



**UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS
DE TOURS**

**ÉCOLE DOCTORALE : SANTE, SCIENCES, TECHNOLOGIES
UMR 0483 Université-INRA, Laboratoire d'Immunologie Parasitaire,
Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses**

THÈSE présentée par :
Rachel GUITON

soutenue le : **13 octobre 2008**

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

***Toxoplasma gondii* et réponse immunitaire
protectrice :**
**- Effecteurs de protection lors d'une vaccination
par des cellules dendritiques**
- Voies de signalisation activées par *T. gondii*

THÈSE dirigée par :

Mme DIMIER-POISSON Isabelle

Professeur, Université François Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. PRINA Eric

Chargé de recherche (HDR), Institut Pasteur de Paris

M. SIRARD Jean-Claude

Chargé de recherche (HDR), Institut Pasteur de Lille

JURY :

Mme BEUVILLAIN Céline

Docteur, Assistante hospitalo-universitaire, Université d'Angers

Mme DIMIER-POISSON Isabelle

Professeur, Université François Rabelais de Tours

Mme LACROIX-LAMANDE Sonia

Chargée de recherche, INRA de Tours-Nouzilly

M. PRINA Eric

Chargé de recherche (HDR), Institut Pasteur de Paris

Mme QUERE Pascale

Directrice de recherche, INRA de Tours-Nouzilly

M. RYFFEL Bernhard

Directeur de recherche, CNRS d'Orléans

M. SIRARD Jean-Claude

Chargé de recherche (HDR), Institut Pasteur de Lille

M. THIBAUT Gilles

Professeur, Université François Rabelais de Tours

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les Pr Bout et Dimier-Poisson pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et d'avoir rendu possible cette aventure de trois ans.

Je tiens également à remercier Mme Quéré pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, MM. Prina et Sirard pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Mme Beauvillain, Mme Lacroix-Lamandé, M. Ryffel et M. Thibault pour avoir accepté de prendre part au jury.

En particulier, je remercie M. Ryffel pour notre collaboration, qui je l'espère, se révélera fructueuse et durable.

Un grand merci à Isabelle, qui même après avoir pris la tête du laboratoire a su rester disponible pour sa thésarde la plus tête en l'air...Merci pour ta patience, ton écoute, ton sens de la pédagogie et pour les petits repas au bord de la piscine ! Les mots me manquent pour exprimer tout ce que tu m'as apporté au cours de ces trois années, alors je te dirai juste mille fois merci.

Je tiens également à remercier Jean-Marie (irremplaçable), Matthieu et Nicolas (inséparables...), Nathalie, Marie-Noëlle, Sarah (je te laisse seule maître du bureau, te laisse pas faire par Matthieu), Stéphanie (la femme sans jambes), Sylvie (une super secrétaire, mais pas que) pour toutes les fois où je les ai embêtés avec mes questions et pour la super ambiance qui règne au laboratoire.

Merci à Dany et Josette, les deux mousquetaires. Dany, pour sa joie de vivre et tous les petits ou grands services. J'espère que tu continueras longtemps à profiter de cette retraite si bien commencée ! Josette, pour les séances de papotage le soir, ses expressions si particulières (je me souviendrai longtemps du froid de chien) et toutes ces petites choses qui font qu'on ne l'oublie pas facilement ! Un dernier mot ? Zen, Josette, zen...

Merci à Céline. Que de concerts, de "barres de rire", de bêtises et d'émotions partagées en trois ans ! Bref, une véritable amie. Picardia independenza ! ;-). Je t'attends à Marseille pour faire un tour dans le stade Vélodrome un soir de match...promis, je ferai même semblant de supporter l'OM !

Un grand merci à tous mes amis, de Tours et d'ailleurs, qui m'ont supportée depuis plus ou moins longtemps (moins pour les chanceux...) et sans qui les cours, les stages, les soirées et les week-ends ne seraient pas les mêmes.

Merci à mon petit rayon de soleil qui a réussi à illuminer cette dernière année de thèse, en partageant les moments difficiles comme les moments de joie. J'espère que de nombreuses années de bonheur nous attendent, semblables à celle que nous venons de vivre.

Enfin, un immense MERCI à ma famille et en particulier à mes parents, à qui je dois et je dédie cette thèse. Merci d'avoir été présents depuis le début et tout au long de mes études, même si je sais que le départ pour Tours n'a pas été facile. J'espère que cette thèse vous emplira de fierté et de bonheur, vous le méritez.

RESUME

Toxoplasma gondii, protozoaire intracellulaire obligatoire, est à l'origine de la toxoplasmose, parasitose qui revêt un caractère sévère au cours de toxoplasmoses cérébrales ou congénitales responsables de nombreux avortements et malformations fœtales, en médecine humaine et vétérinaire. Aucun vaccin n'est disponible ; le développement d'approches vaccinales efficaces est donc d'actualité.

Des travaux précédents ont montré que l'immunisation de souris CBA/J avec des cellules dendritiques pulsées avec de l'extrait de *T. gondii* induit une réponse humorale spécifique du parasite, en association avec une réponse cellulaire de type Th1 et une protection significative des souris se traduisant par une réduction de 60% de la charge parasitaire cérébrale.

La déplétion *in vivo* des LTCD₄⁺ ou des LTCD₈⁺, suite à un challenge par des kystes de *T. gondii*, nous a permis de déterminer le rôle décisif des LTCD₈⁺ et le rôle accessoire des LTCD₄⁺ au cours de la phase chronique de l'infection.

Dans un second temps, nous avons étudié deux voies de signalisation intracellulaires conséquentes de la reconnaissance du toxoplasme.

Nous avons étudié le rôle du récepteur à l'IL-17 (IL-17R) ainsi que l'implication de la molécule MyD88, un adaptateur de la voie des TLR (récepteurs de l'immunité innée), dans la survie et la protection des souris face à une infection par *T. gondii*. Nous avons ainsi montré l'implication de l'IL-17R dans l'induction de la réponse inflammatoire délétère chez les souris C57BL/6. Nous avons également déterminé le caractère essentiel de MyD88 pour la survie des souris BALB/c en phase chronique, son absence aboutissant à la mort des animaux par toxoplasmose cérébrale.

SUMMARY

Toxoplasma gondii, an obligate intracellular protozoan, is the etiologic agent of toxoplasmosis. This parasitic infection has severe consequences during cerebral or congenital toxoplasmosis, responsible for numerous abortions or fetal malformations, both in human and veterinary medicines. No vaccine is currently available so the design of efficient vaccine strategies is still a topical question.

Previous works have shown that immunization of CBA/J mice with *T. gondii* extract-pulsed dendritic cells induces a parasite-specific humoral response, associated with a Th1 type cellular response and a significant protection of mice assessed by a 60% reduction of the brain cyst load.

In vivo depletion of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes following a challenge with *T. gondii* cysts, allowed us to establish the relative implication of these populations during the chronic phase of infection. We thus demonstrated the main effector role of CD8⁺ T cells and the secondary role of CD4⁺ T cells in the protection of mice.

The second part of our work consisted in the study of intracellular signaