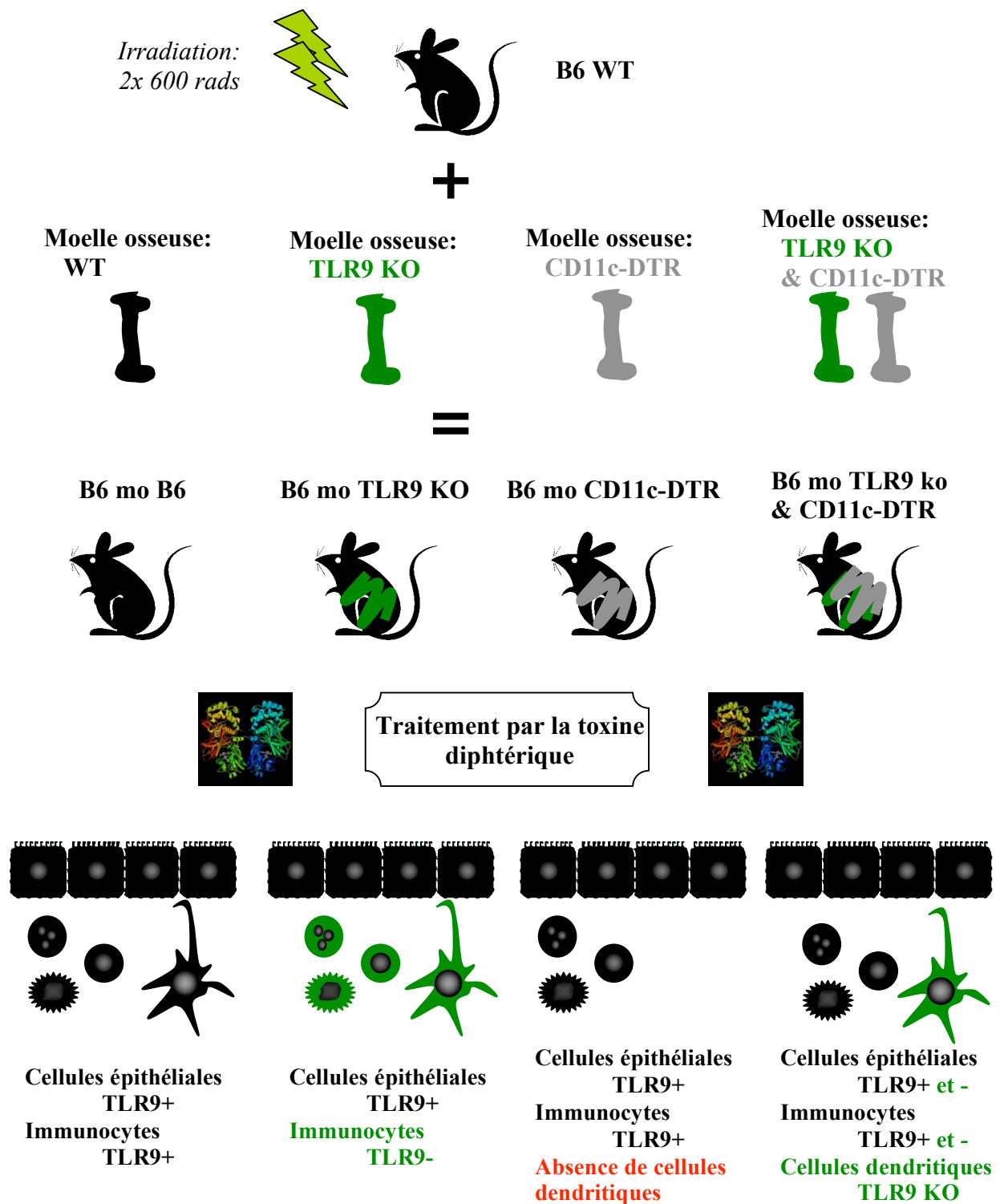
ont une réduction significative de l'expression de ces deux molécules. Les souris TLR9 KO en revanche ne montrent pas d'évolution phénotypique des cellules dendritiques plasmacytoïdes en réponse à l'infection. Ceci indique que le TLR9 est nécessaire soit pour l'expansion ou la migration des cellules dendritiques plasmacytoïdes vers les ganglions mésentériques en réponse à l'infection par *T. gondii* (**article 1 ; figure 4**).

Les souris CD11c-DTR (Diphtheria Toxin Receptor) expriment un récepteur humain à la toxine diphtérique placée sous la dépendance du promoteur CD11c (**article 1 / résultats complémentaires ; figure A**). Deux injections intra-péritonéales (I.P.) avec 4ng de toxine diphtérique par mg de poids de souris, réparties sur deux jours, permettent l'élimination des cellules CD11c+. Consécutivement à ce traitement, les populations de cellules dendritiques CD11c+ sont totalement déplétées pendant 3 jours puis sont régénérées une semaine à 10 jours {Probst, 2005} {observations personnelles}.



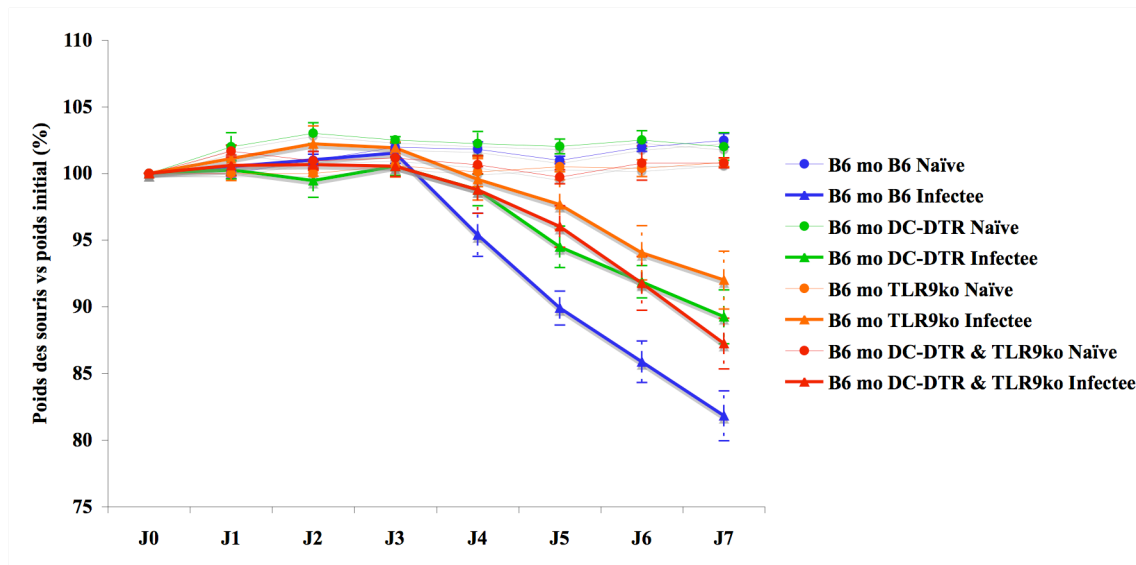
**Figure A :** spécificité d'expression du TLR9 par les cellules hématopoïétiques (immunocytes) et non hématopoïétiques (cellules épithéliales) de l'intestin grêle des souris C57BL/6 sauvages (WT – Wild Type), TLR9 KO et CD11c-DTR.

Ce modèle nous a permis de créer d'une part des souris chimères (sur fonds C57BL/6) ayant reçu de la moelle osseuse de souris CD11c-DTR, et d'autre part des souris double-chimères ayant reçu de la moelle osseuse provenant de souris TLR9 KO et CD11c-DTR. En les traitant avec de la toxine diphtérique 48 et 24 heures avant infection par *T. gondii*, les souris chimères (B6 mo CD11c-DTR) ont une absence totale des cellules dendritiques mais expriment le TLR9 dans leurs compartiments hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Dans le cas des souris double-chimères (B6 mo CD11c-DTR & TLR9 KO), seules les cellules dendritiques TLR9 KO sont conservées après le traitement par la toxine diphtérique, les cellules épithéliales et les immunocytes constituant le GALT gardent un phénotype TLR9+ (**article 1 / résultats complémentaires ; figure B**).



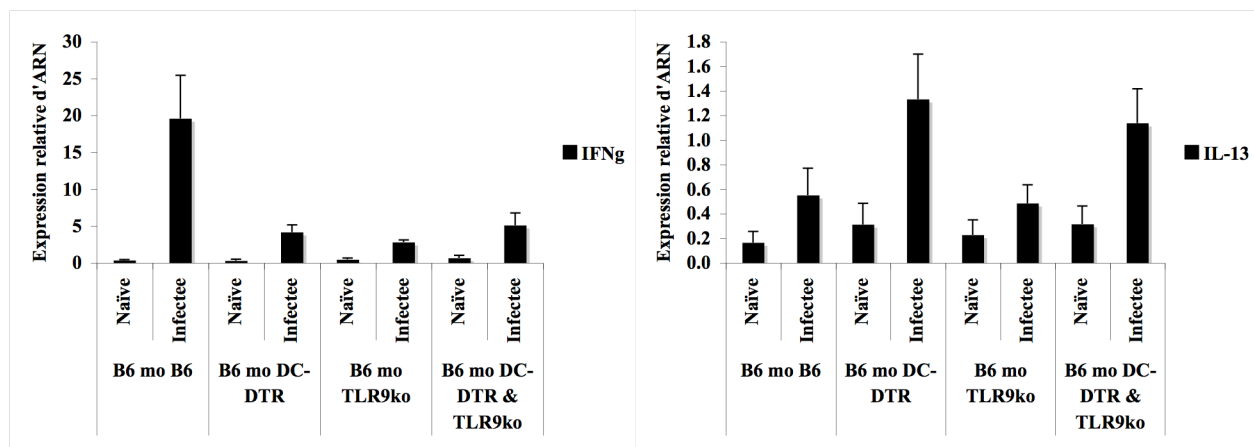
*Figure B : phénotypes des populations cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques des souris chimères (B6 mo TLR9 KO ou CD11c-DTR), et doubles-chimères (B6 mo TLR9 KO ou CD11c-DTR), après traitement par la toxine diphtérique.*

L'infection orale de souris C57BL/6 par *T. gondii* génère une puissante réponse de type Th1 destinée à éliminer le parasite. Lors de la phase aiguë de l'infection des cellules T effectrices productrices d'IFN- $\gamma$  sont recrutées et activées dans la *lamina propria*. Cette réponse immune intestinale si elle reste non régulée a pour conséquence une perte de poids des souris qui succombent environ 10 jours après l'infection. L'analyse de la morbidité des souris chimères et double-chimères montre qu'en l'absence de cellules dendritiques les souris sont moins sensibles à la phase aiguë de l'infection. Ceci est également observé pour les souris dont le compartiment hématopoïétique n'exprime pas le TLR9 ou ne possédant que des cellules dendritiques TLR9 KO (**article 1 / résultats complémentaires ; figure C**).



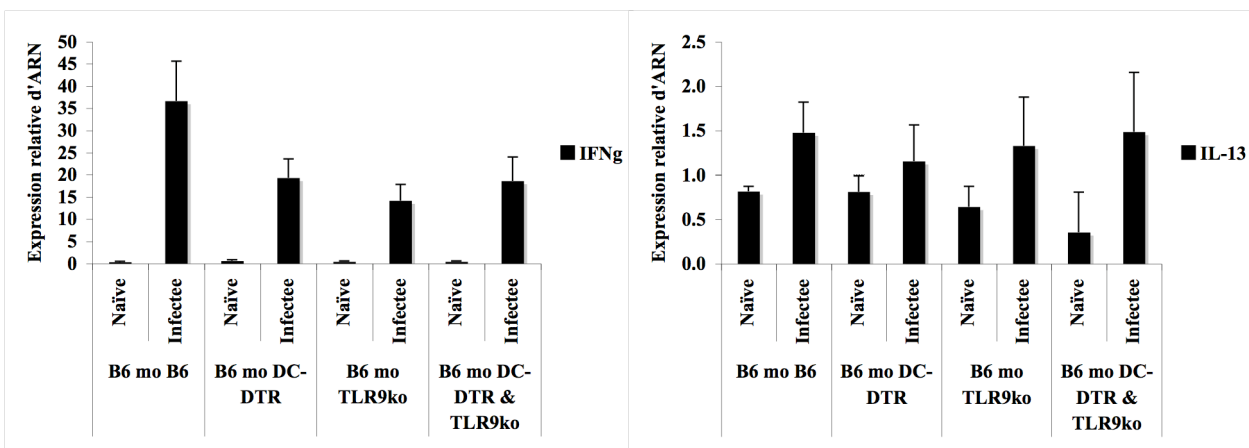
**Figure C:** les souris chimères, déplétées en cellules dendritiques, ou les souris double-chimères, n'exprimant que des cellules dendritiques TLR9 KO, sont moins sensibles à la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*. Les souris chimères et double-chimères ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K (3 souris par groupes) puis leur morbidité a été évaluée en mesurant l'évolution de leur poids comparé au poids initial durant 7 jours suivant l'infection.

Nous avons ainsi observé que les souris C57BL/6 ne possédant pas de cellules dendritiques ont une réponse Th1 (IFN- $\gamma$ ) dépréciée en réponse à l'infection orale par le toxoplasme, à la fois dans la *lamina propria* et dans les ganglions mésentériques 7 jours après infection. Il en est de même pour les souris ne possédant que des cellules dendritiques TLR9 KO (**article 1 / résultats complémentaires ; figures D et E**). Ceci indique que l'expression du TLR9 par les cellules dendritiques est requise pour l'initiation d'une réponse Th1 lors de l'infection orale par *T. gondii*. L'analyse, par PCR quantitative en temps réel, de l'expression d'IL-10 et d'IL-13 (cytokine de type Th2) nous a permis d'observer que l'absence de cellules dendritiques ou l'absence d'expression du TLR9 par ces mêmes cellules induit une réponse adaptative de type Th2 dans l'intestin grêle lors de l'infection par *T. gondii*.



**Figure D :** l'absence de cellules dendritiques exprimant le TLR9 polarise la réponse adaptative dans l'intestin grêle lors de l'infection par *T. gondii* vers un type Th2. Les souris chimères et double-chimères (3 souris par groupes) ont été infectées oralement par 35 kystes de *T. gondii* 76K. L'intestin grêle a ensuite été prélevé 7 jours après infection pour mesurer l'expression par RT-PCR quantitative des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  (Th1) et l'IL-13 (Th2).



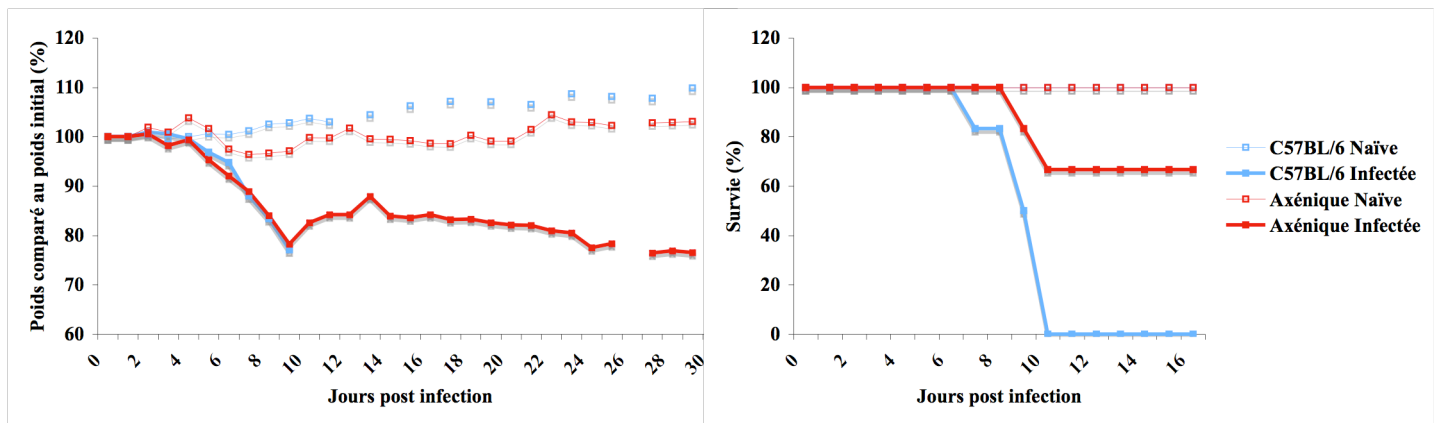


**Figure E :** l'absence de cellules dendritiques exprimant le TLR9 provoque une diminution de la réponse adaptative Th1 dans les ganglions mésentériques lors de l'infection par *T. gondii*. Sept jours après infection orale par *T. gondii* 76K (35 kystes), les ganglions mésentériques des souris chimères et double-chimères (3 souris par groupes) ont été prélevés. L'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  (Th1) et l'IL-13 (Th2) a été mesurée par RT-PCR quantitative

### 1.3. L'activation des voies de signalisation TLR9 lors de l'infection par *T. gondii* génère la production d'Interférons (IFNs) de type I

La pathogénie des maladies inflammatoires de l'intestin est due à un dysfonctionnement de l'interaction entre la flore endogène intestinale et la réponse immunitaire muqueuse. En absence d'éléments pathogènes parmi la flore de l'intestin, la tolérance aux antigènes microbiens peut être altérée soit par la présence de cellules T effectrices réagissant de façon disproportionnée à ces antigènes, soit par un défaut de l'activité des populations cellulaires régulatrices de la *lamina propria* {Strober, 2007}.

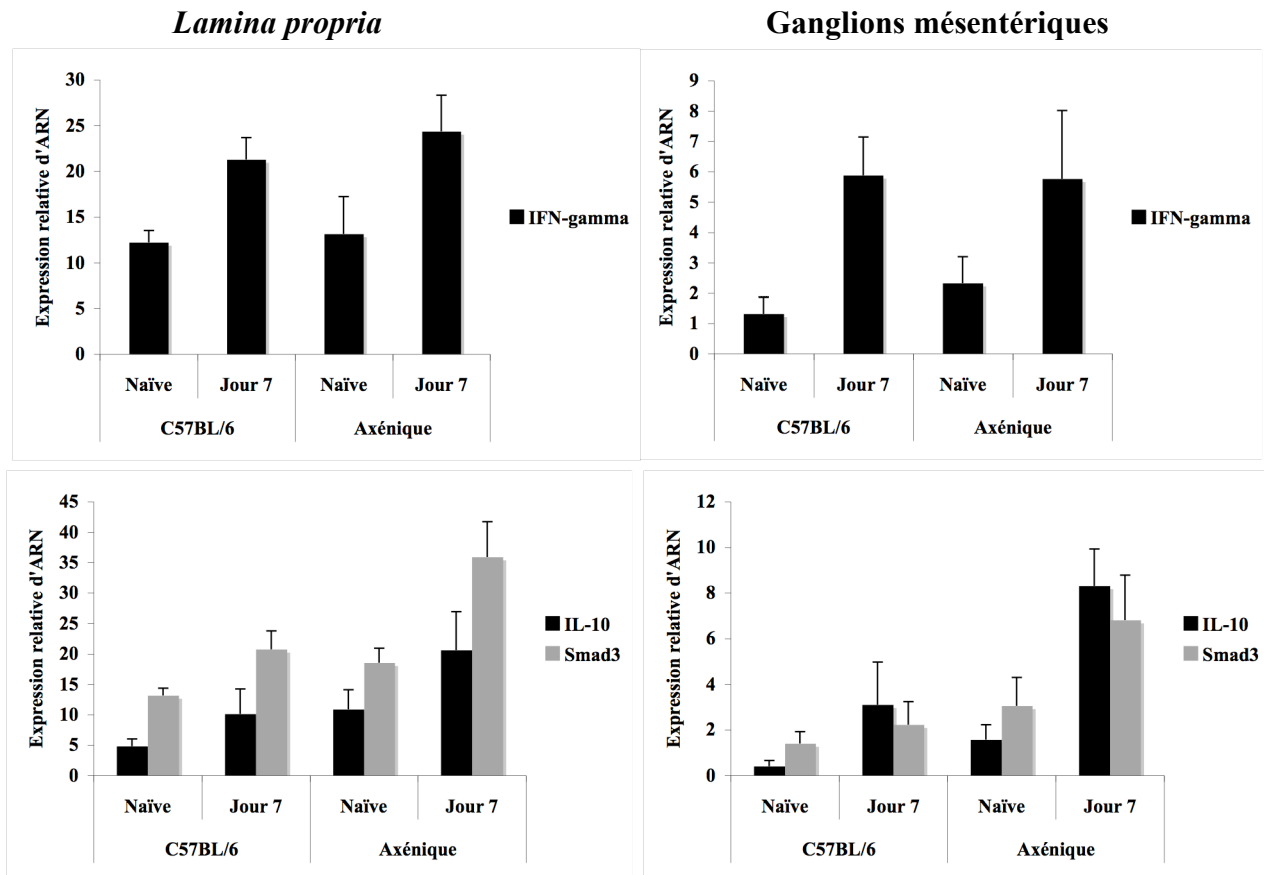
Nous avons étudié le rôle de la flore intestinale dans la génération et/ou la régulation de la réponse hyper immune au toxoplasme. En absence de flore intestinale, nous avons observé que malgré une morbidité identique aux souris C57BL/6 lors de la phase aiguë de l'infection, les souris axéniques survivent à l'iléite intestinale (**article 1 / résultats complémentaires ; figure F**).



**Figure F : La morbidité des souris axéniques est identique à celle des souris contrôles lors de la phase aiguë de l'infection, mais les souris axéniques survivent contrairement aux souris témoins. Les souris axéniques ou contrôles (6 par groupe) ont été infectées oralement par *T. gondii*. Leur morbidité a été mesurée en comparant l'évolution de leur poids à leur poids initial quotidiennement.**

Après infection par *T. gondii* la mort des souris est causée par une production intempestive de cytokine Th1. Afin de comprendre pourquoi les souris axéniques ne meurent pas, nous avons étudié le profil des cytokines (Th1, Th2 et Th3) produites dans l'intestin grêle mais aussi les ganglions mésentériques avant infection et au jour 7 après infection. La mesure par RT-PCR de l'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  (cytokine Th1) montre que les souris axéniques infectées oralement par *T. gondii* développent une réponse inflammatoire identique aux souris C57BL/6 conventionnelles ce qui corrobore nos observations initiales sur la morbidité. Ces souris développent une réponse inflammatoire normale, protectrice contre l'infection par *T. gondii* (**article 1 / résultats complémentaires ; figure G**). Cependant, des différences notables sont observées quant à la production de cytokines Th2 et Th3. Ainsi, à l'état naïf, les cellules purifiées de la *lamina propria* et des ganglions mésentériques des souris axéniques expriment d'avantage d'IL-10 et de Smad3 (facteur de transcription induisant l'expression de TGF- $\beta$ ) que celles issues de souris conventionnelles. De plus, lors de la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*, ces cellules maintiennent un taux de production de cytokines Th2 et Th3 deux fois supérieur chez les souris axéniques comparées aux

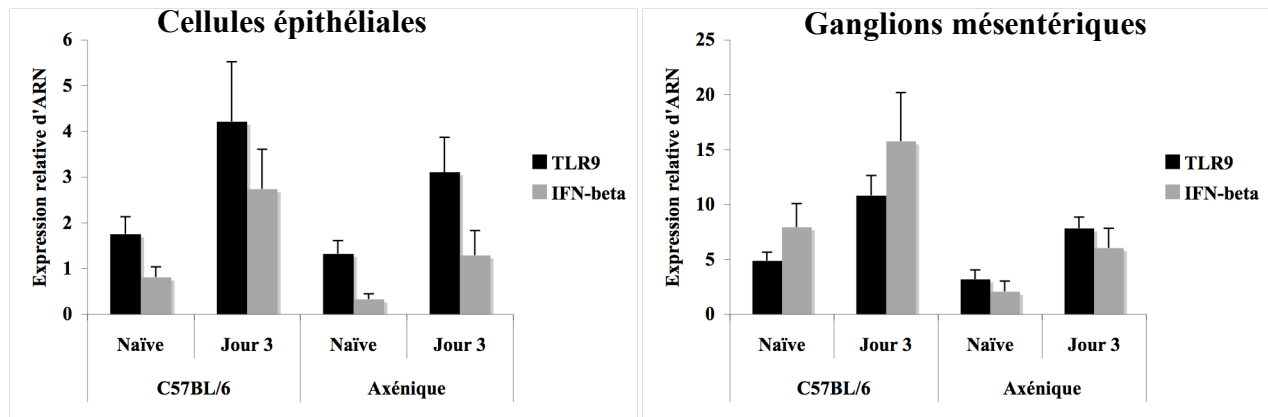
souris conventionnelles (**article 1 / résultats complémentaires ; figure G**). Ainsi, l'absence de flore microbienne ne modifie pas la capacité des souris à répondre à l'infection par le toxoplasme, mais permet une meilleure régulation de l'homéostasie intestinale.



**Figure G :** les souris axéniques ont un profil cytokinique Th2 et Th3 renforcé et produisent d'avantage de ces cytokines immuno-régulatrices en réponse à l'infection par orale *T. gondii*. Les cellules de la lamina propria et des ganglions mésentériques ont été purifiées à partir de souris axéniques ou contrôles (3 par groupe) 7 jours après l'infection orale par 35 kystes de *T. gondii*. L'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10 et Smad3 a été mesurée par PCR quantitative en temps réel.

L'activation de la voie de signalisation TLR9 par des bactéries invasives comme *Salmonella sp* ou par des agonistes synthétiques tels les CpG-ODNs induit la translocation nucléaire de facteurs de transcription NFκB, AP-1 et IRF7 {Verthelyi, 2001} {Totemeyer, 2005} {Magnusson, 2007}. Nous avons observé que l'activation des voies de signalisation TLR9 lors de l'infection de souris C57BL/6 par le toxoplasme induit la production d'IFNs de type I. La cinétique de production de ces IFNs suit le cycle infectieux du parasite, avec une première augmentation des ARNm codant pour les IFN-α et -β vingt-quatre à quarante-huit heures après infection, puis aux jours 3-4 après infection lorsque le parasite est libéré par les entérocytes infectés pour réinfecter la barrière épithéliale et pénétrer dans *la lamina propria* (**article 1 ; figure 3**).

L'initiation de la réponse Th1 dans le GALT étant associée à l'expression du TLR9, nous avons tiré parti de ces expériences avec les souris axéniques pour préciser l'origine bactérienne ou parasitaire de l'agoniste du TLR9. Dans les souris axéniques, nous avons ainsi mesuré l'expression des ARNm codant pour le TLR9 et l'IFN-β par les entérocytes et les lymphocytes purifiés des ganglions mésentériques 3 jours après infection par le toxoplasme. Les souris axéniques ont une activation réduite des voies de signalisation TLR9 et de la production d'IFN-β par les entérocytes et les lymphocytes des ganglions mésentériques (**article 1 / résultats complémentaires ; figure H**). Cette tendance, bien que reproductible, n'est cependant pas significative. Ainsi, en absence de flore microbienne, les souris axéniques activent la voie de signalisation TLR9 et produisent de l'IFN-β en réponse à l'infection. Ceci indique que le parasite active directement ce récepteur de l'immunité innée. La flore intestinale cependant joue un rôle amplificateur dans cette réponse, mais n'est pas requise pour l'activation de ce processus d'immunité innée au toxoplasme



**Figure H : les souris axéniques modulent les voies de signalisation TLR9 en réponse à l'infection orale par *T. gondii*.** Des souris axéniques (3 par groupe) ont été infectées oralement par *T. gondii* puis sacrifiées 3 jours après infection. Les cellules épithéliales de l'intestin ont été purifiées et les ganglions mésentériques isolés pour mesurer par PCR quantitative en temps réel l'expression des ARNm codant pour le TLR9 et l'IFN- $\beta$ .

# TLR9 Is Required for the Gut-Associated Lymphoid Tissue Response following Oral Infection of *Toxoplasma gondii*

Laurie A. Minns,\* Laurence C. Menard,\* David M. Foureau,\* Sylvie Darche,<sup>†</sup> Catherine Ronet,<sup>§</sup> Daniel W. Mielcarz,\* Dominique Buzoni-Gatel,<sup>2†</sup> and Lloyd H. Kasper<sup>1,2\*</sup>

TLRs expressed by a variety of cells, including epithelial cells, B cells, and dendritic cells, are important initiators of the immune response following stimulation with various microbial products. Several of the TLRs require the adaptor protein, MyD88, which is an important mediator for the immune response following *Toxoplasma gondii* infection. Previously, TLR9-mediated innate immune responses were predominantly associated with ligation of unmethylated bacterial CpG DNA. In this study, we show that TLR9 is required for the Th1-type inflammatory response that ensues following oral infection with *T. gondii*. After oral infection with *T. gondii*, susceptible wild-type (WT; C57BL/6) but not TLR9<sup>-/-</sup> (B6 background) mice develop a Th1-dependent acute lethal ileitis; TLR9<sup>-/-</sup> mice have higher parasite burdens than control WT mice, consistent with depressed IFN- $\gamma$ -dependent parasite killing. A reduction in the total T cell and IFN- $\gamma$ -producing T cell frequencies was observed in the lamina propria of the TLR9<sup>-/-</sup> parasite-infected mice. TLR9 and type I IFN production was observed by cells from infected intestines in WT mice. TLR9 expression by dendritic cell populations is essential for their expansion in the mesenteric lymph nodes of infected mice. Infection of chimeric mice deleted of TLR9 in either the hemopoietic or nonhemopoietic compartments demonstrated that TLR9 expression by cells from both compartments is important for efficient T cell responses to oral infection. These observations demonstrate that TLR9 mediates the innate response to oral parasite infection and is involved in the development of an effective Th1-type immune response. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 7589–7597.

Innate immunity provides the first line of defense against invading pathogens and is essential for survival in the absence of adaptive immune responses. Innate immune recognition relies on a limited number of germline-encoded receptors, such as TLRs, that recognize pathogen-associated molecular patterns of microbial origin (1–6). To date, 13 members of the TLR family have been characterized in mice. Although TLRs are expressed in a broad range of tissues, the greatest variety of TLR mRNAs is found in professional APCs. A key role of TLRs in innate immunity is the development of the acquired immune response characterized by polarization of naive CD4<sup>+</sup> helper T cells toward the Th type I (Th1) or Th2 phenotype.

The classically defined ligand for TLR9, bacterial unmethylated CpG DNA, has an immunomodulatory effect at the cellular level, and TLR9<sup>-/-</sup> mice are unresponsive to immunostimulatory CpG DNA (7–9). Human TLR9-conferred responsiveness to CpG-DNA occurs via the recognition of species-specific CpG motifs (10). The engagement of CpG DNA with TLR9 results in the activation of a wide range of transcription factors (i.e., NF- $\kappa$ B, AP-1, or IFN regulatory factor-7) by MyD88-dependent signaling pathways that ultimately leads to the expression of Th1 proinflammatory cytokines

such as IL-12 and type I IFNs (11, 12). Whereas TLR1, TLR2, and TLR4 are cell surface expressed, current opinion is that TLR9 has a predominantly intracellular localization in macrophages and dendritic cells (DC),<sup>3</sup> an advantageous position for the recognition of intracellular pathogens (13).

Recent observations indicate that DNA is not the only ligand for TLR9. *Plasmodium falciparum* blood stage schizonts, soluble schizont extracts, and, most recently, hemozoin pigment activate plasmacytoid DCs and use the TLR9-MyD88 signaling pathway, indicating that TLR9 plays an essential role in recognizing Apicomplexa infections (14, 15).

Oral infection with *Toxoplasma gondii* in certain strains of mice (C57BL/6) leads to an acute lethal ileitis within 7 days of infection. This experimental model of inflammatory bowel disease is similar to human ileitis with regard to disease localization, histological findings, and immunologic imbalance (16). The death is not related to an uncontrolled parasite replication but is due to an overwhelming Th1-like immune response. CD4 T cells from the lamina propria secrete huge quantities of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  that are responsible for the inflammatory process (17). Mice genetically incapable of producing IFN- $\gamma$  do not develop the lethal ileitis despite a high parasite replication. Indeed the Th1-like immune response, although deleterious if uncontrolled, is necessary to limit parasite replication.

Defective APC responses were observed in MyD88<sup>-/-</sup> macrophages, neutrophils, and splenic DCs exposed to soluble *T. gondii* Ag, indicating the essential role of a MyD88-dependent TLR in responding to *T. gondii* infection (18). Additional reports show intact APC responses in TLR2- and TLR4-deficient mice, suggesting that neither of these MyD88-dependent TLRs are involved in systemic immune responses to *T. gondii* infection (19). Studies

\*Department of Medicine and Department of Microbiology and Immunology, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH 03756; <sup>†</sup>Department of Parasitology, Unit of Early Responses to Intracellular Parasites and Immunopathology, Institut Pasteur-INRA, Paris, France; and <sup>§</sup>World Health Organization-Immunology Research and Training Center, Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland

Received for publication March 9, 2005. Accepted for publication March 31, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Lloyd H. Kasper, Department of Microbiology and Immunology, Dartmouth Medical School, 1 Medical Center Drive, Lebanon, NH 03756. E-mail address: lloyd.kasper@dartmouth.edu

<sup>2</sup> D.B.-G. and L.H.K. share senior authorship.

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; KO, knockout; WT, wild type; BM, bone marrow; IEC, intestinal epithelial cell; MLN, mesenteric lymph node; LPL, lamina propria lymphocyte; GALT, gut-associated lymphoid tissue; int, intermediate.

with TLR11 knockout (KO) mice demonstrate that after systemic infection with *T. gondii*, these mice have a persistently elevated serum titer of both IL-12 and IFN- $\gamma$ , implying that other TLR pathways are involved in the host innate response to this parasite (20). Taken together, these observations indicate that *T. gondii* infection triggers an immune response that signals through a MyD88-dependent TLR, which may work independently or in concert with TLR11. In this study, we show for the first time that TLR9 expression by APCs from the hemopoietic and nonhemopoietic compartments is essential for initiating the innate immune response following oral infection with *T. gondii* and that TLR9 is required for an efficient T cell response in the small intestine.

## Materials and Methods

### Mice and parasites

Female 6- to 8-wk-old C57BL/6 mice (wild-type; WT) obtained from The Jackson Laboratory and TLR9<sup>-/-</sup> mice backcrossed onto a C57BL/6 background (provided by S. Akira, Department of Host Defense, Osaka University, Osaka, Japan; Ref. 9) were bred and housed under approved conditions at the Animal Research Facility at Dartmouth Medical School or at the Institut Pasteur (Paris, France). Bone marrow (BM) chimeric mice were engineered in which only the hemopoietic system or the nonhemopoietic system was impaired for the TLR9 expression. Recipient WT or TLR9<sup>-/-</sup> mice were lethally irradiated (900 rad) with a Ce<sup>137</sup> source. Then, they received i.v. BM cells ( $1 \times 10^7$ ) recovered from femurs and tibias of donor WT or TLR9<sup>-/-</sup> mice. The quality of the reconstitution was appreciated 7 wk later by bleeding the chimeric mice and checking by quantitative RT-PCR for TLR9 expression among the blood cells. The chimeric mice were used 7 wk after reconstitution. Mice were infected orally by intragastric gavage with 35 cysts of the 76K *T. gondii* strain maintained through passage in CBA/J mice. After infection, mice were weighed and mortality was recorded daily. All experiments were performed with 4–6 mice/group and were repeated a minimum of three times; error bars represent the SEM, unless specified otherwise.

### Histology

Intestines were immediately fixed in 10% formalin overnight, embedded in paraffin, and sectioned. Sections were stained with H&E and photographed. Histological inflammatory score from 0 to 4 was applied in a blinded fashion as described previously (21): 0, no inflammation; 1, slight infiltrating lymphocytes in the lamina propria with focal acute infiltration; 2, mild infiltrating cells in the lamina propria with increased blood flow and mild edema; 3, diffuse and massive infiltrating cells leading to disturbed mucosal architecture; 4, crypt abscess and superficial necrosis of the intestinal villi.

### Purification of intestinal epithelial cells (IEC)

Small intestines were washed with PBS, and Peyer's patches were removed. Intestines were opened longitudinally and cut into 1-cm long samples. The pieces were incubated in PBS (Ca/Mg free)-EDTA 3 mM under agitation (10 min, 37°C), and the supernatants containing the IECs were collected and washed in RPMI 1640 with 5% FBS. This process was repeated twice. Dithioerythritol was then added to the cells (1.6 mg/10 ml). After incubation (15 min, 37°C), cells were washed twice. Purified IECs were collected at the interface of a Percoll gradient of 60–30% (30 min, 1500 rpm) and washed with RPMI 1640 before use.

### Mesenteric lymph node (MLN) DC suspension

DC suspensions from mice were performed as described previously (22). Briefly, MLNs and spleens were collected from mice, excess fat removed, and digested in 1.67 Wunsch U/ml Liberase Cl (Roche, Boehringer Mannheim) and 0.2 mg/ml DNase I (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 to form a single-cell suspension. Cells were then resuspended in RPMI 1640 10% FBS for further analysis.

### Purification of lamina propria lymphocytes (LPL)

LPLs were purified as described previously (23). Briefly, fat and Peyer's patches were removed from small intestines that were washed twice with PBS. Small intestines were opened longitudinally, cut into 1-cm pieces, and washed twice in 3 mM EDTA in Ca/Mg-free PBS for 10 min at 37°C. Intestine pieces were then washed twice in 1 mM EGTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> in RPMI 1640 1% FBS for 10 min at 37°C. Intestine pieces were then digested in Liberase (Roche) 0.14 Wunsch U/ml and DNase I (Sigma-

Aldrich) at 5 U/ml in RPMI 1640 at 37°C for up to 1 h. Cell suspensions were washed twice in RPMI 1640 10% FBS then laid over Histopaque (density = 1.077) and centrifuged. Cells in the interphase were collected, washed, and used for further assays.

### Cell surface fluorescent-activated cell analysis

Single-cell suspensions of typically  $1 \times 10^6$  cells were stained using conventional methods in PBS 2% FBS with Fc Block (BD Pharmingen) using the following Abs: CD3FITC, CD3APC, CD4FITC, CD4APC, CD45RBPE, CD8 $\beta$ PE, CD8 $\alpha$ PerCP, CD11cFITC, CD11cAPC, Gr-1PE, MHC class II PE, CD11bPE, B220APC, CD80FITC, CD86FITC, the appropriate isotype controls (BD Pharmingen), and mPDCA (Miltenyi Biotec); cells were analyzed for four-color staining on a BD FACSCalibur (BD Biosciences). Gating for analysis was determined using the appropriate isotype control.

### Intracellular cytokine staining

Single-cell suspensions from the LPL or MLN were restimulated ex vivo with 50 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) for 2 h in RPMI 1640 10% FBS at 37°C followed by treatment with 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 2 h at 37°C. Following surface marker staining using conventional methods, cells were permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD Pharmingen) and stained intracellularly with IFN- $\gamma$  allophycocyanin or IFN- $\gamma$ PE (BD Pharmingen).

### Two-step SYBR green quantitative real-time PCR

A total of 0.5  $\mu$ g to 2.0  $\mu$ g (within each experiment, the same quantity of mRNA was used) of QIAgen RNeasy-purified (Qiagen) mRNA was reverse transcribed using SuperScript II RT (Invitrogen Life Technologies). A total of 200 ng of cDNA was amplified using the SYBR green Core reagents or the  $\times 2$  SYBR green mix (Applied Biosystems) on a Bio-Rad iCycler. Relative expression was normalized to  $\beta$ -actin and was expressed using the  $\Delta C_T$  method, where relative expression =  $2^{-(\text{exp} - \text{actin})} \times 1000$ . The following primers were used:  $\beta$ -actin, forward AGAGGGAAATCGT GCGTGAC and reverse CAATAGTGATGACCTGGCCGT; IFN- $\gamma$ , forward TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA and reverse TGGCTCTG CAGGATTTTCATG (24); TNF- $\alpha$ , forward CATCTTCTCAAATTC GAGTGACAA and reverse TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC (24); IFN- $\beta$ , forward CCATCCAAGAGATGCTCCAG and reverse GTGG AGAGC AGTTGAGGACA (25); and TLR9, forward AGGCTGTCAAT GGCTCTCAGT and reverse TGAACGATTTCCAGTGGTACAAGT (26). For *T. gondii* parasite burden, the *T. gondii* B1 gene was amplified from 1  $\mu$ g of total genomic DNA prepared using the DNeasy kit (Qiagen), and a standard curve for parasite equivalents was generated using a plasmid as described previously: QB1, forward GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG and reverse TCTTTAAAGCGTTCGTGGT (27).

### Statistical analyses

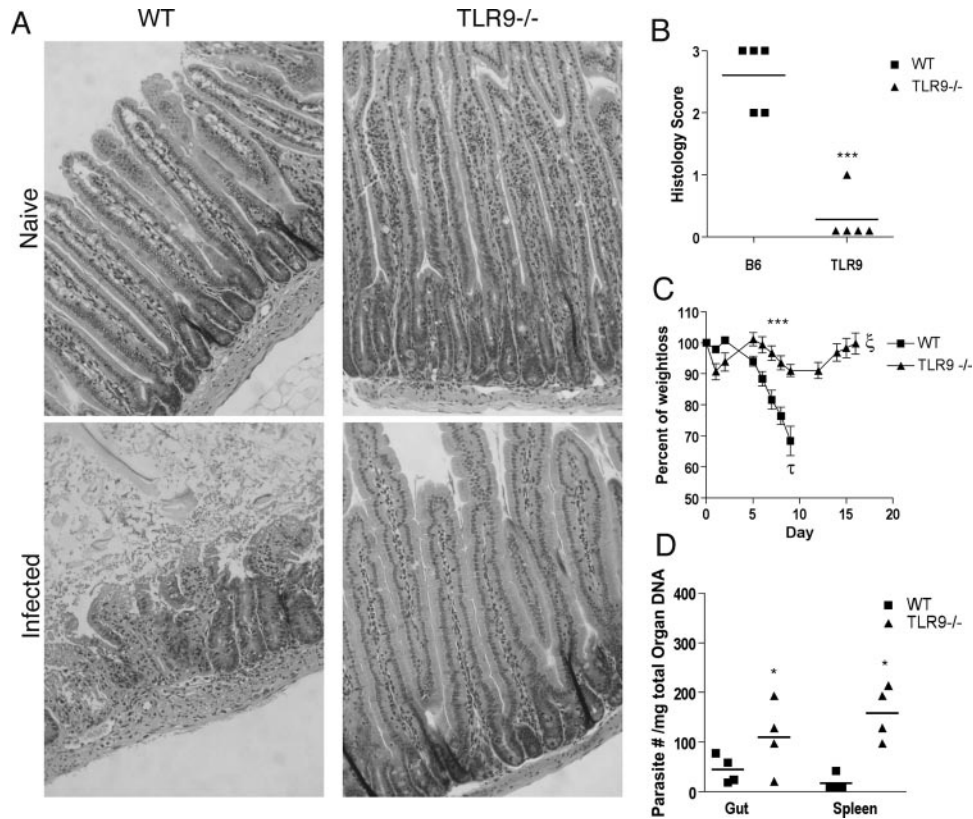
Groups were compared using Prism Statistical Software's unpaired *t* test; significance was expressed as  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## Results

### TLR9<sup>-/-</sup> mice are resistant to the ileitis following oral infection with *T. gondii*

We have reported previously that C57BL/6 mice die within 10 days following oral infection with *T. gondii*. These mice die of an acute ileitis that is associated with the complete, transmural destruction of the epithelial barrier. The entire ileum of the infected mice is disrupted with sparing of the colon. Microscopically, inflammation associated with large numbers of infiltrating cells and hemorrhages into the small intestine is observed. Histological examination of the small intestine from TLR9<sup>-/-</sup>-infected mice revealed the absence of inflammatory signs and showed intact integrity of the epithelial barrier similar to that of uninfected control mice (Fig. 1A). Histological scorings of ileum sections from infected mice revealed a significant ( $p < 0.001$ ) reduction in inflammation (Fig. 1B) as compared with the WT mice. Additionally, TLR9<sup>-/-</sup> mice had a significantly lower weight loss at day 8 ( $p < 0.001$ ) and 100% survival by day 15 postinfection compared with the WT-infected controls that had rapid weight loss and succumbed to the inflammation brought on by the infection by day 9.





**FIGURE 1.** TLR9<sup>-/-</sup> mice are resistant to *T. gondii*-induced ileitis and exhibit higher parasite burdens compared with WT controls. WT (C57BL/6) and TLR9<sup>-/-</sup> mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii*, and histological evidence of inflammation was noted at day 7 postinfection. Histological analysis of day 7 postinfection small intestines from TLR9<sup>-/-</sup> mice showed an absence of inflammation following oral infection with *T. gondii* (A). Histological scoring revealed a significant decrease in intestinal inflammation in TLR9<sup>-/-</sup> mice compared with WT controls (B). Following oral infection with 35 *T. gondii* cysts, TLR9<sup>-/-</sup> mice were resistant to *T. gondii*-induced weight loss compared with WT controls;  $\tau$ , 100% mortality at day 9 in WT mice compared with  $\zeta$ , 100% survival at day 15 in TLR9<sup>-/-</sup> mice (C). Parasite burden as determined by quantitative real-time PCR of the *T. gondii* B1 gene measured at day 3 postinfection was significantly higher in TLR9<sup>-/-</sup> mice in the gut and spleen compared with WT controls (D). Data shown are one representative experiment of three independent experiments with at least 5 mice/group.

TLR9<sup>-/-</sup> mice failed to develop ileitis through the completion of these studies, indicating a reduced capacity to mount an inflammatory response following infection (Fig. 1C). To confirm that the absence of inflammation in TLR9<sup>-/-</sup> mice was not due to decreased infectivity of the mice, parasite burden was assessed using real-time quantitative PCR. TLR9<sup>-/-</sup> mice had higher parasite burden in the intestine and spleen compared with the WT controls at day 3 postinfection (Fig. 1D) that continued until the WT controls succumbed to the inflammation (data not shown).

*TLR9<sup>-/-</sup> mice have reduced T cell responses in the lamina propria and impaired Th1 cytokine responses in the small intestine*

To characterize the immune response in the small intestines of TLR9<sup>-/-</sup> mice following oral infection with *T. gondii*, cytokine mRNA levels were compared using quantitative real-time PCR. TNF- $\alpha$  levels appeared reduced at days 3 and 7 postinfection; however, the reduction was not significant (Fig. 2A). There was a significant difference in IFN- $\gamma$  mRNA expression, the hallmark of the Th1-like immune response at day 7 postinfection ( $p < 0.01$ ) between the WT and TLR9<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2B).

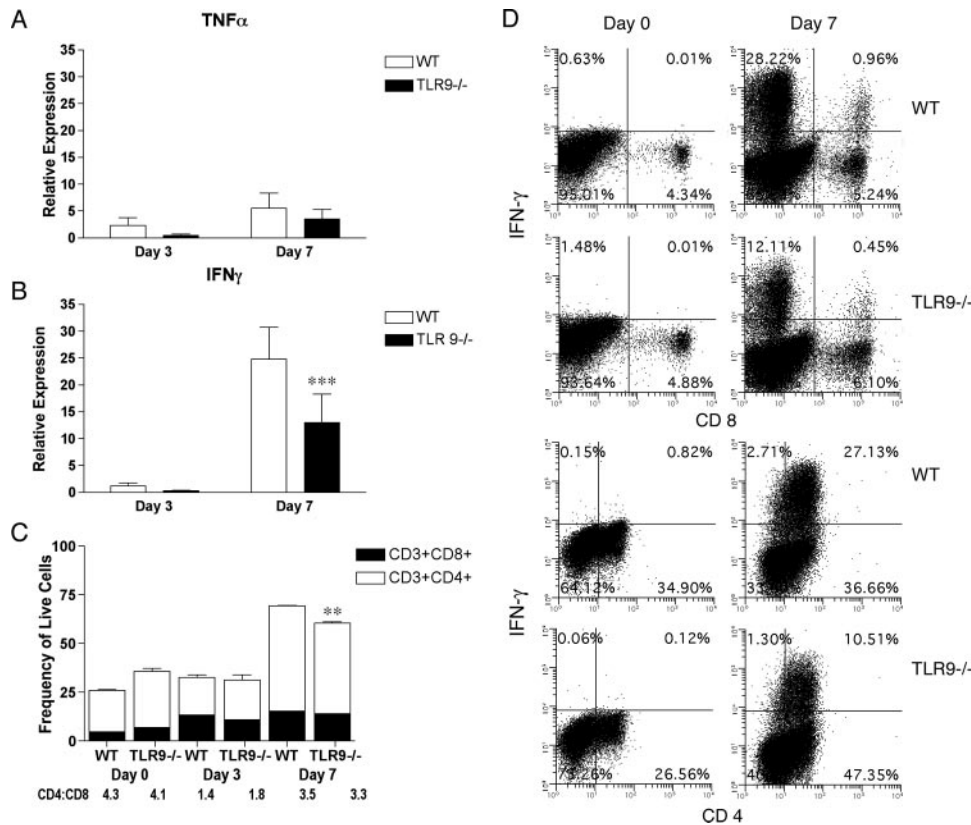
To determine whether T cell responses were altered as a result of the TLR9 deletion following oral infection with *T. gondii*, the frequency of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells from the lamina propria was measured by FACS analysis. As expected, by day 7 postinfection there was a significant increase of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T

cells in the lamina propria of both WT and TLR9<sup>-/-</sup> mice compared with days 0 and 3 (Fig. 2C). Although there was an overall increase in CD4<sup>+</sup> T cells in the lamina propria, TLR9<sup>-/-</sup> mice exhibited a reduced frequency of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells compared with the WT controls at day 7 ( $p < 0.001$ ). Moreover, there was an overall decrease in the percentage of IFN- $\gamma$ -producing T cells in the lamina propria by both the CD8<sup>+</sup> population as well as CD4<sup>+</sup> by day 7 postinfection (Fig. 2D). There was no demonstrable change in either IL-4 or IL-10 expression (both by intracellular FACS analysis of cells from the lamina propria and by quantitative real-time PCR of infected small intestines), confirming that the decrease in Th1 cytokine production was not associated with a Th2 shift (data not shown). Analysis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> population in the lamina propria and the MLNs failed to demonstrate a shift in the CD45RB<sup>low</sup> T cell population from TLR9<sup>-/-</sup> mice as compared with control mice (data not shown). These data as well as the observed decrease in total small intestine mRNA for IFN- $\gamma$  in TLR9<sup>-/-</sup> mice is consistent with a depressed Th1 type inflammatory response in TLR9<sup>-/-</sup> mice following oral infection with *T. gondii*.

*TLR9 and type I IFN- $\beta$  are expressed in the small intestine by IECs and by cells from the lamina propria in response to T. gondii infection*

The small intestine constantly samples a variety of microbial and food Ags. TLR9 is expressed by nonprofessional APC such as





**FIGURE 2.** Infected TLR9 $^{-/-}$  mice have a decreased Th1 response in the small intestine and in the lamina propria. WT and TLR9 $^{-/-}$  mice were orally infected with 35 *T. gondii* cysts, and intestines were measured at day 3 and day 7 postinfection for inflammatory cytokines. SYBR green quantitative real-time PCR of small intestines from infected mice showed a reduction in TNF- $\alpha$  mRNA and a significant decrease in IFN- $\gamma$  mRNA (day 7), measured at days 3 and 7 postinfection (A and B). Lymphocytes from the lamina propria were isolated, and the frequency of CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$  T cells and CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  T cells were determined by FACS analysis (lamina propria preparations from six mice with three pooled intestines stained and measured three times per independent experiment). An overall increase of CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  cells was observed at day 7 compared with naive controls (day 0) and day 3 postinfection (C). A significant decrease in the CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  population in the lamina propria of TLR9 $^{-/-}$  mice was observed at day 7 postinfection compared with the WT controls (C). Cells purified from the lamina propria were restimulated ex vivo with PMA and ionomycin and stained intracellularly with IFN- $\gamma$ . Following restimulation, TLR9 $^{-/-}$  mice displayed a 2-fold reduction of IFN- $\gamma$ -producing T cells (D), compared with WT controls. Data shown are representative of three independent experiments with 4–6 mice/group.

epithelial cells (28), and more specifically by the IECs (29). In addition to TLR9 mRNA levels, previous studies have shown that TLR9 engagement can be measured in terms of type I IFN expression (14, 30, 31). Exposure to type I IFNs ( $\alpha$  or  $\beta$ ) results in the phenotypic maturation of DCs (32). Quantitative real-time PCR was performed for IFN- $\beta$  and TLR9 to determine their expression level over the course of infection. At early time points, such as 12 h postinfection, elevated mRNA for TLR9 and IFN- $\beta$  was observed in the small intestine; TLR9 and IFN- $\beta$  mRNA appeared to peak at day 3 postinfection in this oral infection model (Fig. 3A). IECs isolated from mice at serial time points postinfection expressed a basal level of TLR9 and IFN- $\beta$  before dropping between 24 h and 3 days postinfection (Fig. 3B). The peak of TLR9 and IFN- $\beta$  was again observed at day 4 postinfection. A cyclic pattern in the kinetics of TLR9 expression was also observed from cells in the lamina propria (Fig. 3C). These results are consistent with successive stages of the parasite life cycle of invasion/replication/release followed by reinvasion of host cells.

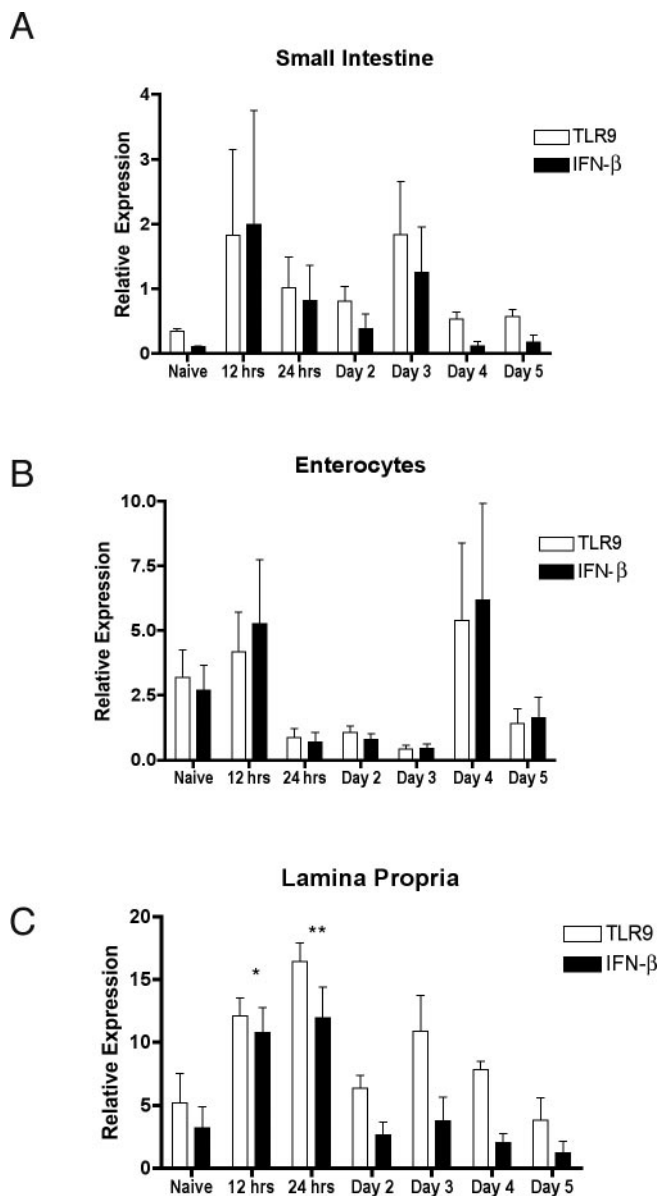
#### DC populations in the MLNs of TLR9 $^{-/-}$ mice are reduced compared with B6 mice after infection

The decrease of the inflammatory response in TLR9 $^{-/-}$  mice might result from a reduced capacity of DCs to help with the induction of a Th1-like immune response. Because DCs are es-

sential for the switch of the immune response toward a Th1 or Th2 profile, they were more thoroughly examined. TLR9 is expressed by a wide variety of APCs including DCs.

Gut-associated lymphoid tissue (GALT) DCs are distinct from peripheral DCs in terms of subset representation, phenotype, and function (33–37); MLN DCs can be characterized based on their expression of CD11c and CD8 $\alpha$ . Previous studies have shown that MLN plasmacytoid-like DC can be CD11c $^{low}$ , CD8 $\alpha$  $^{+}$ , B220 $^{+}$ , GR-1 $^{+}$ , class II $^{low}$ , CD80 $^{low}$ , and CD86 $^{low}$  (34). Separate studies suggest that CD11c $^{+}$ CD8 $\alpha$  $^{int}$ CD11b $^{+}$  cells could also be considered plasmacytoid DC (33). MLN CD11c $^{+}$  CD8 $\alpha$  $^{-}$  DCs can be either nonplasmacytoid or myeloid DCs (36). mPDCA is expressed on peripheral plasmacytoid DCs (38); its expression on GALT DCs had not been described previously. In humans, only plasmacytoid DCs are known to express TLR9, whereas myeloid, plasmacytoid, and conventional DC (pDC) subsets (CD11c $^{+}$ ) express TLR9 in mice (8) (39).

Four populations of MLN DCs were analyzed, CD11c $^{high}$  CD8 $\alpha$  $^{+/-}$  (CD11c $^{high}$ ), CD8 $\alpha$  $^{-}$ CD11c $^{low}$  (CD8 $\alpha$  $^{-}$  DCs), CD8 $\alpha$  $^{int}$  CD11c $^{low}$  (CD8 $\alpha$  $^{int}$ ), and CD8 $\alpha$  $^{high}$ CD11c $^{low}$  (CD8 $\alpha$  $^{high}$ ) (Fig. 4A). These subsets were phenotyped for the expression of B220, CD11b, GR-1, mPDCA, MHC class II, CD80, and CD86 (Fig. 4B). Both naive B6 and TLR9 $^{-/-}$  mice had similar DC populations in terms of frequency (Fig. 4A) and phenotype (Fig. 4B). The



**FIGURE 3.** TLR9 and IFN- $\beta$  mRNA are expressed by cells from the small intestine and specifically by IECs and cells from the lamina propria following *T. gondii* infection. WT mice were orally infected with 35 *T. gondii* cysts; representative sections of intestines, purified IECs, and lamina propria cells were assayed for TLR9 and IFN- $\beta$  production. TLR9 and IFN- $\beta$  mRNA were expressed by cells from the small intestines as early as 12 h postinfection, then peaked again at day 3 postinfection (A) as evidenced by SYBR green real-time PCR. Ex vivo-purified IECs exhibited a similar kinetic pattern of TLR9 and IFN- $\beta$  production (B). Similarly, cells from the lamina propria displayed significantly increased TLR9 and IFN- $\beta$  mRNA expression beginning at 12 h postinfection, peaking at 24 h, then cycling again as seen in the other panels (C). Data are representative of two independent experiments with 4 mice/group.

CD11c<sup>high</sup> cells are only present under naive conditions in both WT and TLR9<sup>-/-</sup> mice; these data correlate with previously published work (34). Phenotypically, these cells are B220<sup>+/+</sup>, CD11b<sup>low</sup>, GR-1<sup>+</sup>, mPDCA<sup>-</sup>, MHC class II<sup>high</sup>, and CD80/CD86<sup>+</sup> (Fig. 4B), indicative of a nonplasmacytoid mature DC. The CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DCs from naive mice are predominantly B220<sup>high</sup>, CD11b<sup>low</sup>, GR-1<sup>+</sup>, mPDCA<sup>-</sup>, MHC class II<sup>high</sup>, CD80<sup>-</sup>, and CD86<sup>+</sup>, suggesting a mature nonplasmacytoid or possibly a myeloid-like DC population. Naive CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> DCs had variable ex-

pression of B220 and GR-1, mPDCA<sup>+</sup>, CD11b<sup>high</sup>, MHC class II<sup>int</sup>, CD80<sup>-</sup>, and CD86<sup>+</sup>, suggestive of pDCs. Naive CD8 $\alpha$ <sup>high</sup> DCs were B220<sup>low</sup>, mostly CD11b<sup>low</sup>, GR-1<sup>int</sup>, mPDCA<sup>low</sup>, MHC class II<sup>low</sup>, CD80<sup>-</sup>, and CD86<sup>+</sup>, also suggestive of a pDC population.

MLNs from infected WT mice showed higher frequencies of all DC populations compared with the infected TLR9<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4A). Of the DCs from infected mice, the most striking increase was in the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> population in the B6 mice; these cells were B220<sup>int</sup>, CD11b<sup>high</sup>, GR-1<sup>-</sup>, mPDCA<sup>+</sup>, MHC class II<sup>low</sup>, suggesting an expansion or migration of a different set of DCs than were present before infection. This population differs significantly from the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> cells from the TLR9<sup>-/-</sup> mice that expressed B220<sup>high</sup>, mPDCA<sup>high</sup>, and MHC class II<sup>high</sup> (Fig. 4B), similar to the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> DCs present in naive mice. These results suggest that this subset of DCs may require TLR9 for their expansion and/or migration into the MLN of parasite-infected mice. In both WT and TLR9<sup>-/-</sup> mice, after infection the CD11c<sup>low</sup> subsets expressed mPDCA and expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 (Fig. 4B) and a modest increase in IL-12(p40/p70) expression (data not shown). Both intracellular and extracellular TLR9 were detected in B6 mice on DCs from the MLN (data not shown).

*TLR9 expressed by the cells from both the hemopoietic and nonhemopoietic compartments is essential for the immune response following oral infection of T. gondii*

TLR9 chimeric mice were generated to identify whether nonhemopoietic cells, such as epithelial cells, or the hemopoietic cells were responsible for initiating the T cell response following oral infection with *T. gondii*. Our studies focused on the CD4<sup>+</sup> T cells from the lamina propria because we showed in this study as well as previously (17, 40, 41), that these CD4<sup>+</sup> T cells infiltrated the lamina propria and produced copious amounts of IFN- $\gamma$  following oral infection. We observed a reduced frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> cells from the lamina propria in irradiated WT mice that were reconstituted with BM from TLR9<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A) (the nonhemopoietic cells from these TLR9<sup>-/-</sup>, whereas the hemopoietic cells are TLR9<sup>-/-</sup>). These results were similar to the observed reduction of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> in TLR9<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A). In chimeric mice where the nonhemopoietic system contained a TLR9<sup>-/-</sup> phenotype and the hemopoietic system a WT one (irradiated TLR9<sup>-/-</sup> mice reconstituted with BM from WT mice), there was also a reduction of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> cells from the lamina propria (Fig. 5A), similar to what was observed in TLR9<sup>-/-</sup> mice. WT mice reconstituted with WT BM were also used as controls and responded similarly to the WT mice (data not shown). These results indicate that there is no endogenous defect in T cells from TLR9<sup>-/-</sup> mice and that the TLR9-dependent Ag responses in the nonhemopoietic as well as the hemopoietic compartments are essential for the initiation of both the innate and adaptive immune response following oral infection with *T. gondii*. Histological analyses of the chimeric mouse intestines revealed a mixed phenotype in the TLR9<sup>-/-</sup> mice reconstituted with WT BM and in the WT mice reconstituted with TLR9<sup>-/-</sup> BM (Fig. 5B), further implicating a role for APCs from both the hemopoietic and nonhemopoietic compartments.

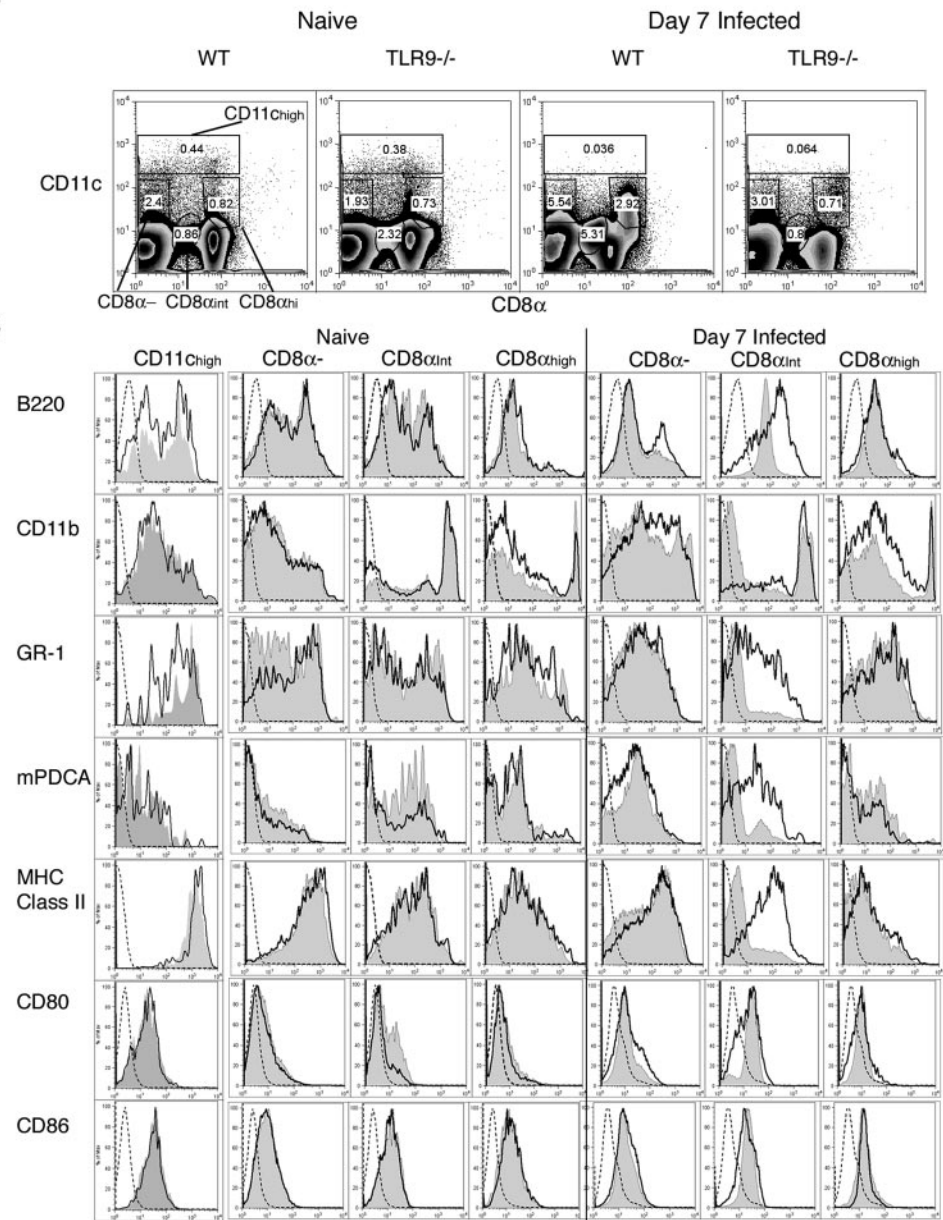
## Discussion

TLRs expressed by cells of the mucosal epithelium and associated lymphoid tissue play an essential role in the defense against microbes by recognizing conserved bacterial molecules. Previous studies as well as unpublished observations in our laboratory indicate that neither TLR4 nor TLR2 participate in the innate mucosal response to this parasite, although signaling through the

A

**FIGURE 4.** DC populations in the MLN expand following oral infection. WT or TLR9<sup>-/-</sup> mice were orally infected with *T. gondii*. Cells from the MLN (pooled from 4 mice/group) were isolated and stained for FACS analysis. Live low-density and mid-density cells were gated for analysis of CD11c and CD8 $\alpha$  expression (A). Oral infection results in an overall increase of all DC populations in WT and TLR9<sup>-/-</sup> mice; however, WT mice have a more robust increase in DC populations, especially the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> population (A). DCs were further gated on CD11c<sup>high</sup> (present only in naive conditions), CD8 $\alpha$ <sup>int</sup>CD11c<sup>low</sup>, and CD8 $\alpha$ <sup>high</sup>CD11c<sup>low</sup> populations for subsequent phenotypic analysis of B220, CD11b, GR-1, mPDCA, MHC class II, CD80 and CD86 (B). Naive DC populations in the TLR9<sup>-/-</sup> and WT mice were similar in terms of subset representation as well as phenotype (A and B). After infection, all DC populations had an increase in costimulatory molecules, CD80 and CD86 (B). The CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> cells from WT mice differed from the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> cells from TLR9<sup>-/-</sup> mice; in WT mice, these cells were B220<sup>high</sup>, CD11b<sup>high</sup>, GR-1<sup>-</sup>, mPDCA<sup>+</sup>, MHC class II<sup>low</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>; in TLR9<sup>-/-</sup> mice, these cells were B220<sup>high</sup>, CD11b<sup>high</sup>, GR-1<sup>+</sup>, mPDCA<sup>+</sup>, MHC class II<sup>int</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> (B). Isotype control, dotted lines, WT mice; gray filled, TLR9<sup>-/-</sup> mice; black lines. Plots represent one of at least three independent experiments. Five hundred thousand live events were counted for each sample.

B



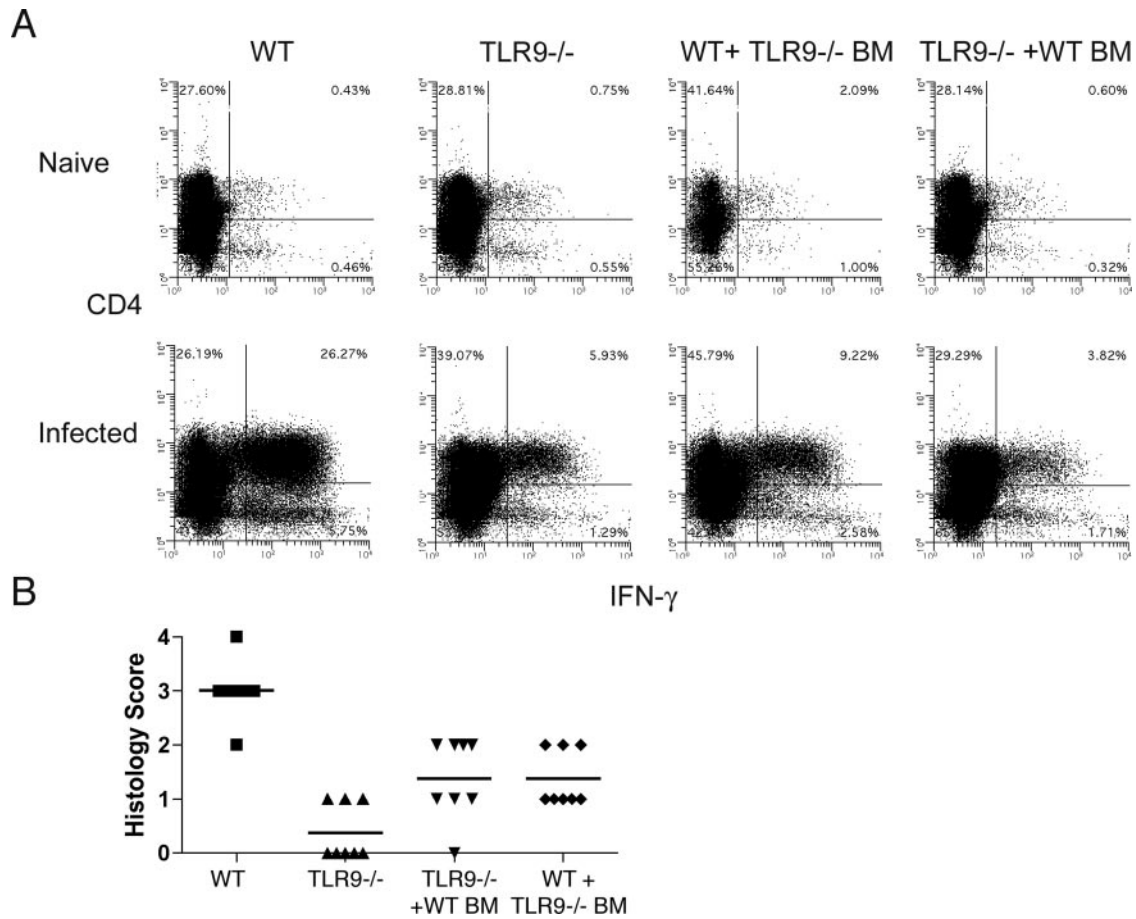
MyD88 pathway is essential. We report that TLR9 expression in susceptible WT mice is critical to the initiation of innate immune response and, subsequently, the adaptive immune response to this obligate intracellular pathogen and that both the hemopoietic and nonhemopoietic compartments are involved in Ag presentation. TLR9 expression on mucosal tissues and its role in the protection against various microbes has been well characterized. It is now appreciated that TLR9 can engage a wide range of microbial infections including bacteria (42, 43), viral (44, 45), and parasitic (8, 9, 15). TLR9 has been localized to several tissues and cell types, including the gastric mucosa, tonsils (29, 46), IECs, Paneth cells in the gut mucosa, B cells, and several DC populations (2, 15, 39, 47–49).

TLR9 expression has been previously described on several cell types including epithelial cells, B cells, and professional APC. Small intestine, ex vivo-purified IECs, and cells from the lamina propria exhibit an early up-regulation of TLR9 and IFN- $\beta$  (a measure of TLR9 activation) mRNA, followed by a second up-regulation by day 3 postinfection with *T. gondii*. Type I IFNs are

thought to be important in the phenotypic maturation of DCs, where they may work in an autocrine manner (32). These data indicate that TLR9 is expressed on cells from the nonhemopoietic compartment (i.e., the Paneth cells and/or enterocytes) in response to oral *T. gondii* infection.

TLR9 may exert different downstream effects depending on the TLR9-ligand interaction (50–53). TLR9 was shown to respond to non-CpG DNA resulting in a Th2 type instead of a Th1 type immune response (53), further indicating that TLR9 is important in polarizing the immune system to different antigenic stimuli. These different functions of activation might contribute to microbial clearance but also could lead to an increase in autoreactive B or T cell stimulation potentially enhancing the inflammatory processes that contribute to the immunopathology of several diseases, including acute ileitis. We examined whether TLR9<sup>-/-</sup> mice displayed a Th2 profile following oral infection with *T. gondii*. mRNA analyses of IL-4, IL-10, and IL-13 show no significant increase in Th2 cytokines compared with WT controls (data not shown). Additional analyses of T cells using intracellular cytokine





**FIGURE 5.** IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells results from activation of TLR9-expressing cells in both the hemopoietic and nonhemopoietic compartments. Day 7 postinfection, ex vivo-restimulated CD4<sup>+</sup> T cells from the lamina propria from 4 mice/group, performed twice, had reduced intracellular IFN- $\gamma$  levels when irradiated B6 mice were reconstituted with BM from TLR9<sup>-/-</sup> and when irradiated TLR9<sup>-/-</sup> mice were reconstituted with BM from B6 mice (A). Histological scoring of intestines from chimeric mice revealed an intermediate phenotype with regard to inflammation (B).

staining confirmed mRNA analyses, adding further support that TLR9<sup>-/-</sup> mice are deficient in inducing a Th1 response as opposed to shifting toward a Th2 response.

DC responses, in terms of IL-12p40 production from soluble *T. gondii* Ag, were shown to be associated with the newly identified MyD88-dependent TLR11; however, a small amount of IL-12 and IFN- $\gamma$  were still present in the serum of infected TLR11<sup>-/-</sup> mice (20), indicating that another MyD88-dependent TLR must be involved in the immune response to *T. gondii*. Although multiple TLRs are up-regulated in the intestine of *T. gondii*-infected mice, mice lacking the expression of TLR4 or TLR2 were still susceptible to the development of ileitis and died within a week of severe ileitis, (our unpublished observation), indicating a comparable immune response to orally infected WT mice. Taken together, these studies indicate that *T. gondii* infection triggers a MyD88-dependent TLR that may act independently or in concert with TLR11 to induce the IFN- $\gamma$  response by T cells from the lamina propria.

Systemically and in the GALT, the balance between mounting an effective immune response vs a tolerogenic effect to several different Ags depends largely upon the APC presenting the Ag and the T cells that respond (54). DCs help the immune system to maintain a tenuous yet crucial balance between attacking pathogens and sparing the body's own tissue through educating T cells as to the appropriate targets. Different GALT DC subsets may accomplish these different functions (54, 55). GALT DCs are distinct from peripheral DCs; our data indicate that in the MLN, CD11c<sup>low</sup> of variable CD8 $\alpha$  expression might be plasmacytoid-

like DCs. Although an increase in the CD11c<sup>low</sup> populations was observed after infection, the most pronounced increase was present in the CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> population. The increase of CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> cells and also the up-regulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 provides sufficient evidence to suggest that these DCs are important for initiating the inflammation in B6 mice after oral *T. gondii* infection. Our data is consistent with previous studies using an oral cholera toxin model of inflammation; in this model, CD8 $\alpha$ <sup>int</sup> DCs both accumulate in the MLNs following cholera toxin treatment and are immunostimulatory to naive CD4<sup>+</sup> T cells (33).

CD4 T cells (CD45RB<sup>high</sup>, CD25<sup>-</sup>), isolated from the lamina propria, were identified as a major player in the inflammatory process (41). Following infection, CD4<sup>+</sup> T cells migrate into the lamina propria, where they act as critical effector cells secreting copious amounts of Th1-type cytokines such as IFN- $\gamma$ , which we and others have identified as being critical in the development of the mucosal inflammatory process (16, 17). By day 7 postinfection, we observed a modest reduction in the overall numbers of CD3<sup>+</sup> T cells (both the CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) in TLR9<sup>-/-</sup> mice compared with the WT controls. Quantification of these lamina propria T cells shows that T cells of a regulatory phenotype (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>) are not involved in the lack of inflammation observed in TLR9<sup>-/-</sup> mice (data not shown). TLR9<sup>-/-</sup> mice display decreased IFN- $\gamma$  levels both in the small intestine and by the CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the lamina propria of TLR9<sup>-/-</sup> mice compared with WT controls. The reduction of IFN- $\gamma$ -producing T cells in the lamina propria following oral infection does not appear to be

due to an endogenous defect in the ability of TLR9<sup>-/-</sup> T cells to mount an IFN- $\gamma$  response because TLR9<sup>-/-</sup>-irradiated mice reconstituted with WT BM also have reduced IFN- $\gamma$  production.

mRNA analysis of purified B cell populations from the GALT reveals that TLR9 expression is not dramatically affected in this compartment during infection (data not shown). Double chimeric mice (irradiated WT B6 mice reconstituted with BM cells from B cell KO mice (50%) and from TLR9 KO mice (50%)) display no difference in susceptibility as compared with the WT mice (data not shown). This evidence rules out a crucial role of TLR9 expression by the B cell population.

In this study, we show that TLR9 deficiency results in a 50% reduction in IFN- $\gamma$  production, a level sufficient to prevent histological evidence of inflammation, yet insufficient to completely abrogate inflammatory cytokine production. It is likely that the immune response to *T. gondii* requires multiple pathogen-associated molecular patterns receptors because TLR11 and now TLR9 appear to play important roles in IFN- $\gamma$  responses, confirming previous reports that TLRs are redundant and may recognize multiple ligands from the same (1–6, 20, 56). In this study we show that in TLR9<sup>-/-</sup> mice, the decrease in inflammation is associated with a defect of DC stimulation and/or migration into the MLN and, subsequently, a lack of Ag presentation for T cell activation following oral infection with *T. gondii*. In summary, this study identifies TLR9 as a critical receptor for the parasite and essential for the development of an efficient T cell response in the small intestine.

## Acknowledgments

We thank John DeLong, Rachel DuPont, Jacqueline Y. Channon, and Niles P. Donegan for technical support and critical review of the manuscript.

## Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

## References

1. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675–680.
2. Akira, S., and H. Hemmi. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 85: 85–95.
3. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335–376.
4. Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16: 3–9.
5. Takeda, K., and S. Akira. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34: 73–82.
6. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17: 1–14.
7. Rutz, M., J. Metzger, T. Gellert, P. Lippa, G. B. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 34: 2541–2550.
8. Wagner, H. 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.* 25: 381–386.
9. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
10. Bauer, S., K. C. Hacker, H. Redecke, V. Hausmann, S. Akira, S. Wagner, H. Lipford, G. B. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9237–9242.
11. Kim, J. M., N. I. Kim, Y. K. Oh, Y. J. Kim, J. Youn, and M. J. Ahn. 2005. CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34<sup>+</sup> cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF- $\kappa$ B-independent pathways. *Int. Immunol.* 17: 1525–1531.
12. Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh, and T. Taniguchi. 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15416–15421.
13. Nishiyama, T., and A. L. DeFranco. 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 279: 19008–19017.
14. Pichyangkul, S., K. Yongvanitchit, U. Kum-arb, H. Hemmi, S. Akira, A. M. Krieg, D. G. Heppner, V. A. Stewart, H. Hasegawa, S. Looreesuan, et al. 2004. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J. Immunol.* 172: 4926–4933.
15. Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, et al. 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* 201: 19–25.
16. Liesenfeld, O. 1999. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 201: 229–239.
17. Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, W. Li, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2002. Lamina propria CD4<sup>+</sup> T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J. Immunol.* 168: 2988–2996.
18. Del Rio, L., B. A. Butcher, S. Bennouna, S. Hieny, A. Sher, and E. Y. Denkers. 2004. *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *J. Immunol.* 172: 6954–6960.
19. Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 5997–6001.
20. Yarovsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626–1629.
21. Bouma, G., A. Kaushiva, and W. Strober. 2002. Experimental murine colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses. *Gastroenterology* 123: 554–565.
22. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176: 47–58.
23. Arstila, T., T. P. Arstila, S. Calbo, F. Selz, M. Malassis-Seris, P. Vassalli, P. Kourilsky, and D. Guy-Grand. 2000. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J. Exp. Med.* 191: 823–834.
24. Overbergh, L., D. Valckx, M. Waer, and C. Mathieu. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11: 305–312.
25. Schiavoni, G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S. M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli, and E. Proietti. 2000. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44<sup>hi</sup> T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemioimmunotherapy of cancer. *Blood* 95: 2024–2030.
26. Sweet, M. J., C. C. Campbell, D. P. Sester, D. Xu, R. C. McDonald, K. J. Stacey, D. A. Hume, and F. Y. Liew. 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of Toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol.* 168: 392–399.
27. Burg, J. L., C. M. Grover, P. Pouletty, and J. C. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1787–1792.
28. Platz, J., C. Beisswenger, A. Dalpke, R. Koczulla, O. Pinkenburg, C. Vogelmeier, and R. Bals. 2004. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 173: 1219–1223.
29. Schmausser, B., M. Andrusis, S. Endrich, S. K. Lee, C. Josenhans, H. K. Muller-Hermelink, and M. Eck. 2004. Expression and subcellular distribution of Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 521–526.
30. Asselin-Paturel, C., G. Brizard, K. Chemin, A. Boonstra, A. O'Garra, A. Vicari, and G. Trinchieri. 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* 201: 1157–1167.
31. Ito, T., Y. H. Wang, and Y. J. Liu. 2005. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin. Immunopathol.* 26: 221–229.
32. Montoya, M., G. Schiavoni, F. Mattei, I. Gresser, F. Belardelli, P. Borrow, and D. F. Tough. 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99: 3263–3271.
33. Anjuere, F., C. Luci, M. Lebens, D. Rousseau, C. Hervouet, G. Milon, J. Holmgren, C. Ardavin, and C. Czerkinsky. 2004. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol.* 173: 5103–5111.
34. Bilsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108: 481–492.
35. Bilsborough, J., and J. L. Viney. 2004. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 127: 300–309.
36. Cruickshank, S. M., N. R. English, P. J. Felsburg, and S. R. Carding. 2005. Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice. *World J. Gastroenterol.* 11: 6338–6347.
37. Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204: 572–581.
38. Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21: 107–119.
39. Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC

- subsets: lack of TLR7 expression by CD8 $\alpha^+$  DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* 33: 827–833.
40. Kasper, L., N. Courret, S. Darche, S. Luangsang, F. Mennechet, L. Minns, N. Rachinel, C. Ronet, and D. Buzoni-Gatel. 2004. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.* 34: 401–409.
  41. Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, L. A. Minns, S. Luangsang, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4 $^+$  T cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 1059–1067.
  42. Ashkar, A. A., and R. KL. 2002. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr. Mol. Med.* 2: 545–556.
  43. Schetter, C., and J. Vollmer. 2004. Toll-like receptors involved in the response to microbial pathogens: development of agonists for Toll-like receptor 9. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 7: 204–210.
  44. Abe, T., H. Hemmi, H. Miyamoto, K. Moriishi, S. Tamura, H. Takaku, S. Akira, and Y. Matsuura. 2005. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79: 2847–2858.
  45. Malmgaard, L., J. Melchjorsen, A. G. Bowie, S. C. Mogensen, and S. R. Paludan. 2004. Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 173: 6890–6898.
  46. Eaton-Bassiri, A., S. B. Dillon, M. Cunningham, M. A. Ryczyn, J. Mills, R. T. Sarisky, and M. L. Mbow. 2004. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 72: 7202–7211.
  47. Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, S. Menard, and A. Balsari. 2004. Degranulation of Paneth cells via Toll-like receptor 9. *Am. J. Pathol.* 165: 373–381.
  48. Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi, and E. Raz. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126: 520–528.
  49. Kato, A., T. Ogasawara, T. Homma, J. Batchelor, S. Imai, H. Wakiguchi, H. Saito, and K. Matsumoto. 2004. CpG oligodeoxynucleotides directly induce CXCR3 chemokines in human B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 1139–1147.
  50. Jurk, M., B. Schulte, A. Kritzer, B. Noll, E. Uhlmann, T. Wader, C. Schetter, A. M. Krieg, and J. Vollmer. 2004. C-class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level. *Immunobiology* 209: 141–154.
  51. He, B., X. Qiao, and A. Cerutti. 2004. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.* 173: 4479–4491.
  52. Vollmer, J., J. S. Jepsen, E. Uhlmann, C. Schetter, M. Jurk, T. Wader, M. Wullner, and A. M. Krieg. 2004. Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides* 14: 23–31.
  53. Vollmer, J., R. D. Weeratna, M. Jurk, U. Samulowicz, M. J. McCluskie, P. Payette, H. L. Davis, C. Schetter, and A. M. Krieg. 2004. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 113: 212–223.
  54. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 331–341.
  55. Mowat, A. M. 2005. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine* 23: 1797–1799.
  56. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2005. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560: 11–18.

## 2. Article 2 : *Toxoplasma gondii* induit la production d'alpha-défensines (ou cryptdines) par des mécanismes TLR9-dépendants

Les alpha-défensines autrement appelées cryptdines chez la souris sont des peptides antimicrobiens produits spécifiquement par les cellules de Paneth de l'intestin {Porter, 2002}. Ces peptides ont une activité anti-microbienne contre les bactéries à Gram négatif et positif et sont cytotoxiques pour les trophozoïtes du parasite *Giardia lamblia* {Lehrer, 1993} {Ganz, 2003}. Les cryptdines interviennent également dans la réponse immunitaire innée en induisant la production de cytokines pro inflammatoires CCL3, CCL4 et CCL5 par les entérocytes in vitro ou lors de l'infection par *Salmonella sp* {Lin, 2004}. Il a été montré que les souris NOD2 déficientes ont un défaut de production de Cryptdines en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes* indiquant que les récepteurs de l'immunité innée régulent la production et le sécrétion des peptides anti-microbiens {Kobayashi, 2005}. Chez la souris, les Cryptdines sont exprimées de façon constitutive, mais leur production peut s'accroître lors de stress microbien. Par ailleurs, la voie de signalisation TLR9 stimulée par des agonistes synthétiques CpG-ODNs induit la libération des Cryptdines dans la lumière intestinale chez la souris, il en est de même lors du traitement de rats par de l'IFN- $\alpha$  {Ozcan, 1996} {Rumio, 2004}. Nous avons étudié le rôle des cryptines dans la réponse immunitaire innée contre *Toxoplasma gondii* dans le modèle murin où la voie de signalisation TLR9 est activée.

### 2.1. Le toxoplasme augmente la production et induit la sécrétion de cryptdines chez la souris

Les cryptdines constituent une famille de six membres (Crp-1 à -6) dont les séquences codantes comportent deux exons {Huttner, 1994}. Nous avons dessiné des amorces pour mesurer par RT-PCR quantitative en temps réel l'expression des Crp-1 à -5, "la" Crp-6 étant hautement polymorphique.

Les cellules de Paneth constituent la dernière ligne de défense de cellules souches épithéliales de l'intestin face aux infections intestinales. Ces cellules sont très réactives

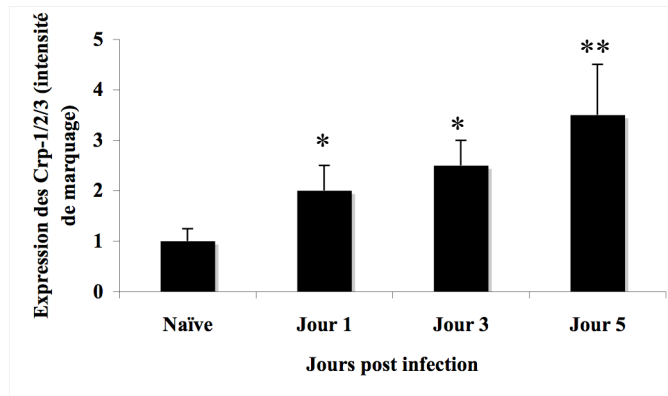
aux stress microbiens et libèrent rapidement des vésicules de sécrétion. Les peptides antimicrobiens, contenus dans ces vésicules, notamment les cryptdines interagissent préférentiellement à concentration physiologique avec les membranes électronégatives des bactéries pathogènes {Satchell, 2003}. Cependant, à forte concentration, les cryptdines deviennent cytotoxiques pour les cellules épithéliales de l'intestin y compris les cellules de Paneth. Ceci rend impossible l'isolement des cellules de Paneth au cause de la dégranulation que cela engendre et de la cytotoxicité des peptides antimicrobiens libérés. Cependant, il est possible d'opérer un enrichissement de ces cellules en procédant à une dissociation mécanique des cellules épithéliales de l'intestin en soumettant des fragments d'intestin grêle ouverts longitudinalement à une agitation douce. Ce procédé permet de collecter des entérocytes et des cryptes entières protégeant ainsi les cellules de Paneth enrichies de toute dégranulation.

Afin d'étudier l'évolution de la production de cryptdines en réponse à l'infection orale par *T. gondii*, nous avons purifié les cellules épithéliales de l'intestin et mesuré l'expression des ARNm codant pour les Crps dans ces cellules. Nous avons observé que les ARNm codant pour les Crp-2, -3, -4 et -5 sont fortement exprimés à partir de 24 heures après infection et maintenus à un haut niveau d'expression jusqu'au jour 5 post infection (**article 2 ; figure 1**). Nous n'avons pas pu observer d'expression constitutive de Crp-1 chez les souris C57BL/6 ni son induction lors de l'infection.

Les cellules de Paneth possèdent chez la souris un mécanisme de régulation post-traductionnel des Crps par la molécule Mmp7 (Matrix Metalloprotease-7). Les Crps sont contenues dans des vésicules de sécrétion sous la forme de Pro-Crps inactives et nécessitent un clivage de la région N-Terminale par Mmp7 afin d'acquérir une structure tertiaire fonctionnelle {Wilson, 1999}. Mmp7 est exprimé de façon constitutive au cours de l'infection par *T. gondii* (**article 2 ; figure 1A**). Les Crps sont des peptides cationiques dénaturés lors de leur migration sur un gel SDS-PAGE classique. Il est cependant possible de les faire migrer sur des gels AU-PAGE (Acid Urea Polyacrylamid Gel Electrophoresis) pour mesurer l'expression protéique des Crps par western blot {Wilson, 1999}. Ainsi au cours de l'infection par *T. gondii*, les Crps sont accumulées dans



l'intestin ce qui confirme les résultats obtenus par RT-PCR (**article 2 / résultats complémentaires ; figure A**).



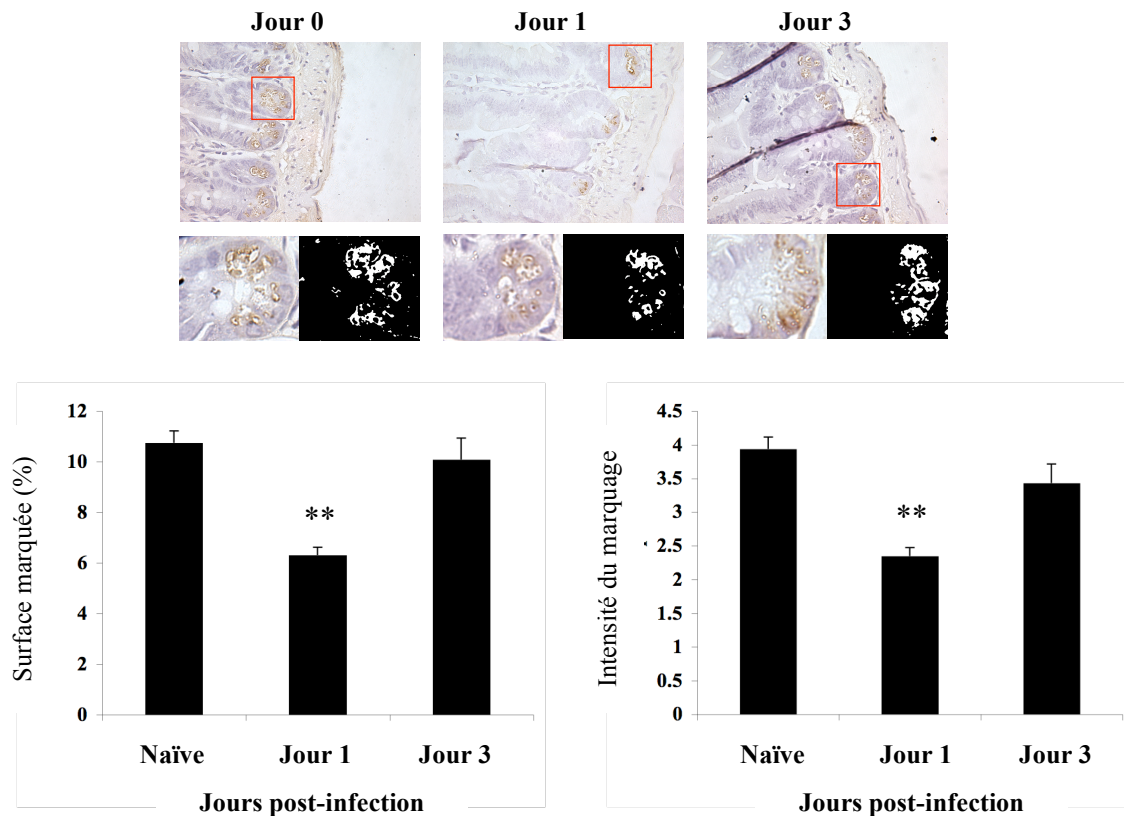
**Figure A : les souris C57BL/6 produisent et accumulent des cryptdines dans l'intestin grêle lors de l'infection orale par *T. gondii*.** Des souris C57BL/6 ont été infectées oralement par 35 kystes de *T. gondii* (5 souris par jours étudiés) . Aux jours 1, 3 et 7 après infection, l'intestin grêle a été prélevé et les protéines purifiées pour mesurer par AU-PAGE / western blot la production des cryptdines avec des anticorps caprin polyclonaux anti-Crp-1, -2 et -3 de souris. Les cryptdines produites ont été quantifiées en mesurant l'intensité des bandes marquées.

Afin de vérifier si l'augmentation de production des Crps est due à une suractivité des cellules de Paneth ou à leur multiplication, nous avons réalisé des comptages sur coupe de ces cellules. Le marquage histochimique phloxine-tartrazine colore en rose ou orange les granules de sécrétion respectivement présentes au pôle apical ou basal des cellules de Paneth. Le marquage immuno-histochimique par des anticorps polyclonaux anti-CRS4c (Cystein Rich Sequence 4c), reconnaît également de façon spécifique l'appareil sécrétoire des cellules de Paneth {Ouellette, 1990} {Huttner, 1994}.

Pour étudier la prolifération des cellules de Paneth, nous avons ensuite compté le nombre de cellules contenant des vésicules tartrazine-positives et mesuré les surfaces marquées par les anticorps anti-CRS4c sur des coupes longitudinales d'intestin grêle. La fréquence des cellules de Paneth lors de la phase aiguë de l'infection par *T. gondii* (jours 1 à 5 après infection) reste inférieure ou égale à ce qui est mesuré chez les souris naïves, indiquant

que les cellules de Paneth ne prolifèrent pas (**article 2 ; figures 2A & article 2 / résultats complémentaires ; figure B**). Ces résultats ont été confirmés par la mesure d'expression des ARNm codant pour Mmp7 dans l'intestin grêle de souris infectées. En effet, lors de la phase précoce de l'infection par *T. gondii*, l'expression de Mmp7 est constitutive (**article 2 ; figure 1B**).

L'intensité du marquage CRS4c sur les coupes histologiques et le nombre de vésicules tartrazine-positives nous ont permis de quantifier la dégranulation des cellules de Paneth. Nous avons observé une diminution du nombre de vésicules tartrazine-positives, de même qu'une diminution de l'intensité de marquage CRS4c, aux jours 1 et 3 après infection ce qui indique que l'infection orale par *T. gondii* provoque la libération des granules de sécrétion par les cellules de Paneth (**article 2 ; figures 2A & article 2 / résultats complémentaires ; figure B**). L'augmentation de production des Crps précédemment mesurée est donc due à une activité accrue des cellules de Paneth plutôt qu'à leur multiplication.



**Figure B : l'infection de souris C57BL/6 par *T. gondii* induit la dégranulation des cellules de Paneth et non leur prolifération.** Aux jours 1 et 3 après infection orale par 35 kystes de *T. gondii* 76K, des coupes longitudinales d'intestin grêle de souris C57BL/6 ont été réalisées et marquées avec des anticorps polyclonaux anti-CRS4c couplés à de la peroxydase. Après révélation des coupes histologiques par l'ajout de DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) les surfaces marquées et l'intensité du marquage ont été quantifiées (\*\* indique une valeur de  $p$  inférieure à 0.001)

## 2.2. Les cryptdines produites en réponse à l'infection par *T. gondii* ont une activité anti-parasitaire lors des phases précoces de l'infection, mais ne contribuent pas au déclenchement de l'iléite létale par le parasite

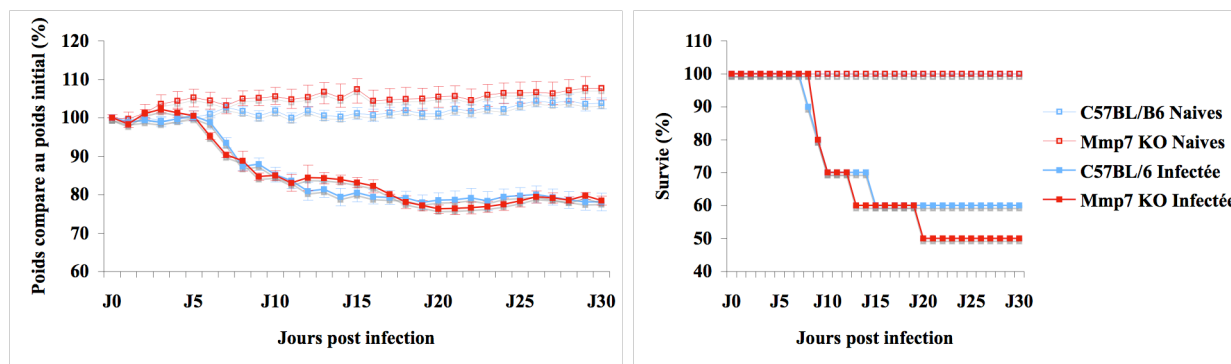
L'infection de souris Mmp7 KO nous a permis d'étudier *in vivo* le rôle des Crps lors de l'infection par *T. gondii*. Les souris Mmp7 KO produisent des pro-Crps, mais ne peuvent les maturer. Il en résulte une sensibilité accrue aux infections bactériennes {Wilson, 1999} (tableau 8).

|                 | Expression du<br>TLR9 | Expression des<br>pro-cryptdines | Sécrétion de<br>cryptdines matures |
|-----------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| C57BL/6 WT      | Oui                   | Oui                              | Oui                                |
| C57BL/6 Mmp7 KO | Oui                   | Oui                              | Non                                |
| C57BL/6 TLR9 KO | Non                   | Oui                              | Oui                                |

**Tableau 8 : profils d'expression du TLR9 et aptitude à maturer les pro-cryptdines des souris C57BL/6 WT (Wild Type - Sauvages), TLR9 KO et Mmp7 KO.**

L'analyse de la réponse cytokinique des lymphocytes de la *lamina propria* montre une nette diminution de la production des cytokines Th1 (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) 7 jours après infection orale chez les souris Mmp7 KO. Cependant, la réponse pro inflammatoire est deux fois plus importante dans les ganglions mésentériques des souris Mmp7 KO comparées aux souris sauvages (article 2 ; figure 4).

Chez les souris C57BL/6, la réponse inflammatoire lors de la phase aiguë de l'infection n'est pas régulée et aboutit à une iléite fatale 10 jours après infection. Bien que nous ayons observé chez les souris Mmp7 KO une importante diminution de la réponse Th1, l'absence de Crps fonctionnelles n'a aucun impact sur l'issue fatale de la maladie. Les souris Mmp7 KO infectées oralement par 30 kystes de *T. gondii* ont une morbidité et une mortalité totalement identiques à ce qui est observé chez les souris sauvages (article 2 / résultats complémentaires ; figure C).

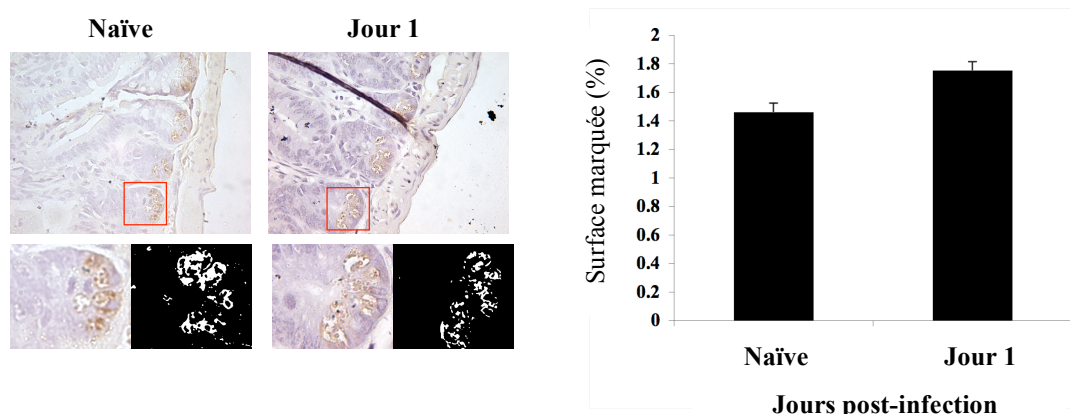


**Figure C : la morbidité et la mortalité des souris Mmp7 KO sont similaires à celles de souris contrôles en réponse à l'infection par *T. gondii*. Les souris contrôles et Mmp7 KO (10 par groupe) ont été infectées oralement par 25 kystes de *T. gondii* 76K (dose infectieuse < DL50). La morbidité est évaluée en mesurant les pertes de poids.**

Cependant, la mesure des charges parasitaires aux jours 3, 8 et 30 post-infection montre que les souris Mmp7 KO sont plus infectées lors des phases précoces de l'infection. Ainsi, 3 jours après l'infection orale par 20 kystes de *T. gondii*, l'absence de Crps fonctionnelles est corrélée à une charge parasitaire accrue dans l'intestin grêle et les ganglions mésentériques. Au jour 8, les charges parasitaires dans les ganglions mésentériques et l'intestin grêle ne sont plus significativement différentes entre les souris Mmp7 KO et C57BL/6. Il en est de même dans le cerveau 30 jours après infection (**article 2 ; figure 3**). Nous avons par ailleurs observé une diminution non significative mais reproductible de production des chimiokines pro inflammatoires (CCL3, CCL4 et CCL5) par les cellules épithéliales chez les souris Mmp7 KO (**article 2 ; supplementary figure 3**) pouvant contribuer à une moindre attraction des cellules immunes comme les cellules dendritiques, les macrophages responsables de la clearance du parasite et de la mise en place de la réponse immune. Ceci pourrait donc expliquer la baisse de réponse immune dans l'intestin (**article 2 ; figure 4**), et la plus grande sensibilité de ces souris lors des phases précoces de l'infection par le toxoplasme.

### 2.3. *Toxoplasma gondii* induit la production et la sécrétion de cryptdines chez la souris par des mécanismes TLR9-dépendant, via la production d'IFNs de type I

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la production des Crps en réponse à l'infection par *T. gondii*, nous avons utilisé le modèle murin TLR9 KO. En absence de TLR9, les souris infectées oralement par le toxoplasme perdent leur aptitude à moduler l'expression des Crps (**article 2 ; figure 5**). Ceci a été confirmé lors de marquages histochimiques (phloxine-tartrazine) et immuno-histochimiques (anticorps anti-CRS4c) de coupes longitudinales d'intestin grêle. L'intensité du marquage CRS4c de même que la fréquence des vésicules tartrazine-positives restent inchangées lors de la phase précoce de l'infection par *T. gondii* de souris TLR9 KO, ce qui indique que les cellules de Paneth n'opèrent pas de dégranulation de leurs vésicules de sécrétion lors du contact avec le parasite (**article 2 ; figure 2B & article 2 / résultats complémentaires ; figure D**). Nous avons observé que les souris TLR9 KO ont également une perte de leur capacité à produire des IFNs de type I en réponse à l'infection (**article 2 ; supplementary figure 1**).



**Figure B :** les cellules de Paneth de souris TLR9 KO ne libèrent pas leurs vésicules de sécrétion en réponse à l'infection par *T. gondii*. Vingt-quatre heures après infection orale par 35 kystes de *T. gondii* 76K, des coupes longitudinales d'intestin grêle de souris TLR9 marquées avec des anticorps polyclonaux anti-CRS4c couplés à de la peroxydase. Après révélation des coupes histologiques par l'ajout de DAB les surfaces marquées ont été quantifiées.

Le Crps sont donc produites lors de l'infection par *T. gondii* par des mécanismes TLR9 dépendants. Dans notre modèle, l'injection sous-cutanée d'IFN- $\beta$  chez des souris C57BL/6 induit la modulation des Crps et la dégranulation des cellules de Paneth dans des proportions similaires à ce qui est observé chez les souris infectées par *T. gondii* (**article 2 ; figures 2A et 6**). En injectant de la même façon de l'IFN- $\beta$  dans des souris TLR9 KO, nous avons observé ces souris augmente la transcriptions des Crps et libèrent leurs granules de sécrétion (**article 2 ; figures 2B et 7**). Ceci suggère que le toxoplasme induit la sécrétion de Crps chez la souris par la production d'IFNs de type I via des mécanismes TLR9-dépendants.

Article soumis le 6 mai 2008

Journal : Gastroenterology

**TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*.**

David M. Foureau<sup>1</sup>, Daniel W. Mielcarz<sup>1</sup>, Laurence C. Menard<sup>1</sup>, Julie Schultess<sup>2</sup>, Catherine Werts<sup>2</sup>, Lloyd H. Kasper<sup>1\*</sup>, Dominique Buzoni-Gatel<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup> Department of Medicine and Microbiology-Immunology, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH, USA; <sup>2</sup> Institut Pasteur-INRA Département de Parasitologie, Paris, France;

<sup>3</sup> INRA IASP 37380 Nouzilly, France.

\* D.B. and L.K. both participated to the direction of this work.

Correspondence to: Dominique Buzoni-Gatel, INRA IASP 37380 Nouzilly, France.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Cryptdins, TLR9, type I IFNs.

**Abbreviations:** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), Toll-like receptor-9 (TLR9), Cryptdins (Crp), Interferons (IFNs), Mesenteric Lymph Node (MLN), Lamina propria cells (LPCs), Intestinal epithelial cells (IECs), wild type (WT), Central nervous system (CNS)



## Abstract

Alpha-defensins (or Cryptdins – Crp) are a group of cationic antimicrobial peptides, harboring a broad spectrum of microbicidal activity against bacteria, fungi and enveloped viruses. In mouse small intestine, epithelial cells and more specifically Paneth cells produce Crp as a component of secretory granules released in the lumen. *In vivo* ligation of Toll-Like Receptor 9 (TLR9), by agonistic CpG-ODNs, can degranulate Paneth cells, although the mechanism, by which this occurs, remains uncertain. Infection of B6 mice with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) can regulate Crp transcription and secretion by intestinal epithelial cells. Oral infection of Mmp7 deficient mice that are defective in Crp maturation results in uncontrolled parasite replication. TLR9 deficient mice lack the ability to up-regulate Crp mRNAs expression, and to release Paneth cells secretory granules in response to *T. gondii* infection. In the small intestine of infected mice, up-regulation of TLR9 mRNA expression is associated with a marked increase of type I IFNs mRNAs. Treatment with exogenous type I IFN $\beta$  is correlated to an up-regulation of Crp mRNA expression and to a decrease in parasite burden. These observations demonstrate that murine Crp expression and secretion by epithelial cells is an important innate immune response element to oral infection with *Toxoplasma gondii*. This response appears mediated via TLR9-dependent production of IFN $\beta$  that may be involved in the blockade of *T. gondii* host penetration.

## Introduction

The intestinal epithelium protects the host against microbial infection not only by forming a physical barrier, but also by active participation in host innate defense via the production of cytokines, chemokines and antimicrobial peptides {Muller, 2005}. Defensins are a group of cationic antimicrobial peptides containing 3 intramolecular disulfide bonds that function by disrupting the membrane integrity of target organisms. They are categorized as alpha- and beta-defensins depending on the position of their cysteine linkage {Ouellette, 1996}. In mice, alpha-defensins are exclusively expressed in Paneth cells, which are located in the crypts of Lieberkhün that line the small intestine {Porter, 2002}. Paneth cells are heterogeneously distributed in the small intestine with a higher frequency in the ileum compared with the duodenum and jejunum {Brennan, 1999}.

Alpha-defensins display a broad spectrum of microbicidal activity against gram positive and negative bacteria (Gram+ and -), fungi, protozoa and enveloped viruses. The primary mechanism by which defensins exhibit antimicrobial activity is the formation of pores in the microbial membrane that distorts integrity and function of the affected microbe {Shai, 1999}. The biological activity of mouse alpha-defensins (or Cryptdins – Crp) requires a proteolytic activation. Mouse Paneth cells secrete matured 3.5kDa Crp as components of secretory granules. Matrix Metalloprotease 7 (Mmp7) mediates 8.4 kDa Pro-Crp processing intracellularly before secretion {Wilson, 1999} {Ouellette, 2006}.

Wehkamp and collaborators have recently reported that the expression of Crp is regulated by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and requires the transcription factor Tcf-L2 (Transcription factor like-2, also called TCF-4) {Wehkamp, 2007}. However, *in vivo* stimulation of TLR9, with agonistic CpG-ODNs, also leads to Paneth cell degranulation {Rumio, 2004}. The activation of the TLR9 signaling pathway induce the nuclear translocation of Interferon Regulatory Factor-7 (IRF7) and the subsequent transcription of type I IFNs  $\alpha$  and  $\beta$  {Kawai, 2004} {Honda, 2005}. Type I IFNs  $\alpha$  and  $\beta$  share the same receptor (IFNAR) expressed by epithelial cells and in the lamina propria mainly by dendritic cells. By interacting with its receptor (IFNAR), IFN  $\alpha$  or  $\beta$  can locally amplify

the type I IFN response (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) either by autocrine or paracrine mechanisms {Decker, 2005}. It remains unclear yet if Paneth cells can release their content directly upon TLR9 activation or if it requires the production of subsequent type I IFNs. Indeed, when treated with IFN- $\alpha$  intraperitoneally, rat Paneth cells release intracellular granules into the lumen {Ozcan, 1996}.

Crp are a key component of the innate immune response against enteric bacteria to protect multipotent stem cells {Ganz, 2000} {Salzman, 2007}. It has been shown that Crp also exhibit a killing activity *in vitro* against fungi, enveloped viruses or protozoa. Crp-2 and -3 kill *Giardia* (an Apicomplexan extracellular parasite) trophozoites effectively, whereas Crp 1 and 6 cannot, suggesting a high degree of specificity for killing despite the extensive sequence similarities between Crp {Aley, 1994}. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an obligate intracellular parasite that is acquired by oral ingestion of either sporozoites from contaminated soil or tissue cysts containing bradyzoites from undercooked meat products such as pork, mutton and beef {Dubey, 2000} {Gilbert, 1999 Petersen}, 2007}. We have previously reported that TLR9 is required to initiate the immune response following oral infection with *T. gondii* in mice. When orally infected with *T. gondii* cysts, TLR9 $^{-/-}$  mice are unable to mount an efficient Th1 IFN $\gamma$  mediated response leading to increased parasite replication {Minns, 2006}.

In these studies we evaluate the role of Crp in the defense against oral infection with *T. gondii*. We demonstrate that Crp (mostly Crp-3 and -5) are expressed during *T. gondii* infection and appear to be dependent on the secretion of type I IFNs following ligation of TLR9.

## Material and methods

### *Mice and parasites*

Female 8 to 10 week old C57BL/6J (wild-type; WT) from the Jackson Laboratory or TLR9<sup>-/-</sup> mice (C57BL/6 background) from Oriental BioService Inc. were bred and housed under approved conditions at the Animal Research Facility at Dartmouth Medical School. Mice were injected intraperitoneally with murine IFN $\beta$  purified from transfected CHO cells, generously provided by doctor Edward Croze, diluted in PBS (Ca/Mg free) BSA 0.1%. Mice were infected orally by intragastric gavage with 20 or 35 cysts of the 76K *T. gondii* strain maintained through passage in CBA/J mice from the Jackson Laboratory. After infection, mice were weighed daily. All experiments were performed with 3 to 6 mice per group analyzed individually and were repeated a minimum of 2 times; error bars represent the SEM.

### *Histochemical stains*

Immediately after sacrifice, the small intestine was removed and flushed with 15 ml of ice-cold PBS-EDTA 2 mM (Ca/Mg free). One to two centimeters sections from its distal third (this segment was arbitrarily designed as the ileum) were cut and fixed overnight in PBS-formalin 10% (Fisher). Each of the tissue section was then placed in a tissue cassette, embedded in paraffin and 5  $\mu$ m thick longitudinal slices were prepared and stained with phloxine-tartrazine standard protocol {Sheehan, 1987}.

### *Purification of intestinal epithelial cells (IECs)*

Small intestines were washed in PBS-EDTA 3mM (Ca/Mg free), and Peyer's patches were removed. Intestine were opened longitudinally and cut into 1 cm long fragments. Pieces were incubated in PBS-EDTA 3mM under agitation (10 min, 37°C) and supernatants containing IEC (i.e enterocytes and Paneth cells) were collected and washed in RPMI 1640 with 5% FBS. This process was repeated twice. Dithioerythritol (Sigma-Aldrich) was then added to the IECs suspension (1.5 mg per 10ml). After incubation (15 min, 37°C), cells were washed twice in RPMI 1640 with 5% FBS. Purified IECs were

collected at the interface of a 60-30% Percoll gradient (30 min, 1500 rpm) and washed in RPMI 1640 with 5% FBS.

#### *Mesenteric lymph node cell (MLN) suspension*

MLNs were collected from mice, excess fat removed, and dissociated through a 70  $\mu$ m cell strainer in RPMI 1640 to form a single cell suspension. Cells were then resuspended in RPMI with FBS 2%, laid over Histopaque (density 1.077) (Sigma-Aldrich) and centrifuged (20 min, 2000 rpm). Cells in the interphase were collected, and washed in RPMI 1640 with 2% FBS before RNA extraction.

#### *Purification of Lamina Propria cells (LPC)*

LPC were purified as described previously {Vremec, 1992}. Briefly, small intestines were washed with PBS (Ca/Mg free), and fat and Peyer's patches were removed. Small intestines were then opened longitudinally, cut into 1 cm pieces and washed in PBS-EDTA 3mM (10 min, 37°C). Intestine pieces were then washed in RPMI 1640 with EGTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM and FBS 5% (10 min, 37°C). Intestine pieces were then washed twice in PBS (Ca/Mg free) (10 min, 37°C). The tissue was digested in Liberase (Roche) 0.14 U/ml and DNaseI (Sigma-Aldrich) 5U/ml in RPMI 1640 at 37°C for 45 min under agitation. Cell suspensions were washed twice in RPMI 1640 with FBS 2% then laid over Histopaque (density 1.077) and centrifuged (20 min, 2000 rpm). Cells at the interphase were collected, and washed in RPMI 1640 with FBS 2% before RNA extraction.

#### *mRNA relative expression measurement by SYBR green quantitative real-time PCR*

A total of 2 $\mu$ g of Qiagen RNeasy-purified (Qiagen) mRNA was reverse transcribed using GeneAmp® RNA PCR kit (Applied Biosystems). A total of 200ng of cDNA was amplified using the 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) on a Biorad iCycler. Relative mRNA expression were normalized to  $\beta$ -actin and was expressed using the  $\Delta$ Ct method where relative mRNA expression =  $2^{-(\text{exp} - \text{actin})} \times 1000$ . See Table 1 for the sequences of primers used for this study.

#### *Parasite burden measurement by SYBR green quantitative real-time PCR*

A total of 1µg genomic DNA was prepared from the small intestine or MLN using DNeasy tissue kit (Qiagen). The *T. gondii* B1 gene was amplified using the 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) on a Biorad iCycler. QB1, forward: GGAACTGCATCCGTTTCATGAG and reverse: TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC. A standard curve for parasite equivalents was generated using a plasmid as described previously {Burg, 1988}.

#### *Statistical analyses*

Groups were compared using Prism Statistical Software's unpaired *t* test. Values of \* $p < 0.005$  or \*\* $p < 0.001$  were considered significant.

## Results

### **Cryptdins mRNAs are upregulated and Paneth cells degranulate in response to *Toxoplasma gondii* infection.**

In response to Gram + and – bacteria infections Paneth epithelial cells release secretory granules, followed by increased expression of Crp mRNA {Kobayashi, 2005}. Quantitative expressions of Crp 2, 3, 4 and 5 mRNA derived from purified intestinal epithelial cells of C57BL/6J (WT) mice were measured by RT-PCR. A significant increase in Crp-3 and -5 mRNAs expression above constitutive level was observed within 24 hours after oral infection and maintained 3 to 5 time higher than naïve mice at least until day 5 post infection (Figure 1A). The increased production of Crps following oral infection by *T. gondii* has been confirmed at the protein level by western blots using pan-Crp-1, -3 and -5 polyclonal antibodies (data not shown). Matrix Metalloprotease 7, required for Crp activation before secretion, was constitutively expressed at the mRNA level and slightly rose (day 5) over the early phase of infection (Figure 1B).

Phloxine-tartrazine staining is the most specific histochemical staining available for detecting Paneth cells secretory apparatus. The tartrazine-positive granules of secretion vary from a pink to orange color respectively at the apical and basal side of Paneth cells. In C57BL/6 mice, twenty-four hours and 3 days after oral challenge with *T. gondii*, tartrazine positive vesicles had a reduced frequency and were only located at the apical side of the cells, indicating that the secretory granules were being released (Figure 2A, left panel). At day 5 post infection, the number of granules contained in Paneth cells was higher than what we have observed in control (D0) mice. However, the frequency of pyramidal shaped cells containing tartrazine-positive vesicles did not rise during infection (5 to 8 per crypts) indicating that Paneth cells did not proliferate but have interrupted the release of their secretory granules during the late stage of infection (Figure 2A, left panel). We have confirmed these observations by immuno-histochemical analysis, using anti-CRS4c antibodies (Cryptdins-related sequence 4c), an antimicrobial peptide contained specifically in Paneth cells {Ouellette, 1990} {Huttner, 1994} (data not shown).

### **The maturation of Cryptosporidia by Matrix Metalloprotease-7 is required to inhibit *T. gondii* host penetration.**

To address the question of the anti-*T. gondii* activity of Crp, parasite burden was measured by RT-PCR in the intestine and mesenteric lymph nodes from Matrix Metalloprotease 7 deficient mice (Mmp7<sup>-/-</sup>), that cannot process immature Crp into biologically active Crp, after oral infection with 20 cysts of *T. gondii*. After infection, the lack of intracellular mature Crp in Mmp7<sup>-/-</sup> mice was correlated with an increase in parasite number during the early phase of the infection. At day 3 after infection the parasite burden in the small intestine and in the mesenteric lymph nodes from Mmp7<sup>-/-</sup> mice was respectively 5 and 7 folds higher compared with WT mice. However, this effect was transitory. A week after the infection, the parasite burden in the small intestine from Mmp7<sup>-/-</sup> mice was identical to that of control mice (Figure 3A). In the mesenteric lymph nodes, the difference in parasite colonization between Mmp7<sup>-/-</sup> and WT mice was still significant ( $p$  value < 0.005) although decreased as compared with what was observed earlier.

Over time, the early anti-parasitic effect associated with the production of mature Crp declined and was no longer observed at day 30 post infection (when chronic infection is established) as shown by a similar number of cysts present in the brains of Mmp7<sup>-/-</sup> and WT mice (Figure 3B).

### **Reduced Th1 polarization in Mmp7 deficient mice.**

Th1 cytokines, in particular IFN- $\gamma$ , are essential for parasite clearance in the infected murine host. To address whether the higher parasite burden observed in Mmp7<sup>-/-</sup> mice during the early phase of infection is due to a defect in stimulation of an efficient Th1 immune response, IFN- $\gamma$  expression, the hallmark of a Th1 like immune response, was measured in these mice (Figure 4). During the early phase of the infection, IFN- $\gamma$  mRNA expression within the lamina propria of Mmp7<sup>-/-</sup> mice was significantly lower than that observed in the small intestine of WT mice. This observation is correlated to the higher parasite burden found in this organ at that time post infection. At day 7 post-infection,



IFN- $\gamma$  mRNA expression in the mesenteric lymph nodes was however above that observed in WT mice. Similar observations were done with TNF- $\alpha$  and T-bet expressions (data not shown).

**Crp mRNA upregulation and Paneth cell degranulation in response to *T. gondii* infection, requires TLR9 expression in mice.**

We have previously observed {Minns, 2006} that TLR9 expression, by both parenchymatous cells and hematopoietic cells, is required for Th1 polarization of the immune system after infection with *T. gondii*. Activation of TLR9 with agonistic CpG-ODNs leads to Paneth cell degranulation in mice {Rumio, 2004}. TLR9 ligation in Paneth cells is associated with the production of Crp.

Intestinal epithelial cells were purified from normal mice that expressed TLR9 and from TLR9<sup>-/-</sup> mice and assayed for the production of Crp-3 and -5. Intestinal epithelial cells from TLR9<sup>-/-</sup> mice failed to mediate Crp mRNA expression in response to *T. gondii* infection whereas the IECs of WT mice demonstrated increased expression of both Crp-3 and -5 mRNA expression (Figure 1, Figure 5) through the 5<sup>th</sup> day post infection. This suggested that TLR9 was required for Crp mRNA modulation in response to *T. gondii* infection in mice.

The analysis of Paneth cell secretory apparatus one and five days after oral infection with *T. gondii*, using phloxine-tartrazine and CrS4c histological stainings, has shown that Paneth cells from TLR9<sup>-/-</sup> mice did not degranulate (Figure 2B, left panel and data not shown). The frequency of pyramidal shaped cells containing tartrazine-positive vesicles remained constant following infection (Figure 2B, left panel).

**mIFN $\beta$  induces upregulation of Crp expression and Paneth cell degranulation.**

Previous observations from our lab have shown that both Type 1 IFNs  $\alpha$  and  $\beta$  are increased in TLR9-expressing mouse intestinal epithelial cells {Minns, 2006} (Supplementary figure 1). Mice were treated with exogenous murine IFN $\beta$  (mIFN $\beta$ ) to determine whether Crp modulation required TLR9 ligation or was a downstream effect

due to type I IFNs production. WT mice were treated daily with mIFN $\beta$  (5000 units per day per mouse) starting the day prior to infection.

Crp mRNA expression by purified intestinal epithelial cells was measured at serial time points post infection (Figure 6). A significant increase in Crp-3 and -5 mRNA expression was observed following mIFN $\beta$  treatment of uninfected compared with untreated uninfected mice. During the early stage of infection (day 1-3) the Crp mRNA upregulation was identical whether mice were treated with mIFN $\beta$  or infected with *T. gondii*. At day 5, there was no substantial difference in Crp mRNA expression between treated or infected mice, suggesting that parasite driven type I IFNs production was sufficient for the Crp mRNA upregulation.

The phenotypical analysis of crypts by phloxine-tartrazine and CRS4c stainings showed that the treatment of C57BL/6 mice with exogenous mIFN $\beta$  alone led to a degranulation of Paneth cells as soon as 24 hours till 5 days after daily injections (figure 2A, right panel and data not shown). As we have previously observed in C57BL/6 mice orally infected with *T. gondii*, mice treated with mIFN $\beta$  maintained a constant frequency of pyramidal shaped cells (6-8 per crypts) (Figure 2A, right panel and data not shown), indicating that the upregulation of Crp mRNA measured by RT-PCR is associated with a higher secretory activity of Paneth cells rather than proliferation of this cell subset.

### **mIFN $\beta$ -mediated degranulation and Crp upregulation do not require TLR9 expression.**

To confirm the direct effect of type I IFNs upon Crp mRNA upregulation by epithelial cells independently of TLR9 engagement, TLR9 $^{-/-}$  mice were treated subcutaneously with high dose of mIFN $\beta$  (5000 units per day per mouse). Mice lacking TLR9 were unable to produce type I IFNs and were unable to modulate Crp mRNA expression in response to *T. gondii* infection (Supplementary figure 2 and Figure 6). Nevertheless, as measured by RT-PCR, TLR9 $^{-/-}$  mice treated with mIFN $\beta$  demonstrated a 18-fold increase in IFN $\alpha$ 1-2 and a 30-fold increase in IFN $\beta$  mRNA expression in the small intestine compared with untreated group. This was correlated with an upregulation in Crp-3 and Crp-5 expression by intestinal epithelial cells (Figure 7). At day 5 post-

treatment, despite a decrease in overall type I IFNs production, the level of IFN $\alpha$ 1-2 and IFN $\beta$  were maintained (Supplementary figure 2). Similarly to WT mice (figure 6), when type I IFNs expression were maintained at a high level of expression, TLR9 $^{-/-}$  mice kept producing Crp-3 and -5 mRNA as late as day 5 after the beginning of the treatment with mIFN $\beta$  (Figure 7). Furthermore, Paneth cells from TLR9 $^{-/-}$  mice treated daily with IFN $\beta$  released their secretory granules soon after treatment (day 1) and had a reduced frequency of tartrazine-positive vesicles at day 5 (figure 2B, right panel). Compared with TLR9 $^{-/-}$  mice which have only been infected with *T. gondii*, injection with type I IFN restore the ability of Paneth cells to degranulate without modifying their proliferation rate (Figure 2B, right panel). Taken together, these observations confirmed the ability of type I IFNs produced upon TLR9 signaling pathway activation to trigger Crp mRNA upregulation and Paneth cells degranulation.

## Discussion

*Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that is the primary cause of CNS inflammation in those with AIDS. In most circumstances the parasite gains entry to the host via oral infection from contaminated soil or meat products. From its entry in the small intestine, the parasite is disseminated throughout the host to all organs, in particular muscle and brain. The gut epithelial barrier is therefore a strategic place to prevent or at least to limit parasite invasion.

Besides being a physical barrier, the intestinal epithelium can participate to the innate immune defense against invasive pathogens. In the present study, we have observed that mouse alpha-defensins (Cryptdins), Crp-3 and Crp-5 are produced by intestinal epithelial cells and Paneth cells secrete granules in response to oral infection of B6 mice. The question to be addressed was whether the increase in Crps mRNA (confirmed at the protein level) is due to an over-stimulation of the Paneth cells by the parasite, or rather to a multiplication or differentiation of new Paneth cells. The oral infection of B6 mice with *T. gondii* cysts leads to a massive recruitment of neutrophils, macrophages, dendritic cells and lymphocytes in the *lamina propria* and to the production of pro inflammatory cytokines that can enhance Paneth cells differentiation {Liesenfeld, 1996}{Kamal, 2001}{Imai, 2007}. During the early phase of *T. gondii* infection (day 1-3) Mmp7 mRNA expression is maintained at a constant level and the frequency of Paneth cells (CRS4c positive cells or pyramidal shaped cells containing tartrazine-positive vesicles) is identical to what is observed in naïve mice. Taken together, these observations rule out the possible increase in Paneth cells differentiation or proliferation during the early phase of infection with *T. gondii*, and indicate that the increased production of Crp is linked to a rise in Paneth cell activity.

Following ingestion, *T. gondii* multiplies within and crosses the epithelial barrier and disseminates throughout the host {Courret, 2006}. Cryptdins can kill protozoa such as the Apicomplexan parasite *Giardia* by altering the membrane integrity {Aley, 1994}. In Mmp7<sup>-/-</sup> mice, the impaired production of mature Cryptdins is associated with a rise in

parasite load measured shortly after infection (day 3) as compared to WT mice. This might suggest that part of the anti-microbial activity of Cryptdins observed in our model against *T. gondii* occurs in the lumen prior invasion into the epithelial barrier. However up-regulation of Crp-3 and -5 production by the epithelial cells begins 24 hours after infection, when most parasites have already invaded the epithelial cells and cannot be affected by the release of Cryptdins into the lumen. Taken together, these observations indicate that the early antimicrobial effect of Cryptdins might be indirect and is associated with a cascade of events occurring after *T. gondii* penetration into epithelial cells.

In addition to their microbicidal activity, human alpha-defensins (“Human Neutrophil Peptides” or HNPs) also display signaling functions. For example HNP-3 promotes chloride efflux *in vitro* {Merlin, 2001} {Yue, 2002} and can also induce the secretion of NFκB-dependent chemokines such as CXCL8 or CCL2 {Lin, 2004} from T84 human epithelial cells cultured *in vitro*. Chemokines play a major role in *in vivo* initiation of a protective Th1 immune response to clear *T. gondii* {Denney, 1999} {Brenier-Pinchart, 2000}. In infected Mmp7<sup>-/-</sup> mice, the early production (Day 1 and 3) of NFκB-dependent chemokines such as CCL2, CCL3 and CCL5 by the intestinal epithelial cells is slightly lower than in WT mice (Supplementary figure 3). This might have for consequence a defect in attraction of scavenger immune cells and explain the increase in parasite load within the gut of Mmp7<sup>-/-</sup> mice. In orally infected B6 mice, Crp may help to orchestrate the immune response against *T. gondii* during the early phase of infection by combining microbicidal activity and immune cell recruitment.

When infected with *T. gondii*, B6 mice develop within 7 to 10 days a lethal ileitis. Histological examinations of the small intestine show a massive leukocyte infiltration in the *lamina propria* as well as a disruption of the epithelial cells. The development of the lethal ileitis is mostly associated to an overwhelming Th1 immune response {Khan, 1997}. At physiological concentration, mouse Crp specifically target electronegative phospholipid bilayers preventing the interaction between Crp and mammalian cells {Satchell, 2003}. However, Crp-2 and -3 are also capable of inducing Cl<sup>-</sup> secretory

response in human intestinal T84 cells *in vitro*, which indicate that Crp can interfere with epithelial barrier function {Lencer, 1997}. *T. gondii* infected Mmp7<sup>-/-</sup> mice die of a lethal ileitis with the same kinetics as WT mice despite a reduced Th1 immune response in the lamina propria associated to the epithelial barrier early after infection. This suggests that a direct cytotoxic effect of active Crp on epithelial cells cannot account by itself for the epithelial damages observed after infection. The decreased Th1 immune response associated to the epithelial barrier is not sufficient to postpone the death of the infected Mmp7<sup>-/-</sup> mice but impairs parasite clearance during the early phase of infection.

Alpha-defensins require proteolytic processing and are signal-induced released to be active in the intestinal lumen. Lipopolysaccharide (LPS) lipoteicoic acid (LTA), lipid A, muramyl dipeptide and CpG-ODNs elicit Cryptdin secretion suggesting a preponderant role of innate immune receptors such as TLRs and NODs in the regulation of Crp release {Ayabe, 2000} {Kobayashi, 2005}. TLRs are widely expressed in mouse small intestine either at the epithelium by enterocytes and Paneth cells, or in the lamina propria (dendritic cells, macrophages, B cells) {Jarrossay, 2001} {Mellman, 2001} {Ito, 2002} {Zarembek, 2002}. We have previously shown that TLR9 from both compartments, non-hematopoietic and hematopoietic, is a key sensor of *T. gondii* infection in mice and is required for an efficient antimicrobial Th1 immune response induction {Minns, 2006}. The heterogeneous distribution of Paneth cells in the small intestine, this cell subset expresses TLR9 at a higher level than enterocytes. Treatment of B6 mice with CpG-ODNs (TLR9 agonist), initiates the release of antimicrobial peptides in the lumen by Paneth cells {Rumio, 2004}. In TLR9<sup>-/-</sup> mice orally infected with *T. gondii*, Crp-3 and -5 mRNA production and Paneth cells degranulation are impaired, suggesting a link between TLR9 activation and Cryptdin production. Type I IFNs  $\alpha$  and  $\beta$  are produced upon TLR9 signaling pathway activation {Kawai, 2004} {Honda, 2005} and trigger Paneth cell degranulation when injected intraperitoneally in rats {Ozcan, 1996}. Type I IFNs also display an antimicrobial activity against *T. gondii* inhibiting the intracellular replication of the parasite {Schmitz, 1989}. In TLR9<sup>-/-</sup> mice, the production of Type I IFN is impaired. Treatment of TLR9<sup>-/-</sup> mice with recombinant Type I IFN restored the production of Cryptdins and Paneth cells degranulation as well as in WT. Taken together

these experiments suggest that *T. gondii* parasites themselves or some other molecule associated with the infection triggers TLR9. TLR9 binding results in type I IFNs production. One of the consequences of Type I IFNs production is the release of Cryptdins by the Paneth cells. These immunological mechanisms aim at limiting parasite invasiveness either directly or indirectly by activation of an early TH1 immune response.

## References.

1. Aley, S. B., M. Zimmerman, M. Hetsko, M. E. Selsted, and F. D. Gillin. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* 62:5397-5403.
2. Ayabe, T., D. P. Satchell, C. L. Wilson, W. C. Parks, M. E. Selsted, and A. J. Ouellette. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1:113-118.
3. Belay, T., F. O. Eko, G. A. Ananaba, S. Bowers, T. Moore, D. Lyn, and J. U. Igietseme. 2002. Chemokine and chemokine receptor dynamics during genital chlamydial infection. *Infect Immun* 70:844-850.
4. Brenier-Pinchart, M. P., H. Pelloux, J. Simon, J. Ricard, J. L. Bosson, and P. Ambroise-Thomas. 2000. *Toxoplasma gondii* induces the secretion of monocyte chemotactic protein-1 in human fibroblasts, in vitro. *Mol Cell Biochem* 209:79-87.
5. Brennan, P. C., J. S. McCullough, and K. E. Carr. 1999. Variations in cell and structure populations along the length of murine small intestine. *Cells Tissues Organs* 164:221-226.
6. Burg, J. L., D. Perelman, L. H. Kasper, P. L. Ware, and J. C. Boothroyd. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 141:3584-3591.
7. Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, and I. Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107:309-316.
8. Decker, T., M. Muller, and S. Stockinger. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5:675-687.
9. Denney, C. F., L. Eckmann, and S. L. Reed. 1999. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 67:1547-1552.
10. Dubey, J. P. 2000. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Until rates of congenital toxoplasmosis fall, control measures are essential. *Bmj* 321:127-128.
11. Ganz, T. 2000. Paneth cells--guardians of the gut cell hatchery. *Nat Immunol* 1:99-100.
12. Gilbert, R. E., D. T. Dunn, S. Lightman, P. I. Murray, C. E. Pavesio, P. D. Gormley, J. Masters, S. P. Parker, and M. R. Stanford. 1999. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 123:283-289.
13. Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777.
14. Huttner, K. M., and A. J. Ouellette. 1994. A family of defensin-like genes codes for diverse cysteine-rich peptides in mouse Paneth cells. *Genomics* 24:99-109.
15. Imai, T., K. Fukuta, M. Hasumura, Y. M. Cho, Y. Ota, S. Takami, H. Nakagama, and M. Hirose. 2007. Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and beta-catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 28:2199-2206.
16. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell



- subsets. *J Exp Med* 195:1507-1512.
17. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31:3388-3393.
  18. Kamal, M., D. Wakelin, A. J. Ouellette, A. Smith, D. K. Podolsky, and Y. R. Mahida. 2001. Mucosal T cells regulate Paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of *T. spiralis*-infected mice. *Clin Exp Immunol* 126:117-125.
  19. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068.
  20. Khan, I. A., J. D. Schwartzman, T. Matsuura, and L. H. Kasper. 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13955-13960.
  21. Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R. A. Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734.
  22. Lencer, W. I., G. Cheung, G. R. Strohmeier, M. G. Currie, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, and J. L. Madara. 1997. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptdins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8585-8589.
  23. Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184:597-607.
  24. Lin, P. W., P. O. Simon, Jr., A. T. Gewirtz, A. S. Neish, A. J. Ouellette, J. L. Madara, and W. I. Lencer. 2004. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 279:19902-19907.
  25. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
  26. Merlin, D., G. Yue, W. I. Lencer, M. E. Selsted, and J. L. Madara. 2001. Cryptdin-3 induces novel apical conductance(s) in Cl<sup>-</sup> secretory, including cystic fibrosis, epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C296-302.
  27. Minns, L. A., L. C. Menard, D. M. Foureau, S. Darche, C. Ronet, D. W. Mielcarz, D. Buzoni-Gatel, and L. H. Kasper. 2006. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 176:7589-7597.
  28. Muller, C. A., I. B. Autenrieth, and A. Peschel. 2005. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 62:1297-1307.
  29. Ouellette, A. J. 2006. Paneth cell alpha-defensin synthesis and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:1-25.
  30. Ouellette, A. J., M. M. Hsieh, M. T. Nosek, D. F. Cano-Gauci, K. M. Huttner, R. N. Buick, and M. E. Selsted. 1994. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun* 62:5040-5047.
  31. Ouellette, A. J., and J. C. Lualdi. 1990. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin. *J Biol Chem* 265:9831-9837.

32. Ouellette, A. J., and M. E. Selsted. 1996. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J* 10:1280-1289.
33. Overbergh, L., D. Valckx, M. Waer, and C. Mathieu. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11:305-312.
34. Ozcan, O., M. K. Irmak, H. Dalcik, E. Karaoz, A. Kubar, and H. Koylu. 1996. Ultrastructural changes in rat Paneth and goblet cells after the administration of interferon-alpha. *Acta Physiol Hung* 84:81-88.
35. Petersen, E. 2007. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 12:214-223.
36. Porter, E. M., C. L. Bevins, D. Ghosh, and T. Ganz. 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 59:156-170.
37. Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.
38. Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, S. Menard, and A. Balsari. 2004. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 165:373-381.
39. Salzman, N. H., M. A. Underwood, and C. L. Bevins. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19:70-83.
40. Satchell, D. P., T. Sheynis, Y. Shirafuji, S. Kolusheva, A. J. Ouellette, and R. Jelinek. 2003. Interactions of mouse Paneth cell alpha-defensins and alpha-defensin precursors with membranes. Prosegment inhibition of peptide association with biomimetic membranes. *J Biol Chem* 278:13838-13846.
41. Schiavoni, G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S. M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli, and E. Proietti. 2000. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood* 95:2024-2030.
42. Schmitz, J. L., J. M. Carlin, E. C. Borden, and G. I. Byrne. 1989. Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 57:3254-3256.
43. Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55-70.
44. Sheehan, D. C. and Hrapchak, B. B. 1980. Theory and practice of histotechnology, 2<sup>nd</sup> Edition. Battelle Press, Columbus.
45. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 176:47-58.
46. Wehkamp, J., G. Wang, I. Kubler, S. Nuding, A. Gregorieff, A. Schnabel, R. J. Kays, K. Fellermann, O. Burk, M. Schwab, H. Clevers, C. L. Bevins, and E. F. Stange. 2007. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 179:3109-3118.
47. Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense.

- Science* 286:113-117.
48. Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113-117.
  49. Yue, G., D. Merlin, M. E. Selsted, W. I. Lencer, J. L. Madara, and D. C. Eaton. 2002. Cryptdin 3 forms anion selective channels in cytoplasmic membranes of human embryonic kidney cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G757-765.
  50. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.

## Legends.

### **Table 1: primer sequences for mRNAs measured by SYBR green RT-PCR.**

The primer sequences are listed from 5' to 3'. References are given when needed. Crp and Mmp7 primers were designed using Primer 3 software {Rozen, 2000}.

### **Figure 1: Crp expression were upregulated and Paneth cells released secretory granules in WT mice infected with *T.gondii*.**

WT (C67BL/6) mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii*. (A) Within 6 hours to 5 days later, Intestinal Epithelial Cells (IECs) from the small intestine were purified. RT-PCRs were performed to measure Crp-2, -3, -4 and -5 mRNA expressions. (B) For each time point 3 pieces representative of the small intestine (jejunum, duodenum and ileum) were also processed to measure Mmp7 mRNA expression. Five mice were used and analyzed separately for each time point. The data were representative of 5 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with naïve (D0) mice.

### **Figure 2: Paneth cells from TLR9-/- mice lost their ability to release their secretory granules in response to *T. gondii* infection but still degranulated upon IFN $\beta$ treatment.**

C57BL/6 (A) or TLR9-/- (B) mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii* (left panel) or treated daily with 5000 unit of mIFN $\beta$  injected subcutaneously (right panel). One, three and five days after infection (or the beginning of mIFN $\beta$  treatment), small intestines were removed to perform phloxine-tartrazine histochemical staining. Individual crypts (10-15 crypts total per mouse) were analyzed to measure the number of pyramidal shaped cells containing tartrazine-positive granules (orange and pink vesicles) as well as the location and the frequency of these vesicles. The data were representative of 3 distinct experiments using 3 mice per group and time point.

**Figure 3: Mmp7<sup>-/-</sup> mice exhibited a reduced ability to control *T. gondii* replication in the small intestine.**

(A) WT and Mmp7<sup>-/-</sup> mice were orally infected with 35 cysts, sacrificed at day 3 and 7 after infection. Three representative pieces were sampled from the small intestine and the mesenteric lymph nodes. Parasite burden was measured by quantitative PCR. Five mice were used for each group and time point. The data are representative of 3 distinct experiments (B) Cysts were enumerated in the brain of Mmp7<sup>-/-</sup> and WT mice at day 30 post infection. Six and 5 mice respectively were used for each group, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with WT mice.

**Figure 4: Depressed early TH1 response to *T. gondii* infection in Mmp7<sup>-/-</sup> mice.**

IFN $\gamma$  mRNA expression in isolated lymphocytes from the *lamina propria* and mesenteric lymph nodes of Mmp7<sup>-/-</sup> and WT mice was measured by RT-PCR at day 3 and 7 post infection. Five mice were used for each group and time point. Data were representative of 4 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with WT mice.

**Figure 5: TLR9<sup>-/-</sup> mice were unable to modulate Crp mRNA expression in response to *T. gondii* infection.**

TLR9<sup>-/-</sup> and WT mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii*. At day 1, 3 and 5 after infection, intestinal epithelial cells were purified from the small intestine. RT-PCRs were performed to measure Crp-3 and Crp-5 mRNA expression. Five mice were used for each group and time point and analyzed separately. The data are representative of 2 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with WT mice.

**Figure 6: IFN $\beta$  treatment led to an upregulation of Crp mRNA expression in the small intestine of WT mice.**

WT mice were treated subcutaneously with 5000 Units of mIFN $\beta$  everyday (grey bars). Twenty-four hours after the first mIFN $\beta$  injection, mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii* (black bars). At day 1, 3 and 5 after infection, intestinal epithelial cells were purified from the small intestine. mRNA was extracted to measure Crp-3 and 5 expression by RT-PCR. Three mice were used for each group (Naïve Treated, Infected

Untreated, Infected Treated) and time point (Day 0, 1, 3 and 5). Mice were processed and analyzed separately. Data were representative of 2 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with naïve (D0) mice.

**Figure 7: IFN $\beta$  treatment led to an upregulation of Crp mRNA expression in the small intestine of TLR9 $^{-/-}$  mice.**

TLR9 $^{-/-}$  mice were subcutaneously treated with 5000 Units of mIFN $\beta$  everyday (grey bars). Twenty-four hours after the first mIFN $\beta$  injection, mice were orally infected (black bars). At day 1, 3 and 5 after infection, intestinal epithelial cells were purified from the small intestine. mRNA was extracted to measure Crp-3 and -5 expression by RT-PCR. Three mice were used for each groups (Naïve Treated, Infected Untreated, Infected Treated) and time points (Day 0, 1, 3 and 5). Mice were processed and analyzed separately. Data were representative of 2 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with D0 mice.

**Supplementary figure 1: WT mice upregulated type I IFNs production in the small intestine in response to *T. gondii* infection or mIFN $\beta$  treatment.**

WT mice were subcutaneously treated with 5000 Units of mIFN $\beta$  everyday (grey bars). Twenty-four hours after the first mIFN $\beta$  injection, mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii* (black bars). At day 1, 3 and 5 after infection, lamina propria cells were purified from the small intestine. mRNA was extracted to measure IFN $\alpha$ 1-2 and IFN $\beta$  expression by RT-PCR. Three mice were used for each group (Naïve Treated, Infected Untreated, Infected Treated) and time point (Day 0, 1, 3 and 5). Mice were processed and analyzed separately. Data were representative of 3 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with D0 mice.

**Supplementary figure 2: TLR9 $^{-/-}$  mice failed to modulate type I IFNs mRNA expression in response to *T. gondii* infection but upregulate IFN $\alpha$ 1-2 and IFN $\beta$  mRNA expression when treated with mIFN $\beta$ .**

TLR9 $^{-/-}$  mice were subcutaneously treated with 5000 Units of mIFN $\beta$  daily (grey bars). Twenty-four hours after the first mIFN $\beta$  injection, mice were orally infected (black bars).

At day 1, 3 and 5 after infection, lamina propria cells were purified from the small intestine. mRNA was extracted to measure IFN $\alpha$ 1-2 and IFN $\beta$  expression by RT-PCR. Three mice were used for each groups (Naïve Treated, Infected Untreated, Infected Treated) and time points (Day 0, 1, 3 and 5). Mice were processed and analyzed separately. Data were representative of 2 distinct experiments, p values <0.005 (\*) or <0.001(\*\*) compared with naïve (D0) mice.

**Supplementary figure 3: Mmp7<sup>-/-</sup> mice displayed a slight decrease in CCL2, CCL3 and CCL5 mRNA expression in response to *T. gondii* infection compared with WT mice at day 1 post infection.**

Mmp7<sup>-/-</sup> and WT mice were orally infected with 35 cysts of *T. gondii*. At day 1 and 3 after infection, intestinal epithelial cells were purified from the small intestine. RT-PCRs were performed to measure CCL2, CCL3 and CCL5 mRNA expression. Three mice were used for each group and time point and analyzed separately. Data were representative of 3 distinct experiments.

## Figures and Tables.

**Table 1**

|                | Forward Primer           | Reverse Primer           |                   |
|----------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>β-actin</b> | AGAGGGAAATCGTGCGTGAC     | CAATAGTGATGACCTGGCCGT    | {Overbergh, 1999} |
| <b>Crp-2</b>   | ACTGAGGAGCAGTCAGGTGAA    | GCCAATGGTCATCTTGTCCT     |                   |
| <b>Crp-3</b>   | CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG   | TCAGCGACAGCAGAGTGTGTA    |                   |
| <b>Crp-4</b>   | CAGGTCCAGGCTGATCCTATC    | AAGTCCCACGAACCTCGTTCTC   |                   |
| <b>Crp-5</b>   | TTGTCCTCCTCTCTGCCCTTGT   | ATGAAGAGCAGACCCTTCTTGG   |                   |
| <b>IFNα1-2</b> | TGTCTGATGCAGCAGGTGG      | AAGACAGGGCTCTCCAGAC      | {Schiavoni, 2000} |
| <b>IFNβ</b>    | CCATCCAAGAGATGCTCCAG     | GTGGAGAGCAGTTGAGGACA     | {Schiavoni, 2000} |
| <b>IFNγ</b>    | TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA | TGGCTCTGCAGGATTTTCATG    | {Overbergh, 1999} |
| <b>Mmp7</b>    | ATGAGGACGCAGGAGTGAAC     | ACAGGTGCAGCTCAGGAAGG     |                   |
| <b>CCL2</b>    | CTTCTGGGCCTGCTGTTCA      | CCAGCCTACTCATTGGCATCA    | {Overbergh, 1999} |
| <b>CCL3</b>    | CTTCTCAGCGCCATATGGAGC    | GATCTGCCGGTTTCTCTTAGTCA  | {Belay, 2002}     |
| <b>CCL5</b>    | CACCTGCCTCACCATATGGCTC   | CACTTCTTCTCTGGGTTGGCACAC | {Belay, 2002}     |



Figure 1

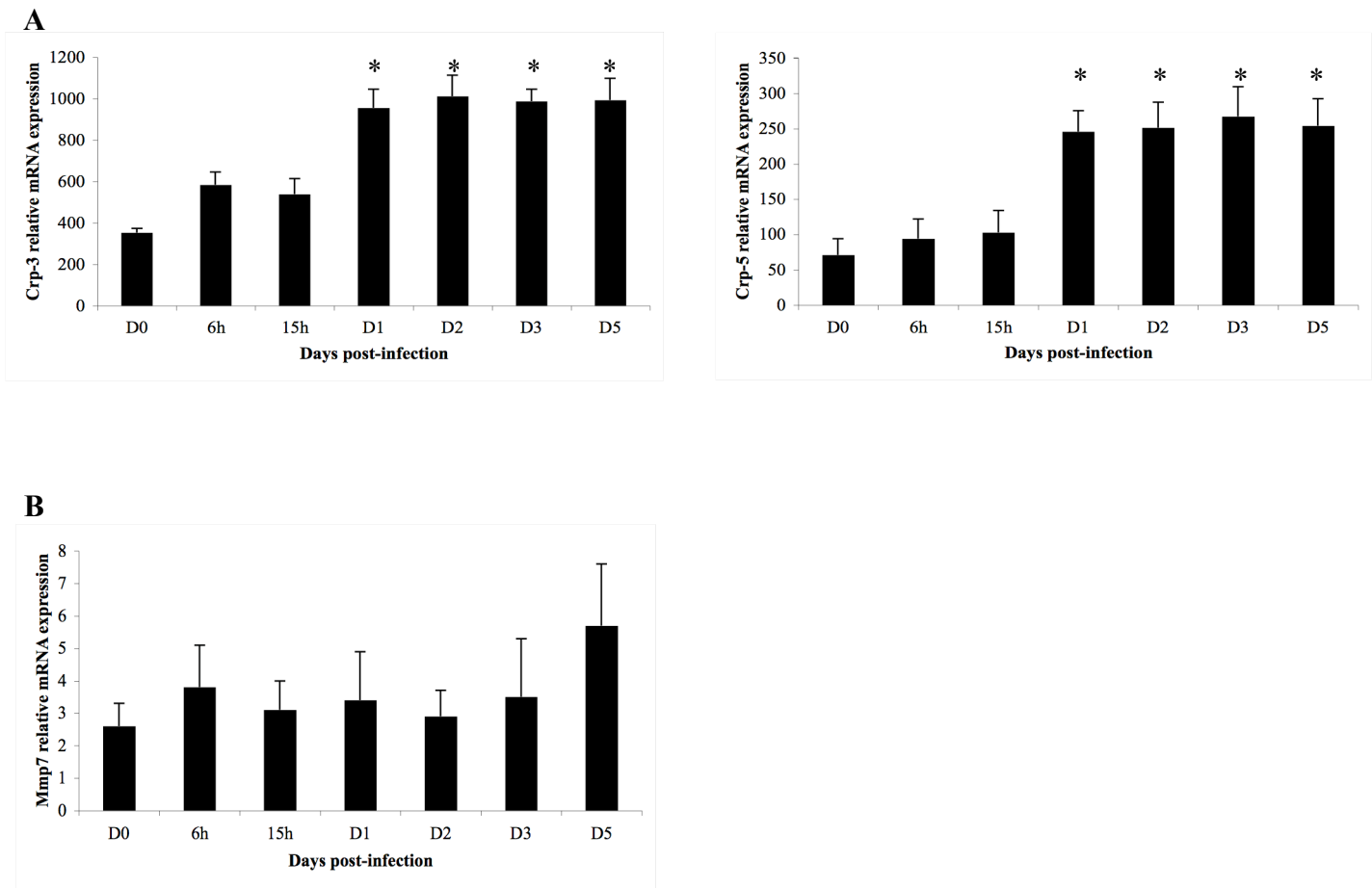


Figure 2

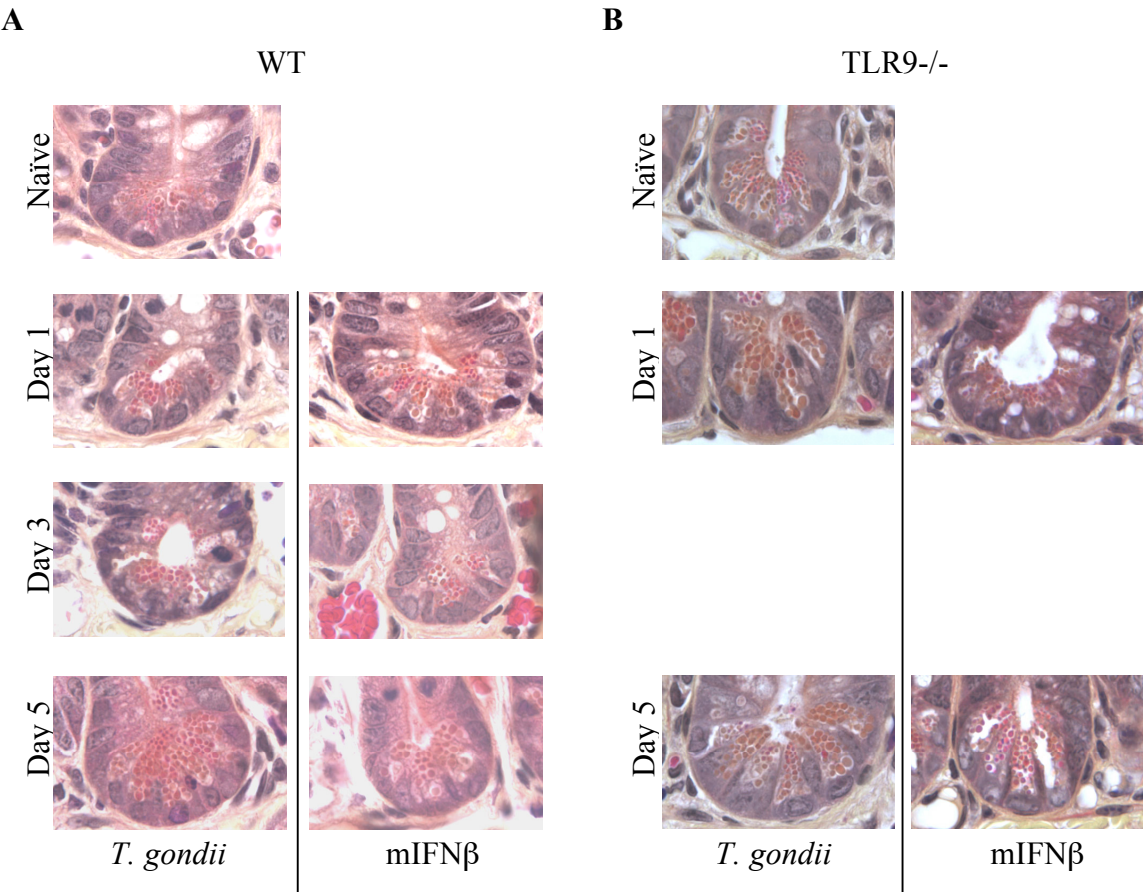


Figure 3

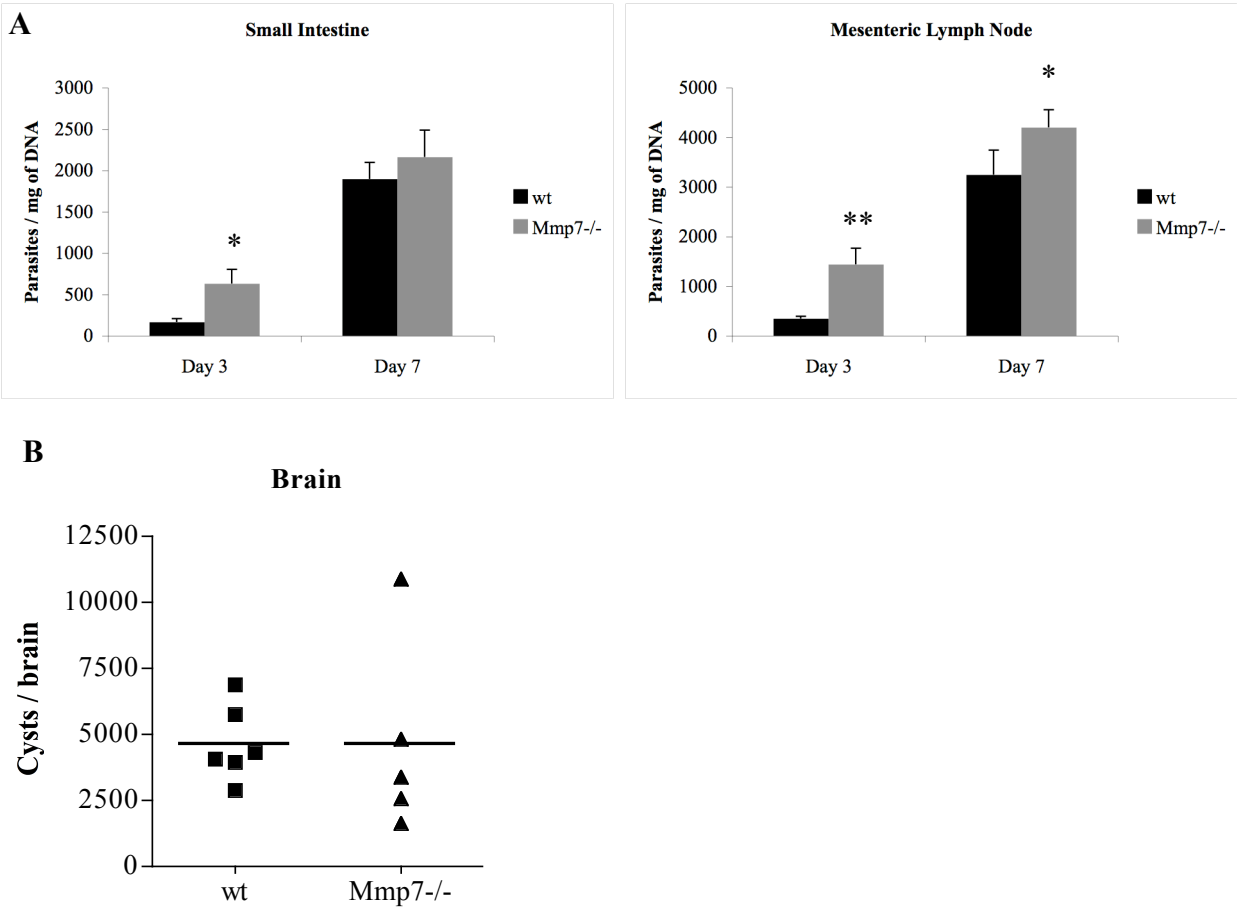


Figure 4

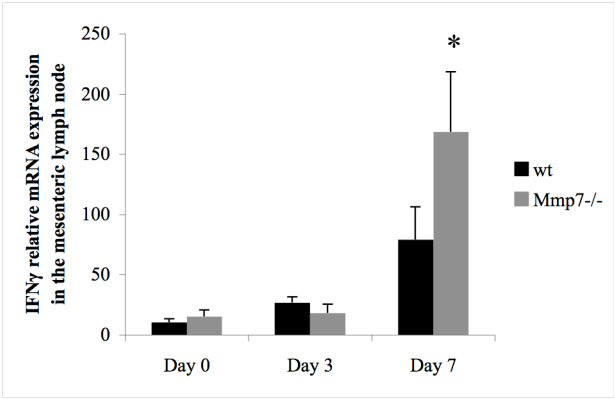
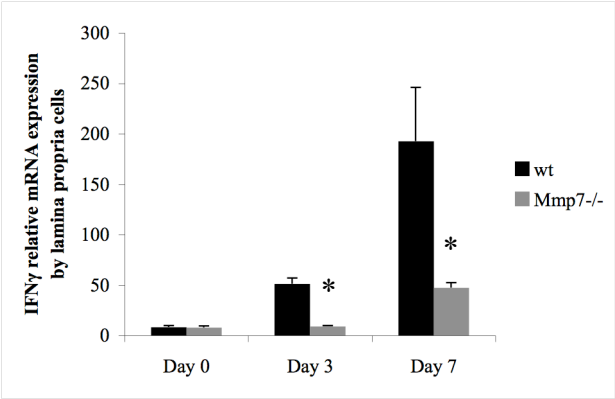


Figure 5

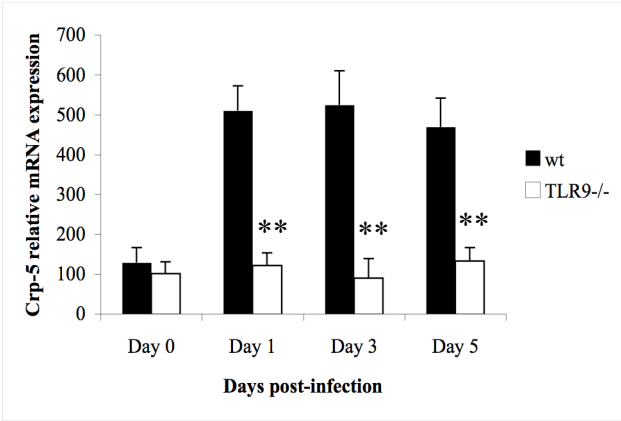
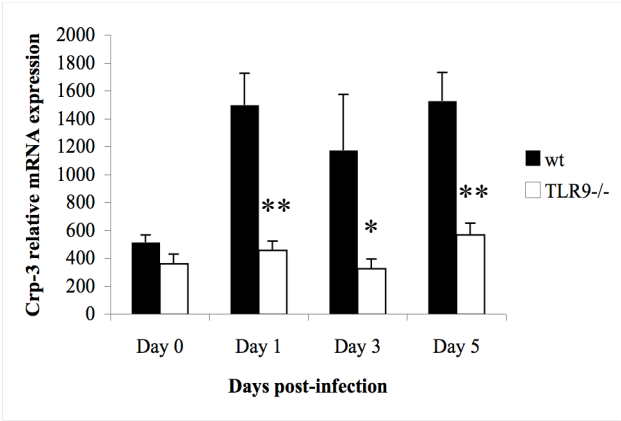
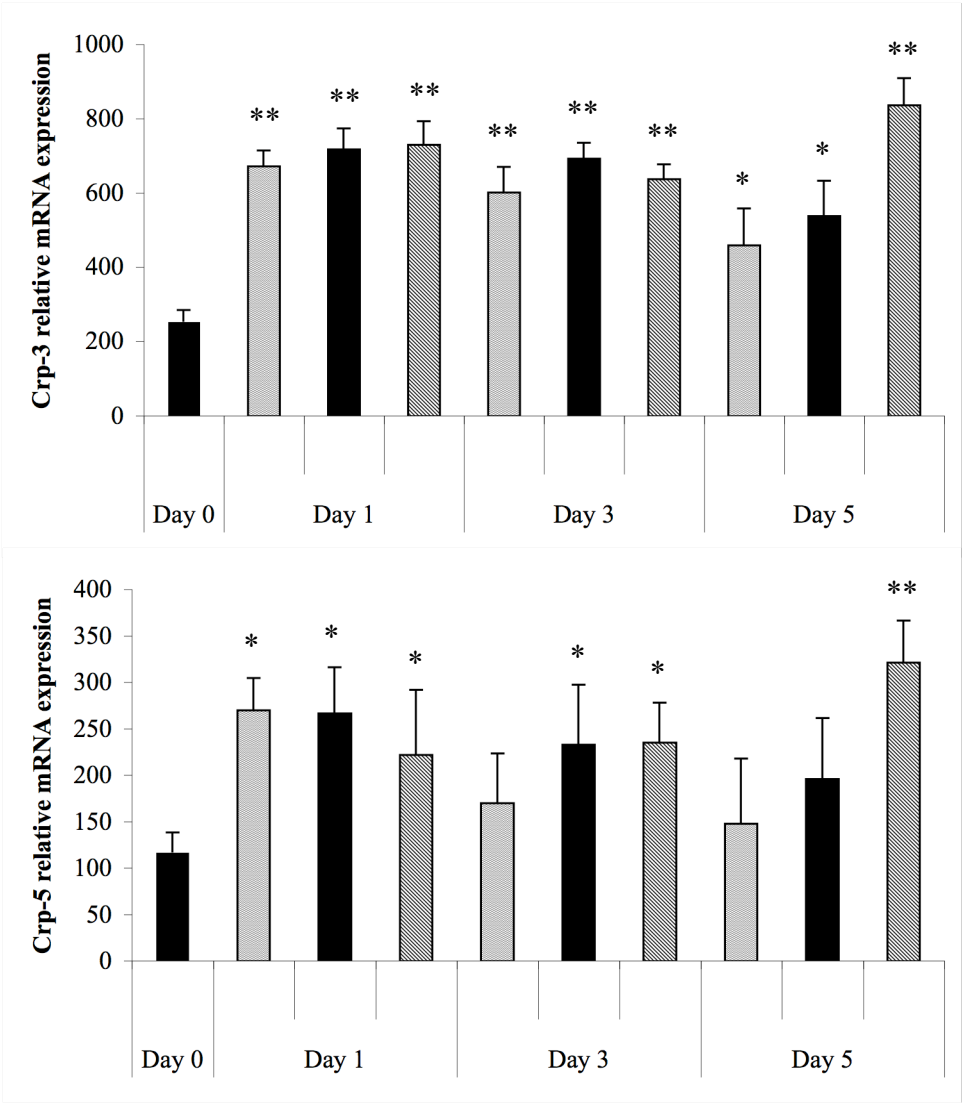
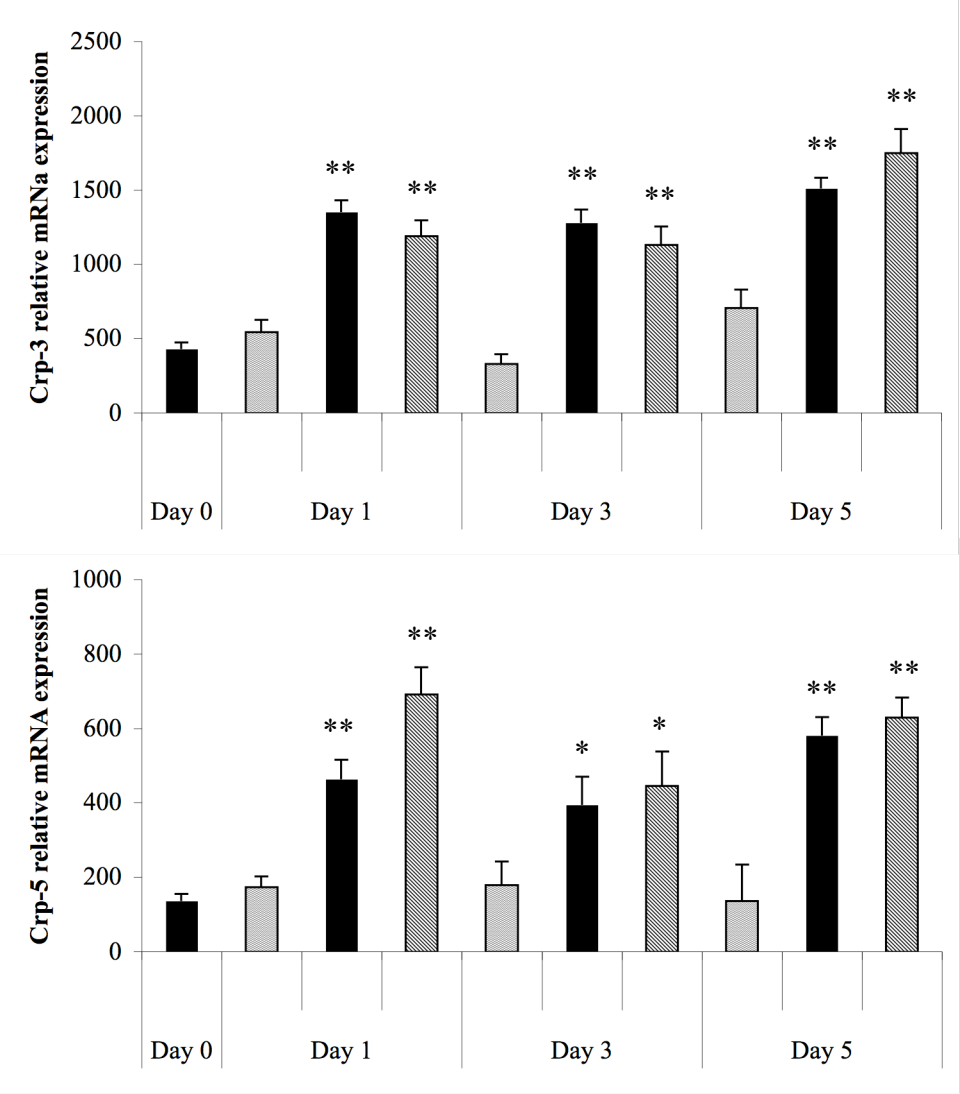


Figure 6



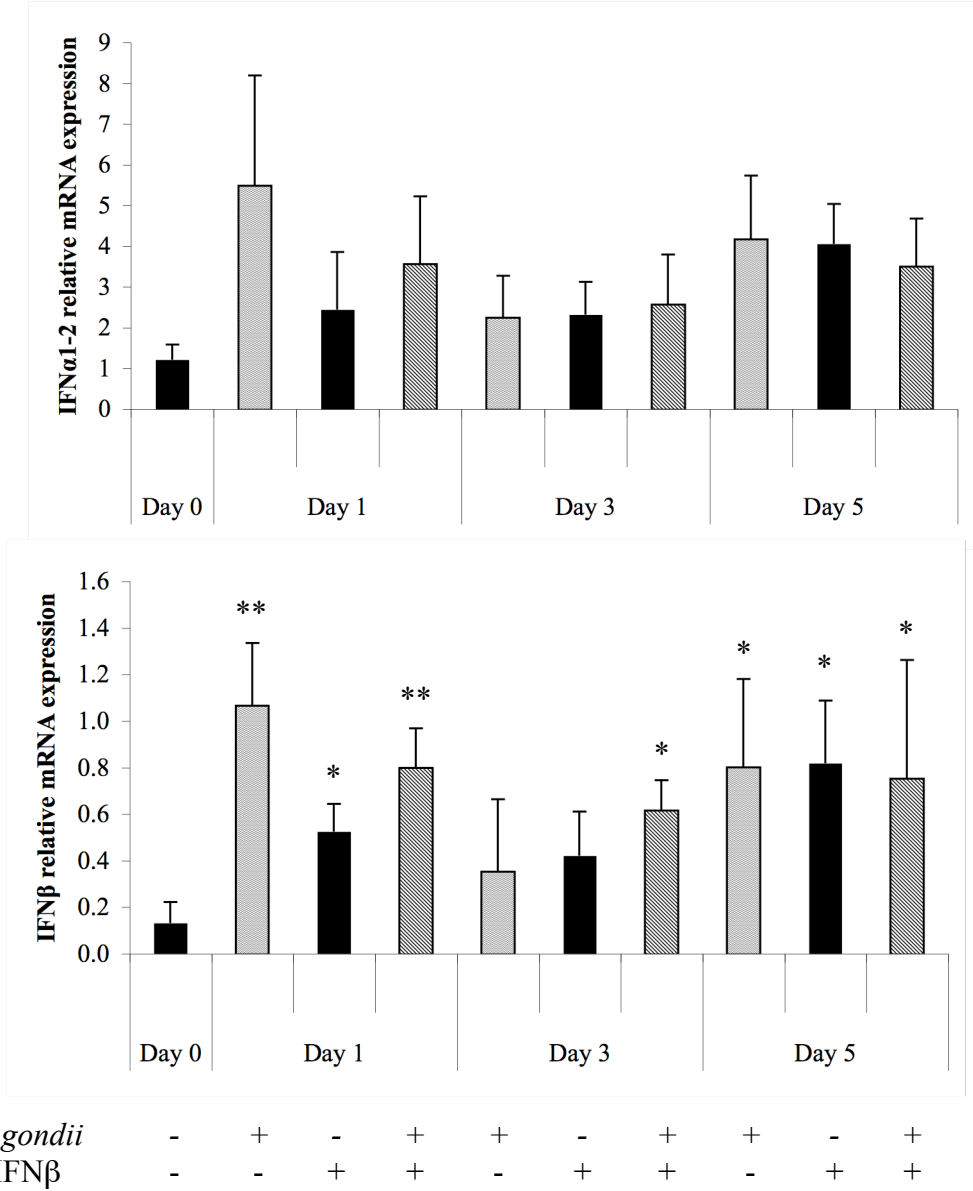
|                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>T. gondii</i> | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| mIFN $\beta$     | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |

Figure 7



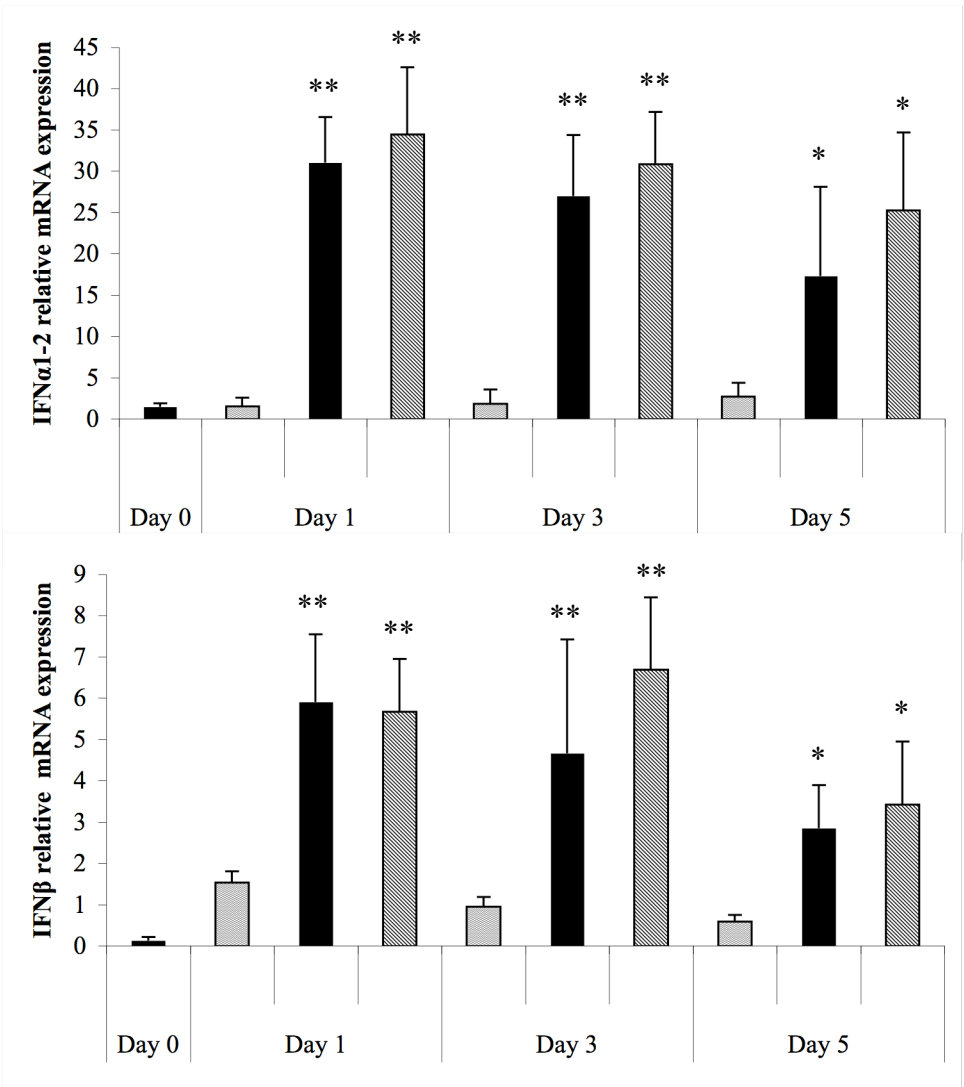
|                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>T. gondii</i> | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| mIFN $\beta$     | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |

Supplementary figure 1



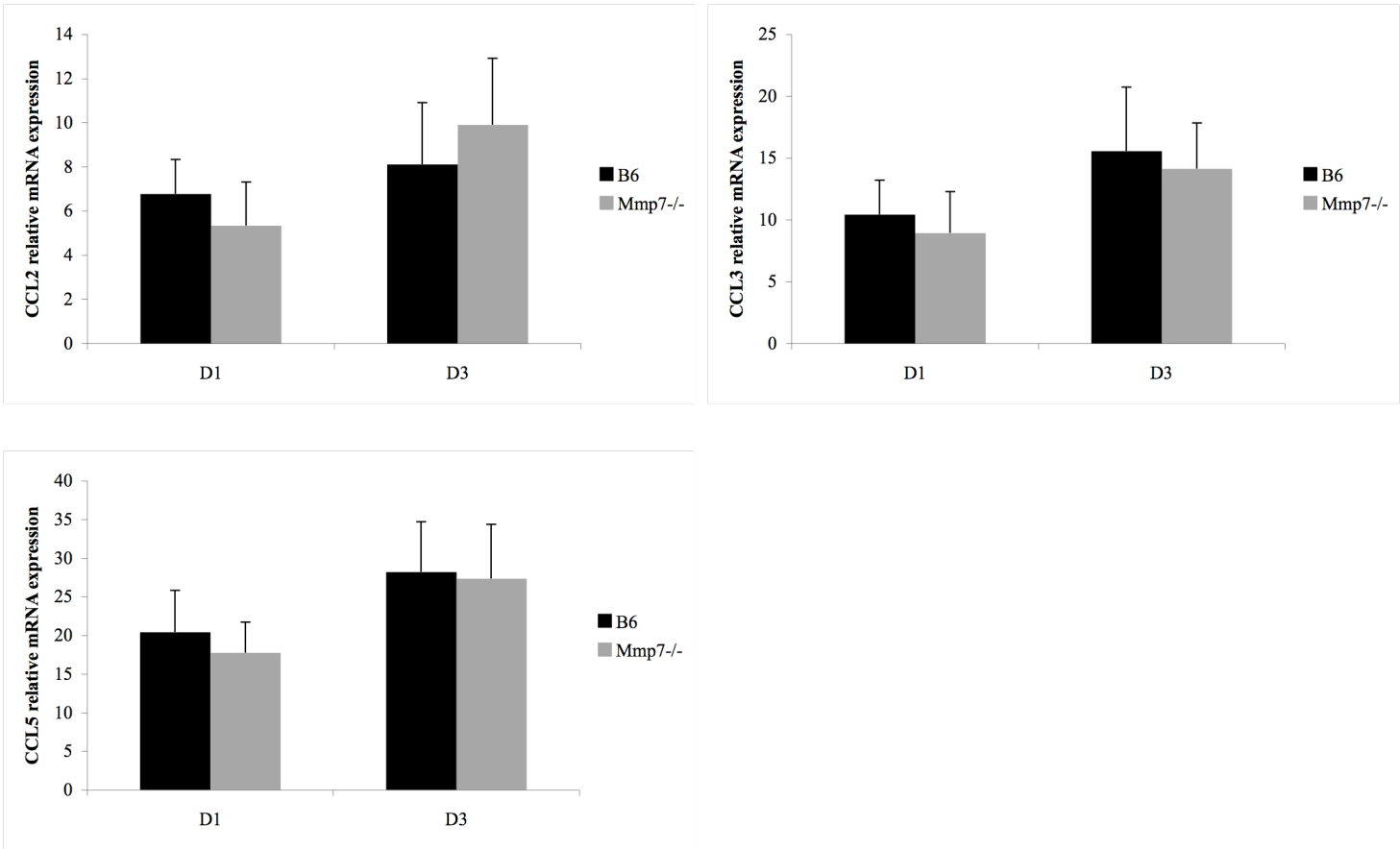


Supplementary figure 2



|                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>T. gondii</i> | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| mIFNβ            | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |

Supplementary figure 3



### 3. Article 3 : les cellules B amplifient la réponse pro inflammatoire des cellules T en réponse à l'infection par *Toxoplasma gondii*

Les lymphocytes B constituent un compartiment cellulaire hétérogène chez l'homme et la souris. Les cellules B-1 résident majoritairement dans les cavités pleurales et péritonéales, tandis que les cellules B-2 se localisent principalement dans les follicules B et les zones marginales des organes lymphoïdes secondaires. Outre leur localisation, les sous populations de cellules B se distinguent par leurs spécificités antigéniques. Ainsi, les cellules B-1 et les cellules B-2 des zones marginales sont activées par des antigènes thymo-indépendants contribuant ainsi à l'immunité contre des pathogènes par la production d'immunoglobulines (Ig) de faible affinité. Les lymphocytes B-2 des follicules B sont activés par des antigènes thymo-dépendants. Ils concourent à la formation des centres germinatifs et se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoires sécrétant des immunoglobulines de forte affinité. L'ensemble des sous populations de cellules B expriment le TLR9, cependant seuls les cellules B-1 et B-2 des zones marginales sont capables d'être activées par des agonistes CpG-ODNs en l'absence de signaux de co-stimulation.

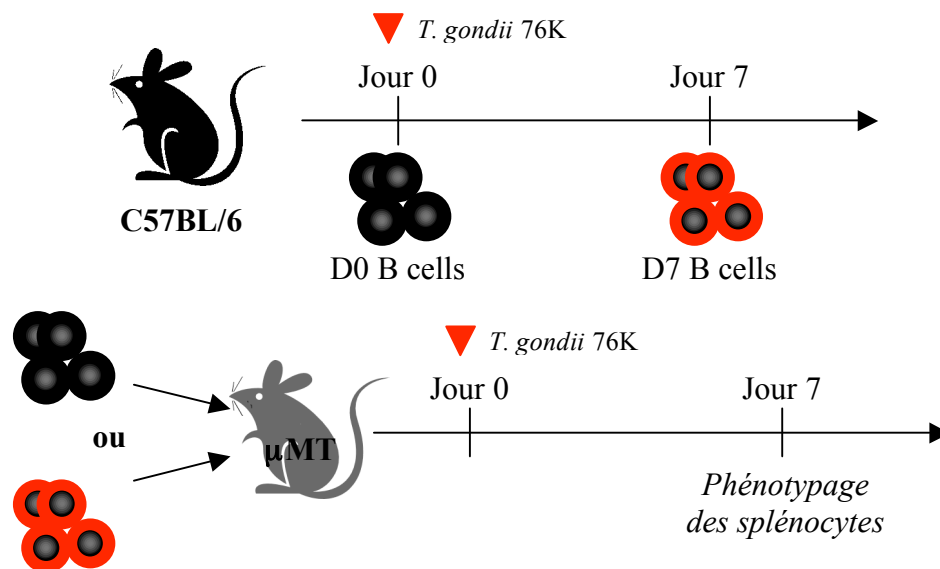
Étant donné l'importance du TLR9 dans l'initiation de la réponse immune à *T. gondii* et la forte expression de ce récepteur de l'immunité innée par les cellules B immatures, nous avons d'abord étudié le rôle du TLR9 exprimé par les cellules B dans l'initiation de la réponse inflammatoire au toxoplasme. Nous avons observé que lors de l'infection de souris par *T. gondii*, les cellules B de la *lamina propria*, des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques ne modulent pas l'expression de TLR9 et ne produisent pas ou peu d'IFNs de type I. De plus, des souris doubles-chimères n'exprimant que des cellules B TLR9-/- initient parfaitement la réponse inflammatoire à *T. gondii*.

Cependant, des études ont montré que les lymphocytes B-1 matures participent à la réponse immunitaire contre *T. gondii*. Les souris  $\mu$ MT (déficientes en cellules B) ayant reçu ou non des cellules B-1 immatures ont un défaut de production de cytokines Th1 et de NO en réponse à l'infection intra-péritonéale par le parasite. Lorsque des cellules B-1

matures (provenant de souris C57BL/6 infectées) sont transférées dans les souris  $\mu$ MT, celles-ci développent une réponse inflammatoire protectrice contre l'infection {Sakaguchi, 2001}. Cependant, ces études ont été réalisées dans un contexte ne prenant pas en compte la voie d'entrée naturelle par le parasite. Nous avons analysé le rôle des cellules B dans la génération de la réponse adaptative inflammatoire après infection orale par le toxoplasme.

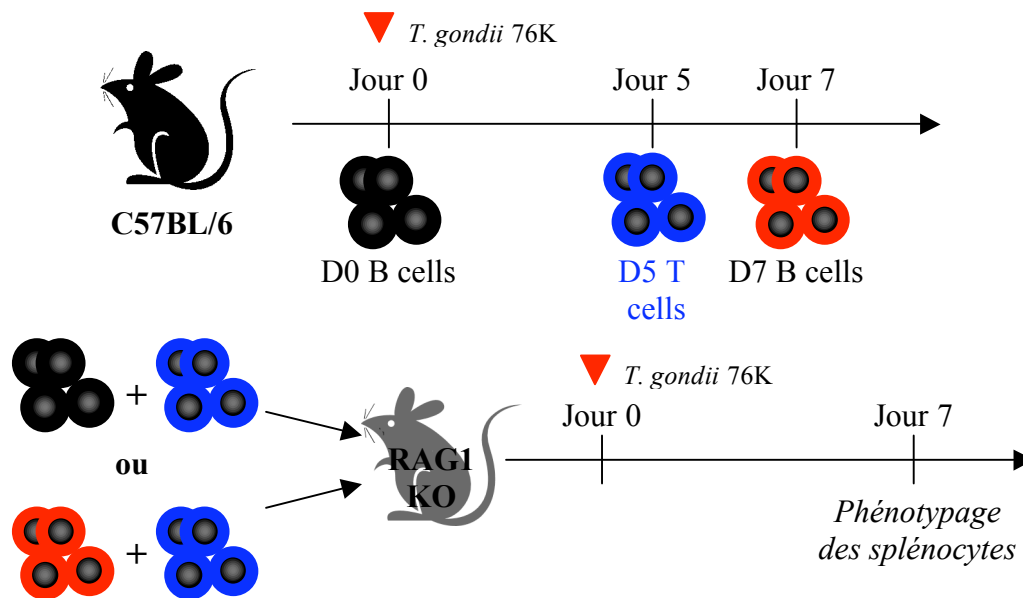
### 3.1. Les cellules B matures, générées dans la rate et les ganglions mésentériques lors de l'infection par *Toxoplasma gondii*, activent la production d'IFN- $\gamma$ par les cellules T effectrices

Afin d'étudier la fonction des cellules B dans la réponse immunitaire au toxoplasme, nous avons comparé la production de cytokines pro-inflammatoires chez les souris C57BL/6 ou  $\mu$ MT infectées par *T. gondii*. Nous avons ainsi observé que la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> de la rate des souris  $\mu$ MT 7 jours après infection (**article 3 ; figure 1**) est nettement diminuée par rapport aux souris témoins WT (B6). Pour étudier plus avant l'activité inflammatoire des cellules B (CD19<sup>+</sup>), nous les avons purifiées des ganglions mésentériques et de la rate et les avons réinjectées dans des souris  $\mu$ MT. Les cellules B transférées proviennent soit de souris naïves (D0B – Day 0 B cells), soit de souris infectées oralement par *T. gondii* depuis 7 jours (D7B – Day 7 B cells) (**article 3 ; figure 2**) (**article 3 / données supplémentaires ; figure A**). Les souris  $\mu$ MT ayant reçu les cellules B ont ensuite été infectées oralement par 35 kystes de *T. gondii* 76K et leur réponse immunitaire a été analysée en mesurant la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T dans la rate 7 jours après infection. La fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> productrice d'IFN- $\gamma$  dans la rate des souris  $\mu$ MT ayant reçu des cellules D7B est forte comparée aux souris  $\mu$ MT ayant reçu des cellules D0B (**article 3 ; figure 2**). Ceci indique que, les cellules B activées (D7B) ont un rôle amplificateur de la réponse inflammatoire.



**Figure A : protocole de transfert de cellules B, provenant de souris B6, naïves (D0B cells) ou stimulées par *T. gondii* 76K (D7 B cells) dans des souris receveuses  $\mu$ MT (ne possédant pas de cellules B).**

Afin d'analyser l'activité pro inflammatoire des cellules B matures (D7B) des transferts adoptifs de cellules D0B et D7B dans des souris RAG1 KO ont été réalisées. Ces souris n'expriment pas de cellules B ni de cellules T. Afin d'étudier les interactions entre cellules B et T, des cellules T activées (D5T – Day 5 T cells) purifiées de souris C57BL/6 5 jours après infection orale par *T. gondii*, ont été co-transférées avec les cellules B (**article 3 / données supplémentaires ; figure B**). Comme précédemment, les souris RAG1 KO ayant reçu des cellules B et T ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* et la réponse immunitaire a été évaluée en mesurant la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T dans la rate. Les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effectrices produisent significativement plus d'IFN- $\gamma$  en réponse à l'infection lors du co-transfert de cellules B. Nous avons également observé que les cellules D7B ayant eu un premier contact avec le toxoplasme amplifient plus largement la réponse pro inflammatoire des cellules T activées que les cellules D0B (**article 3 ; figure 3**).



**Figure B :** *protocole de co-transfert de cellules B, provenant de souris B6, naïves (D0B cells) ou stimulées par T. gondii 76K (D7 B cells) conjointement a des cellules T activées (D5 T cells) dans des souris receveuses RAG1 KO (ne possédant ni cellules B, ni cellules T).*

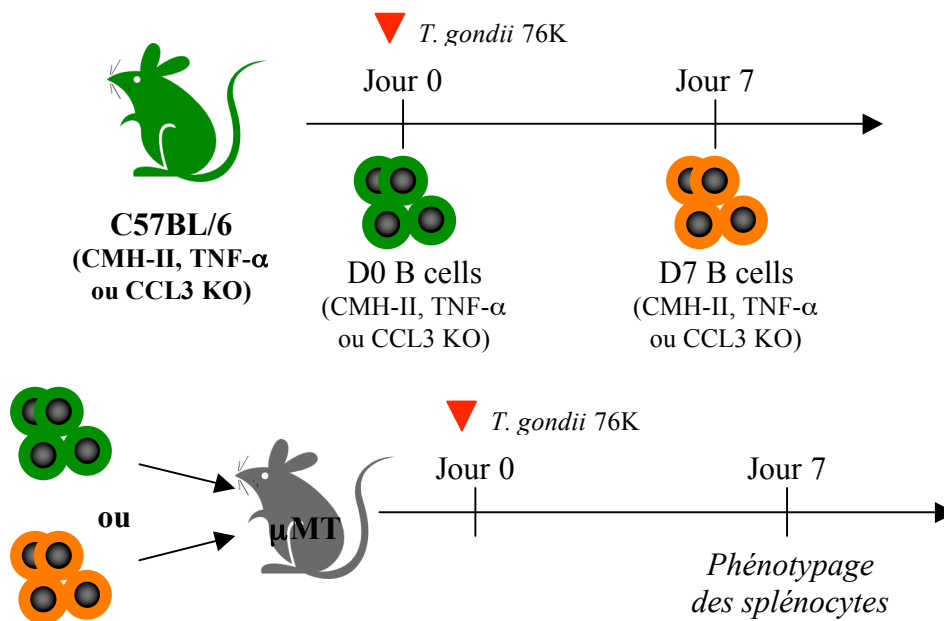
### 3.2. L'activation des cellules T effectrices par les cellules B matures requiert un contact direct entre les deux types cellulaires

Les modèles *in vivo* d'infection orale par le toxoplasme de souris  $\mu$ MT et RAG1 KO ayant reçu des cellules B matures ou immatures (en complément de cellules effectrices activées pour le modèle RAG1 KO) montrent que ces cellules participent à l'amplification de la réponse inflammatoire. Les cellules B peuvent exercer une activité pro inflammatoire soit par le renforcement de la présentation antigénique ou par la production de cytokines pro inflammatoires (sécrétées ou lié à leur membrane) tel l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou de chimiokines.

Afin d'identifier les mécanismes d'action de ces cellules nous avons réalisé des co-cultures *in vitro* de cellules B avec des cellules effectrices T en se focalisant sur la

nécessité ou non d'un contact entre ces cellules. Les co-cultures ont été réalisées avec contact direct entre cellules, ou en séparant les deux populations cellulaires par une membrane semi-perméable aux cytokines et chimiokines solubles, sans restimulation antigénique. L'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , par les cellules T effectrices CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> par les cellules D7B, requiert un contact direct entre les cellules (**article 3 ; figure 4**). Ceci indique que l'amplification de la réponse inflammatoire est médiée soit par une augmentation de la présentation antigénique, soit par l'expression de cytokines liées à la membrane.

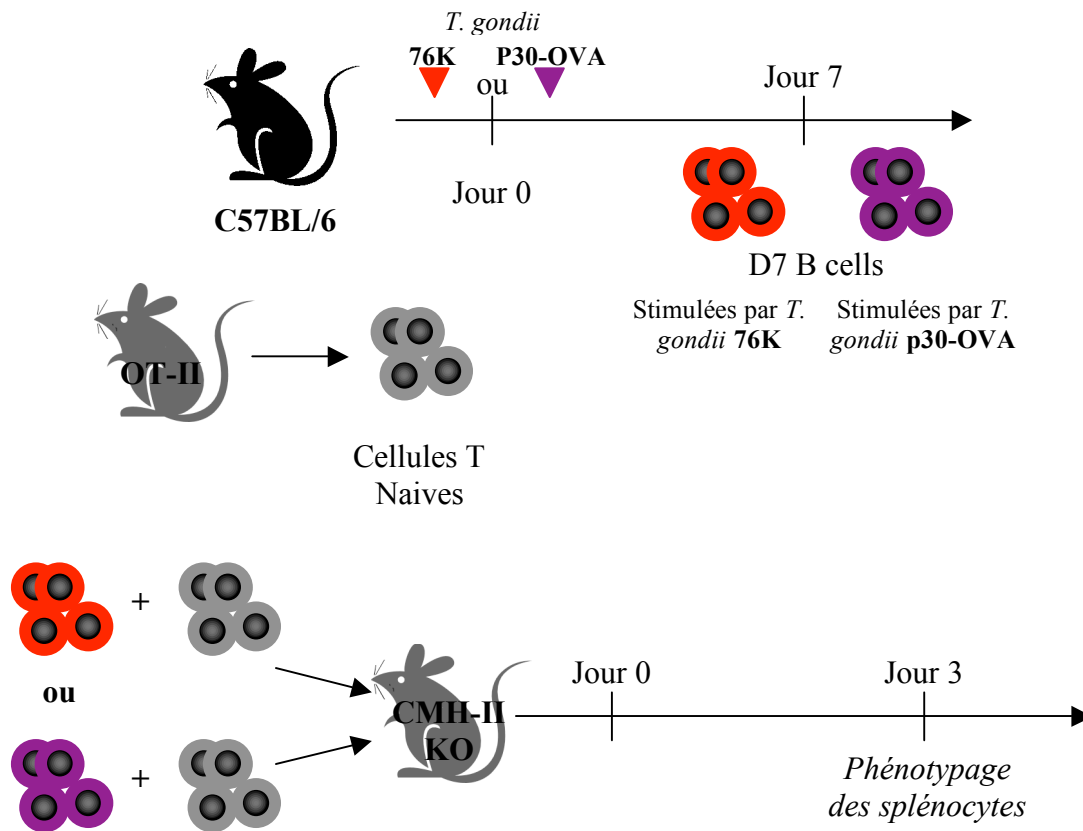
Pour étudier le rôle de la présentation antigénique dans ce phénomène des cellules D7B provenant de souris CMH-II KO ont été transférées dans des souris  $\mu$ MT. Les souris CMH-II KO ne peuvent présenter les antigènes dans le cadre du complexe majeure de classe II, sauf par le transfert adoptif de cellules pouvant reconstituer cette fonction. En absence de présentation antigénique via le CMH-II, les cellules D7B conservent leur capacité à stimuler la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> de la rate 7 jours après infection orale par *T. gondii* (**article 3 ; figure 5**) (**article 3 / données supplémentaires ; figure C**). Ceci corrobore les différences observées lors de transferts de cellules B immatures D0B (exprimant CMH-II) et matures D7B (perte d'expression des molécules CMH-II et de costimulation). Les cellules D7B étant plus efficaces dans la stimulation de la réponse pro inflammatoire au toxoplasme que les cellules D0B (**article 3 ; figure 2 et 3**). Des résultats analogues ont été obtenus lors du transfert de cellules B purifiées de souris CD40 KO dans des souris receveuse  $\mu$ MT indiquant que la présence de molécule de présentation antigénique CMH-II ou de costimulation CD40 n'est pas requise pour permettre aux cellules B d'exercer leur activité pro inflammatoire.



**Figure C : protocole de transfert de cellules B naïves (D0B cells) ou stimulées par *T. gondii* 76K (D7 B cells) provenant de souris CMH-II KO, TNF- $\alpha$  KO ou CCL3 KO dans des souris receveuses  $\mu$ MT (ne possédant pas de cellules B).**

Les souris OT-II expriment un TCR transgénique (V $\beta$ 5 V $\alpha$ 2) reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine (OVA 323-339). Afin de confirmer l'absence d'implication de la présentation antigénique dans l'activité inflammatoire des cellules B lors de l'infection par *T. gondii*, nous avons purifié des cellules B de souris C57BL/6 infectées soit avec *T. gondii* 76K, soit avec le mutant recombinant P30-OVA. Ces cellules B ainsi purifiées ont ensuite été injectées dans des souris CMH-II KO receveuses avec des cellules T naïves purifiées de souris OT-II (**article 3 ; figure 5**) (**article 3 / données supplémentaires ; figure D**). Les cellules B sensibilisées avec du toxoplasme de phénotype sauvage, ou du toxoplasme recombinant exprimant l'ovalbumine ne montre aucune différence significative dans leur habilité à stimuler la production d'IFN- $\gamma$  des cellules T. Ainsi, les cellules B ne contribuent pas au renforcement de la présentation antigénique lors de l'infection orale par *T. gondii*.





**Figure D :** protocole de co-transfert de cellules B, provenant de souris B6 suaves, stimulées soit par *T. gondii* 76K (D7 B cells "stimulés par *T. gondii* 76K"), soit par *T. gondii* P30-OVA (D7 B cells "stimulées par *T. gondii* P30-OVA"), conjointement à des cellules T naïves provenant de souris OT-II (D5 T cells), dans des souris receveuses CMH-II KO.

### 3.3. Les cellules B matures stimulent la réponse pro inflammatoire par la production de TNF- $\alpha$ et de CCL3

L'activité inflammatoire des cellules B, bien que nécessitant un contact direct avec les cellules T effectrices n'intervient pas lors de la phase de stimulation antigénique. Nous nous sommes demandé si l'effet enregistré est dû à la production de molécules inflammatoires.

Lors de l'infection orale par *T. gondii*, les cellules B de la rate et des ganglions mésentériques produisent peu d'IFN- $\gamma$  (**article 3 ; figures 3 et 6**) mais beaucoup de TNF- $\alpha$  (**article 3 ; figure 6**). Afin de tester le rôle potentiel du TNF- $\alpha$ , des cellules B provenant de souris TNF- $\alpha$  KO infectées (D7B TNF- $\alpha$  KO) ont été transférées dans des souris  $\mu$ MT (**article 3 / données supplémentaires ; figure C**). Sept jours après infection, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de la rate des ces souris est significativement inférieure à celle observée chez les souris  $\mu$ MT ayant reçu des cellules D7B exprimant le TNF- $\alpha$  (**article 3 ; figure 6**). Le TNF- $\alpha$  ainsi produit par les cellules B matures doit être membranaire, comme suggérés par les marquages Facs et l'importance des contacts cellulaires dans les événements décrits, pour stimuler la réponse inflammatoire des cellules T effectrices.

La production des chimiokines CCL3 et CCL5 jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse Th1 anti-toxoplasmique lors de la phase aiguë de la maladie. Lors de l'infection, la production de CCL3 par les cellules D7B est fortement augmentée par rapport à celle des cellules B naïves. En se liant aux récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5, cette chimiokine contribue au recrutement de cellules T effectrices. Afin d'étudier *in vivo* le rôle du récepteur aux chimiokines CCL3, nous avons purifié des cellules B de souris CCL3 KO et opéré un transfert dans des souris receveuses  $\mu$ MT (**article 3 / données supplémentaires ; figure C**). Une semaine après infection orale par *T. gondii*, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de la rate des souris  $\mu$ MT ayant reçu des cellules B CCL3 KO activées (D7B CCL3 KO) est significativement inférieure à

ce qui est mesuré chez les souris ayant reçu des cellules B compétentes activées (D7B) **(article 3 ; figure 6)**.

Ainsi, les cellules B matures, générées lors de l'infection orale par le toxoplasme, soutiennent à la fois la production de cytokines pro inflammatoires par les cellules T effectrices, via l'expression de TNF- $\alpha$  membranaire, mais contribuent également au recrutement de ces cellules par la production de chimiokine pro inflammatoire CCL3.

# B Cells Amplify IFN- $\gamma$ Production By T Cells via a TNF- $\alpha$ -Mediated Mechanism<sup>1</sup>

Laurence C. Menard,\* Laurie A. Minns,\* Sylvie Darche,<sup>†</sup> Daniel W. Mielcarz,\* David M. Foureau,\* David Roos,<sup>‡</sup> Florence Dzierszinski,<sup>§</sup> Lloyd H. Kasper,\* and Dominique Buzoni-Gatel<sup>2†</sup>

Aside from being the precursors of the Ab-secreting cells, B cells are engaged in other immune functions such as Ag presentation to T cells or cytokine production. These functions may contribute to the pathogenic role of B cells in a wide range of autoimmune diseases. We demonstrate that B cells acquire the capacity to amplify IFN- $\gamma$  production by CD4 and CD8 T cells during the course of the Th1 inflammatory response to *Toxoplasma gondii* infection. Using the two following different strategies, we observed that B cells from *T. gondii*-infected mice, but not from naive mice, induce higher IFN- $\gamma$  expression by splenic host T cells: 1) reconstitution of B cell-deficient mice with B cells expressing an alloantigen different from the recipients, and 2) adoptive transfer of B and T cells into RAG<sup>-/-</sup> mice. In vitro assays allowing the physical separation of T and B cells demonstrate that Ag-primed B cells enhance IFN- $\gamma$  production by T cells in a contact-dependent fashion. Using an OVA-transgenic strain of *T. gondii* and OVA-specific CD4 T cells, we observed that the proinflammatory effect of B cells is neither Ag specific nor requires MHCII expression. However, TNF- $\alpha$  expressed on the surface of B cells appears to mediate in part the up-regulation of IFN- $\gamma$  by the effector T cells. *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 4857–4866.

It is well appreciated that B lymphocytes have the potential to act as APC as well as precursor cells for the humoral immune response. B1 and marginal zone B cells are specialized to respond to thymus-independent Ags that suggest the existence of natural innate B cell response. In contrast, B cell responses to most protein Ags require the activation of dendritic cells and the recruitment of Ag-specific Th cells. Regarding these thymus-dependent responses, which mainly involve follicular B2 cells (1), naive B cells internalize through their surface Igs (IgM and IgD), process, and present specific Ags via MHC class II molecules to CD4 T cells. Following interaction with T cells, B cells either differentiate into IgM-producing short-lived plasma cells or undergo hypersomatic mutations and class switch recombination within the germinal centers, thereby producing long-lived plasma cells and memory B cells (2). In addition, B cells might be capable of cross-priming with CD8<sup>+</sup> T cells (3, 4). Polyclonal activation by TLR signaling can also occur, in particular for B1, marginal zone, and memory B cells. In B2 cells, unless the stimulation of the TLR is coupled to the engagement of the BCR, this type of activation aborts (5).

B cells, when stimulated, produce a wide range of polarizing cytokines such as IL-12 and IFN- $\gamma$  (6), or IL-4 (7). The so-designated B effector 1 and B effector 2 cells, respectively, produce polarized subsets of cytokines following infection with Th1- and

Th2-inducing pathogen (8). IFN- $\gamma$ -producing B cells have been identified in mice infected with pathogens such as *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* (8).

The role of B cells in some autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis (RA)<sup>3</sup> may in part be due to the production of autoantibodies whose binding to tissues leads to damages by induction of local inflammatory response. Alternatively, the ability of B cells to promote T cell activation by Ag presentation, costimulation, or cytokine production has also been suggested as part of the pathogenic process (9). In humans, mounting evidence based on the results of clinical trials with the B cell-depleting Ab anti-CD20 (rituximab) for some autoimmune diseases including RA and multiple sclerosis would suggest that B cells play a vital role in the amplification of the effector T cell response associated with disease progression (10–12).

Infection with the obligate intracellular protozoan *T. gondii* induces a Th1 inflammatory response (13, 14). C57BL/6 mice succumb within 10 days postoral infection from an overwhelming Th1 inflammation affecting the ileum and characterized by the overproduction of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by T cells (15). We use this strong inducer of a Th1 response to demonstrate that B cells, when activated, enhance CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses. This activation occurs within 7 days after infection, and the proinflammatory effect of D7-primed B cells requires T cell contact, but is not Ag specific. The mechanisms involved may be linked to the presence of membrane-bound TNF- $\alpha$  on B cell surface.

## Materials and Methods

### Mice and parasites

Female 8- to 10-wk-old C57BL/6 (B6),  $\mu$ MT (B cell-deficient mice on a B6 background), CCL3<sup>-/-</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice (B6 background), and

\*Departments of Microbiology and Immunology, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH 03756; <sup>†</sup>Unité de Réponse Précoce aux Parasites et Immunopathologie, Institut Pasteur-Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France; <sup>‡</sup>Lynch Laboratories, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104; and <sup>§</sup>McGill University, Institute of Parasitology, Quebec, Canada

Received for publication April 24, 2007. Accepted for publication July 19, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by National Institutes of Health Grant AI19613.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Dominique Buzoni-Gatel, Unité de Réponse Précoce aux Parasites et Immunopathologie, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. E-mail address: buzoni@pasteur.fr

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: RA, rheumatoid arthritis; MLN, mesenteric lymph node; WT, wild type.

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/\$2.00

RAG1<sup>-/-</sup> (B and T cell-deficient mice on a B6 background) mice were obtained from The Jackson Laboratory. MHCII<sup>-/-</sup> (B6 background) mice were purchased at Taconic Farms. B6-Ly5.2 (B6 mice expressing the alloantigen CD45.1) and OTII mice (B6 mice whose CD4 T cells express an OVA-specific TCR) were given by R. Noelle (Dartmouth Medical School, Lebanon, NH). These mice were housed under approved conditions at the Animal Research Facility of Dartmouth Medical School. Mice were infected orally by intragastric gavage with 35 cysts of *T. gondii*. Unless specified otherwise, the 76K strain of *T. gondii* was used. Parasites secreting OVA in the parasitic vacuole (P30-OVA) (16) or wild-type (WT) parental controls, both on a Prugnau background, were provided by D. Roos and F. Dzierszinski (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Parasites were maintained through passage in CBA/J mice.

To measure *T. gondii* parasite burden, the *T. gondii* B1 gene was amplified by real-time PCR using the 2× SYBR Green mix (Applied Biosystems) on a Bio-Rad iCycler, from ~500 ng of total genomic DNA prepared using the DNeasy kit (Qiagen). A standard curve for parasite equivalents was generated by real-time PCR using a plasmid, as previously described, as follows: QB1 forward, GGAACGTCATCCGTTTCATGAG, and reverse, TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC. For each sample, the parasite count was calculated by interpolation from the standard curve (17, 18). The parasite numbers were normalized to the exact amount of DNA using primers targeting the  $\beta$ -actin gene (19), as follows: forward, AGCCATGTACGTAGCCATCC; reverse, CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA.

### Cell purification

Mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer's patches, and spleen were dissociated and freed of connective tissue by filtration (70- $\mu$ m cell strainers).

### Adoptive transfers

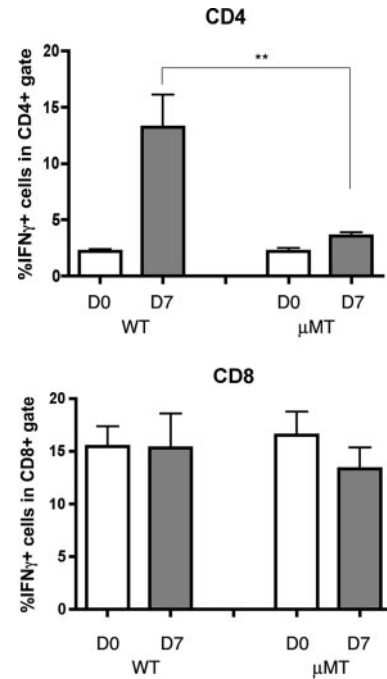
**Transfer of B cells into  $\mu$ MT.** Cells were collected from the MLN and spleen from naive or 7 days previously infected (D7-infected) B6, B6-Ly5.2, MHCII<sup>-/-</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup>, or CCL3<sup>-/-</sup> mice and were selected with anti-CD19 magnetic beads (Miltenyi Biotec). CD19<sup>+</sup> cells from MLN and spleen were mixed (10% of the final mix came from MLN CD19<sup>+</sup> cells, and 90% came from CD19<sup>+</sup> splenic cells). Purity was checked before each transfer by staining with anti-CD19 allophycocyanin, and 10<sup>7</sup> cells/recipient were injected i.v. in the retro-orbital sinus of  $\mu$ MT mice. Only the pan B cell marker CD19 was used for sorting, whereas CD19 or B220 was used as B cell marker for surface staining. Three to six mice per group were adoptively transferred with B cells isolated from three to four mice.

**Transfer into RAG1<sup>-/-</sup> mice.** CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD25<sup>-</sup> T effector cells were sorted from the MLN of eight D5-infected B6 mice by FACS after staining with anti-mouse CD4 FITC, CD45RB PE, and CD25 PerCP (BD Pharmingen). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> T cells were sorted from the MLN of four D5-infected B6 mice by FACS following staining with anti-mouse CD8 $\alpha$  PE and CD5 allophycocyanin (BD Pharmingen). A purity >99% was obtained for the sort of both T cell types. CD19<sup>+</sup> B cells from MLN and spleen of at least two naive (D0B) or D7-infected (D7B) B6 mice were magnetically sorted (as described above). Different combinations of these lymphocyte types (10<sup>5</sup> T cells/recipient, 10<sup>6</sup> B cells/recipient) were injected i.v. into RAG1<sup>-/-</sup> mice (four mice per group). Transferred RAG1<sup>-/-</sup> mice were infected the following day with 35 cysts, and cells from MLN and spleen were analyzed 10 days after infection.

**Transfer of OTII cells.** CD4<sup>+</sup> cells from the spleen and MLN of two OTII mice were purified by magnetic sorting with a CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). They were CFSE labeled and injected i.v. into MHCII<sup>-/-</sup> mice (10<sup>6</sup> cells/recipient). B cells were sorted with anti-CD19 magnetic beads (Miltenyi Biotec) from the spleen and MLN of two naive mice (D0B) or two mice infected with 35 cysts of P30-OVA or WT parasites (Prugnau background) at D7 and injected i.v. into MHCII<sup>-/-</sup> mice (10<sup>7</sup> cells/recipient; three to four recipients per group) the day after OTII transfer. Three days later, the IFN- $\gamma$  production by splenic CFSE<sup>+</sup> T cells was measured by intracellular cytokine staining.

### FACS analysis

**Intracellular cytokine staining.** Cells were incubated 2 h in 50 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich). Then 10  $\mu$ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) was added for 1 h. FcRs of cells were blocked with anti-CD16/CD32 Ab (BD Pharmingen) before surface staining in HBSS/5% FBS with B220 PerCP or CD4 FITC and CD8 $\alpha$  PerCP or CD5 PerCP, or CD4 PerCP or CD8 $\alpha$  PerCP and CD45.2 FITC (BD Pharmingen). Cells were permeabilized with BD Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen). Nonspecific sites were blocked with heat-inactivated rat serum (Harlan Sprague-Dawley), and intracellular IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were stained with anti-mouse IFN- $\gamma$  allophycocyanin and TNF- $\alpha$  PE, respectively (BD Pharmingen).



**FIGURE 1.** B cell-deficient mice have a depressed CD4 T cell response in the spleen following challenge with *T. gondii*. IFN- $\gamma$  production by CD4 or CD8<sup>+</sup> cells in the spleen at D7. IFN- $\gamma$  was detected by intracellular staining, and the percentage of IFN- $\gamma$ -positive cells in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> gate was measured by FACS. The means of the percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> gates for seven experiments with at least three mice per group are represented as a bar graph; error bars are SEM. \*\*,  $p < 0.01$ .

**CFSE labeling.** A total of 10<sup>7</sup> cells/ml was resuspended in RPMI 1640 containing 5  $\mu$ M CFSE (Invitrogen Life Technologies) and incubated 10 min in dark at 37°C. After incubation, the equal volume of FBS was added and tubes were topped with RPMI 1640. Cells were then immediately washed twice with RPMI 1640-5% FBS.

### In vitro assays

**Coculture of T and B cells.** T and B cells were purified from the spleen and MLN of naive (three mice) or D5 (two mice)- or D7 (three mice)-infected B6 mice with anti-CD90 and anti-CD19 magnetic beads (Miltenyi Biotec), respectively. T cells were CFSE labeled. Lower chambers of a HTS Transwell-96 system 0.4  $\mu$ m pore size (Corning Glass) were seeded in triplicates with 0.5  $\times$  10<sup>6</sup> T cells, alone (D0T or D5T) or with 10<sup>6</sup> D0 B cells (D0T + D0B or D5T + D0B) or 10<sup>6</sup> D7B cells (D0T + D7B or D5T + D7B), either in the lower chamber or in the upper chamber. Cells were cultured in RPMI 1640 with L-glutamine added with 10% FBS (Atlanta), penicillin (100 U/ml; Invitrogen Life Technologies), streptomycin (100 U/ml; Invitrogen Life Technologies), and 2-ME (55  $\mu$ M; Invitrogen Life Technologies) 3 days at 37°C, and then washed and prepared for intracellular staining, as described earlier.

**Cytokine production by B cells.** Splenic B cells were sorted from three naive (D0) or infected B6 mice at different time points (D2, D4, D7) with anti-CD19 magnetic beads (Miltenyi Biotec) (purity >97%) and cultured 24 h in RPMI 1640-10% FBS (2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well). Cytokine concentration in the culture supernatant was then measured with a multicytokine kit for CCL3, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  (BioSource International).

### Statistical analysis

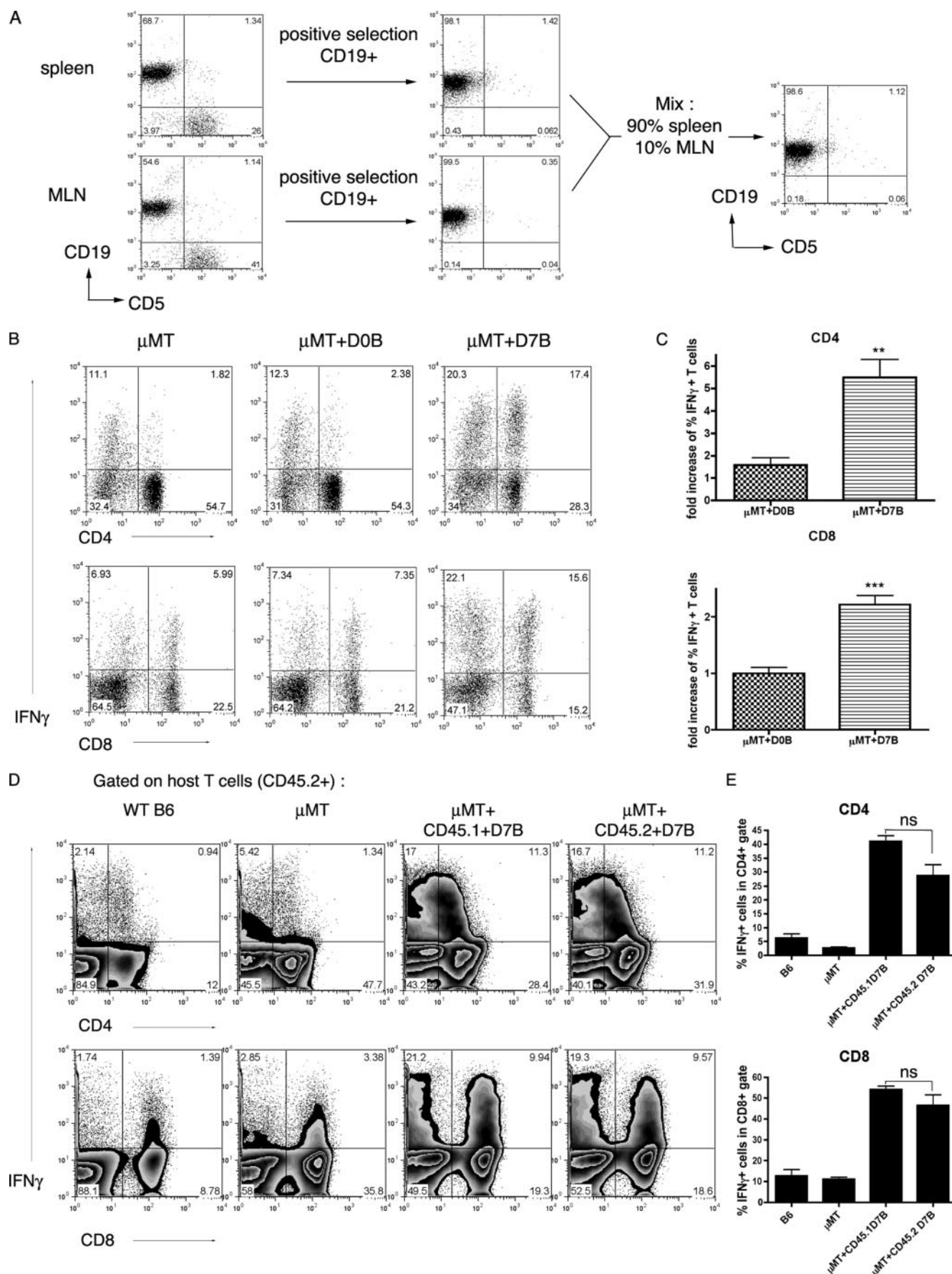
Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical differences between groups were analyzed using Prism Statistical Software's unpaired  $t$  test; significance was expressed as  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## Results

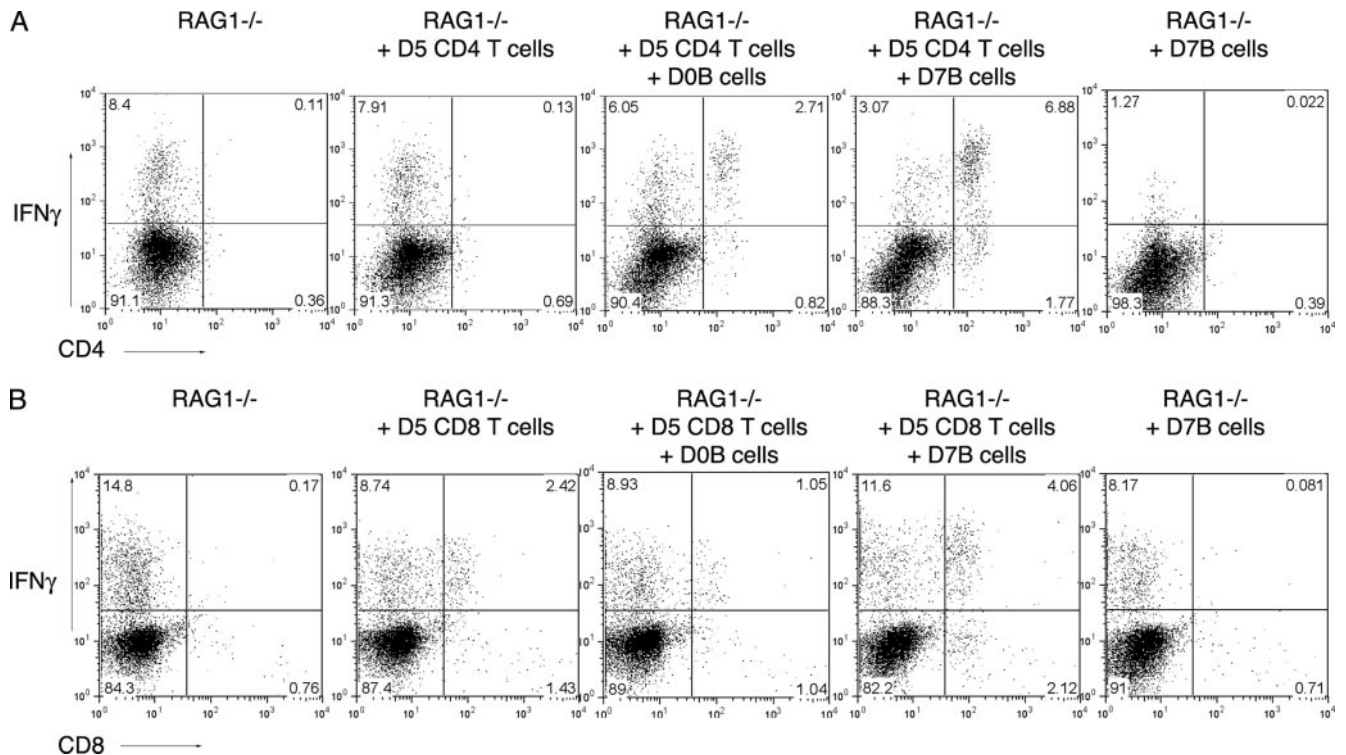
### Impaired activation of splenic T cells from B cell-deficient mice

Oral infection with *T. gondii* and the subsequent development of inflammation in B6 mice are correlated with an overproduction of





**FIGURE 2.** Increase in IFN- $\gamma$  production by splenic T cells from B cell-deficient mice after transfer of D7-primed B cells. **A**, CD19<sup>+</sup> B cells were sorted from MLN and spleen cells and combined in the respective proportions, as follows: 10 and 90%. An aliquot of each fraction was stained with anti-CD19 allophycocyanin and anti-CD5 PerCP (pan T cell marker). A purity of 97–99% was routinely obtained. Numbers are the percentage of CD19<sup>+</sup> cells in the



**FIGURE 3.** Activation of T cells by D7-primed B cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> (A) or CD8α<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B) T cells were sorted by FACS from MLN of D5-infected B6 mice (purity >99% for both cases). B cells from a mix of CD19<sup>+</sup> MLN and splenic cells (respectively 10 and 90%) from naive (D0B) or D7-infected (D7B) B6 mice were magnetically sorted with anti-CD19 beads (purity >97%). T cells alone or D7B cells alone or mix of T cells and D0B or T cells and D7B were injected (10<sup>5</sup> T cells, 10<sup>6</sup> B cells) into RAG1<sup>-/-</sup> mice (B6 background) that lack mature B and T cells. Mice were challenged with 35 cysts of *T. gondii* the day following transfer and sacrificed 9–10 days later when the disease had obviously set up. A total of 10<sup>6</sup> splenic cells was stained, and CD4<sup>+</sup> T or CD8<sup>+</sup> T cells were analyzed for IFN-γ production by intracellular staining. Numbers are the percentages of positive cells in the represented gates. These results are representative of two independent experiments, using three mice per group.

Th1-like cytokine such as IFN-γ by T cells (15). In the spleen, which is an organ in which B cells are dominant, the induction of IFN-γ production by splenic CD4<sup>+</sup> T cells from μMT mice was impaired at day 7 postinfection as compared with WT B6 mice (Fig. 1). However, the splenic parasite burden was similar in WT B6 mice and in μMT mice, as measured by real-time PCR (data not shown).

#### D7B cells activate effector T cells

B cell-deficient mice are known to have defects in lymphoid organ architecture (20). The reduced induction of IFN-γ production by splenic T cells from infected μMT mice could be attributed to impairment of Ag presentation and T cell priming. To address this

issue, μMT and RAG1<sup>-/-</sup> mice were reconstituted with B cells, and B and T cells, respectively.

The lack of T cell activation in infected μMT mice was first studied by reconstitution of μMT mice with B cells from a mix of MLN and splenic cells (respectively 10 and 90%) isolated from either naive (D0B) or D7-infected (D7B) mice (purity 97–99%; Fig. 2A). The mice were infected 1 day post-B cell transfer. Seven days after infection, D0B and D7B cells were found mainly in the spleen as follows: 1.2 and 1.3% of B220<sup>+</sup> B cells in infected μMT + D0B and μMT + D7B mice, respectively, and 0.3% in infected and nonreconstituted μMT mice (data not shown). Transfer of D7B cells led to a large increase in IFN-γ production by splenic CD4 and CD8 T cells from infected recipient mice (Fig. 2, B and

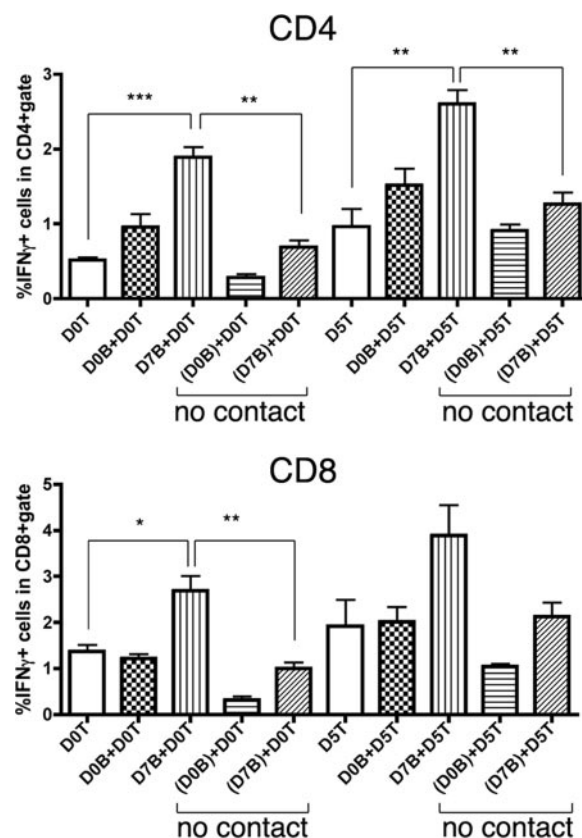
represented gate. B and C, CD19<sup>+</sup> B cells were purified as in A, and 10<sup>7</sup> B cells/mouse were i.v. injected into B cell-deficient mice (μMT). One day after transfer, mice were challenged with 35 cysts of *T. gondii* and were sacrificed 7 days later for analysis. IFN-γ production by CD4 or CD8 T cells from the spleen of μMT mice, μMT mice transferred with D0 B cells (μMT + D0B), or μMT mice transferred with D7B cells (μMT + D7B) was measured by intracellular staining 7 days after infection. B, Representative FACS profile of six to seven experiments. Numbers are the percentage of positive cells in the represented gates. C, The fold increase in IFN-γ expression by T cells from the spleen of adoptively transferred hosts (μMT + D0B or μMT + D7B) relative to nontransferred μMT mice was calculated as follows for each experiment: (average of percents of IFN-γ<sup>+</sup> cells in CD4 or CD8<sup>+</sup> gates for transferred groups)/(average of percents of IFN-γ<sup>+</sup> cells in CD4 or CD8<sup>+</sup> gates for μMT). The average of these fold increases for six (μMT + D0B) or seven (μMT + D7B) experiments with at least three mice per group is represented. Error bars: SEM, *p* values: fold increase for μMT + D7B vs fold increase for μMT + D0B. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01; \*\*\*, *p* < 0.001. D and E, D7B cells amplify IFN-γ response of splenic host T cells. CD19<sup>+</sup> B cells from a mix of CD19<sup>+</sup> MLN and splenic cells (respectively 10 and 90%) from four CD45.1<sup>+</sup> mice (CD45.1<sup>+</sup>D7B) or three WT B6 mice (CD45.2<sup>+</sup>D7B) 7 days after infection. A total of 10<sup>7</sup> B cells/mouse was i.v. injected into B cell-deficient mice (μMT). One day after transfer, mice were challenged with 35 cysts of *T. gondii* and were sacrificed 7 days later for analysis. IFN-γ production by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells from the spleen of WT B6 mice, μMT mice, μMT mice transferred with CD45.1<sup>+</sup> D7B cells (μMT + CD45.1<sup>+</sup>D7B), or μMT mice transferred with CD45.2<sup>+</sup> D7B cells (μMT + CD45.2<sup>+</sup>D7B) was measured by intracellular staining 7 days after infection. D, Representative FACS profiles of IFN-γ and CD4 or CD8 expression in CD45.2<sup>+</sup> gates; numbers are percentages of cells in each quadrant. E, Average of percentages of IFN-γ<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> gates (after gating on CD45.2<sup>+</sup> cells) for three groups of two mice, measured by flow cytometry. Error bars are SEM.

C). In contrast, adoptive transfer of D0B cells induced only a slight increase in IFN- $\gamma$  expression by splenic CD4 and CD8 T cells from D7-infected recipients as compared with mice that did not receive any B cell (Fig. 2, B and C). Despite the purification procedure applied to the B cell population (up to 99%), a small contamination of the adoptively transferred D7B cell by Ag-experienced T cells might account for the increase in the IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cell population. To rule out this possibility, D7B cells from B6-Ly5.2 mice expressing the CD45.1 alloantigen, which is different from the alloantigen expressed by B6 and  $\mu$ MT mice (CD45.2), were adoptively transferred into  $\mu$ MT mice, as well as D7B cells from B6 mice as a positive control, and IFN- $\gamma$  expression by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>CD45.2<sup>+</sup> T cells (from the recipient) was assessed. Transfer of D7B cells from both CD45.2-expressing and CD45.1-expressing mice led to an increase in the frequency of CD45.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD45.2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells, without any significant difference (Fig. 2, D and E). In case of adoptive transfer with CD45.1<sup>+</sup> D7B cells, CD45.1<sup>+</sup> T cells were not detected in host (all T cells were CD45.2<sup>+</sup>; data not shown). This observation suggests that D7B cells (CD45.1<sup>+</sup>) can activate splenic host T cells (CD45.2<sup>+</sup>) to produce IFN- $\gamma$ .

Previous studies from our laboratory have demonstrated that at day 5 following oral infection with *T. gondii*, CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD25<sup>-</sup> T cells can induce ileitis in RAG1<sup>-/-</sup> mice following adoptive transfer and Ag re-exposure (21). For these studies, *T. gondii*-primed effector CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from D5-infected mice alone or with either D0B or D7B cells were adoptively transferred into RAG1<sup>-/-</sup> mice (B6 background) lacking mature B and T cells. RAG1<sup>-/-</sup> mice were infected the day after reconstitution, and analyzed 9–10 days later for evidence of ileitis. After infection, unlike the nontransferred RAG1<sup>-/-</sup>, all groups receiving these primed effector T cells developed the intestinal disease, confirming the efficacy of the transfer. Higher IFN- $\gamma$  production by splenic CD4<sup>+</sup> T cells was observed via FACS analysis when effector T cells were cotransferred with D7B cells (6.88% of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells) than with D0B cells (2.71%) or without B cells (0.13%) (Fig. 3A). However, transfer of D7B cells alone did not lead to the development of such a CD4<sup>+</sup> T cell population (Fig. 3, group RAG1<sup>-/-</sup> + D7B). The IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells observed in the spleen of RAG1<sup>-/-</sup> mice after cotransfer of effector T cells and D7B are thus probably not issued from a contamination of the D7B cells by Ag-experienced T cells, confirming the data obtained with the use of mice expressing the different alloantigens CD45.1 and CD45.2. We observed an increased IFN- $\gamma$  response by splenic CD8<sup>+</sup> T cells following transfer of D7B cells into  $\mu$ MT mice 7 days after *T. gondii* infection (Fig. 2). To determine whether B cells directly enhance CD8 T cell activation, D7B cells, or D0B cells as a control, were cotransferred with CD8 T cells from D5-infected B6 mice into RAG1<sup>-/-</sup> mice and infected the following day. Nine–10 days posttransfer, CD8 T cells were analyzed for expression of IFN- $\gamma$ . Cotransfer of CD8 T cells with D7B cells, but not with D0B cells, resulted in enhanced IFN- $\gamma$  production (Fig. 3B). These findings suggest that, upon activation, B cells acquire the capacity to enhance IFN- $\gamma$  production by both CD4 and CD8 T cells.

#### Direct proinflammatory effect of B cells upon IFN- $\gamma$ production by T cells

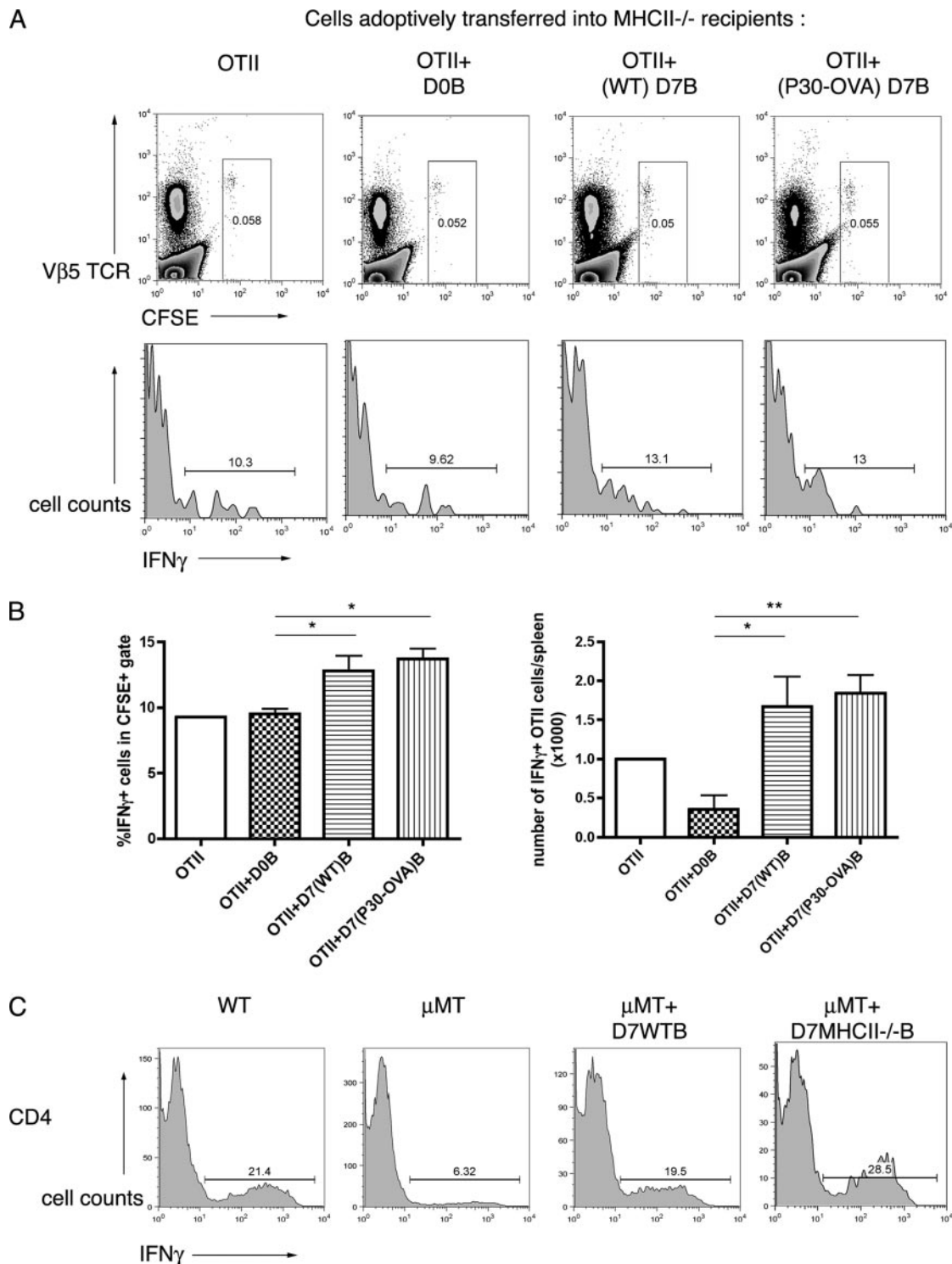
The observation that adoptively transferred D7B cells into  $\mu$ MT mice enhanced IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells suggests a direct effect of D7B cells on T cell responses. To test whether the D7B cells activate T cells via cell-cell contact, an experiment using a HTS Transwell-96 system, in which a semipermeable membrane prevents cell-cell contact, but not circulation



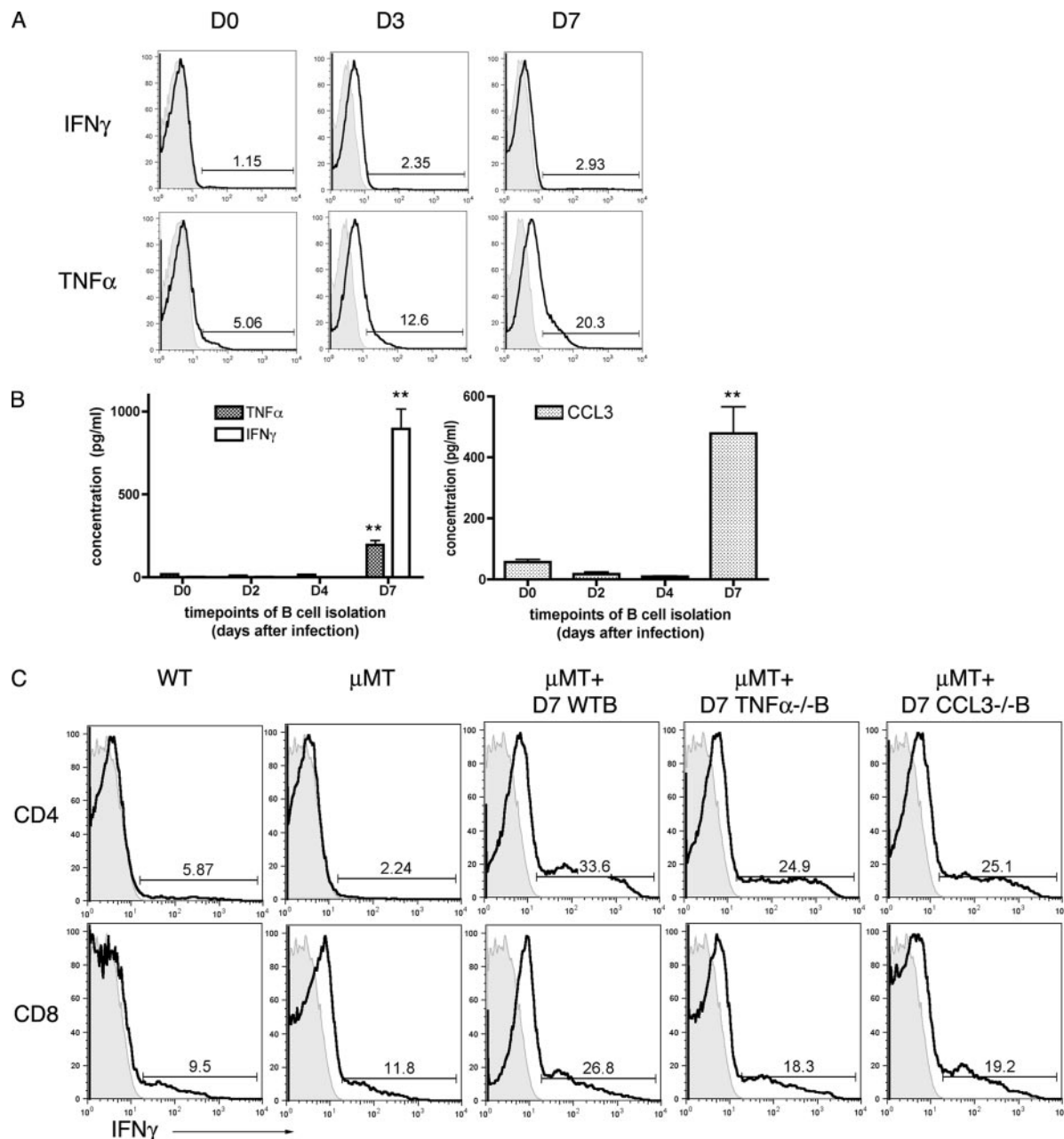
**FIGURE 4.** The proinflammatory effect of D7B cells is direct and contact dependent. T and B cells were sorted with magnetic beads (anti-CD90 and anti-CD19, respectively; purity 98% minimum) from MLN and spleen of naive or D7-infected B6 mice. A total of  $0.5 \times 10^6$  naive (D0) or  $0.5 \times 10^6$  primed (D5) T cells was CFSE labeled and seeded in the lower chamber of a HTS Transwell-96 0.4- $\mu$ m pore-size system. A total of  $10^6$  D0B or  $10^6$  D7B cells was added in the same chamber as T cells, or in the upper chamber of the HTS Transwell-96 system (D0B or D7B represented between parentheses in the legend). After 3 days of culture, the cells were briefly restimulated with PMA-ionomycin for staining of intracellular IFN- $\gamma$  and CD4 or CD8 surface markers. Error bars are SEM ( $n = 3$ ); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . These experiments were performed three times with consistent results.

of cytokines or chemokines, was performed. CFSE-labeled CD90<sup>+</sup> T cells from naive and D5-infected mice (D0T or D5T) T cells were seeded in the lower chamber of a Transwell system, and CD19<sup>+</sup> B cells from naive and D7-infected mice (D0B or D7B) were added to either the lower chamber, allowing contact with T cells, or in the upper chamber, without direct contact with T cells. After 3 days of culture and in the absence of any stimulation, the frequency of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> D0T and D5T cells was low, the former being only slightly higher than the latter. However, coculture of D7B cells in direct contact with both D0T or D5T cells significantly increased the production of IFN- $\gamma$  by D0 and D5 CD4<sup>+</sup> T cells (respectively  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ) and D0 CD8<sup>+</sup> T cells ( $p < 0.05$ ), which illustrates the direct proinflammatory effect of D7B cells on IFN- $\gamma$  production by T cells (Fig. 4). IFN- $\gamma$  production by D5 CD8 T cells was also augmented by direct contact with D7B cells, although not significantly. In contrast, when D7B cells were separated from the T cells by the HTS Transwell-96 system, T cells failed to demonstrate an increase in IFN- $\gamma$  production, suggesting that the proinflammatory effect of D7B cells requires direct cell-cell contact with the T cells (Fig. 4). There was no difference in CFSE-dye dilution when T cells were cultured alone or with B





**FIGURE 5.** Ag presentation is not required for the proinflammatory effect of B cells. *A* and *B*, OTII cells (T cells expressing an OVA-specific TCR) were CFSE labeled and transferred into MHCII<sup>-/-</sup> mice ( $10^6$  cells/recipients). The following day, naive B cells (D0B) or D7B cells ( $10^7$  cells/recipients, purity >98%) primed in vivo with parasites secreting OVA in the parasitic vacuole (D7(P30-OVA)B) or with the WT parental strain (D7(WT)B) were injected into the recipients of OTII cells. Three days after B cell transfer, mice were sacrificed, spleens were collected, and the IFN- $\gamma$  production by the CFSE<sup>+</sup> T cells was measured. *A*, *Top*, FACS data representing the expression of V $\beta$ 5 chain (expressed by OTII cells in their transgenic TCR) and CFSE on total live splenic cells ( $2 \times 10^5$  cells were acquired for analysis). Numbers represent the percentage of CFSE<sup>+</sup> cells. *Bottom*, IFN- $\gamma$  expression of cells in CFSE<sup>+</sup> gate as defined in *top*; numbers represent the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells. *B*, Histograms showing the average of the percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in CFSE<sup>+</sup> gate measured for each sample of each group ( $n = 3$ ) (*left*) or the absolute numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> OTII cells/spleen (*right*). Error bar is SEM; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . *C*, D7B cells from a mix of splenic (90%) or MLN (10%) D7B cells of D7-infected WT or MHCII<sup>-/-</sup> mice were purified with anti-CD19 magnetic beads and injected into  $\mu$ MT mice ( $10^7$  B cells/mouse, purity >99%). Recipients were infected the following day with 35 cysts and sacrificed at D7. IFN- $\gamma$  production by splenic T cells was measured by intracellular cytokine staining for CD4<sup>+</sup> cells. FACS profiles show the IFN- $\gamma$  expression by cells in the CD4<sup>+</sup> gate at D7, and numbers are the percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells (as determined with isotype control) in these gates. These experiments have been repeated twice with consistent results, using three to four mice per group. WT, Nontransferred WT B6 mice;  $\mu$ MT, nontransferred  $\mu$ MT mice;  $\mu$ MT + D7WTB,  $\mu$ MT mice adoptively transferred with D7WT B;  $\mu$ MT + D7 MHCII<sup>-/-</sup> B,  $\mu$ MT mice adoptively transferred with D7 MHCII<sup>-/-</sup> B.



**FIGURE 6.** B cell-driven production of TNF- $\alpha$  at D7 plays a role in the proinflammatory effect of D7B cells. **A**, B cells from the spleen of D7-infected B6 mice were stained for B220, and their expression in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was assessed by intracellular staining. The numbers are the percentage of positive cells for the indicated cytokine among the B220 $^{+}$  gated population. This experiment was repeated twice with consistent results, using four mice per group. **B**, Splenic B cells were positively selected for CD19 expression with anti-CD19 magnetic beads (purity >97%) at D0, D2, D4, and D7, and cultured 24 h ( $2 \times 10^5$  cells/well). TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , or CCL3 was detected by luminex assay of the culture supernatant. Error bar represents the SEM of the measure made in triplicates. \*\*,  $p < 0.01$  D7 vs D0. **C**, CD19 $^{+}$  B cells from a mix of CD19 $^{+}$  MLN and splenic cells (respectively 10 and 90%) purified with anti-CD19 magnetic beads from D7-infected WT, TNF- $\alpha^{-/-}$ , and CCL3 $^{-/-}$  mice. A total of  $10^7$  B cells was injected i.v. into  $\mu$ MT mice that were infected 1 day later. Seven days after infection, spleen cells were collected and stained for T cell surface markers (CD4, CD8) and intracellular IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  expression and percentages of IFN- $\gamma^{+}$  cells in CD4 $^{+}$  (upper panel) and CD8 $^{+}$  (lower panel) gates are shown. Data are representative of two independent experiments with three mice per group. WT, Nontransferred WT B6 mice;  $\mu$ MT, nontransferred  $\mu$ MT mice;  $\mu$ MT + D7 WT B,  $\mu$ MT mice adoptively transferred with D7 WT B;  $\mu$ MT + D7 TNF- $\alpha^{-/-}$  B,  $\mu$ MT mice adoptively transferred with D7 TNF- $\alpha^{-/-}$  B;  $\mu$ MT + D7 CCL3 $^{-/-}$  B,  $\mu$ MT mice adoptively transferred with D7 CCL3 $^{-/-}$  B.

cells, which means that B cells did not affect T cell proliferation in this system (data not shown).

#### *Ag presentation by MHCII is not required for the proinflammatory role of D7B cells*

Once activated, B cells may become professional APC and consequently participate in the activation of T cells via Ag presenta-

tion on MHCII molecule. To test whether D7B cells can enhance IFN- $\gamma$  production by T cells during Ag presentation, the requirement for Ag specificity was analyzed. A total of  $10^6$  CD4 $^{+}$  T cells carrying a TCR specific for OVA (OTII cells) was CFSE labeled and adoptively transferred into MHCII $^{-/-}$  mice, so that only the adoptively transferred B cells could activate CD4 $^{+}$  T cells via MHCII. Either D0B cells, or D7B cells from mice infected with

cysts from an OVA-secreting strain of *T. gondii* (P30-OVA) or from the WT parental strain, were adoptively transferred the following day. Three days later, spleens from the recipient mice were collected and analyzed for IFN- $\gamma$  secretion by CFSE<sup>+</sup> T cells, which at this point include T cells that might have started to divide as well as nondivided cells. Adoptive transfer of P30-OVA-primed D7B cells (OTII<sup>+</sup>D7(P30-OVA)B) and of WT-primed D7B cells (OTII<sup>+</sup>D7(WT)B) significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced IFN- $\gamma$  production by OTII cells in recipient mice (Fig. 5, A and B), as measured by percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> OTII cells or absolute numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> OTII cells, indicating that activation was required, but not dependent upon Ag specificity.

One might argue that P30-OVA-primed B cell population did not contain any OVA-specific cells, even though P30-OVA parasites are known to induce an OVA-specific T cell response (16); thus, the enhancement of IFN- $\gamma$  production by OTII cells observed could be influenced by the nominal presence of activated innate cells transferred with B cells. To rule out this possibility, an additional approach was developed. WT or MHCII<sup>-/-</sup> D7B cells were transferred into  $\mu$ MT recipients that were infected the following day, and IFN- $\gamma$  production by T cells at D7 was measured. If Ag presentation by MHCII was involved in the proinflammatory effect of D7B cells, enhancement by D7B cells of IFN- $\gamma$  production by CD4 T cells should be impaired by MHCII deficiency. IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 T cells were actually in higher frequency when MHCII<sup>-/-</sup> D7B cells were transferred, as compared with mice transferred with WT D7B cells (Fig. 5C). Taken together, these two different experiments further support the lack of involvement of Ag presentation in the proinflammatory role of D7B cells.

A pathogenic role of B cells in autoimmune disease has been linked to an important role for the CD40/CD154 interactions in T cell activation (22). The involvement of the CD40/CD154 ligation was tested in vitro, by blockade of CD154 with the mAb MR1 during the coculture of sorted T and B cells. Disruption of the CD40/CD154 ligation did not prevent T cell activation in terms of IFN- $\gamma$  production, by D7B cells, indicating that the direct interaction between the activated B and T cells was not dependent on costimulation via CD40/CD154 (data not shown).

#### *The proinflammatory role of D7B cells is mediated by TNF- $\alpha$*

To characterize D7-primed B cells, B cell-mediated production of several cytokines and chemokines was tested using a multicytokine assay. B cells sorted from the spleen (purity >97%) of naive (D0) or D2- or D4- or D7-infected mice were cultured 24 h. TNF- $\alpha$  was not quantifiable in culture supernatant until D7 (Fig. 6B). Consistent with these data, intracellular staining on B cells showed that the frequency of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> B cells increased gradually after infection (Fig. 6A).

To evaluate the importance of TNF- $\alpha$  in the proinflammatory role of D7B cells, D7B cells from TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice were injected into  $\mu$ MT mice. Recipients were infected with *T. gondii* 1 day later, and IFN- $\gamma$  production by host splenic T cells was assessed 7 days after infection. TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> D7B cells were less efficient than WT D7B cells to amplify IFN- $\gamma$  expression by T cells (Fig. 6C), suggesting that TNF- $\alpha$  produced by B cells at D7 plays an important role in the proinflammatory effect of D7B cells.

B cells produced little or no IL-12 at D7 (data not shown). Despite a low frequency of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells, D7B cells release large amounts of IFN- $\gamma$  (Fig. 6, A and B). However, in our model, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> D7B cells retained the proinflammatory role of D7B cells when adoptively transferred into  $\mu$ MT mice (data not shown).

#### *Secretion of CCL3 by D7B cells participates in the proinflammatory role of D7B*

CCL3 was also secreted in large quantities by B cells at D7 (Fig. 6B). The importance of this chemokine in the proinflammatory role of D7B cells in vivo was evaluated. D7B cells deficient for CCL3 were injected into  $\mu$ MT mice, recipients were infected with *T. gondii* 1 day later, and IFN- $\gamma$  production by host splenic T cells was assessed. Similar to TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> D7B cells, CCL3<sup>-/-</sup> D7B cells induced a lower expansion of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells than WT D7B (Fig. 6C). TNF- $\alpha$  and CCL3 produced by B cells at D7 appear thus to participate in the proinflammatory effect of D7B cells.

## Discussion

The role of B cells in T cell-mediated autoimmune diseases remains uncertain. In this study, we demonstrate that B cells amplify the splenic Th1-polarized response to *T. gondii*. *T. gondii*-infected B6 mice develop a robust and uncontrolled Th1 response. *T. gondii*-primed B cells, but not naive B cells, were able to increase IFN- $\gamma$  production by splenic T cells in vivo. This proinflammatory property is developed post-B cell activation. The necessity for a direct contact interaction was demonstrated when naive and primed T cells cultured in vitro during 3 days with activated B cells showed an increased IFN- $\gamma$  production, but not when these two populations were cultured across a transmembrane filter.

B cells have the ability to present the Ag to CD4 T cells, once they migrate to the T cell area. Even though it has long been thought that B cells were not required for T cell priming (23–25), recent data show that Ag presentation provided by B cells is required for an optimal activation of T cells (26). Recent favorable clinical trials in human autoimmune disease such as RA and multiple sclerosis using the anti-CD20 Ab rituximab further implicate B cells as playing an important role in Ag presentation to T cells. B cells indeed express costimulatory molecules and are thus able to give the two signals required for T cell activation. Moreover, CD40, mainly expressed by B cells, is required for the development of the Th1 response to *T. gondii* in B6 mice (27). We thus studied the role of Ag presentation by B cells in the activation of T cells observed in our system.

We first investigated the requirement of Ag specificity. D7B cells primed with WT parasites enhanced IFN- $\gamma$  production by OVA-specific T cells at the same extent as D7B cells primed with OVA-secreting parasites, despite the ability of OVA-secreting parasites to induce an OVA-specific T cell response (16). Thus, B cell activation, but not Ag specificity, is required. These data were confirmed by the equal, if not increased, ability of D7 MHCII<sup>-/-</sup> B cells compared with D7 WT B cells to enhance IFN- $\gamma$  production by splenic T cells at D7, when transferred into  $\mu$ MT mice. Taken together, these findings eliminate the necessity of Ag specificity in the observed proinflammatory effect of D7B cells. Moreover, the observations of the coculture of B/T cells in the presence of blocking Ab anti-CD154 would suggest that activation of T cells by B cells does not require CD40/CD154 interactions.

This activation of B cells toward a proinflammatory profile is unlikely driven by cognate interactions with CD4 T cells, as suggested by the equal, if not higher, proinflammatory capacity of MHCII<sup>-/-</sup> B cells. Activation of B cells through TLR signaling or cross-presentation to CD8<sup>+</sup> T cells are other possible pathways. For instance, engagement of TLR9, which plays a critical role in the development of the Th1 response to *T. gondii* (28), can drive activation of B cells without help of T cells and thus participate in the activation of pathogenic B cells in autoimmune (29) diseases. In addition, B cells can present Ags to CD8<sup>+</sup> T cells via MHC



cross-presentation (3, 4), and possibly get activated in a similar way as in cognate interactions with CD4 T cells.

The clear change of the function of B cells that become proinflammatory at D7 led us to screen for possible modifications of B cell biology. We observed that D7B cells were characterized by a dramatic change of their phenotype as follows: whereas most naive B cells are B220<sup>high</sup> CD23<sup>+</sup>, B cells at D7 were mainly B220<sup>high</sup> CD23<sup>−</sup> (our unpublished observations). Additional experiments of GFP<sup>+</sup> B cell transfers and analysis of their phenotype showed that this change in phenotype was most likely due to a decreased CD23 surface expression by B cells, and not to a shift in B cell subsets. Indeed, a recent study showed that IFN- $\gamma$  induces a down-regulation of CD23 expression by B cells (30). IFN- $\gamma$  released by T or B cells could explain this dramatic reduction of CD23 expression by B cells. The shedding of CD23 from the plasma membrane is another possibility. The soluble form of CD23 activates in vitro monocytes to produce proinflammatory cytokines (31, 32) and has been associated with inflammatory disorders such as RA (33–36).

TNF- $\alpha$  expression by B cells was also greatly increased at D7, and TNF- $\alpha$ <sup>−/−</sup> D7B cells were not as efficient as WT D7B cells to increase IFN- $\gamma$  production by T cells at D7, implicating a possible role for TNF- $\alpha$  in mediating the proinflammatory effect of D7B cells. TNF- $\alpha$  is a major proinflammatory cytokine, via activation of the NF- $\kappa$ B pathway, and can induce IFN- $\gamma$  expression and is involved in chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease or RA (37–39). In particular, overexpression of the membrane-bound form of TNF- $\alpha$  is sufficient to induce RA in mice (40). The necessity of contact between B and T cells for the proinflammatory effect of B cells as demonstrated in vitro may indicate that the transmembrane TNF- $\alpha$  is the major source of TNF- $\alpha$  responsible for the enhancement of IFN- $\gamma$  expression by T cells. In contrast to the IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> D7B cells that are represented by a low frequency and nevertheless release large quantities of IFN- $\gamma$  when cultured 24 h, the frequency of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> D7B cells was relatively high compared with the amount of TNF- $\alpha$  found in the culture supernatant. This observation would suggest that the TNF- $\alpha$  measured by intracellular cytokine staining is primarily membrane bound and not secreted.

CCL3 is a potent chemoattractant that binds CCR1, CCR3, or CCR5 expressed by a large panel of cell types, including T cells (41). It is involved in autoimmune disorders such as RA (42), inflammatory bowel disease (43, 44), or experimental autoimmune encephalomyelitis (45). We can speculate that CCL3 secreted by D7B cells attracts T cells and is involved in the enhancement of IFN- $\gamma$  production by T cells.

These findings provide a novel insight into an alternative mechanism by which B cells can enhance a proinflammatory T cell response.

## Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

## References

- Berland, R., and H. H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 253–300.
- Mills, D. M., and J. C. Cambier. 2003. B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Semin. Immunol.* 15: 325–329.
- Heit, A., K. M. Huster, F. Schmitz, M. Schiemann, D. H. Busch, and H. Wagner. 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J. Immunol.* 172: 1501–1507.
- Hon, H., A. Oran, T. Brocker, and J. Jacob. 2005. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *J. Immunol.* 174: 5233–5242.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987–995.
- Harris, D. P., S. Goodrich, A. J. Gerth, S. L. Peng, and F. E. Lund. 2005. Regulation of IFN- $\gamma$  production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN- $\gamma$  receptor. *J. Immunol.* 174: 6781–6790.
- Harris, D. P., S. Goodrich, K. Mohrs, M. Mohrs, and F. E. Lund. 2005. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor  $\alpha$ , and Th2 cells. *J. Immunol.* 175: 7103–7107.
- Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain, and F. E. Lund. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1: 475–482.
- Martin, F., and A. C. Chan. 2004. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity: insights from the clinic. *Immunity* 20: 517–527.
- Cross, A. H., J. L. Stark, J. Lauber, M. J. Ramsbottom, and J. A. Lyons. 2006. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 180: 63–70.
- Edwards, J. C., and G. Cambridge. 2006. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 394–403.
- Edwards, J. C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350: 2572–2581.
- Liesenfeld, O. 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl. 1): S96–S101.
- Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4<sup>+</sup> T cell-dependent, interferon- $\gamma$ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184: 597–607.
- Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, W. Li, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2002. Lamina propria CD4<sup>+</sup> T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J. Immunol.* 168: 2988–2996.
- Pepper, M., F. Dzierszinski, A. Crawford, C. A. Hunter, and D. Roos. 2004. Development of a system to study CD4<sup>+</sup> T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 72: 7240–7246.
- Burg, J. L., C. M. Grover, P. Pouletty, and J. C. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1787–1792.
- Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, and I. Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309–316.
- Elder, P. K., C. L. French, M. Subramaniam, L. J. Schmidt, and M. J. Getz. 1988. Evidence that the functional  $\beta$ -actin gene is single copy in most mice and is associated with 5' sequences capable of conferring serum- and cycloheximide-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 480–485.
- Crowley, M. T., C. R. Reilly, and D. Lo. 1999. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J. Immunol.* 163: 4894–4900.
- Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, C. Dutta, F. J. Mennechet, S. Luangsang, L. A. Minns, M. E. Grigg, S. Tomavo, J. C. Boothroyd, and L. H. Kasper. 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 173: 2725–2735.
- Martin, F., and A. C. Chan. 2006. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 467–496.
- Epstein, M. M., F. Di Rosa, D. Jankovic, A. Sher, and P. Matzinger. 1995. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 182: 915–922.
- Topham, D. J., R. A. Tripp, A. M. Hamilton-Easton, S. R. Sarawar, and P. C. Doherty. 1996. Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell memory in the absence of B cells and Ig. *J. Immunol.* 157: 2947–2952.
- Itano, A. A., and M. K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat. Immunol.* 4: 733–739.
- Crawford, A., M. Macleod, T. Schumacher, L. Corlett, and D. Gray. 2006. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* 176: 3498–3506.
- Li, W., D. Buzoni-Gatel, H. Debbabi, M. S. Hu, F. J. Mennechet, B. G. Durell, R. J. Noelle, and L. H. Kasper. 2002. CD40/CD154 ligation is required for the development of acute ileitis following oral infection with an intracellular pathogen in mice. *Gastroenterology* 122: 762–773.
- Minns, L. A., L. C. Menard, D. M. Foureau, S. Darche, C. Ronet, D. W. Mielcarz, D. Buzoni-Gatel, and L. H. Kasper. 2006. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 176: 7589–7597.
- Leadbetter, E. A., I. R. Rifkin, A. M. Hohlbaum, B. C. Beaudette, M. J. Shlomchik, and A. Marshak-Rothstein. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603–607.
- Sukumar, S., D. H. Conrad, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 2006. Differential T cell-mediated regulation of CD23 (Fc $\epsilon$ RII) in B cells and follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 176: 4811–4817.
- Lecoanet-Henchoz, S., J. F. Gauchat, J. P. Aubry, P. Graber, P. Life, N. Paul-Eugene, B. Ferrua, A. L. Corbi, B. Dugas, C. Plater-Zyberk, et al. 1995. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* 3: 119–125.

32. Lecoanet-Henchoz, S., C. Plater-Zyberk, P. Graber, D. Gretener, J. P. Aubry, D. H. Conrad, and J. Y. Bonnefoy. 1997. Mouse CD23 regulates monocyte activation through an interaction with the adhesion molecule CD11b/CD18. *Eur. J. Immunol.* 27: 2290–2294.
33. Huissoon, A. P., P. Emery, P. A. Bacon, J. Gordon, and M. Salmon. 2000. Increased expression of CD23 in rheumatoid synovitis. *Scand. J. Rheumatol.* 29: 154–159.
34. Kleinau, S., P. Martinsson, S. Gustavsson, and B. Heyman. 1999. Importance of CD23 for collagen-induced arthritis: delayed onset and reduced severity in CD23-deficient mice. *J. Immunol.* 162: 4266–4270.
35. Plater-Zyberk, C., and J. Y. Bonnefoy. 1995. Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. *Nat. Med.* 1: 781–785.
36. Ribbens, C., V. Bonnet, M. J. Kaiser, B. Andre, O. Kaye, N. Franchimont, D. de Groote, Y. Beguin, and M. G. Malaise. 2000. Increased synovial fluid levels of soluble CD23 are associated with an erosive status in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 120: 194–199.
37. Holtmann, M. H., M. Schutz, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2002. Functional relevance of soluble TNF- $\alpha$ , transmembrane TNF- $\alpha$  and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Z. Gastroenterol.* 40: 587–600.
38. Palladino, M. A., F. R. Bahjat, E. A. Theodorakis, and L. L. Moldawer. 2003. Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 736–746.
39. Plevy, S. E., C. J. Landers, J. Prehn, N. M. Carramanzana, R. L. Deem, D. Shealy, and S. R. Targan. 1997. A role for TNF- $\alpha$  and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J. Immunol.* 159: 6276–6282.
40. Alexopoulou, L., M. Pasparakis, and G. Kollias. 1997. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* 27: 2588–2592.
41. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 455–481.
42. Chintalacharuvu, S. R., J. X. Wang, J. M. Giaconia, and C. Venkataraman. 2005. An essential role for CCL3 in the development of collagen antibody-induced arthritis. *Immunol. Lett.* 100: 202–204.
43. Banks, C., A. Bateman, R. Payne, P. Johnson, and N. Sheron. 2003. Chemokine expression in IBD: mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pathol.* 199: 28–35.
44. Pender, S. L., V. Chance, C. V. Whiting, M. Buckley, M. Edwards, R. Pettiipher, and T. T. MacDonald. 2005. Systemic administration of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  exacerbates inflammatory bowel disease in a mouse model. *Gut* 54: 1114–1120.
45. Matejuk, A., J. Dwyer, A. Ito, Z. Bruender, A. A. Vandenbark, and H. Offner. 2002. Effects of cytokine deficiency on chemokine expression in CNS of mice with EAE. *J. Neurosci. Res.* 67: 680–688.

#### 4. Résultats complémentaires: les cellules T régulatrices (CD4+, CD25+, FoxP3+) régulent la réponse inflammatoire des souris C57BL/6 oralement infectées par *T. gondii*

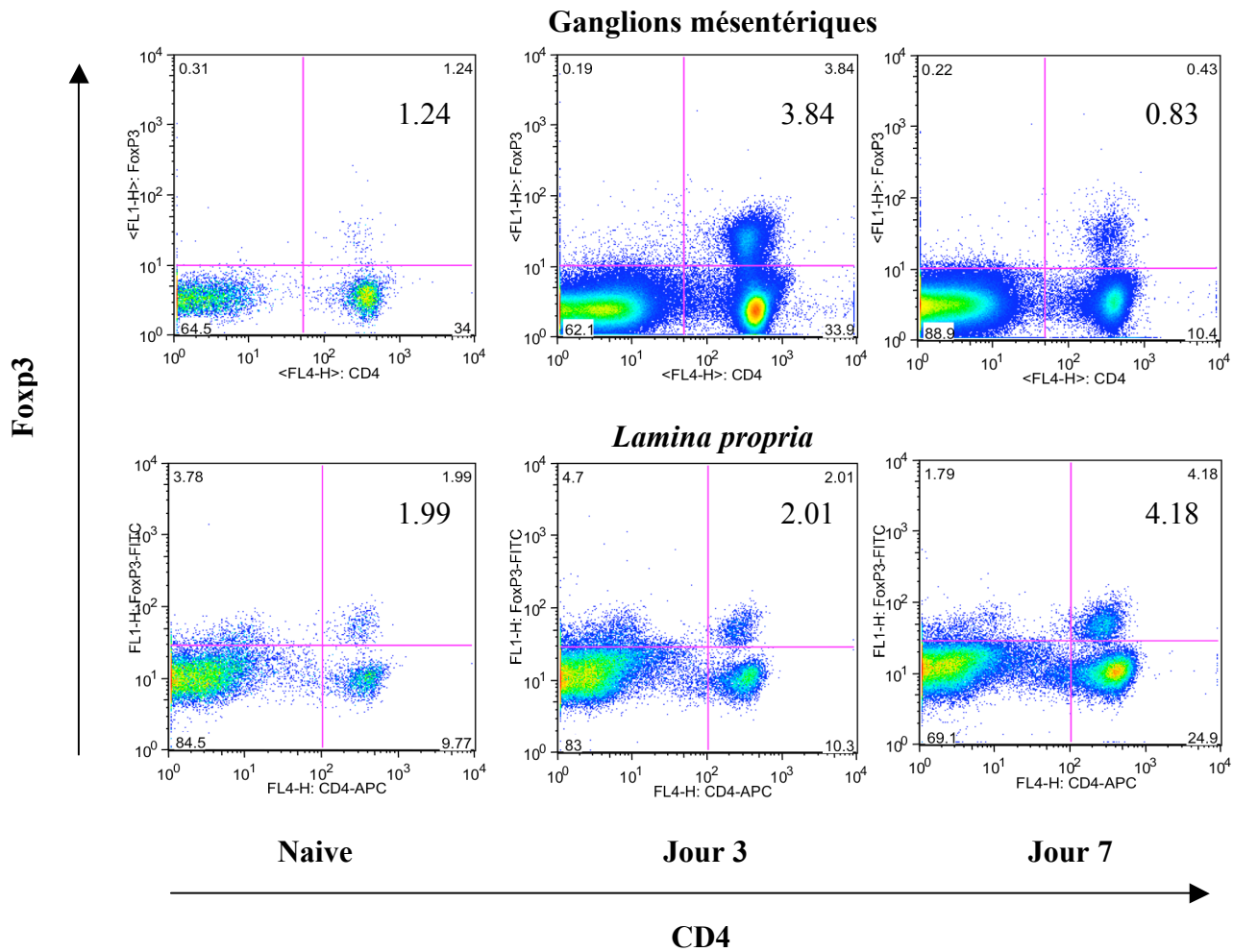
L'infection orale par *T. gondii* déclenche une réponse inflammatoire visant à éliminer les parasites. Les souris C57BL/6 sont incapables de réguler cette forte réponse inflammatoire et succombent 7 à 10 jours après infection d'une iléite. Des mécanismes régulateurs de la réponse inflammatoire sont cependant activés. Par exemple, les lymphocytes intra épithéliaux sont recrutés dans la *lamina propria* et tendent à limiter localement la production de cytokines Th1 par la production de TGF- $\beta$  {Luangsay, 2003}.

Les cellules T régulatrices (T regs) sont une population cellulaire essentielle pour la régulation de l'homéostasie du système immunitaire. La déplétion *in vivo* de ces cellules soit par des anticorps anti-CD25, soit par la création de souris Foxp3 KO, est corrélée à l'apparition de troubles auto-immuns systémiques. Par exemple, les descendants Foxp3 KO homozygotes de souris Scurfy développent des colites spontanées. La *lamina propria* est un site privilégié pour la génération des cellules T regs, ceci étant associé à la capacité des cellules dendritiques (et macrophages) à métaboliser la vitamine A en acide rétinoïque. Il a été montré *in vitro* que l'acide rétinoïque, bien que facultatif pour la génération des Tregs, stabilise l'expression de Foxp3 lors de la stimulation de cellules T CD4+ par de l'IL-2 et du TGF- $\beta$ .

Nous nous sommes demandé si les cellules T régulatrices pouvaient réguler l'homéostasie intestinale dans notre modèle d'iléite induit par l'infection orale de souris C57BL/6 par *T. gondii*. Nous avons d'une part quantifié la fréquence et étudié la migration de ces cellules lors de la phase aigue de l'infection. D'autre part, nous nous sommes demandé si, comme dans le cas des lymphocytes intraépithéliaux, les T regs requièrent une phase de sensibilisation par des antigènes de *T. gondii* avant infection pour parvenir à réguler l'homéostasie intestinale dans notre modèle.

#### 4.1. Les cellules T régulatrices sensibilisées générées lors de l'infection par *T. gondii* protègent les souris contre l'iléite

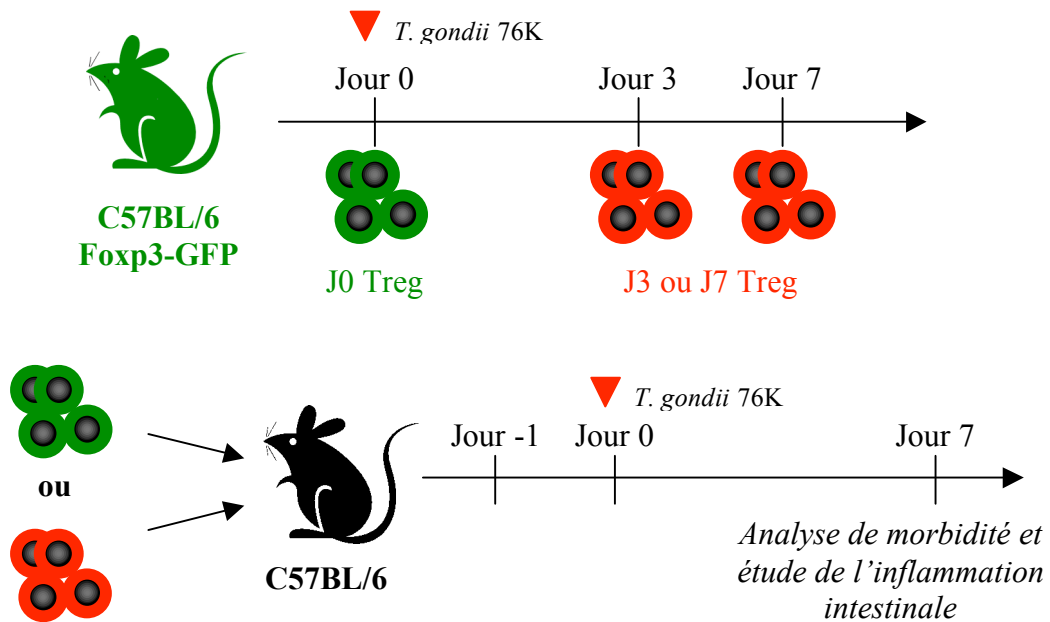
Nous avons dans un premier temps étudié la migration et/ou la génération des cellules T régulatrices dans le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale en réponse à l'infection orale par *T. gondii*. Pour ce faire, nous avons mesuré par FACS la fréquence des cellules T regs dans la *lamina propria* et les ganglions mésentériques 3 et 5 jours après infection chez les souris C57BL/6 conventionnelles. Nous avons observé que les cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> sont abondamment présentes dans les ganglions mésentériques 3 jours après infection puis dans la *lamina propria* 5 jours après infection. Ceci indique que des cellules T régulatrices sont activées soit directement dans l'intestin lors de la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*, soit dans les ganglions mésentériques. Ces cellules sont ensuite recrutées dans la *lamina propria* (**Résultats complémentaires ; figure A**).



**Figure A :** la fréquence des cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) augmente dans les ganglions mésentériques et la lamina propria de souris C57BL/6 lors de l'infection orale par *T. gondii*. Des souris C57BL/6 (8 par groupe) ont été infectées oralement avec *T. gondii* 76K, puis sacrifiées aux jours 3 et 5 après infection. L'expression des marqueurs CD4 et Foxp3 par les lymphocytes purifiés de la lamina propria et des ganglions mésentériques a été analysée par Facs.

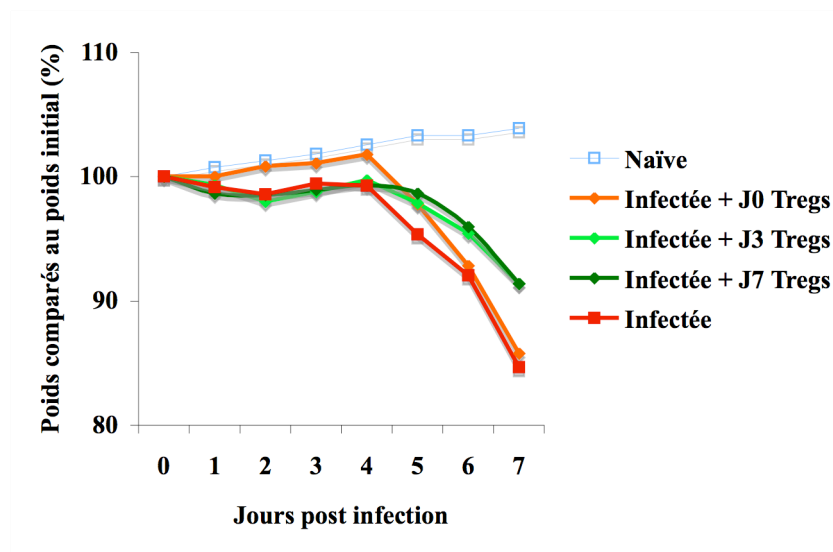


Bien que recrutant ou induisant dans la *lamina propria* des populations cellulaires immuno-régulatrices (lymphocytes intra-épithéliaux, cellules T régulatrices), les souris C57BL/6 succombent à l'iléite environ 10 jours après infection. Ces souris possèdent une forte expression constitutive de cytokines pro-inflammatoires de type Th1. Afin de clarifier le rôle des cellules T régulatrices nous avons réalisé des transferts de lymphocytes T regs, provenant de souris naïves ou aux jours 3 et 7 après infection, dans des souris C57BL/6. Les cellules T régulatrices transférées (1 million de Tregs par souris receveuse) ont été purifiées à partir des ganglions mésentériques et de la rate de souris Foxp3-GFP (Green Fluorescent Protein) (pureté supérieure à 98%). (**Résultats complémentaires ; figure B**). Les souris receveuses ont été infectées par *T. gondii* 24 heures après transfert.



**Figure B : protocole de transfert dans des souris receveuses C57BL/6 de cellules T régulatrices provenant de souris C57BL/6 Foxp3-GFP naïves (J0 Treg), 3 et 7 jours après infection orale par *T. gondii* 76K (J3, J7 Tregs).**

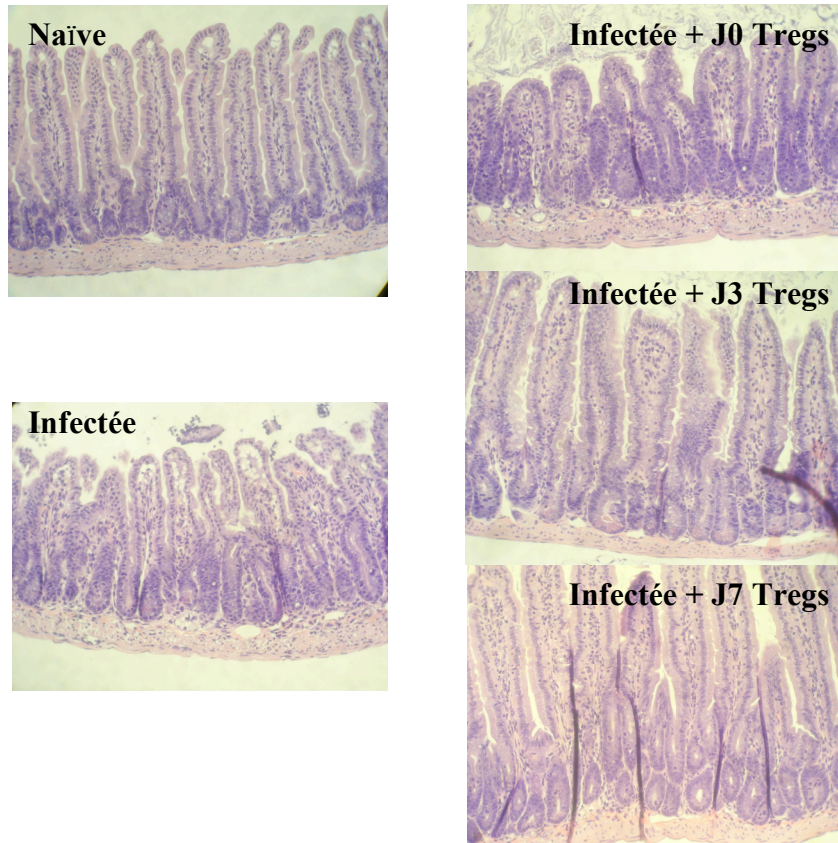
L'analyse de la morbidité des souris ayant reçu des lymphocytes T regs montre que la sensibilisation de ces cellules par des antigènes de *T. gondii* leur confère une activité protectrice. Ainsi, au même titre que les souris contrôles, les souris C57BL/6 infectées ayant reçu des T regs naïfs ont perdues 16% de leur masse corporelle à jour 7, leur perte de poids étant initiée au cinquième jours post-infection. Les souris ayant reçu des Tregs sensibilisés, issues de souris infectées (J3 ou J7), ont perdues seulement 9% de leur masse corporelle une semaine après infection et ont initié leur perte de poids avec un délai de 24 heures (**Résultats complémentaires ; figure C**).



**Figure C : les souris C57BL/6 infectées ayant reçu des cellules T régulatrices sensibilisées ont une morbidité réduite.** Des souris C57BL/6 (5 par groupes) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naturelles (J0) ou adaptative (J3, J7). Vingt-quatre heures après ce transfert adoptif, les souris ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K. La morbidité a été évaluée en mesurant la perte de poids.

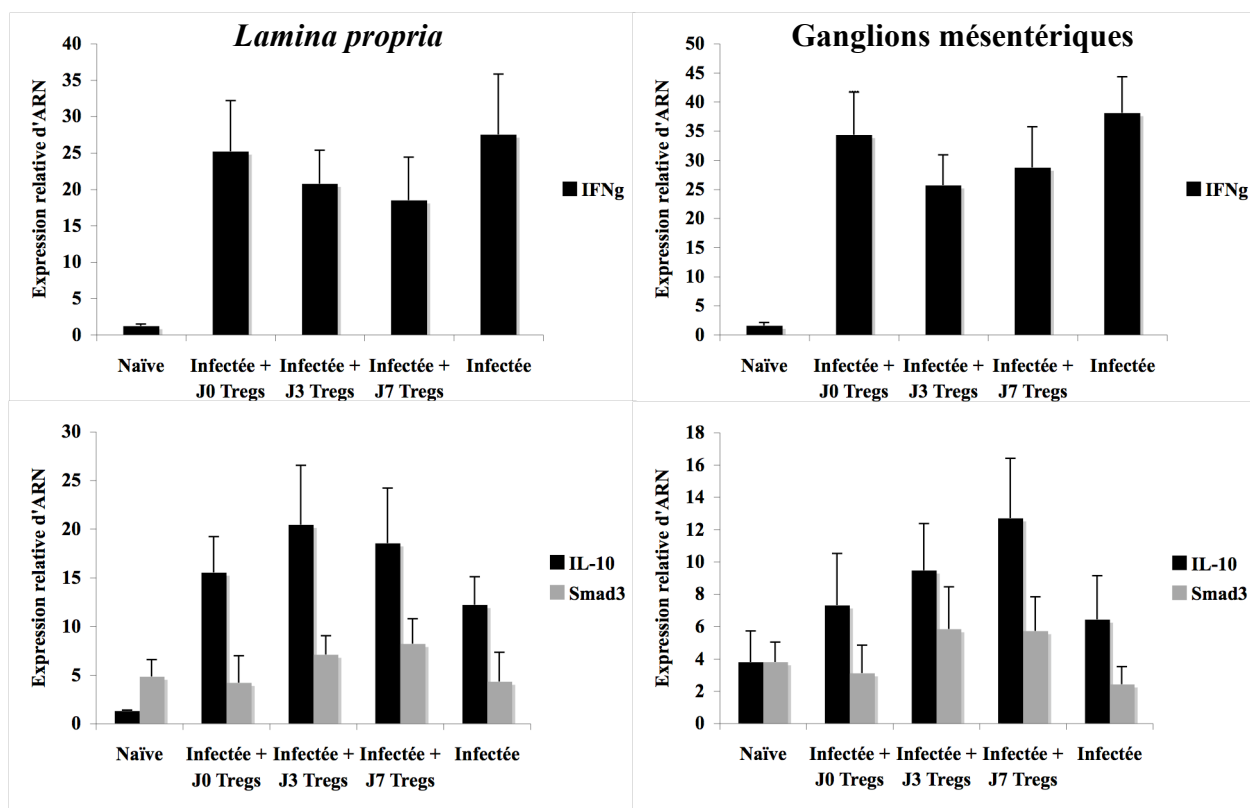
Nous avons réalisé des marquages H&E (Hematoxylyn & Emosoin) sur des coupes longitudinales d'intestin grêle afin de mesurer l'impact du transfert adoptif de T regs (sensibilisés ou non) sur l'infiltration leucocytaire de la *lamina propria* des souris C57BL/6 infectées. Sept jours après infection, les souris ayant reçu des T regs sensibilisés (J3 ou J7 Treg) montrent une nette réduction de la fréquence des leucocytes

recrutés dans la *lamina propria* et conservent des villosités intestinales intactes comparées aux souris contrôles ou ayant reçu des Tregs naïfs (**Résultats complémentaires ; figure D**). Ceci indique que l'injection de cellules T regs sensibilisées par des antigènes de *T. gondii* dans des souris C57BL/6 protège contre la rupture de l'intégrité de la barrière intestinale en réponse à l'infection orale par le parasite.



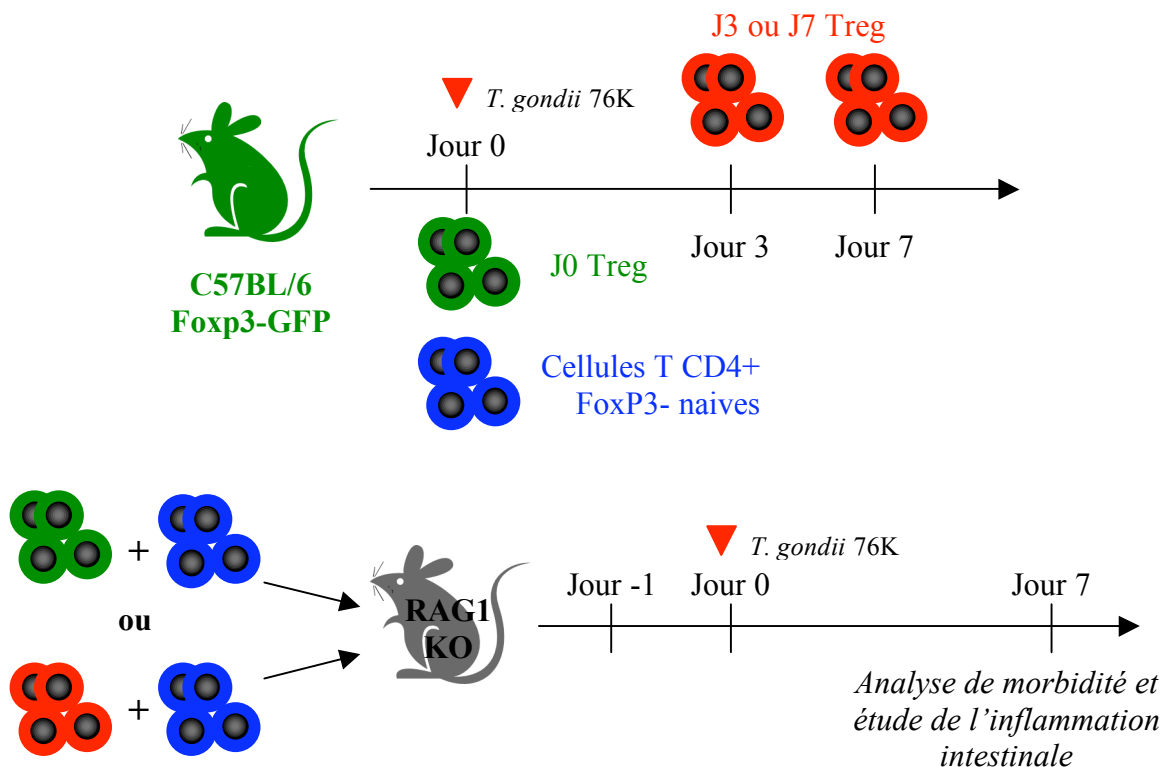
**Figure D : le transfert de T regs sensibilisés dans des souris C57BL/6 infectées protège contre la rupture de l'intégrité des villosités intestinales.** Des souris C57BL/6 (5 par groupes) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices issues de souris naïves (J0) ou infectées (J3, J7). Vingt-quatre heures après transfert, les souris receveuses ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, l'iléum a été prélevé pour réaliser des marquages H&E sur des coupes longitudinales afin d'étudier l'intégrité de la barrière intestinale.

Afin de mieux apprécier la protection apportée par les transferts de lymphocytes T regs, nous avons étudié la balance cytokinique dans la *lamina propria* et les ganglions mésentériques des souris C57BL/6 infectées. Bien que des différences phénotypiques aient été précédemment observées entre les souris contrôles ou ayant reçu des T regs sensibilisés, aucune variation significative d'expression des cytokines Th1, Th2 et Th3 n'a été mesurée parmi les lymphocytes purifiés de ces différents groupes. Une semaine après infection, nous avons toutefois observé que seuls les lymphocytes purifiés de la *lamina propria* et des ganglions mésentériques des souris receveuses de T regs sensibilisés (J3 ou J7) présentent une diminution de production d'IFN- $\gamma$  (marqueur Th1), corrélée à une plus forte transcription des gènes codant pour l'IL-10 (marqueur Th2) et Smad3 (marqueur Th3), comparés aux lymphocytes purifiés des souris contrôles (**Résultats complémentaires ; figure E**).



**Figure E :** après infection, les souris C57BL/6 receveuses de cellules T regs sensibilisées présentent une diminution de réponse Th1 corrélée à une augmentation des réponses Th2 et Th3. Des souris C57BL/6 (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naïves (J0) ou sensibilisées (J3, J7). Vingt-quatre heures après transfert, les souris ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, les cellules de la lamina propria ont été purifiées et les ganglions mésentériques prélevés pour mesurer l'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10 et Smad3 par PCR quantitative en temps réel.

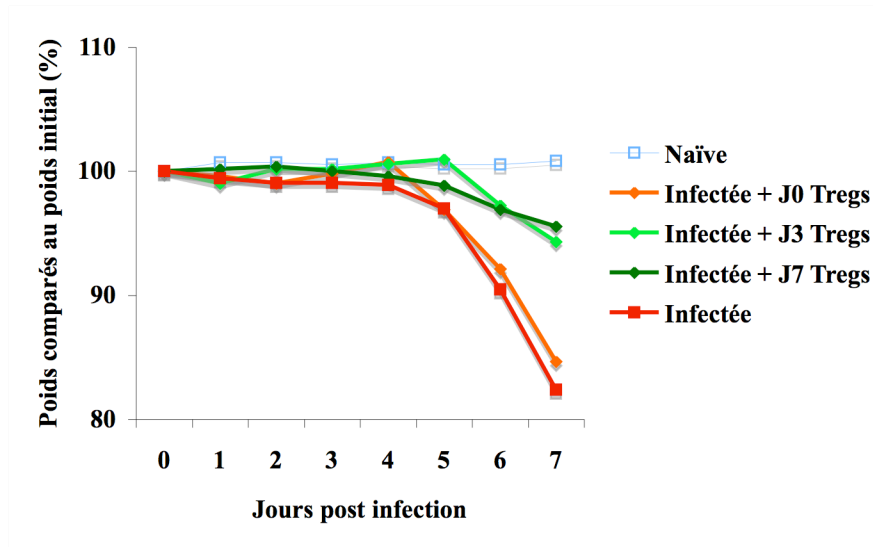
Dans le but de confirmer le rôle protecteur des cellules T régulatrices générées en réponse à l'infection par *T. gondii* dans le modèle murin, nous avons utilisé des souris RAG1 KO ne produisant pas de cellules T. Ce modèle nous a permis de nous affranchir de la forte expression constitutive et systémique de cytokines Th1 avant infection. Nous avons réalisé des co-transferts de cellules T CD4+ naïves (2 millions de cellules par souris) avec des lymphocytes T regs naïfs ou sensibilisés (1 million de cellules par souris) dans les souris RAG1 KO un jour avant infection. Les cellules T régulatrices proviennent des rates et ganglions mésentériques de souris Foxp3-GFP (pureté supérieure à 98%) (Résultats complémentaires ; figure F).



**Figure F :** protocole de co-transfert de cellules T régulatrices et de cellules T effectrices (ratio 1:2) purifiées de souris C57BL/6 Foxp3-GFP naïves (J0 Treg), ou 3 et 7 jours après infection (J3, J7 Tregs), dans des souris RAG1 KO receveuses.

L'analyse du phénotype des souris RAG1 KO ayant reçu un co-transfert de cellules T effectrices naïves et de Treg (J0, J3 ou J7) corrobore nos observations faites lors de l'étude du modèle C57BL/6.

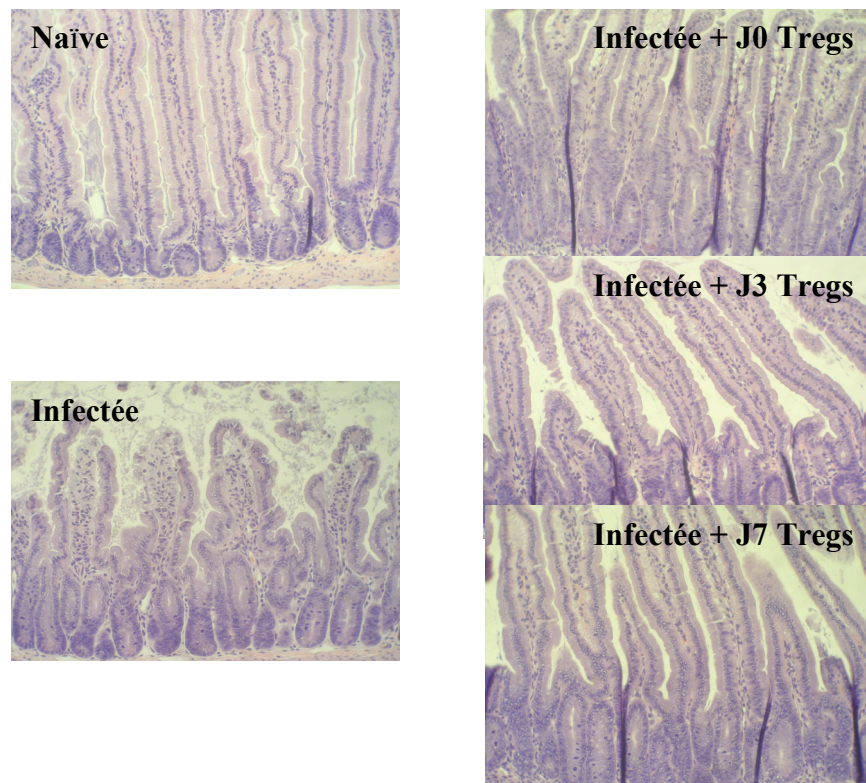
Ainsi, les souris RAG1 KO transférées par des T regs sensibilisés ont une perte de poids limitée lors de l'infection (5% de réduction de masse corporelle à jour 7 post-infection) comparées aux souris infectées contrôles (18% de réduction de masse corporelle) (**Résultats complémentaires ; figure G**). Ceci confirme le rôle protecteur des T regs sensibilisés contre l'iléite intestinale développée par les souris C57BL/6 (ou RAG1 KO transférées par des cellules T effectrices naïves).



**Figure G :** la perte de poids des souris RAG1 KO ayant reçu des cellules T régulatrices sensibilisées est réduite lors de l'infection orale par *T. gondii* comparée à celle des souris contrôles. Des souris RAG1 KO (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naïves (J0) ou sensibilisées (J3, J7) avec 2 millions de cellules CD4 T effectrices naïves. Vingt-quatre heures après transfert, les souris ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K. La perte de poids a été mesurée quotidiennement.



Les marquages H&E de coupes transversales d'intestin nous ont montrés que les souris RAG1 KO infectées (jour 7 post-infection), receveuses de cellules T effectrices et de T regs sensibilisés, ont une infiltration leucocytaire de faible amplitude dans la *lamina propria* (**Résultats complémentaires ; figure H**). Ceci est corrélé à une conservation de l'intégrité intestinale, phénotype non observé chez les souris RAG1 KO contrôles. Nous avons par ailleurs observé dans ce modèle que les T regs naïfs limitent également l'infiltration leucocytaire intestinale mais dans des proportions moindres que les T regs sensibilisés (**Résultats complémentaires ; figure H**).

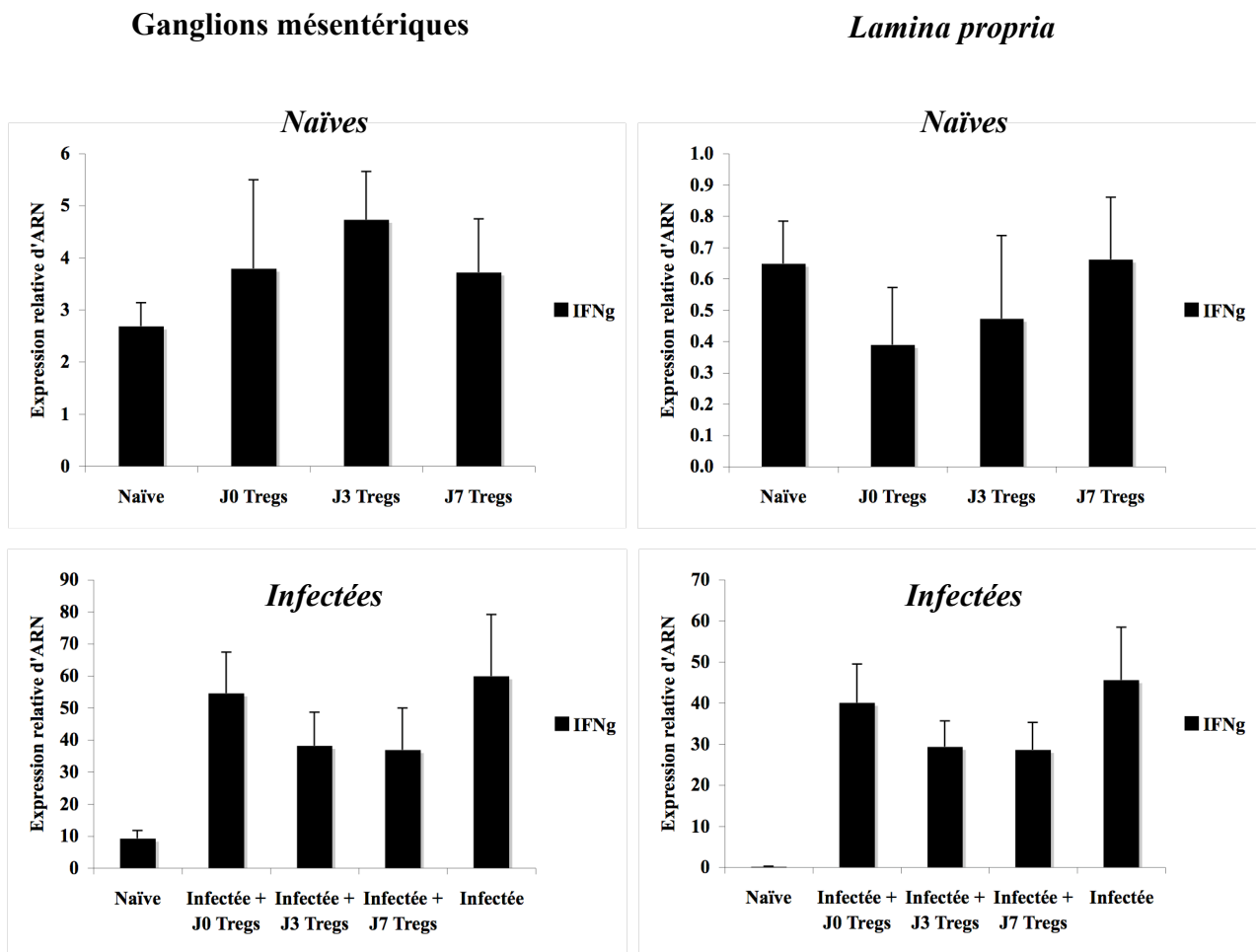


**Figure H : l'intégrité des villosités intestinales des souris RAG1 KO infectées ayant reçu des cellules T regs sensibilisées est conservée.** Des souris RAG1 KO (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naïves (J0) ou sensibilisés (J3, J7) avec 2 millions de cellules T effectrices naïves. Vingt-quatre heures après transfert, les souris ont été infectées oralement avec *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, l'iléum de ces souris a été prélevé pour effectuer un marquage H&E (Hematoxylyn & Emosoïn) sur des coupes longitudinales afin d'observer l'intégrité de la barrière intestinale.



Le modèle RAG1 KO co-transféré avec des lymphocytes T effecteurs naïfs et des T regs (sensibilisés ou non) nous a permis de mettre en évidence des différences du profil cytokinique des souris receveuses en absence de stimulus infectieux ou 7 jours après infection.

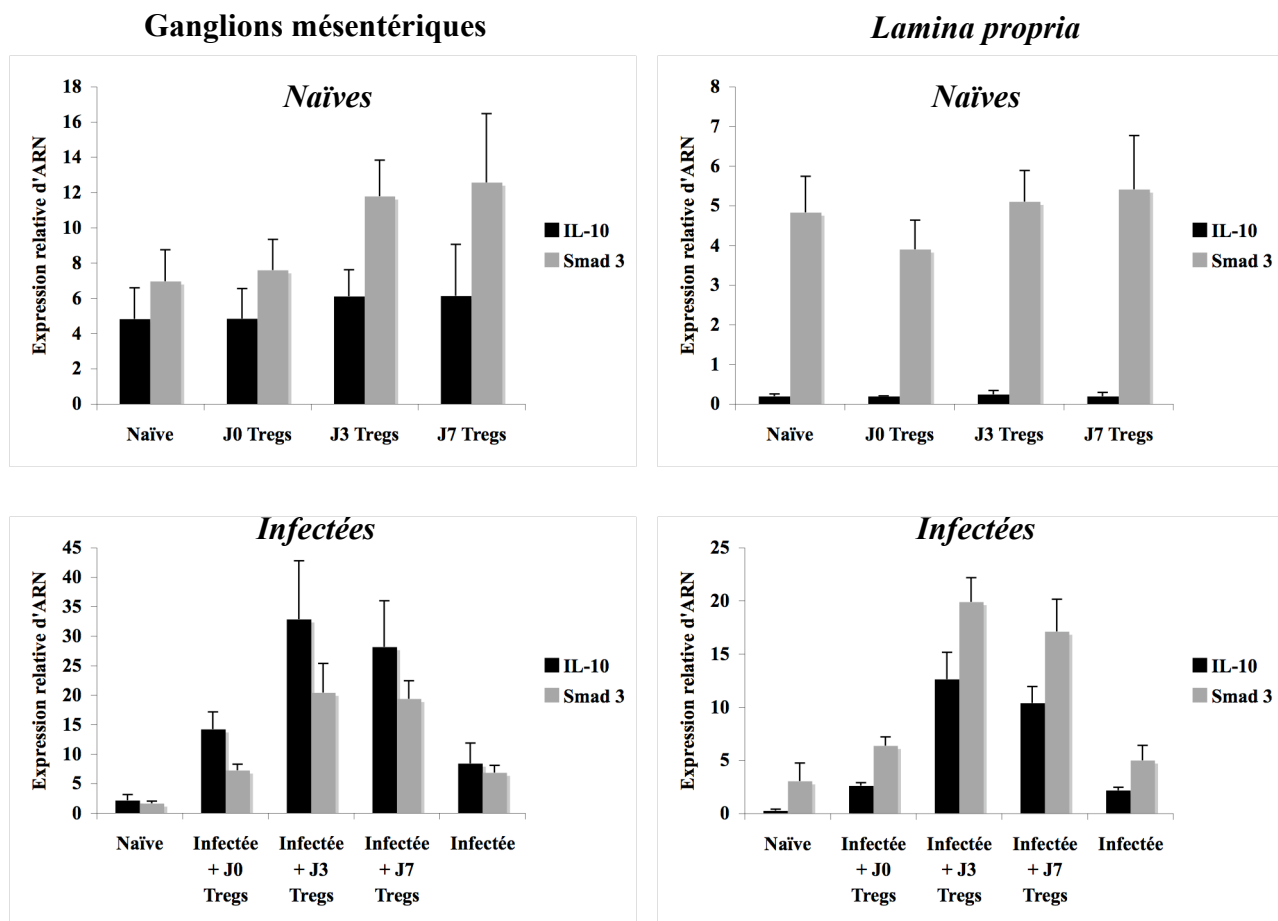
Nous avons mesuré la transcription des gènes codant pour l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes purifiés des ganglions mésentériques et de *la lamina propria* des souris RAG1 KO receveuses. En absence de stimulus infectieux, nous avons observé que le transfert de T regs naïfs ou sensibilisés ne modifie pas significativement le profil Th1 dans ces deux compartiments cellulaires. En revanche, une semaine après infection, les lymphocytes purifiés de l'intestin de souris RAG1 KO receveuses de T regs sensibilisés montrent une nette réduction ( $p < 0.005$ ) d'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  comparées aux souris ayant reçu ou non des T regs naïfs (**Résultats complémentaires ; figure I**). Une tendance similaire a été observée lors de l'analyse par PCR quantitative en temps réel des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  et le facteur de transcription T-bet (marqueurs Th1). À la différence du modèle C57BL/6 décrit précédemment, le modèle RAG1 KO nous a permis de confirmer à l'échelle moléculaire le rôle anti-inflammatoire des T regs sensibilisés.



**Figure I : les souris *RAG1* KO infectées ayant reçu des cellules *T* régulatrices sensibilisées ont une diminution significative de la réponse *Th1*. Des souris *RAG1* KO (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules *T* régulatrices naïves (J0) ou sensibilisées (J3, J7) et 2 millions de cellules *T* effectrices naïves. Vingt-quatre heures après ce transfert adoptif, les souris ont été infectées oralement par *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, les cellules de la lamina propria ont été purifiées et les ganglions mésentériques prélevés pour mesurer l'expression des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  par PCR quantitative en temps réel.**

Afin de compléter l'étude du profil cytokinique des souris RAG1 KO receveuses, nous avons mesuré l'expression de ARNm codant pour des marqueurs Th2 (IL-10, IL-13) et Th3 (Smad2, Smad3) par leurs lymphocytes intestinaux.

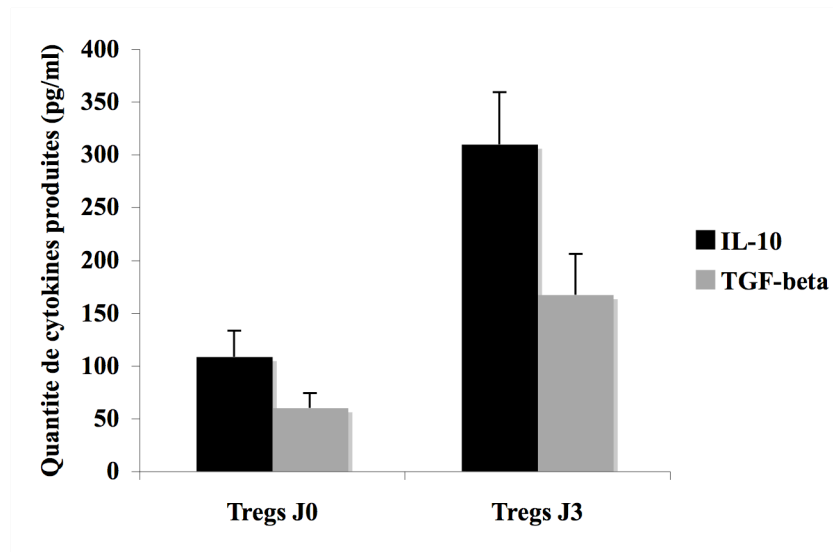
Alors que l'effet des T regs naïfs est neutre vis-à-vis de l'expression de ces cytokines immuno-régulatrices, nous avons observé une augmentation significative ( $p < 0.005$ ) de leur expression dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale des souris RAG1 KO naïves ayant reçu des Tregs sensibilisés en complément des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices. L'expression d'IL-10 et Smad3 est par ailleurs maintenue à un taux significativement plus élevé ( $P < 0.001$ ) dans la *lamina propria* des souris RAG1 KO receveuses de cellules T regs sensibilisés (**Résultats complémentaires ; figure J**). Ceci confirme le rôle immuno-modulateurs des cellules T régulatrices sensibilisées par des antigènes de *T. gondii* face à la réponse inflammatoire développée en réponse à l'infection. La production des cytokines de type anti-inflammatoire par les T regs et leur action régulatrice sur la production d'IFN- $\gamma$  pourrait participer à la diminution des effets physiopathologiques engendrés par une trop forte réponse de type Th1 chez les souris C57BL/6.



**Figure J :** l'expression des cytokines Th2 et Th3 est significativement augmentée, avant et après infection par *T. gondii*, chez les souris RAG1 KO ayant des Treg sensibilisés. Des souris RAG1 KO (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naturelles (J0) ou adaptative (J3, J7) et 2 millions de cellules T effectrices naïves. Vingt-quatre heures après ce transfert adoptif, les souris ont été infectées oralement avec 35 kystes de *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, les cellules de la lamina propria ont été purifiées et les ganglions mésentériques prélevés pour mesurer l'expression des ARNm codant pour l'IL-10 et Smad3 par PCR quantitative en temps réel.

#### 4.2. Les cellules T régulatrices sensibilisées expriment des marqueurs de trafic intestinal et produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$

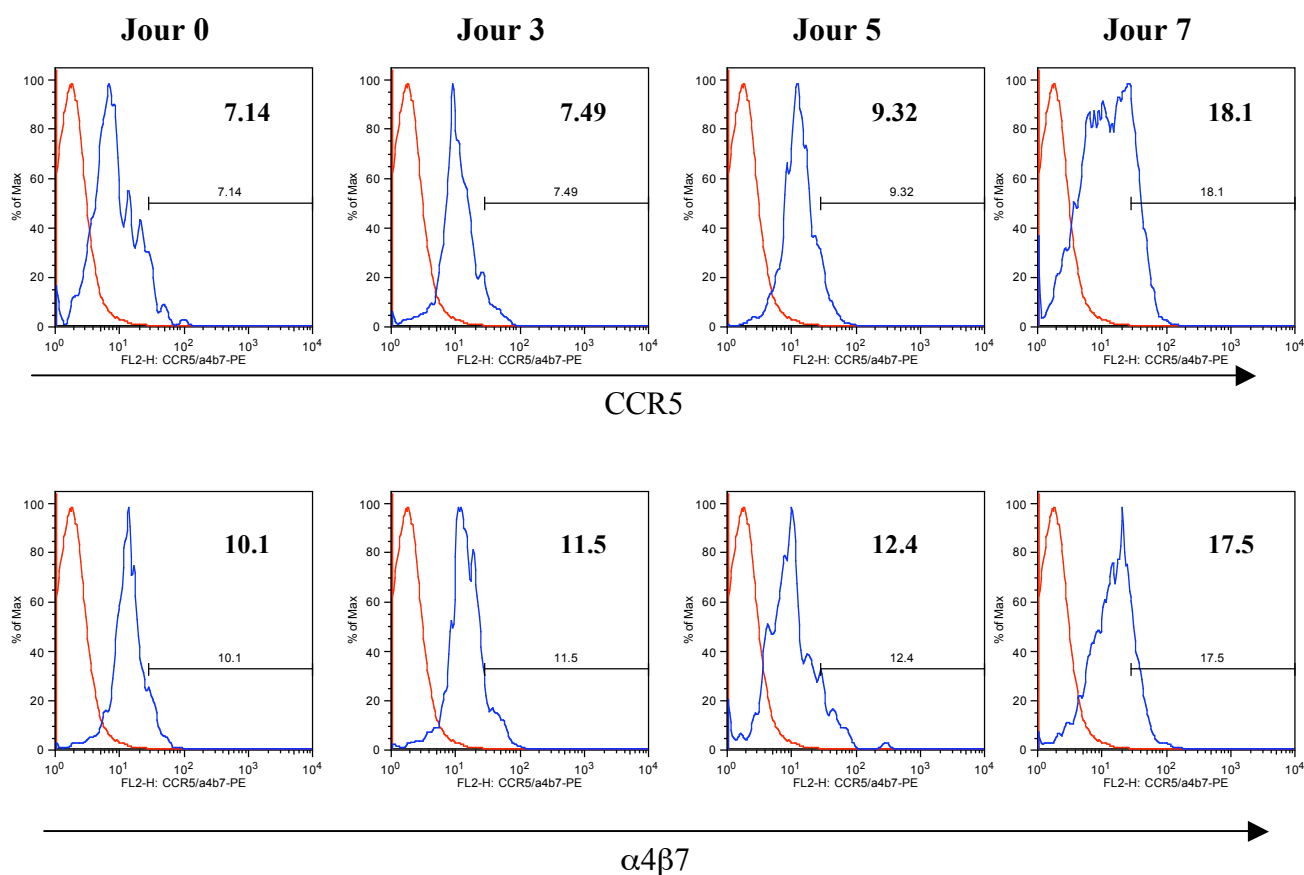
Les cellules T régulatrices possèdent un mécanisme paracrine de régulation de la réponse immunitaire par la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Nous avons cherché à définir si les différences phénotypiques observées entre les souris RAG1 KO mais aussi C57BL/6, ayant reçu des T regs naïfs ou sensibilisés, sont liées à une variation de production de cytokines immuno-régulatrices par ces cellules. Nous avons placé en culture des cellules T regs purifiées de la rate et des ganglions mésentériques de souris Foxp3-GFP naïves ou 3 jours après infection (pureté supérieure à 98%). Ces cellules ont été cultivées 24h en milieu complet contenant de l'IL-2 et re-stimulées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD25. Les concentrations d'IL-10 et de TGF- $\beta$  contenus dans les surnageants de cultures ont ensuite été mesurées par ELISA. Nous avons observé que les T regs sensibilisés, purifiés de souris infectées par *T. gondii*, sécrètent 3 à 4 fois plus d'IL-10 et de TGF- $\beta$  que les T regs provenant de souris naïves ( $p < 0.001$ ) (**Résultats complémentaires ; figure K**). Ceci indique que la sensibilisation des lymphocytes T regs par des antigènes de *T. gondii* stimule leur production intrinsèque de cytokines immuno-régulatrices induisant un biais vers un profil Th2/Th3 dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale des souris receveuses.



**Figure K : les cellules T régulatrices sensibilisées (J3) produisent significativement d'avantage d'IL-10 et de TGF- $\beta$  in vitro, comparées aux cellules T regs naïves.** Des cellules T régulatrices ont été purifiées de la rate et des ganglions mésentériques de souris C57BL/6 Foxp3-GFP, infectées ou non, puis placées en culture 24 heures ( $5 \cdot 10^5$  cellules par puits) et re-stimulées par des anticorps anti-CD3 / anti-CD25. La concentration des cytokines Th2 (IL-10) et Th3 (TGF- $\beta$ ) a été mesurée par ELISA.

Les cellules T régulatrices inhibent spécifiquement la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> et leur production de cytokines Th1 par des mécanismes contact dépendants. Ceci implique un recrutement des T regs aux sites inflammés pour pouvoir exercer leur activité immuno-régulatrice. Des études réalisées *in vivo* chez la souris et *in vitro* ont montré que l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et le récepteur aux chimiokines CCR5 contribue au trafic des cellules T effectrices, des cellules B activées mais aussi des cellules T régulatrices de la périphérie vers la *lamina propria*.

Nous avons observé une diminution de la fréquence des leucocytes recrutés ou ayant proliféré dans la *lamina propria* des souris RAG1 KO ou C57BL/6 transférées avec des T regs sensibilisés (**Résultats complémentaires ; figures D et H**). Afin de corrélérer ce phénotype à une plus grande propension des Treg à se re-localiser au site primaire de l'infection par *T. gondii*, nous avons mesuré par FACS l'expression de marqueurs de domiciliation vers la *lamina propria* par les T regs contenus dans la circulation sanguine de souris C57BL/6 Foxp3-GFP infectées oralement par le parasite. Nous avons observé que l'expression de CCR5 et  $\alpha 4\beta 7$  par les lymphocytes T regs augmente graduellement au cours de l'infection. Trois jours après infection, nous avons mesuré une augmentation de l'expression des marqueurs CCR5 (phénotype reproductible bien que non significatif) et  $\alpha 4\beta 7$  ( $p < 0.005$ ) par les T regs de la circulation sanguine des souris C57BL/6. Aux jours 5 et 7 post-infection, l'expression de ces marqueurs de domiciliation intestinale continue à augmenter de façon graduelle ( $p < 0.001$ ) (**Résultats complémentaires ; figure L**). Ceci indique que les cellules T regs générées lors de l'infection par le toxoplasme acquièrent une capacité accrue à se re-localiser dans la *lamina propria* au cours de l'infection

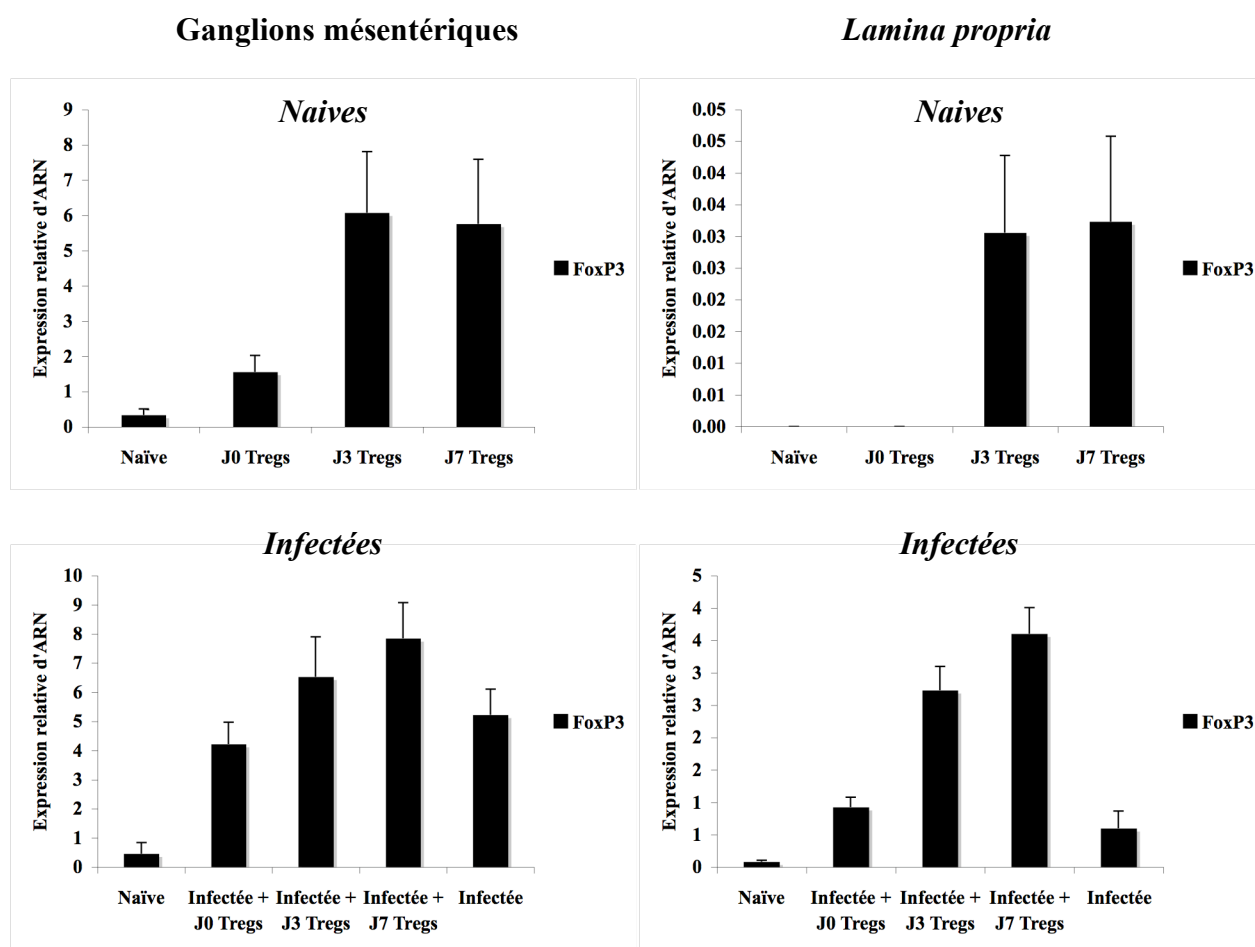


**Figure L : l'expression de marqueurs de domiciliation intestinale par les cellules T régulatrices circulant en périphérie augmentent graduellement au cours de l'infection de l'infection par *T. gondii*.** Les leucocytes sanguins de souris C57BL/6 *Foxp3*-GFP ont été purifiés et analysés par Facs (1.5\*10<sup>6</sup> évènements par groupes et marquages étudiés). Afin d'identifier la population de cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, *Foxp3*<sup>+</sup>) nous avons marqué les leucocytes purifiés avec des anticorps CD4-APC et CD25-PECy5. Des anticorps CCR5-PE ou α4β7-PE ont été utilisés pour étudier l'expression de ces marqueurs de domiciliation intestinale.



Afin de confirmer la re-localisation des cellules T régulatrices transférées dans le modèle RAG1 KO, nous avons mesuré par PCR quantitative en temps réel l'expression des ARNm codant pour Foxp3, huit jours après transfert adoptif des Treg, chez les souris receveuses naïves ou infectées (**Résultats complémentaires ; figure F**). En absence de stimulus infectieux, nous avons observé que les ARNm codant pour Foxp3 ne sont pas, ou peu, exprimés par les lymphocytes purifiés des ganglions mésentériques des souris RAG1 KO receveuses de T regs naïfs. En revanche, chez les souris ayant reçu des cellules T regs sensibilisées, des ARNm codant pour Foxp3 sont détectés lors des PCR quantitatives en temps réel dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale des souris receveuses. Ceci indique qu'à la différence des lymphocytes T reg naïfs, les T regs sensibilisés injectés se re-localisent préférentiellement dans ce compartiment chez les souris receveuses avant infection par *T. gondii* (**Résultats complémentaires ; figure M**).

Sept jours après infection, l'expression de Foxp3 par les lymphocytes purifiés des ganglions mésentériques et de la *lamina propria* est significativement supérieure (respectivement  $p < 0.005$  et  $p < 0.001$ ) chez les souris RAG1 KO ayant reçu des T regs sensibilisés (J7) comparées au souris infectées contrôles (**Résultats complémentaires ; figure M**). Ceci confirme la capacité accrue des T regs sensibilisés à se domicilier aux sites primaires de l'infection par *T. gondii*.



**Figure M :** en absence ou en présence de stimulus infectieux par *T. gondii*, l'expression des ARNm codant pour *Foxp3* est supérieure, dans les ganglions mésentériques et la lamina propria des souris RAG1 receveuses de T regs sensibilisés comparées aux souris ayant reçu des Tregs naïfs. Des souris RAG1 KO (5 par groupe) ont reçu 1 million de cellules T régulatrices naturelles (J0) ou adaptative (J3, J7) avec 2 millions de cellules T effectrices naïves. Vingt-quatre heures après transfert, les souris ont été infectées oralement avec *T. gondii* 76K. Une semaine après infection, les cellules de la lamina propria ont été purifiées et les ganglions mésentériques prélevés pour mesurer l'expression des ARNm codant pour *Foxp3* par PCR quantitative en temps réel.

Ainsi, nous avons montré que les cellules T régulatrices interviennent dans la réponse immunitaire au toxoplasme. Lors de la phase aigue de l'infection, des T regs sont générés et vont préférentiellement se domicilier au site primaire de l'infection : la *lamina propria*. Ce mécanisme de domiciliation des T regs implique l'augmentation de l'expression à leur surface membranaire de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et du récepteur aux chimiokines CCR5. Les cellules T regs générées et/ou recrutées dans la *lamina propria* ont de plus une expression accrue de cytokines immuno-régulatrices de type Th2 et Th3. Ceci permet aux Treg sensibilisés par *T. gondii* d'exercer une activité protectrice contre l'iléite intestinale lorsqu'ils sont introduit par transfert adoptif avant infection orale par le toxoplasme.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lors de l'infection orale par le parasite *T. gondii*, la réponse immunitaire intestinale est un processus dynamique médié par des mécanismes cellulaires et moléculaires initiant et/ou régulant l'inflammation. Les différents acteurs de la réponse immunitaire interagissent entre eux à la fois pour combattre l'infection et pour contrôler la réponse inflammatoire

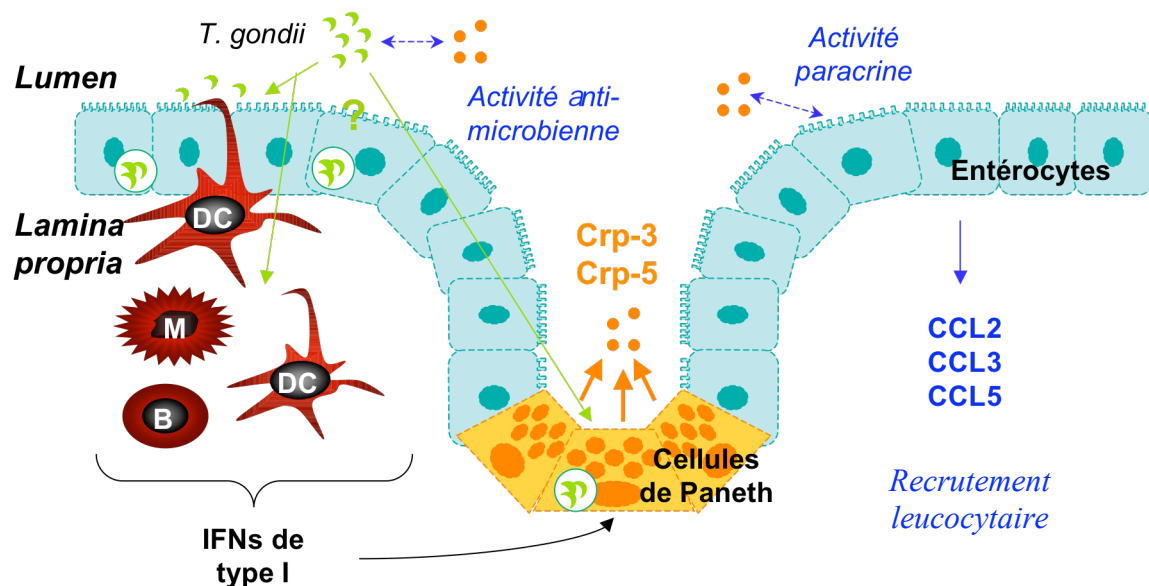
### 1- Initiation de la réponse immunitaire contre *T. gondii* par TLR9

L'activation des voies de signalisation TLR9 par le toxoplasme est une étape clé pour l'initiation de la réponse immunitaire de l'intestin. Dans ce modèle, la microflore intestinale joue un rôle amplificateur de la réponse inflammatoire, conduisant à une iléite létale, mais n'est pas requise pour l'activation du TLR9. L'engagement du TLR9 par *T. gondii* induit notamment la production d'IFNs de type I  $\alpha$  et  $\beta$  par les cellules de la barrière intestinale (compartiment non hématopoïétique) et par les leucocytes de la *lamina propria* (compartiment hématopoïétique). Il en résulte une infiltration massive de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN- $\gamma$  dans l'intestin luttant contre la prolifération et la dissémination du parasite. L'agoniste du TLR9 présenté par *T. gondii* n'a cependant pas été identifié à ce jour (voir perspective 1 : caractérisation de l'agoniste TLR9 présenté par *T. gondii*).

Dans la *lamina propria*, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques expriment constitutivement le TLR9 et modulent ses voies de signalisation lors d'infections microbiennes. À la différence des cellules dendritiques, les cellules B ont un faible pouvoir initiateur de la réponse immunitaire contre le toxoplasme (voir perspective 2 : rôle des macrophages dans l'initiation de la réponse immunitaire contre *T. gondii*). L'engagement du TLR9 consécutivement à l'infection orale par *T. gondii* induit le recrutement ou la prolifération des cellules dendritiques, à la fois plasmacytoïdes (pDCs) et myéloïdes (mDCs), dans l'intestin. Le TLR9 intervient également dans la fonctionnalité des cellules dendritiques, puisque l'activation des voies de signalisation sous-jacentes polarise la réponse immunitaire intestinale contre *T. gondii* vers un profil de type Th1. La réponse inflammatoire, initiée par les cellules dendritiques suivant des

mécanismes TLR9-dépendant, fait probablement intervenir des facteurs solubles de l'inflammation comme l'IL-12 et les IFNs de type I (voir perspective 3 : rôles des IFNs de type I  $\alpha$  et  $\beta$  dans la polarisation de la réponse immunitaire contre le toxoplasme).

Les d'IFNs de type I renforcent par ailleurs l'activité des cellules de Paneth présentes dans l'épithélium intestinal. Durant la phase précoce de l'infection par *T. gondii*, la transcription des Cryptdines (Crp-3 et -5) augmente dans ces cellules qui les sécrètent dans la lumière intestinale, en réponse à la stimulation par les IFNs  $\alpha$  et  $\beta$  issus de l'activation des voies de signalisation TLR9. Les Cryptdines limitent la pénétration du toxoplasme dans l'intestin en renforçant la réponse inflammatoire intestinale notamment par la production des chimiokines CCL2, CCL3 et CCL5 par les entérocytes.



*Schéma théorique de la séquence des évènements aboutissant à la libération des Cryptdines dans la lumière intestinale en réponse à l'infection orale par *T. gondii*.*

### **Perspective 1 : caractérisation de l'agoniste TLR9 présenté par *T. gondii***

Les protéines membranaires (SAGs) et sécrétés (ROPs, MICs) du toxoplasme, intervenant dans l'adhésion et l'invasions des cellules cibles, conditionnent sa virulence. De plus, les mutants de *T. gondii* RH  $\Delta$ SAG1,  $\Delta$ ROP16 ou  $\Delta$ MIC5 induisent une réponse inflammatoire de faible amplitude comparée à la souche sauvage {Rachinel, 2004} {Saeij, 2007} {Nischik, 2001}. SAG1 serait liés directement au développement de l'iléite intestinale après infection orale de souris C57BL/6 {Rachinel, 2004}.

Étant donné que *T. gondii* active directement les voies de signalisation TLR9 sans interventions de la flore intestinale, l'un des antigènes du toxoplasme pourrait donc être un agoniste du TLR9. Nous proposons d'étudier *in vitro* l'activation des voies de signalisation TLR9 de cellules HEK293, transfectées par ce récepteur, cultivées avec des souches de *T. gondii* RH mutantes  $\Delta$ SAG1-3,  $\Delta$ ROP16-18 et  $\Delta$ MIC1-7. Le traitement de ces mêmes cellules HEK293 par des fractions HPLC d'antigène soluble de *T. gondii* pourrait être une alternative pour identifier un agoniste du TLR9 exprimé par le toxoplasme dans le cas où notre banque de mutants serait insuffisante.

### **Perspective 2 : rôle des macrophages dans l'initiation de la réponse immunitaire à *T. gondii***

Nous avons étudié le rôle du TLR9 des cellules B et des cellules dendritiques dans l'initiation de la réponse immunitaire au toxoplasme. Les lymphocytes B n'interviennent pas dans ce processus. L'analyse de la réponse inflammatoire chez des souris doubles-chimères ayant une déplétion du TLR9, spécifiquement les cellules dendritiques (CD11c+), nous a permis d'identifier un rôle prépondérant de ces cellules dans l'initiation d'une réponse inflammatoire efficace. Cependant, la protection contre l'iléite dans ce modèle reste partielle comparée à ce que nous avons observé chez les souris TLR9 KO, suggérant l'intervention d'autres cellules.

Il a été montré que les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigène exprimant le TLR9. L'une des questions qui se pose est de savoir si les macrophages participent à l'initiation de la réponse immunitaire contre *T. gondii* par des mécanismes TLR9-dépendants. Nous projetons d'utiliser des souris C57BL/6 CD11b-DTR, dont les macrophages (CD11b+) peuvent être déplétés avec un traitement intra péritonéal de toxine diphtérique, et des souris TLR9 KO, pour réaliser des doubles-chimères possédant uniquement des macrophages n'exprimant pas le TLR9. Ce modèle nous permettra de mesurer l'intensité de la réponse immunitaire intestinale après infection orale par le parasite, et d'étudier l'impact sur la génération de l'iléite de la déplétion spécifique du TLR9 dans la population de macrophages.

### **Perspective 3 : rôle des IFNs de type I $\alpha$ et $\beta$ dans la polarisation de la réponse immunitaire contre le toxoplasme**

La population des cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) est la plus fortement altérée lors de l'infection de souris TLR9 KO par le toxoplasme. Parmi les cellules présentatrices d'antigène exprimant le TLR9, les pDCs (ou IPC – Interferons-Producing Cells) ont été identifiées comme étant les principales cellules productrices d'IFNs de type I en réponse à la stimulation des voies de signalisations TLRs {Svensson, 1996}.

Nous souhaitons étudier le rôle des IFNs de type I  $\alpha$  et  $\beta$  dans la stimulation d'une réponse inflammatoire contre *T. gondii*, mais aussi dans la génération de l'iléite. Les IFNs de type I partagent un unique récepteur IFNAR. Nous projetons d'infecter oralement par *T. gondii* des souris C57BL/6 IFNAR KO, de mesurer l'infiltration leucocytaire dans la *lamina propria* et de caractériser le phénotype de ces cellules (profil cytokinique et marqueurs de domiciliation). Afin de confirmer les résultats obtenus dans le modèle IFNAR KO, nous allons traiter des souris C57BL/6 sauvages avec des anticorps neutralisant anti-IFN- $\alpha$  (1-3) et anti-IFN- $\beta$  pour répéter l'analyse de la réponse inflammatoire intestinale. Enfin, pour connaître l'impact des IFNs de type I dans la génération de l'iléite, nous allons traiter quotidiennement des souris Balb/c et CBA/J avec de fortes doses d'IFN- $\beta$  murin et étudier la régulation de l'homéostasie intestinale



chez ces souris qui sont naturellement résistantes au développement de l'inflammation intestinale après infection avec le parasite.

## **2- Amplification de la réponse inflammatoire par les cellules B et activité immuno-régulatrices des T regs**

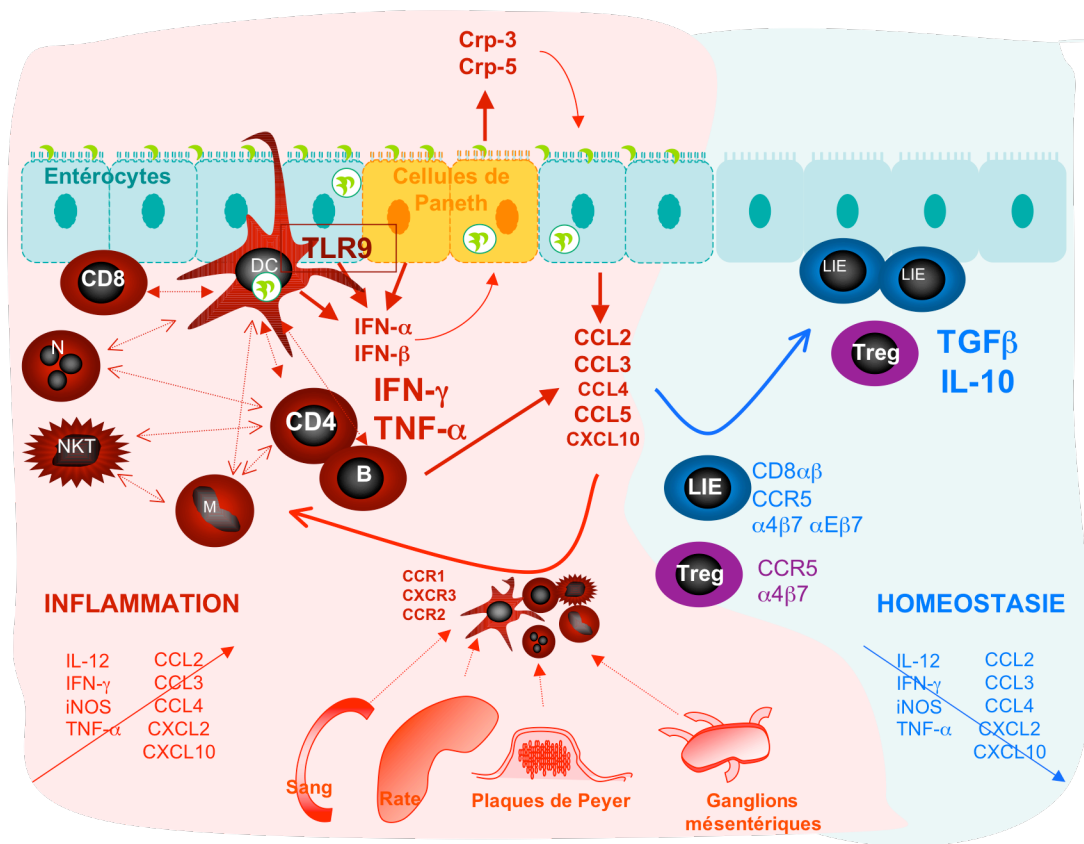
La sensibilisation des cellules B par des antigènes du toxoplasme leur confère un rôle amplificateur de la réponse inflammatoire intestinale. Les cellules B matures, générées consécutivement à l'infection orale par *T. gondii*, renforcent d'une part le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs dans l'intestin par la production de la chimiokine pro inflammatoire CCL3. D'autre part, les lymphocytes B sensibilisés par des antigènes du toxoplasme augmentent l'expression membranaire de TNF- $\alpha$ . Cette cytokine pro inflammatoire stimule, par des interactions de contact, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> recrutées dans l'intestin des souris infectées.

Les mécanismes initiateurs et amplificateurs de la réponse immunitaire contre *T. gondii* précédemment décrits permettent le contrôle de la prolifération et de la dissémination du parasite. Les souris C57BL/6 possèdent différents mécanismes cellulaires régulateurs de cette réponse inflammatoire, comme les lymphocytes intra-épithéliaux ou les cellules T régulatrices (T regs) mais ces populations cellulaires ne parviennent pas à maintenir l'homéostasie intestinale, les souris infectées mourant d'iléite. Lorsque des cellules T regs sensibilisés *in vivo* par des antigènes de *T. gondii* sont injectés dans des souris, préalablement à l'infection orale par le parasite, ces cellules parviennent à réguler la réponse inflammatoire intestinale et préviennent la génération de l'iléite.

Les lymphocytes T régulateurs inhibent la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et leur production de cytokines inflammatoires à la fois par des mécanismes contact dépendants (voir perspective 4 : mécanismes inhibiteurs des T regs sensibilisés contrôlant la réponse inflammatoire) mais aussi par la sécrétion locale de cytokines immuno-régulatrices. Les cellules T regs sensibilisées accentuent la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Lorsque ces cellules sont transférées dans des souris receveuses avant infection, les lymphocytes

purifiés du système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale modifient leur profil cytokinique, réduisant leur production d'IFN- $\gamma$  (cytokine Th1) et augmentant celle de cytokines Th2 et Th3. De plus, les cellules T regs générées en réponse à l'infection orale par le parasite ont une expression accrue des marqueurs de domiciliation intestinale CCR5 et  $\alpha 4\beta 7$ , ceci étant corrélé à une plus forte fréquence de ces cellules dans la *lamina propria*. Il a été montré que l'origine des cellules présentatrices d'antigène conditionne la relocalisation des cellules T régulatrices activées {Benson, 2007}. Nous n'avons cependant pas d'évidence direct permettant de distinguer si la fréquence accrue des T regs dans la *lamina propria* des souris infectées est uniquement due à la domiciliation de ces cellules dans ce compartiment, ou si cela est dû à la prolifération de cellules T régulatrices endogènes (voir perspective 5 : analyse de la migration et de la prolifération des cellules T régulatrices générées dans l'intestin de souris infectées par *T. gondii*).

Les lymphocytes T regs représentent un outil de thérapie cellulaire à fort potentiel pour lutter contre les maladies inflammatoires aiguës. L'activation de l'activité de ces cellules est spécifique d'antigène et leur redistribution vers les sites inflammés est finement régulée. Dans notre modèle d'iléite induite par l'ingestion orale de kystes de *T. gondii*, nous avons montré que les cellules T regs sensibilisés *in vivo* possèdent une activité protectrice contre la pathologie intestinale. Cependant, un protocole de thérapie cellulaire utilisant des cellules T regs autologues sensibilisés pour lutter contre des maladies inflammatoires aiguës, ou des rejets de greffes, ne peut être développé uniquement si ces cellules parviennent également à contrôler l'homéostasie du système immunitaire dans le cas d'une réponse inflammatoire déjà initiée (voir perspective 6 : étude de l'effet thérapeutique des T regs sensibilisés introduits consécutivement à l'infection orale par *T. gondii*).



*Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires et moléculaire intervenant dans le contrôle de l'infection par *T. gondii* et le maintien de l'homéostasie intestinale*

#### **Perspective 4 : mécanismes inhibiteurs des T regs sensibilisés contrôlant la réponse inflammatoire au toxoplasme**

Bien que nous ayons identifié une production accrue de cytokines immuno-régulatrices par les T regs sensibilisés, nous n'avons pas défini si l'inhibition de la réponse inflammatoire requiert des interactions de contact ou la sécrétion de facteurs solubles. Afin de caractériser les mécanismes inhibiteurs que possèdent les T regs dans notre modèle, nous allons réaliser des co-cultures en transwell de cellules T régulatrices, sensibilisées ou non, avec des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices stimulées par des billes CD3-CD28<sup>+</sup>, ou des antigènes solubles de *T. gondii* présentées par des cellules dendritiques. Nous allons ensuite mesurer la prolifération de ces cellules effectrices (marquages CFSE) ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$  (marquages CD4 et IFN- $\gamma$ ) par Facs.

Dans le cas où des interactions de contacts seraient associées à l'activité immuno-régulatrice des cellules T regs, nous prévoyons de réaliser des co-cultures de cellules T regs provenant de souris C57BL/6 avec des cellules T effectrices T CD4<sup>+</sup> provenant de souris actine-GFP (traitées avec du PKH26) en présence d'anticorps neutralisant anti-CTLA-4 ou anti-TGF- $\beta$  membranaire. Au même titre que le CFSE, le marquage PKH26 permet d'analyser la prolifération cellulaire, mais sa fluorescence peut être lue sur le canal FL2 du Facs (le canal FL1 étant déjà monopolisé par la GFP).

#### **Perspective 5 : analyse de la migration et de la prolifération des cellules T régulatrices générées dans l'intestin de souris infectées par *T. gondii***

L'analyse par Facs des cellules T régulatrices générées en réponse à l'infection orale par le toxoplasme nous a montré que leur fréquence dans la *lamina propria* augmente, de même que l'expression de marqueurs de domiciliation intestinale. Il nous reste cependant à confirmer que les T regs sensibilisés se re-localisent effectivement dans la *lamina propria* après infection par *T. gondii* et qu'il ne s'agit pas de la prolifération de T regs endogènes.

Nous nous proposons d'injecter dans des souris C57BL/6 Foxp3-GFP exprimant le marqueur congénique Ly1.1 des T regs naïfs ou sensibilisés provenant de souris Foxp3-GFP exprimant le marqueur congénique Ly1.2 et traités avec PKH26. Après infection orale par *T. gondii*, nous allons purifier les lymphocytes de la *lamina propria* et analyser par Facs la prolifération des lymphocytes T régulateurs injectés. Ceci nous permettra de déterminer si les cellules T regs retrouvées dans la *lamina propria* après infection proviennent de la périphérie.

Afin d'analyser la prolifération d'une population endogène de cellules T regs, nous allons traiter des souris C57BL/6 Foxp3-GFP exprimant le marqueur congénique Ly1.1 avec PKH26. Nous allons ensuite traiter oralement ces souris avec la molécule FTY720 pour bloquer tout trafic cellulaire des ganglions mésentériques vers la *lamina propria* et infecter oralement ces souris avec *T. gondii*, 24 heures après le traitement par FTY720. La prolifération des cellules T régulatrices contenues dans la *lamina propria* sera enfin mesurée par Facs.

#### **Perspective 6 : étude de l'effet thérapeutique des cellules T regs sensibilisées introduites consécutivement à l'infection orale par *T. gondii***

Afin de compléter l'étude de l'effet immuno-régulateur des lymphocytes T regs sensibilisés, nous allons tester le pouvoir protecteur de ces cellules injectées dans des souris 24 heures, 3 jours et une semaine après infection. Les T regs sensibilisés seront purifiés de souris Foxp3-GFP aux jours 3 et 7 post-infection. Les souris receveuses seront dans un premier temps de génotype RAG1 KO (co-transferts de T regs et de cellules T effectrices naïves, ratio 1:2) puis de génotype C57BL/6 afin de nous approcher de conditions plus physiologiques. Comme lors des études précédemment décrites concernant l'effet protecteur des T regs sensibilisés, nous allons étudier l'inflammation intestinale d'un point de vue phénotypique (morbidité et infiltration leucocytaire) et également d'un point de vue moléculaire (étude de la balance cytokinique des souris receveuses).

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Abreu-Martin, M. T., and S. R. Targan. 1996. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Crit Rev Immunol* 16:277-309.
2. Adams, L. B., J. B. Hibbs, Jr., R. R. Taintor, and J. L. Krahenbuhl. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 144:2725-2729.
3. Agace, W. W., J. M. Higgins, B. Sadasivan, M. B. Brenner, and C. M. Parker. 2000. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin  $\alpha$ (E)(CD103) $\beta$ (7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 12:563-568.
4. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
5. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968.
6. Ahonen, A., and A. Penttila. 1975. Effects of glucagon and insulin on the Paneth cells of the mouse duodenum. *Experientia* 31:1074-1075.
7. Akira, S. 2006. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:1-16.
8. Albelda, S. M., C. W. Smith, and P. A. Ward. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 8:504-512.
9. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
10. Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 8:878-884.
11. Aliberti, J., J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, C. Reis e Sousa, A. Fairlamb, J. M. Ribeiro, and A. Sher. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 4:485-490.
12. Aliberti, J., J. P. Viola, A. Vieira-de-Abreu, P. T. Bozza, A. Sher, and J. Scharfstein. 2003. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol* 170:5349-5353.
13. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
14. Allez, M., J. Brimnes, I. Dotan, and L. Mayer. 2002. Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 123:1516-1526.
15. Allison, M. C., S. Cornwall, L. W. Poulter, A. P. Dhillon, and R. E. Pounder. 1988. Macrophage heterogeneity in normal colonic mucosa and in inflammatory bowel disease. *Gut* 29:1531-1538.
16. Ando-Akatsuka, Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse, and S. Tsukita. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133:43-47.
17. Andoh, A., Y. Fujiyama, T. Bamba, and S. Hosoda. 1993. Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial

- cell line, Caco-2. *J Immunol* 151:4239-4247.
18. Andoh, A., Y. Fujiyama, K. Hata, K. Sumiyoshi, and T. Bamba. 1996. Regulation of complement C3 synthesis by interleukin-1 and transforming growth factor-beta in rat non-transformed intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Gastroenterol* 31:633-638.
  19. Arany, I., M. Muldrow, and S. K. Tying. 2001. The endogenous interferon system in anal squamous epithelial lesions with different grades from HIV-positive individuals. *Int J STD AIDS* 12:229-233.
  20. Asahara, H., K. Fujisawa, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Maeda, M. Asanuma, N. Ogawa, H. Inoue, T. Sumida, and K. Nishioka. 1997. Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 40:912-918.
  21. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144-1150.
  22. Ayabe, T., D. P. Satchell, C. L. Wilson, W. C. Parks, M. E. Selsted, and A. J. Ouellette. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1:113-118.
  23. Azuma, T., T. Takahashi, A. Kunisato, T. Kitamura, and H. Hirai. 2003. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 63:4516-4520.
  24. Bachmann, M. F., M. Kopf, and B. J. Marsland. 2006. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol* 6:159-164.
  25. Bahia-Oliveira, L. M., J. L. Jones, J. Azevedo-Silva, C. C. Alves, F. Orefice, and D. G. Addiss. 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9:55-62.
  26. Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733.
  27. Balachandran, S., P. C. Roberts, T. Kipperman, K. N. Bhalla, R. W. Compans, D. R. Archer, and G. N. Barber. 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* 74:1513-1523.
  28. Balkwill, F., and A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.
  29. Barragan, A., and L. D. Sibley. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* 195:1625-1633.
  30. Barragan, A., and L. D. Sibley. 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol* 11:426-430.
  31. Barton, B. E., J. Shortall, and J. V. Jackson. 1996. Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model. *Infect Immun* 64:714-718.
  32. Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9237-9242.
  33. Beagley, K. W., and A. J. Husband. 1998. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit Rev Immunol* 18:237-254.
  34. Belvin, M. P., and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila*



- toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:393-416.
35. Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2002. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196:1099-1104.
  36. Bens, M., A. Bogdanova, F. Cluzeaud, L. Miquerol, S. Kerneis, J. P. Kraehenbuhl, A. Kahn, E. Pringault, and A. Vandewalle. 1996. Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol* 270:C1666-1674.
  37. Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, and R. J. Noelle. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204:1765-1774.
  38. Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, and R. J. Noelle. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204:1765-1774.
  39. Bergenfeldt, M., M. Nystrom, M. Bohe, C. Lindstrom, A. Polling, and K. Ohlsson. 1996. Localization of immunoreactive secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in intestinal mucosa. *J Gastroenterol* 31:18-23.
  40. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
  41. Black, M. W., and J. C. Boothroyd. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:607-623.
  42. Bland, P. 1988. MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today* 9:174-178.
  43. Bleicher, P. A., S. P. Balk, S. J. Hagen, R. S. Blumberg, T. J. Flotte, and C. Terhorst. 1990. Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250:679-682.
  44. Bliss, S. K., L. C. Gavrilescu, A. Alcaraz, and E. Y. Denkers. 2001. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* 69:4898-4905.
  45. Bogdan, C., J. Mattner, and U. Schleicher. 2004. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev* 202:33-48.
  46. Boismenu, R., L. Feng, Y. Y. Xia, J. C. Chang, and W. L. Havran. 1996. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 157:985-992.
  47. Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
  48. Boothroyd, J. C., and M. E. Grigg. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5:438-442.
  49. Boraschi, D., and A. Tagliabue. 2006. The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm* 74:229-254.
  50. Bosisio, D., N. Polentarutti, M. Sironi, S. Bernasconi, K. Miyake, G. R. Webb, M. U. Martin, A. Mantovani, and M. Muzio. 2002. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99:3427-3431.
  51. Bout, D., M. Moretto, I. Dimier-Poisson, and D. B. Gatel. 1999. Interaction between

- Toxoplasma gondii and enterocyte. *Immunobiology* 201:225-228.
52. Boyd, Y., M. Goodchild, S. Morroll, and N. Bumstead. 2001. Mapping of the chicken and mouse genes for toll-like receptor 2 (TLR2) to an evolutionarily conserved chromosomal segment. *Immunogenetics* 52:294-298.
  53. Bozza, M., A. R. Satoskar, G. Lin, B. Lu, A. A. Humbles, C. Gerard, and J. R. David. 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189:341-346.
  54. Bradley, J. R., and J. S. Pober. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20:6482-6491.
  55. Brennan, F. M., C. O. Zachariae, D. Chantry, C. G. Larsen, M. Turner, R. N. Maini, K. Matsushima, and M. Feldmann. 1990. Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur J Immunol* 20:2141-2144.
  56. Burg, J. L., D. Perelman, L. H. Kasper, P. L. Ware, and J. C. Boothroyd. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii. *J Immunol* 141:3584-3591.
  57. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 273:12203-12209.
  58. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, F. J. Mennechet, V. Martin, A. C. Lepage, J. D. Schwartzman, and L. H. Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:914-924.
  59. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, F. J. Mennechet, V. Martin, A. C. Lepage, J. D. Schwartzman, and L. H. Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:914-924.
  60. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, F. J. Mennechet, V. Martin, A. C. Lepage, J. D. Schwartzman, and L. H. Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:914-924.
  61. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, M. Moretto, I. H. Dimier-Poisson, A. C. Lepage, D. T. Bout, and L. H. Kasper. 1999. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to Toxoplasma gondii oral infection. *J Immunol* 162:5846-5852.
  62. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, M. Moretto, I. H. Dimier-Poisson, A. C. Lepage, D. T. Bout, and L. H. Kasper. 1999. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to Toxoplasma gondii oral infection. *J Immunol* 162:5846-5852.
  63. Buzoni-Gatel, D., A. C. Lepage, I. H. Dimier-Poisson, D. T. Bout, and L. H. Kasper. 1997. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with Toxoplasma gondii. *J Immunol* 158:5883-5889.
  64. Campbell, N. A., H. S. Kim, R. S. Blumberg, and L. Mayer. 1999. The nonclassical class I molecule CD1d associates with the novel CD8 ligand gp180 on intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 274:26259-26265.
  65. Campbell, N. A., M. S. Park, L. S. Toy, X. Y. Yio, L. Devine, P. Kavathas, and L. Mayer. 2002. A non-class I MHC intestinal epithelial surface glycoprotein, gp180, binds to CD8. *Clin Immunol* 102:267-274.

66. Campos, M. A., I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procopio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167:416-423.
67. Canchis, P. W., A. K. Bhan, S. B. Landau, L. Yang, S. P. Balk, and R. S. Blumberg. 1993. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 80:561-565.
68. Cario, E., and D. K. Podolsky. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017.
69. Carlin, J. M., E. C. Borden, and G. I. Byrne. 1989. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. *J Interferon Res* 9:329-337.
70. Carloni, V., R. G. Romanelli, M. Pinzani, G. Laffi, and P. Gentilini. 1996. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 110:1127-1136.
71. Carpenter, S., and L. A. O'Neill. 2007. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol* 9:1891-1901.
72. Carreno, B. M., and M. Collins. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:29-53.
73. Carruthers, V., and J. C. Boothroyd. 2007. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. *Curr Opin Microbiol* 10:83-89.
74. Cepek, K. L., D. L. Rimm, and M. B. Brenner. 1996. Expression of a candidate cadherin in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6567-6571.
75. Cerede, O., J. F. Dubremetz, M. Soete, D. Deslee, H. Vial, D. Bout, and M. Lebrun. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence. *J Exp Med* 201:453-463.
76. Chen, W., and S. M. Wahl. 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:85-89.
77. Chirido, F. G., O. R. Millington, H. Beacock-Sharp, and A. M. Mowat. 2005. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 35:1831-1840.
78. Christa, L., F. Carnot, M. T. Simon, F. Levavasseur, M. G. Stinnakre, C. Lasserre, D. Thepot, B. Clement, E. Devinoy, and C. Brechot. 1996. HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. *Am J Physiol* 271:G993-1002.
79. Chu, W. M., D. Ostertag, Z. W. Li, L. Chang, Y. Chen, Y. Hu, B. Williams, J. Perrault, and M. Karin. 1999. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 11:721-731.
80. Chuang, T. H., and R. J. Ulevitch. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11:372-378.
81. Clark, G. 1979. Displacement. *Stain Technol* 54:111-119.
82. Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii, and S. Akira. 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201:19-

- 25.
83. Cohen, B., D. Novick, S. Barak, and M. Rubinstein. 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol* 15:4208-4214.
84. Colgan, S. P., R. M. Hershberg, G. T. Furuta, and R. S. Blumberg. 1999. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13938-13943.
85. Colognato, H., M. MacCarrick, J. J. O'Rear, and P. D. Yurchenco. 1997. The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J Biol Chem* 272:29330-29336.
86. Constantinescu, S. N., E. Croze, A. Murti, C. Wang, L. Basu, D. Hollander, D. Russell-Harde, M. Betts, V. Garcia-Martinez, J. E. Mullersman, and L. M. Pfeffer. 1995. Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10487-10491.
87. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
88. Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, and I. Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107:309-316.
89. Crowe, S. E., L. Alvarez, M. Dytoc, R. H. Hunt, M. Muller, P. Sherman, J. Patel, Y. Jin, and P. B. Ernst. 1995. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology* 108:65-74.
90. Cunliffe, R. N., F. R. Rose, J. Keyte, L. Abberley, W. C. Chan, and Y. R. Mahida. 2001. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:176-185.
91. da Silva Correia, J., K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276:21129-21135.
92. Decker, T., M. Muller, and S. Stockinger. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5:675-687.
93. Decker, T., S. Stockinger, M. Karaghiosoff, M. Muller, and P. Kovarik. 2002. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* 109:1271-1277.
94. Deenick, E. K., and S. G. Tangye. 2007. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 85:503-505.
95. Del Rio, L., S. Bennouna, J. Salinas, and E. Y. Denkers. 2001. CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167:6503-6509.
96. den Haan, J. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192:1685-1696.
97. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
98. Denkers, E. Y. 2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39:193-203.
99. Denkers, E. Y., B. A. Butcher, L. Del Rio, and S. Bennouna. 2004. Neutrophils, dendritic

- cells and Toxoplasma. *Int J Parasitol* 34:411-421.
100. Denkers, E. Y., L. Del Rio, and S. Bennouna. 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy* 83:95-114.
  101. Denney, C. F., L. Eckmann, and S. L. Reed. 1999. Chemokine secretion of human cells in response to Toxoplasma gondii infection. *Infect Immun* 67:1547-1552.
  102. Devitt, A., P. A. Lund, A. G. Morris, and J. H. Pearce. 1996. Induction of alpha/beta interferon and dependent nitric oxide synthesis during Chlamydia trachomatis infection of McCoy cells in the absence of exogenous cytokine. *Infect Immun* 64:3951-3956.
  103. Di Noia, J. M., and M. S. Neuberger. 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76:1-22.
  104. Di Sabatino, A., R. Ciccocioppo, F. Cupelli, B. Cinque, D. Millimaggi, M. M. Clarkson, M. Paulli, M. G. Cifone, and G. R. Corazza. 2006. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 55:469-477.
  105. Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 196:247-253.
  106. Dignass, A., K. Lynch-Devaney, H. Kindon, L. Thim, and D. K. Podolsky. 1994. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 94:376-383.
  107. Dignass, A. U., K. Lynch-Devaney, and D. K. Podolsky. 1994. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 202:701-709.
  108. Dignass, A. U., S. Tsunekawa, and D. K. Podolsky. 1994. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106:1254-1262.
  109. Dimier, I. H., and D. T. Bout. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication: a role for intracellular iron. *Immunology* 94:488-495.
  110. Du, X., A. Poltorak, Y. Wei, and B. Beutler. 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11:362-371.
  111. Dubey, J. P. 1996. Strategies to reduce transmission of Toxoplasma gondii to animals and humans. *Vet Parasitol* 64:65-70.
  112. Dubey, J. P. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii. *J Eukaryot Microbiol* 44:592-602.
  113. Dubey, J. P. 1998. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. *Int J Parasitol* 28:1019-1024.
  114. Dubey, J. P. 2000. Sources of Toxoplasma gondii infection in pregnancy. Until rates of congenital toxoplasmosis fall, control measures are essential. *Bmj* 321:127-128.
  115. Dubey, J. P., and J. K. Frenkel. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. *J Protozool* 23:537-546.
  116. Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11:267-299.
  117. Dunne, A., M. Ejdeback, P. L. Ludidi, L. A. O'Neill, and N. J. Gay. 2003. Structural

- complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 278:41443-41451.
118. Dwinell, M. B., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. M. Varki, and M. F. Kagnoff. 1999. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117:359-367.
  119. Dwinell, M. B., N. Luger, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120:49-59.
  120. Dybdahl, B., A. Wahba, E. Lien, T. H. Flo, A. Waage, N. Qureshi, O. F. Sellevold, T. Espevik, and A. Sundan. 2002. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105:685-690.
  121. Dzierszinski, F., M. Mortuaire, M. F. Cesbron-Delauw, and S. Tomavo. 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol Microbiol* 37:574-582.
  122. Eaves-Pyles, T. D., H. R. Wong, K. Odoms, and R. B. Pyles. 2001. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol* 167:7009-7016.
  123. Eckmann, L., H. C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105:1689-1697.
  124. Eckmann, L., H. C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105:1689-1697.
  125. Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61:4569-4574.
  126. el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
  127. El-Omar, E. M., M. T. Ng, and G. L. Hold. 2008. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* 27:244-252.
  128. Elias, K. M., A. Laurence, T. S. Davidson, G. Stephens, Y. Kanno, E. M. Shevach, and J. J. O'Shea. 2008. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* 111:1013-1020.
  129. Elkins, K. L., T. R. Rhinehart-Jones, S. Stibitz, J. S. Conover, and D. M. Klinman. 1999. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 162:2291-2298.
  130. Ericksen, B., Z. Wu, W. Lu, and R. I. Lehrer. 2005. Antibacterial activity and specificity of the six human  $\alpha$ -defensins. *Antimicrob Agents Chemother* 49:269-275.
  131. Evengard, B., K. Petersson, M. L. Engman, S. Wiklund, S. A. Ivarsson, K. Tear-Fahnehjelm, M. Forsgren, R. Gilbert, and G. Malm. 2001. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. *Epidemiol Infect* 127:121-127.
  132. Exley, M. A., and M. J. Koziel. 2004. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 40:1033-1040.
  133. Fagarasan, S., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Ikuta, and T. Honjo. 2001. In situ class

- switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413:639-643.
134. Fagarasan, S., R. Shinkura, T. Kamata, F. Nogaki, K. Ikuta, and T. Honjo. 2000. Mechanism of B1 cell differentiation and migration in GALT. *Curr Top Microbiol Immunol* 252:221-229.
  135. Fagarasan, S., N. Watanabe, and T. Honjo. 2000. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev* 176:205-215.
  136. Farquhar, M. G., and G. E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375-412.
  137. Ferguson, A. 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18:921-937.
  138. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B. L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737-746.
  139. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
  140. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198:1043-1055.
  141. Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronese, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol* 177:7959-7967.
  142. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
  143. Forsbach, A., J. G. Nemorin, C. Montino, C. Muller, U. Samulowitz, A. P. Vicari, M. Jurk, G. K. Mutwiri, A. M. Krieg, G. B. Lipford, and J. Vollmer. 2008. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *J Immunol* 180:3729-3738.
  144. Framson, P. E., D. H. Cho, L. Y. Lee, and R. M. Hershberg. 1999. Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 116:1054-1062.
  145. Frenkel, J. K., B. M. Nelson, and J. Arias-Stella. 1975. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. *Hum Pathol* 6:97-111.
  146. Freudenberg, M. A., T. Merlin, C. Kalis, Y. Chvatchko, H. Stubig, and C. Galanos. 2002. Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J Immunol* 169:1665-1668.
  147. Freyre, A., J. P. Dubey, D. D. Smith, and J. K. Frenkel. 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol* 75:750-755.
  148. Fujihashi, K., S. Kawabata, T. Hiroi, M. Yamamoto, J. R. McGhee, S. Nishikawa, and H. Kiyono. 1996. Interleukin 2 (IL-2) and interleukin 7 (IL-7) reciprocally induce IL-7 and IL-2 receptors on gamma delta T-cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3613-3618.
  149. Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2:

- novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.
150. Gallucci, S., and P. Matzinger. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114-119.
  151. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
  152. Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33-41.
  153. Gavrilescu, L. C., and E. Y. Denkers. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167:902-909.
  154. Gewirtz, A. T. 2003. Intestinal epithelial toll-like receptors: to protect. And serve? *Curr Pharm Des* 9:1-5.
  155. Ghosh, D., E. Porter, B. Shen, S. K. Lee, D. Wilk, J. Drazba, S. P. Yadav, J. W. Crabb, T. Ganz, and C. L. Bevins. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3:583-590.
  156. Gil, S. G., T. A. Brown, M. C. Ryan, and W. G. Carter. 1994. Junctional epidermolysis bullosis: defects in expression of epiligrin/nicein/kalinin and integrin beta 4 that inhibit hemidesmosome formation. *J Invest Dermatol* 103:31S-38S.
  157. Gilbert, R. E., D. T. Dunn, S. Lightman, P. I. Murray, C. E. Pavesio, P. D. Gormley, J. Masters, S. P. Parker, and M. R. Stanford. 1999. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 123:283-289.
  158. Gilmore, T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.
  159. Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4:231-237.
  160. Gomez-Gomez, L., and T. Boller. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* 7:251-256.
  161. Graeler, M., G. Shankar, and E. J. Goetzel. 2002. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J Immunol* 169:4084-4087.
  162. Grigg, M. E., J. Ganatra, J. C. Boothroyd, and T. P. Margolis. 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184:633-639.
  163. Grimm, M. C., P. Pavli, E. Van de Pol, and W. F. Doe. 1995. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 100:291-297.
  164. Gross, G., and A. Margalit. 2007. Targeting tumor-associated antigens to the MHC class I presentation pathway. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7:99-109.
  165. Gulzar, N., and K. F. Copeland. 2004. CD8+ T-cells: function and response to HIV infection. *Curr HIV Res* 2:23-37.
  166. Guy-Grand, D., and P. Vassalli. 1993. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5:247-252.
  167. Hajjar, A. M., D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson. 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166:15-19.



168. Han, H., T. Iwanaga, and T. Fujita. 1993. Species-differences in the process of apoptosis in epithelial cells of the small intestine: an ultrastructural and cytochemical study of luminal cell elements. *Arch Histol Cytol* 56:83-90.
169. Hang, C. H., J. X. Shi, J. S. Li, W. Q. Li, and H. X. Yin. 2005. Up-regulation of intestinal nuclear factor kappa B and intercellular adhesion molecule-1 following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol* 11:1149-1154.
170. Haque, S. J., and B. R. Williams. 1994. Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem* 269:19523-19529.
171. Hardy, M. P., C. M. Owczarek, L. S. Jermin, M. Ejdeback, and P. J. Hertzog. 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84:331-345.
172. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
173. Hart, D. N., G. J. Clark, J. W. Dekker, D. B. Fearnley, M. Kato, B. D. Hock, A. D. McLellan, T. Neil, R. V. Sorg, U. Sorg, K. L. Summers, and S. Vuckovic. 1997. Dendritic cell surface molecules. A proliferating field. *Adv Exp Med Biol* 417:439-442.
174. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
175. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
176. Hayashi, S., C. C. Chan, R. Gazzinelli, and F. G. Roberge. 1996. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol* 156:1476-1481.
177. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-2224.
178. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196-200.
179. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
180. Hertzog, P. J., L. A. O'Neill, and J. A. Hamilton. 2003. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 24:534-539.
181. Hill, D., and J. P. Dubey. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8:634-640.
182. Hirose, K., H. Suzuki, H. Nishimura, A. Mitani, J. Washizu, T. Matsuguchi, and Y. Yoshikai. 1998. Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect Immun* 66:5677-5683.
183. Ho, P. P., P. Fontoura, M. Platten, R. A. Sobel, J. J. DeVoss, L. Y. Lee, B. A. Kidd, B. H. Tomooka, J. Capers, A. Agrawal, R. Gupta, J. Zernik, M. K. Yee, B. J. Lee, H. Garren, W. H. Robinson, and L. Steinman. 2005. A suppressive oligodeoxynucleotide enhances the efficacy of myelin cocktail/IL-4-tolerizing DNA vaccination and treats autoimmune disease. *J Immunol* 175:6226-6234.
184. Hoang, P., B. Crotty, H. R. Dalton, and D. P. Jewell. 1992. Epithelial cells bearing class

- II molecules stimulate allogeneic human colonic intraepithelial lymphocytes. *Gut* 33:1089-1093.
185. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
  186. Holtkamp, M., A. F. Okuducu, R. Klingebiel, and C. J. Ploner. 2004. Cerebral toxoplasmosis in a patient with common variable immunodeficiency. *Neurology* 63:2192-2193.
  187. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6:644-658.
  188. Hong, Y. H., H. S. Lillehoj, E. P. Lillehoj, and S. H. Lee. 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 114:259-272.
  189. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
  190. Horiguchi, Y., F. Furukawa, M. Fujita, and S. Imamura. 1994. Ultrastructural localization of E-cadherin cell adhesion molecule on the cytoplasmic membrane of keratinocytes in vivo and in vitro. *J Histochem Cytochem* 42:1333-1340.
  191. Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors. 2002. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195:559-570.
  192. Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.
  193. Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752.
  194. Howe, D. K., S. Honore, F. Derouin, and L. D. Sibley. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35:1411-1414.
  195. Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191:435-444.
  196. Huang, L. Y., J. Aliberti, C. A. Leifer, D. M. Segal, A. Sher, D. T. Golenbock, and B. Golding. 2003. Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. *J Immunol* 171:1441-1446.
  197. Huang, Q., J. Yang, Y. Lin, C. Walker, J. Cheng, Z. G. Liu, and B. Su. 2004. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 5:98-103.
  198. Hue, S., J. J. Mention, R. C. Monteiro, S. Zhang, C. Cellier, J. Schmitz, V. Verkarre, N. Fodil, S. Bahram, N. Cerf-Bensussan, and S. Caillat-Zucman. 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21:367-377.
  199. Hung, C. C., M. Y. Chen, S. M. Hsieh, C. F. Hsiao, W. H. Sheng, and S. C. Chang. 2005.

- Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection and incidence of toxoplasma encephalitis in non-haemophiliac HIV-1-infected adults in Taiwan. *Int J STD AIDS* 16:302-306.
200. Hurst, S. D., and T. A. Barrett. 1996. T-cell responses to enteric antigens. *Semin Gastrointest Dis* 7:118-123.
  201. Huttner, K. M., and A. J. Ouellette. 1994. A family of defensin-like genes codes for diverse cysteine-rich peptides in mouse Paneth cells. *Genomics* 24:99-109.
  202. Huttner, K. M., M. E. Selsted, and A. J. Ouellette. 1994. Structure and diversity of the murine cryptdin gene family. *Genomics* 19:448-453.
  203. Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258-267.
  204. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195:1507-1512.
  205. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
  206. James, S. P., C. Fiocchi, A. S. Graeff, and W. Strober. 1986. Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* 91:1483-1489.
  207. James, S. P., and A. S. Graeff. 1985. Spontaneous and lymphokine-induced cytotoxic activity of monkey intestinal mucosal lymphocytes. *Cell Immunol* 93:387-397.
  208. Janssens, S., and R. Beyaert. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11:293-302.
  209. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31:3388-3393.
  210. Jenum, P. A., B. Stray-Pedersen, K. K. Melby, G. Kapperud, A. Whitelaw, A. Eskild, and J. Eng. 1998. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol* 36:2900-2906.
  211. Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake, and H. R. Petty. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165:3541-3544.
  212. Johnson, G. B., G. J. Brunn, Y. Kodaira, and J. L. Platt. 2002. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168:5233-5239.
  213. Jones, J. L., D. Kruszon-Moran, and M. Wilson. 2003. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. *Emerg Infect Dis* 9:1371-1374.
  214. Jones, S. C., L. K. Trejdosiewicz, R. E. Banks, P. D. Howdle, A. T. Axon, M. F. Dixon, and J. T. Whicher. 1993. Expression of interleukin-6 by intestinal enterocytes. *J Clin Pathol* 46:1097-1100.
  215. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196:255-260.
  216. Jung, H. C., J. M. Kim, I. S. Song, and C. Y. Kim. 1997. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of

- mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *J Gastroenterol Hepatol* 12:473-480.
217. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863-869.
  218. Kaiserlian, D., D. Rigal, J. Abello, and J. P. Revillard. 1991. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 21:2415-2421.
  219. Kaiserlian, D., K. Vidal, and J. P. Revillard. 1989. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 19:1513-1516.
  220. Karin, M., and F. R. Greten. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5:749-759.
  221. Kasper, L., N. Courret, S. Darche, S. Luangsay, F. Mennechet, L. Minns, N. Rachinel, C. Ronet, and D. Buzoni-Gatel. 2004. Toxoplasma gondii and mucosal immunity. *Int J Parasitol* 34:401-409.
  222. Katze, M. G., Y. He, and M. Gale, Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2:675-687.
  223. Kaufman, H. E., M. L. Melton, J. S. Remington, and L. Jacobs. 1959. Strain differences of Toxoplasma gondii. *J Parasitol* 45:189-190.
  224. Kaufman, H. E., J. S. Remington, and L. Jacobs. 1958. Toxoplasmosis: the nature of virulence. *Am J Ophthalmol* 46:255-260; discussion 260-251.
  225. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-122.
  226. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
  227. Kearsley, J. A., and A. W. Stadnyk. 1996. Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods* 194:35-48.
  228. Khan, I. A., M. Moretto, X. Q. Wei, M. Williams, J. D. Schwartzman, and F. Y. Liew. 2002. Treatment with soluble interleukin-15 exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response. *J Exp Med* 195:1463-1470.
  229. Kim, C. H. 2005. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol* 12:298-304.
  230. Kim, K., and L. M. Weiss. 2004. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34:423-432.
  231. Kinjo, Y., E. Tupin, D. Wu, M. Fujio, R. Garcia-Navarro, M. R. Benhnia, D. M. Zajonc, G. Ben-Menachem, G. D. Ainge, G. F. Painter, A. Khurana, K. Hoebe, S. M. Behar, B. Beutler, I. A. Wilson, M. Tsuji, T. J. Sellati, C. H. Wong, and M. Kronenberg. 2006. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7:978-986.
  232. Kinjo, Y., D. Wu, G. Kim, G. W. Xing, M. A. Poles, D. D. Ho, M. Tsuji, K. Kawahara, C. H. Wong, and M. Kronenberg. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434:520-525.

233. Klein, L., K. Khazaie, and H. von Boehmer. 2003. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8886-8891.
234. Kobayashi, H., S. Miura, H. Nagata, Y. Tsuzuki, R. Hokari, T. Ogino, C. Watanabe, T. Azuma, and H. Ishii. 2004. In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes: relationships to maturation and role of chemokines. *J Leukoc Biol* 75:434-442.
235. Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R. A. Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734.
236. Kohm, A. P., J. S. McMahon, J. R. Podojil, W. S. Begolka, M. DeGutes, D. J. Kasproicz, S. F. Ziegler, and S. D. Miller. 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 176:3301-3305.
237. Koizumi, M., N. King, R. Lobb, C. Benjamin, and D. K. Podolsky. 1992. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103:840-847.
238. Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi, and J. T. Harty. 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161:2428-2434.
239. Krieg, A. M., and H. Wagner. 2000. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 21:521-526.
240. Krishnan, K., H. Yan, J. T. Lim, and J. J. Krolewski. 1996. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene* 13:125-133.
241. Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23:877-900.
242. Kunkel, E. J., J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Boisvert, A. I. Roberts, E. C. Ebert, M. A. Vieira, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, C. M. Parker, E. C. Butcher, D. P. Andrew, and W. W. Agace. 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192:761-768.
243. Kuwajima, S., T. Sato, K. Ishida, H. Tada, H. Tezuka, and T. Ohteki. 2006. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol* 7:740-746.
244. Kvale, D., P. Krajci, and P. Brandtzaeg. 1992. Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human intestinal epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 35:669-676.
245. Kvale, D., P. Krajci, and P. Brandtzaeg. 1992. Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human intestinal epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 35:669-676.
246. Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S. Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez, and S. Keshav. 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125:47-57.

247. Lammers, K. M., J. Jansen, P. B. Bijlsma, M. Ceska, G. N. Tytgat, C. L. Labois, and S. J. van Deventer. 1994. Polarised interleukin 8 secretion by HT 29/19A cells. *Gut* 35:338-342.
248. Langermans, J. A., M. E. van der Hulst, P. H. Nibbering, and R. van Furth. 1992. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun* 60:5107-5112.
249. Le Page, C., P. Genin, M. G. Baines, and J. Hiscott. 2000. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2:374-386.
250. Lee, S. H., P. M. Starkey, and S. Gordon. 1985. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 161:475-489.
251. Leeuwenberg, J. F., E. J. von Asmuth, T. M. Jeunhomme, and W. A. Buurman. 1990. IFN-gamma regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J Immunol* 145:2110-2114.
252. Lefrancois, L. 1991. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 147:1746-1751.
253. Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, and T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11:105-128.
254. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
255. Lenardo, M. J., C. M. Fan, T. Maniatis, and D. Baltimore. 1989. The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* 57:287-294.
256. Lencer, W. I., G. Cheung, G. R. Strohmeier, M. G. Currie, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, and J. L. Madara. 1997. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8585-8589.
257. Levy, D. E. 2002. Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection. *J Exp Med* 195:F15-18.
258. Levy, D. E., and J. E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662.
259. Li, H., E. Cuartas, W. Cui, Y. Choi, T. D. Crawford, H. Z. Ke, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, and A. Vignery. 2005. IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J Exp Med* 201:1169-1177.
260. Li, R. W., T. S. Sonstegard, C. P. Van Tassell, and L. C. Gasbarre. 2007. Local inflammation as a possible mechanism of resistance to gastrointestinal nematodes in Angus heifers. *Vet Parasitol* 145:100-107.
261. Li, W., D. Buzoni-Gatel, H. Debbabi, M. S. Hu, F. J. Mennechet, B. G. Durell, R. J. Noelle, and L. H. Kasper. 2002. CD40/CD154 ligation is required for the development of acute ileitis following oral infection with an intracellular pathogen in mice. *Gastroenterology* 122:762-773.
262. Li, W., D. Buzoni-Gatel, H. Debbabi, M. S. Hu, F. J. Mennechet, B. G. Durell, R. J. Noelle, and L. H. Kasper. 2002. CD40/CD154 ligation is required for the development of acute ileitis following oral infection with an intracellular pathogen in mice. *Gastroenterology* 122:762-773.

263. Li, X., M. Commane, C. Burns, K. Vithalani, Z. Cao, and G. R. Stark. 1999. Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol* 19:4643-4652.
264. Li, X., S. Leung, S. Qureshi, J. E. Darnell, Jr., and G. R. Stark. 1996. Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *J Biol Chem* 271:5790-5794.
265. Lieberman, L. A., E. N. Villegas, and C. A. Hunter. 2004. Interleukin-15-deficient mice develop protective immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 72:6729-6732.
266. Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, and D. T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274:33419-33425.
267. Liesenfeld, O. 1999. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 201:229-239.
268. Liesenfeld, O., H. Kang, D. Park, T. A. Nguyen, C. V. Parkhe, H. Watanabe, T. Abo, A. Sher, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1999. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 21:365-376.
269. Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184:597-607.
270. Lin, P. W., P. O. Simon, Jr., A. T. Gewirtz, A. S. Neish, A. J. Ouellette, J. L. Madara, and W. I. Lencer. 2004. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 279:19902-19907.
271. Lin, Y., H. Lee, A. H. Berg, M. P. Lisanti, L. Shapiro, and P. E. Scherer. 2000. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275:24255-24263.
272. Lindsay, D. S., J. P. Dubey, B. L. Blagburn, and M. Toivio-Kinnucan. 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol* 77:126-132.
273. Lindsay, D. S., M. A. Toivio-Kinnucan, and B. L. Blagburn. 1993. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol* 79:289-292.
274. Lingelbach, K., and K. A. Joiner. 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 11):1467-1475.
275. Liu, L., M. Zhang, C. Jenkins, and G. G. MacPherson. 1998. Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 161:1146-1155.
276. Lohoff, M., G. S. Duncan, D. Ferrick, H. W. Mittrucker, S. Bischof, S. Prechtel, M. Rollinghoff, E. Schmitt, A. Pahl, and T. W. Mak. 2000. Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *J Exp Med* 192:325-336.
277. Lohoff, M., and T. W. Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell

- differentiation. *Nat Rev Immunol* 5:125-135.
278. Lowes, J. R., P. Radwan, J. D. Priddle, and D. P. Jewell. 1992. Characterisation and quantification of mucosal cytokine that induces epithelial histocompatibility locus antigen-DR expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 33:315-319.
  279. Luangsay, S., L. H. Kasper, N. Rachinel, L. A. Minns, F. J. Mennechet, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2003. CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 125:491-500.
  280. Lyon, M. F., J. Peters, P. H. Glenister, S. Ball, and E. Wright. 1990. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2433-2437.
  281. MacDermott, R. P. 1999. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 19:266-272.
  282. MacDermott, R. P., I. R. Sanderson, and H. C. Reinecker. 1998. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 4:54-67.
  283. Maden, M. 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755-765.
  284. Magnusson, M., R. Tobes, J. Sancho, and E. Pareja. 2007. Cutting edge: natural DNA repetitive extragenic sequences from gram-negative pathogens strongly stimulate TLR9. *J Immunol* 179:31-35.
  285. Mahida, Y. R. 2000. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 6:21-33.
  286. Maillot, C., G. Gargala, A. Delaunay, P. Ducrotte, P. Brasseur, J. J. Ballet, and L. Favennec. 2000. *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol Res* 86:947-949.
  287. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189:587-592.
  288. Mallow, E. B., A. Harris, N. Salzman, J. P. Russell, R. J. DeBerardinis, E. Ruchelli, and C. L. Bevins. 1996. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *J Biol Chem* 271:4038-4045.
  289. Marshall, J. D., K. Fearon, C. Abbate, S. Subramanian, P. Yee, J. Gregorio, R. L. Coffman, and G. Van Nest. 2003. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol* 73:781-792.
  290. Martin, H. J., J. M. Lee, D. Walls, and S. D. Hayward. 2007. Manipulation of the toll-like receptor 7 signaling pathway by Epstein-Barr virus. *J Virol* 81:9748-9758.
  291. Martin, P., G. M. Del Hoyo, F. Anjuere, C. F. Arias, H. H. Vargas, L. A. Fernandez, V. Parrillas, and C. Ardavin. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100:383-390.
  292. Martin-Villa, J. M., S. Ferre-Lopez, J. C. Lopez-Suarez, A. Corell, M. Perez-Blas, and A. Arnaiz-Villena. 1997. Cell surface phenotype and ultramicroscopic analysis of purified human enterocytes: a possible antigen-presenting cell in the intestine. *Tissue Antigens*



- 50:586-592.
293. Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler. 2002. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 168:1533-1537.
  294. Matsuguchi, T., T. Musikacharoen, T. Ogawa, and Y. Yoshikai. 2000. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 165:5767-5772.
  295. Matsuuchi, L., and M. R. Gold. 2001. New views of BCR structure and organization. *Curr Opin Immunol* 13:270-277.
  296. Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462:1-10.
  297. Matsuzawa, A., K. Saegusa, T. Noguchi, C. Sadamitsu, H. Nishitoh, S. Nagai, S. Koyasu, K. Matsumoto, K. Takeda, and H. Ichijo. 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6:587-592.
  298. Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, 3rd, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, K. Hoebe, O. Schneewind, D. Walker, B. Beutler, L. Teyton, P. B. Savage, and A. Bendelac. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525-529.
  299. McCormick, B. A., P. M. Hofman, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, and J. L. Madara. 1995. Surface attachment of Salmonella typhimurium to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J Cell Biol* 131:1599-1608.
  300. McCurdy, J. D., T. J. Lin, and J. S. Marshall. 2001. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 70:977-984.
  301. McGee, D. W., K. W. Beagley, W. K. Aicher, and J. R. McGhee. 1993. Transforming growth factor-beta and IL-1 beta act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 151:970-978.
  302. McGee, D. W., S. J. Vitkus, and P. Lee. 1996. The effect of cytokine stimulation on IL-1 receptor mRNA expression by intestinal epithelial cells. *Cell Immunol* 168:276-280.
  303. McHeyzer-Williams, L. J., and M. G. McHeyzer-Williams. 2005. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23:487-513.
  304. McLeod, R., R. G. Estes, D. G. Mack, and H. Cohen. 1984. Immune response of mice to ingested Toxoplasma gondii: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J Infect Dis* 149:234-244.
  305. McQuillan, G. M., D. Kruszon-Moran, B. J. Kottiri, L. R. Curtin, J. W. Lucas, and R. S. Kington. 2004. Racial and ethnic differences in the seroprevalence of 6 infectious diseases in the United States: data from NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* 94:1952-1958.
  306. Mekala, D. J., R. S. Alli, and T. L. Geiger. 2005. IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11817-11822.
  307. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
  308. Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, W. Li, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2002. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial

- cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* 168:2988-2996.
309. Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, L. A. Minns, S. Luangsang, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 34:1059-1067.
  310. Mercier, C., D. K. Howe, D. Mordue, M. Lingnau, and L. D. Sibley. 1998. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect Immun* 66:4176-4182.
  311. Meyer, T. A., J. Wang, G. M. Tiao, C. K. Ogle, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1995. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery* 118:336-342.
  312. Miettinen, M., T. Sareneva, I. Julkunen, and S. Matikainen. 2001. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* 2:349-355.
  313. Minakhina, S., and R. Steward. 2006. Nuclear factor-kappa B pathways in *Drosophila*. *Oncogene* 25:6749-6757.
  314. Mitsuyama, K., M. Sata, and S. Rose-John. 2006. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:451-461.
  315. Miyake, K., Y. Yamashita, M. Ogata, T. Sudo, and M. Kimoto. 1995. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol* 154:3333-3340.
  316. Moon, R., A. A. Parikh, C. Szabo, J. E. Fischer, A. L. Salzman, and P. O. Hasselgren. 1997. Complement C3 production in human intestinal epithelial cells is regulated by interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha. *Arch Surg* 132:1289-1293.
  317. Morales, V. M., A. Christ, S. M. Watt, H. S. Kim, K. W. Johnson, N. Utku, A. M. Texeira, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, G. J. Russell, S. E. Russell, A. K. Bhan, G. J. Freeman, and R. S. Blumberg. 1999. Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a). *J Immunol* 163:1363-1370.
  318. Mordue, D. G., F. Monroy, M. La Regina, C. A. Dinarello, and L. D. Sibley. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167:4574-4584.
  319. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
  320. Mudter, J., and M. F. Neurath. 2007. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 13:1016-1023.
  321. Mueller, Y. M., P. M. Bojczuk, E. S. Halstead, A. H. Kim, J. Witek, J. D. Altman, and P. D. Katsikis. 2003. IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 101:1024-1029.
  322. Murray, H. W. 1984. Macrophage activation: enhanced oxidative and antiprotozoal activity. *Contemp Top Immunobiol* 13:97-115.
  323. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164:5998-6004.
  324. Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V. M. Dixit. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2

- and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278:1612-1615.
325. Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3:667-672.
  326. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
  327. Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194:1171-1178.
  328. Neyer, L. E., G. Grunig, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick, and C. A. Hunter. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65:1675-1682.
  329. Nichols, B. A. 1985. Interactions between *Toxoplasma* and host phagocytes. *Int Ophthalmol Clin* 25:71-80.
  330. Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H. C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
  331. Nischik, N., B. Schade, K. Dytterska, H. Dlugonska, G. Reichmann, and H. G. Fischer. 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect* 3:689-699.
  332. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
  333. Obermeier, F., N. Dunger, U. G. Strauch, C. Hofmann, A. Bleich, N. Grunwald, H. J. Hedrich, E. Aschenbrenner, B. Schlegelberger, G. Rogler, J. Scholmerich, and W. Falk. 2005. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 129:913-927.
  334. Offit, P. A., S. L. Cunningham, and K. I. Dudzik. 1991. Memory and distribution of virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and CTL precursors after rotavirus infection. *J Virol* 65:1318-1324.
  335. Ogata, H., I. Su, K. Miyake, Y. Nagai, S. Akashi, I. Mecklenbrauker, K. Rajewsky, M. Kimoto, and A. Tarakhovsky. 2000. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 192:23-29.
  336. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
  337. Ohno, Y., J. Lee, R. D. Fusunyan, R. P. MacDermott, and I. R. Sanderson. 1997. Macrophage inflammatory protein-2: chromosomal regulation in rat small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10279-10284.
  338. Ohyama, K., T. Sano, and H. Toyoda. 2004. Predominant contribution of IFN-beta expression to apoptosis induction in human uterine cervical fibroblast cells by influenza-virus infection. *Biol Pharm Bull* 27:1750-1757.
  339. Okada, S., S. Obata, M. Hatano, and T. Tokuhisa. 2003. Dominant-negative effect of the c-fos family gene products on inducible NO synthase expression in macrophages. *Int*

- Immunol* 15:1275-1282.
340. Okada, T., Z. X. Lian, M. Naiki, A. A. Ansari, S. Ikehara, and M. E. Gershwin. 2003. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33:1012-1019.
  341. Okamura, Y., M. Watari, E. S. Jerud, D. W. Young, S. T. Ishizaka, J. Rose, J. C. Chow, and J. F. Strauss, 3rd. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:10229-10233.
  342. Opitz, B., N. W. Schroder, I. Spreitzer, K. S. Michelsen, C. J. Kirschning, W. Hallatschek, U. Zahring, T. Hartung, U. B. Gobel, and R. R. Schumann. 2001. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 276:22041-22047.
  343. Orellana, M. A., Y. Suzuki, F. Araujo, and J. S. Remington. 1991. Role of beta interferon in resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 59:3287-3290.
  344. Orian-Rousseau, V., D. Aberdam, P. Rousselle, A. Messent, J. Gavrilovic, G. Meneguzzi, M. Kedinger, and P. Simon-Assmann. 1998. Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *J Cell Sci* 111 ( Pt 14):1993-2004.
  345. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278:49751-49762.
  346. Ouellette, A. J. 2005. Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol* 27:133-146.
  347. Ouellette, A. J., and J. C. Lualdi. 1990. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin. *J Biol Chem* 265:9831-9837.
  348. Ouellette, A. J., D. P. Satchell, M. M. Hsieh, S. J. Hagen, and M. E. Selsted. 2000. Characterization of luminal paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. Attenuated antimicrobial activities of peptides with truncated amino termini. *J Biol Chem* 275:33969-33973.
  349. Ozcan, O., M. K. Irmak, H. Dalcik, E. Karaoz, A. Kubar, and H. Koylu. 1996. Ultrastructural changes in rat Paneth and goblet cells after the administration of interferon-alpha. *Acta Physiol Hung* 84:81-88.
  350. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13766-13771.
  351. Pacher, P., J. S. Beckman, and L. Liaudet. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
  352. Pal, E., T. Tabira, T. Kawano, M. Taniguchi, S. Miyake, and T. Yamamura. 2001. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. *J Immunol* 166:662-668.
  353. Pang, G., A. Buret, R. T. Batey, Q. Y. Chen, L. Couch, A. Cripps, and R. Clancy. 1993. Morphological, phenotypic and functional characteristics of a pure population of CD56+ CD16- CD3- large granular lymphocytes generated from human duodenal mucosa. *Immunology* 79:498-505.
  354. Parikh, A. A., A. L. Salzman, C. D. Kane, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1997. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is

- associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Surg Res* 69:139-144.
355. Pedersen, G., L. Andresen, M. W. Matthiessen, J. Rask-Madsen, and J. Brynskov. 2005. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* 141:298-306.
  356. Pereira, P., and B. Rocha. 1991. Post- thymic in vivo expansion of mature alpha beta T cells. *Int Immunol* 3:1077-1080.
  357. Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W. C. Yeh, and G. Cheng. 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 199:1651-1658.
  358. Pestka, S. 1997. The interferon receptors. *Semin Oncol* 24:S9-18-S19-40.
  359. Pestka, S., C. D. Krause, and M. R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32.
  360. Petersen, E. 2007. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5:285-293.
  361. Petersen, E. 2007. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 12:214-223.
  362. Phalipon, A., and B. Corthesy. 2003. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* 24:55-58.
  363. Phalipon, A., and P. J. Sansonetti. 2003. Shigellosis: innate mechanisms of inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. *Crit Rev Immunol* 23:371-401.
  364. Pietila, T. E., V. Veckman, P. Kyllonen, K. Lahteenmaki, T. K. Korhonen, and I. Julkunen. 2005. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 78:909-920.
  365. Piguet, P. F., C. Vesin, J. Guo, Y. Donati, and C. Barazzone. 1998. TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by the TNF receptor 1 and does not require p53. *Eur J Immunol* 28:3499-3505.
  366. Plattner, F., F. Yarovsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher, and D. Soldati-Favre. 2008. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* 3:77-87.
  367. Podack, E. R. 1995. Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through separate molecular pathways. *Curr Opin Immunol* 7:11-16.
  368. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
  369. Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297-329.
  370. Porter, E. M., C. L. Bevins, D. Ghosh, and T. Ganz. 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 59:156-170.
  371. Porter, E. M., M. A. Poles, J. S. Lee, J. Naitoh, C. L. Bevins, and T. Ganz. 1998. Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Lett* 434:272-276.
  372. Prakash, A., E. Smith, C. K. Lee, and D. E. Levy. 2005. Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection. *J Biol Chem* 280:18651-18657.
  373. Probst, H. C., K. Tschannen, B. Odermatt, R. Schwendener, R. M. Zinkernagel, and M.

- Van Den Broek. 2005. Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 141:398-404.
374. Putsep, K., L. G. Axelsson, A. Boman, T. Midtvedt, S. Normark, H. G. Boman, and M. Andersson. 2000. Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *J Biol Chem* 275:40478-40482.
  375. Qiao, L., G. Schurmann, M. Betzler, and S. C. Meuer. 1991. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* 101:1529-1536.
  376. Qureshi, S. T., P. Gros, and D. Malo. 1999. The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 48:613-620.
  377. Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615-625.
  378. Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, C. Dutta, F. J. Mennechet, S. Luangsay, L. A. Minns, M. E. Grigg, S. Tomavo, J. C. Boothroyd, and L. H. Kasper. 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 173:2725-2735.
  379. Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi, and E. Raz. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126:520-528.
  380. Radema, S. A., S. J. van Deventer, and A. Cerami. 1991. Interleukin 1 beta is expressed predominantly by enterocytes in experimental colitis. *Gastroenterology* 100:1180-1186.
  381. Radke, J. R., B. Striepen, M. N. Guerini, M. E. Jerome, D. S. Roos, and M. W. White. 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115:165-175.
  382. Radke, J. R., and M. W. White. 1998. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol* 94:237-247.
  383. Ray, N., M. Kuwahara, Y. Takada, K. Maruyama, T. Kawaguchi, H. Tsubone, H. Ishikawa, and K. Matsuo. 2006. c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. *Int Immunol* 18:671-677.
  384. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
  385. Reinecker, H. C., R. P. MacDermott, S. Mirau, A. Dignass, and D. K. Podolsky. 1996. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 111:1706-1713.
  386. Reinecker, H. C., and D. K. Podolsky. 1995. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8353-8357.
  387. Remick, D. G., R. G. Kunkel, J. W. Larrick, and S. L. Kunkel. 1987. Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor. *Lab Invest* 56:583-590.
  388. Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh, and L. H. Glimcher. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195:1003-1012.
  389. Rescigno, M., and P. Borrow. 2001. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell* 106:267-270.

390. Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204:572-581.
391. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
392. Rocha, B., P. Vassalli, and D. Guy-Grand. 1994. Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* 180:681-686.
393. Rodriguez-Juan, C., M. Perez-Blas, A. P. Valeri, N. Aguilera, A. Arnaiz-Villena, A. Pacheco-Castro, and J. M. Martin-Villa. 2001. Cell surface phenotype and cytokine secretion in Caco-2 cell cultures: increased RANTES production and IL-2 transcription upon stimulation with IL-1beta. *Tissue Cell* 33:570-579.
394. Rodriguez-Pinto, D. 2005. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238:67-75.
395. Roger, T., J. David, M. P. Glauser, and T. Calandra. 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414:920-924.
396. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68-79.
397. Ronet, C., S. Darche, M. Leite de Moraes, S. Miyake, T. Yamamura, J. A. Louis, L. H. Kasper, and D. Buzoni-Gatel. 2005. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 175:899-908.
398. Ruco, L. P., D. Pomponi, R. Pigott, A. Stoppacciaro, F. Monardo, S. Uccini, D. Boraschi, A. Tagliabue, A. Santoni, E. Dejana, and et al. 1990. Cytokine production (IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF alpha) and endothelial cell activation (ELAM-1 and HLA-DR) in reactive lymphadenitis, Hodgkin's disease, and in non-Hodgkin's lymphomas. An immunocytochemical study. *Am J Pathol* 137:1163-1171.
399. Ruemmele, F. M., J. F. Beaulieu, S. Dionne, E. Levy, E. G. Seidman, N. Cerf-Bensussan, and M. J. Lentze. 2002. Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* 51:842-848.
400. Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, S. Menard, and A. Balsari. 2004. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 165:373-381.
401. Russell-Harde, D., H. Pu, M. Betts, R. N. Harkins, H. D. Perez, and E. Croze. 1995. Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons. *J Biol Chem* 270:26033-26036.
402. Rutschmann, S., A. Kilinc, and D. Ferrandon. 2002. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 168:1542-1546.
403. Saeij, J. P., J. P. Boyle, and J. C. Boothroyd. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21:476-481.
404. Saeij, J. P., S. Collier, J. P. Boyle, M. E. Jerome, M. W. White, and J. C. Boothroyd. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445:324-327.
405. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.

406. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18-32.
407. Salzman, N. H., M. A. Underwood, and C. L. Bevins. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 19:70-83.
408. Satchell, D. P., T. Sheynis, Y. Shirafuji, S. Kolusheva, A. J. Ouellette, and R. Jelinek. 2003. Interactions of mouse Paneth cell alpha-defensins and alpha-defensin precursors with membranes. Prosegment inhibition of peptide association with biomimetic membranes. *J Biol Chem* 278:13838-13846.
409. Sato, K., and S. Fujita. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 56:183-191.
410. Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-548.
411. Satoh, Y., K. Ishikawa, H. Tanaka, and K. Ono. 1986. Immunohistochemical observations of immunoglobulin A in the Paneth cells of germ-free and formerly-germ-free rats. *Histochemistry* 85:197-201.
412. Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168:5997-6001.
413. Scharton-Kersten, T., C. Contursi, A. Masumi, A. Sher, and K. Ozato. 1997. Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med* 186:1523-1534.
414. Scheidereit, C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25:6685-6705.
415. Schiavoni, G., C. Mauri, D. Carlei, F. Belardelli, M. C. Pastoris, and E. Proietti. 2004. Type I IFN protects permissive macrophages from *Legionella pneumophila* infection through an IFN-gamma-independent pathway. *J Immunol* 173:1266-1275.
416. Schieferdecker, H. L., R. Ullrich, A. N. Weiss-Breckwoldt, R. Schwarting, H. Stein, E. O. Riecken, and M. Zeitz. 1990. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 144:2541-2549.
417. Schmieg, J., G. Gonzalez-Aseguinolaza, and M. Tsuji. 2003. The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect* 5:499-506.
418. Schmitz, J. L., J. M. Carlin, E. C. Borden, and G. I. Byrne. 1989. Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 57:3254-3256.
419. Schneeberger, E. E., and R. D. Lynch. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262:L647-661.
420. Schreiber, M., A. Kolbus, F. Piu, A. Szabowski, U. Mohle-Steinlein, J. Tian, M. Karin, P. Angel, and E. F. Wagner. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53



- dependent. *Genes Dev* 13:607-619.
421. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.
  422. Schromm, A. B., E. Lien, P. Henneke, J. C. Chow, A. Yoshimura, H. Heine, E. Latz, B. G. Monks, D. A. Schwartz, K. Miyake, and D. T. Golenbock. 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 194:79-88.
  423. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406-17409.
  424. Schwartz, R. H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6:327-330.
  425. Senegas-Balas, F., D. Balas, L. Pradayrol, J. Laval, and A. Ribet. 1979. Comparative effects of CCK-PZ on certain intestinal hydrolases in the mucosa and in the luminal content of the hamster jejunum-ileum. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 26:486-492.
  426. Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55-70.
  427. Shanahan, F., R. Deem, R. Nayersina, B. Leman, and S. Targan. 1988. Human mucosal T-cell cytotoxicity. *Gastroenterology* 94:960-967.
  428. Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131-136.
  429. Shibahara, T., J. N. Wilcox, T. Couse, and J. L. Madara. 2001. Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:60-70.
  430. Shibuya, H., K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1996. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272:1179-1182.
  431. Shirafuji, Y., H. Tanabe, D. P. Satchell, A. Henschen-Edman, C. L. Wilson, and A. J. Ouellette. 2003. Structural determinants of procryptdin recognition and cleavage by matrix metalloproteinase-7. *J Biol Chem* 278:7910-7919.
  432. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
  433. Sibley, L. D., D. G. Mordue, C. Su, P. M. Robben, and D. K. Howe. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:81-88.
  434. Silva, N. M., C. V. Rodrigues, M. M. Santoro, L. F. Reis, J. I. Alvarez-Leite, and R. T. Gazzinelli. 2002. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70:859-868.
  435. Simmons, D. L. 1995. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv* 24:141-155.
  436. Skeen, M. J., M. A. Miller, T. M. Shinnick, and H. K. Ziegler. 1996. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J Immunol* 156:1196-1206.

437. Smith, J. E. 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 25:1301-1309.
438. Smith, P. D., L. E. Smythies, M. Mosteller-Barnum, D. A. Sibley, M. W. Russell, M. Merger, M. T. Sellers, J. M. Orenstein, T. Shimada, M. F. Graham, and H. Kubagawa. 2001. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 167:2651-2656.
439. Specian, R. D., and M. G. Oliver. 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol* 260:C183-193.
440. Speer, C. A., and J. P. Dubey. 1998. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 116 ( Pt 1):35-42.
441. Spencer, J., T. T. MacDonald, T. Finn, and P. G. Isaacson. 1986. The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clin Exp Immunol* 64:536-543.
442. Stadnyk, A. W., G. R. Sisson, and C. C. Waterhouse. 1995. IL-1 alpha is constitutively expressed in the rat intestinal epithelial cell line IEC-6. *Exp Cell Res* 220:298-303.
443. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.
444. Stocks, S. C., M. H. Ruchaud-Sparagano, M. A. Kerr, F. Grunert, C. Haslett, and I. Dransfield. 1996. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur J Immunol* 26:2924-2932.
445. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 117:514-521.
446. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109:1351-1359.
447. Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton, and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160:1212-1218.
448. Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L. E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli. 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164:5375-5382.
449. Svensson, H., A. Johannisson, T. Nikkila, G. V. Alm, and B. Cederblad. 1996. The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry. *Scand J Immunol* 44:164-172.
450. Svensson, M., J. Pfeifer, B. Stockinger, and M. J. Wick. 1997. Bacterial antigen delivery systems: phagocytic processing of bacterial antigens for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *Behring Inst Mitt*:197-211.
451. Sweet, M. J., C. C. Campbell, D. P. Sester, D. Xu, R. C. McDonald, K. J. Stacey, D. A. Hume, and F. Y. Liew. 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 168:392-399.
452. Taguchi, T., W. K. Aicher, K. Fujihashi, M. Yamamoto, J. R. McGhee, J. A. Bluestone, and H. Kiyono. 1991. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 147:3736-3744.

453. Taguchi, T., J. R. McGhee, R. L. Coffman, K. W. Beagley, J. H. Eldridge, K. Takatsu, and H. Kiyono. 1990. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that secrete IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 145:68-77.
454. Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto. 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5:649-658.
455. Takaesu, G., R. M. Surabhi, K. J. Park, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and R. B. Gaynor. 2003. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol* 326:105-115.
456. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310.
457. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
458. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
459. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.
460. Takeuchi, O., T. Kawai, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Takeda, and S. Akira. 1999. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231:59-65.
461. Taki, S., T. Sato, K. Ogasawara, T. Fukuda, M. Sato, S. Hida, G. Suzuki, M. Mitsuyama, E. H. Shin, S. Kojima, T. Taniguchi, and Y. Asano. 1997. Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* 6:673-679.
462. Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka, and N. Tanaka. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19:623-655.
463. Targan, S. R., R. L. Deem, M. Liu, S. Wang, and A. Nel. 1995. Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol* 154:664-675.
464. Tato, C. M., A. Villarino, J. H. Caamano, M. Boothby, and C. A. Hunter. 2003. Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 170:3139-3146.
465. Tenter, A. M., A. R. Heckerroth, and L. M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.
466. Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon. 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195:99-111.
467. Thieblemont, N., and S. D. Wright. 1999. Transport of bacterial lipopolysaccharide to the golgi apparatus. *J Exp Med* 190:523-534.
468. Thorne, K. J., and J. M. Blackwell. 1983. Cell-mediated killing of protozoa. *Adv*

- Parasitol* 22:43-151.
469. Timpl, R. 1989. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180:487-502.
  470. Totemeyer, S., P. Kaiser, D. J. Maskell, and C. E. Bryant. 2005. Sublethal infection of C57BL/6 mice with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium leads to an increase in levels of Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, and TLR9 mRNA as well as a decrease in levels of TLR6 mRNA in infected organs. *Infect Immun* 73:1873-1878.
  471. Tovey, M. G., J. F. Meritet, J. Guymarho, and C. Maury. 1999. Mucosal cytokine therapy: marked antiviral and antitumor activity. *J Interferon Cytokine Res* 19:911-921.
  472. Ueda, N., H. Kuki, D. Kamimura, S. Sawa, K. Seino, T. Tashiro, K. Fushuku, M. Taniguchi, T. Hirano, and M. Murakami. 2006. CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells in a manner dependent on IL-4. *Int Immunol* 18:1397-1404.
  473. Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada. 2007. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 44:3100-3111.
  474. Uehara, S., K. Song, J. M. Farber, and P. E. Love. 2002. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69<sup>+</sup> thymocytes and gammadeltaTCR<sup>+</sup> thymocytes preferentially respond to CCL25. *J Immunol* 168:134-142.
  475. Uehori, J., M. Matsumoto, S. Tsuji, T. Akazawa, O. Takeuchi, S. Akira, T. Kawata, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect Immun* 71:4238-4249.
  476. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
  477. Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14459-14463.
  478. Upadhyaya, G., S. C. Guba, S. A. Sih, A. P. Feinberg, M. Talpaz, H. M. Kantarjian, A. B. Deisseroth, and S. G. Emerson. 1991. Interferon-alpha restores the deficient expression of the cytoadhesion molecule lymphocyte function antigen-3 by chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *J Clin Invest* 88:2131-2136.
  479. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, C. da Costa, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Hacker, and H. Wagner. 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276:31332-31339.
  480. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels, and H. Wagner. 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277:15107-15112.
  481. Van Gool, S. W., P. Vandenberghe, M. de Boer, and J. L. Ceuppens. 1996. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* 153:47-83.
  482. van Pesch, V., H. Lanaya, J. C. Renauld, and T. Michiels. 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol* 78:8219-8228.

483. Varilek, G. W., G. A. Neil, and W. P. Bishop. 1994. Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *Am J Physiol* 267:G1101-1107.
484. Velazquez, L., K. E. Mogensen, G. Barbieri, M. Fellous, G. Uze, and S. Pellegrini. 1995. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem* 270:3327-3334.
485. Verthelyi, D., K. J. Ishii, M. Gursel, F. Takeshita, and D. M. Klinman. 2001. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 166:2372-2377.
486. Visintin, A., A. Mazzoni, J. A. Spitzer, and D. M. Segal. 2001. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12156-12161.
487. Wagner, H. 1999. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73:329-368.
488. Wagner, H. 2001. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14:499-502.
489. Wang, H., E. Rayburn, and R. Zhang. 2005. Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics. *Curr Pharm Des* 11:2889-2907.
490. Wang, H. C., and J. R. Klein. 2001. Multiple levels of activation of murine CD8(+) intraepithelial lymphocytes defined by OX40 (CD134) expression: effects on cell-mediated cytotoxicity, IFN-gamma, and IL-10 regulation. *J Immunol* 167:6717-6723.
491. Wang, Q., C. H. Fang, and P. O. Hasselgren. 2001. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1013-1023.
492. Wang, Q., J. J. Wang, S. Boyce, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1998. Endotoxemia and IL-1 beta stimulate mucosal IL-6 production in different parts of the gastrointestinal tract. *J Surg Res* 76:27-31.
493. Wang, T., W. P. Lafuse, and B. S. Zwilling. 2000. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following Mycobacterium avium infection. *J Immunol* 165:6308-6313.
494. Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley, and T. Maniatis. 1998. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1:507-518.
495. Watson, J. L., and D. M. McKay. 2006. The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut. *Clin Chim Acta* 364:1-11.
496. Wehkamp, J., G. Wang, I. Kubler, S. Nuding, A. Gregorieff, A. Schnabel, R. J. Kays, K. Fellermann, O. Burk, M. Schwab, H. Clevers, C. L. Bevins, and E. F. Stange. 2007. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 179:3109-3118.
497. Wesche, H., W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, and Z. Cao. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847.
498. Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113-117.
499. Wolfs, T. G., W. A. Buurman, A. van Schadewijk, B. de Vries, M. A. Daemen, P. S.

- Hiemstra, and C. van 't Veer. 2002. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 168:1286-1293.
500. Wong, S. Y., and J. S. Remington. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *Aids* 7:299-316.
  501. Wurbel, M. A., M. Malissen, D. Guy-Grand, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, M. Richelme, A. Carrier, and B. Malissen. 2001. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 98:2626-2632.
  502. Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X. F. Lei, and M. K. Achong. 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101:311-320.
  503. Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
  504. Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270:2008-2011.
  505. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
  506. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
  507. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4:1144-1150.
  508. Yang, C. H., A. Murti, S. R. Pfeffer, L. Basu, J. G. Kim, and L. M. Pfeffer. 2000. IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13631-13636.
  509. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.
  510. Yang, Y. L., L. F. Reis, J. Pavlovic, A. Aguzzi, R. Schafer, A. Kumar, B. R. Williams, M. Aguet, and C. Weissmann. 1995. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Embo J* 14:6095-6106.
  511. Yap, G. S., and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240-247.
  512. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.
  513. Ye, H., J. R. Arron, B. Lamothe, M. Cirilli, T. Kobayashi, N. K. Shevde, D. Segal, O. K. Dzivenu, M. Vologodskaya, M. Yim, K. Du, S. Singh, J. W. Pike, B. G. Darnay, Y. Choi, and H. Wu. 2002. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418:443-447.
  514. Yio, X. Y., and L. Mayer. 1997. Characterization of a 180-kDa intestinal epithelial cell

- membrane glycoprotein, gp180. A candidate molecule mediating t cell-epithelial cell interactions. *J Biol Chem* 272:12786-12792.
515. Young, J. D., A. J. Lawrence, A. G. MacLean, B. P. Leung, I. B. McInnes, B. Canas, D. J. Pappin, and R. D. Stevenson. 1999. Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med* 5:1424-1427.
  516. Yue, G., D. Merlin, M. E. Selsted, W. I. Lencer, J. L. Madara, and D. C. Eaton. 2002. Cryptdin 3 forms anion selective channels in cytoplasmic membranes of human embryonic kidney cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G757-765.
  517. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.
  518. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
  519. Zeitz, M., R. Ullrich, T. Schneider, H. L. Schieferdecker, and E. O. Riecken. 1994. Cell differentiation and proliferation in the gastrointestinal tract with respect to the local immune system. *Ann N Y Acad Sci* 733:75-86.
  520. Zhao, Q., S. Matson, C. J. Herrera, E. Fisher, H. Yu, and A. M. Krieg. 1993. Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Res Dev* 3:53-66.
  521. Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner, and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160:3627-3630.
  522. Zuber, P., and P. Jacquier. 1995. [Epidemiology of toxoplasmosis: worldwide status]. *Schweiz Med Wochenschr Suppl* 65:19S-22S.

## **Mécanismes cellulaires et moléculaires TLR9-dépendants activés par *Toxoplasma gondii* dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale.**

Lors de l'infection orale par le parasite *T. gondii*, la réponse immunitaire intestinale fait intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires initiateurs de l'inflammation servant à combattre l'infection. Cette réponse inflammatoire requiert l'intervention de mécanismes immuno-régulateurs pour permettre le maintien de l'homéostasie intestinale.

Nous avons étudié le rôle du TLR9 dans l'initiation de la réponse immunitaire à *T. gondii*. Ce récepteur de l'immunité innée est largement distribué dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale, à la fois par les cellules constituant la barrière épithéliale et dans la *lamina propria*. L'expression du TLR9 est requise dans ces différents compartiments pour initier une réponse immunitaire protectrice contre l'infection par *T. gondii*. L'activation des voies de signalisation du TLR9, par la reconnaissance directe de motifs moléculaires exprimés par *T. gondii*, induit la production d'interférons (IFNs) de type I  $\alpha$  et  $\beta$  dans l'intestin grêle des souris infectées. Ces cytokines stimulent la production de Cryptdines (Crp-3 et -5) par les cellules de Paneth et leur libération dans la lumière intestinale. Au-delà de leur activité antimicrobienne, les Crps participent au recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteurs d'IFN- $\gamma$  en renforçant la production de chimiokines inflammatoires comme CCL2, CCL3 et CCL5. Dans la *lamina propria*, les cellules dendritiques initient la réponse inflammatoire au parasite par des mécanismes TLR9-dépendants. L'engagement de ce récepteur par *T. gondii* polarise la réponse immunitaire au parasite, induite par les cellules dendritiques, vers un profil Th1.

Les lymphocytes B, bien qu'exprimant le TLR9, ne participent pas à l'initiation de la réponse inflammatoire à *T. gondii*. En revanche consécutivement à l'infection orale par le parasite, les cellules B activées amplifient d'une part le recrutement de cellules T CD4<sup>+</sup> dans la *lamina propria* par la production de la chimiokine CCL3. D'autre part renforcent la production de la cytokine inflammatoire IFN- $\gamma$ , par les cellules T effectrices, par des interactions de contact faisant intervenir leur TNF- $\alpha$  membranaire. La réponse immunitaire à *T. gondii* dégénère chez les souris C57BL/6 en iléite létale. Les lymphocytes T régulateurs sont naturellement générés au cours de l'infection. La sensibilisation des cellules T regs par des antigènes de *T. gondii*, préalablement à l'infection par le parasite, protège dans notre modèle de la génération de l'iléite. Les T regs sensibilisés ont une expression renforcée des marqueurs de domiciliation intestinale CCR5 et  $\alpha 4\beta 7$ . Ils rééquilibrent la balance cytokinique dans le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale des souris infectées en limitant la production de cytokines Th1 par les lymphocytes purifiés de la *lamina propria* et renforçant leur production de cytokines Th2 et Th3.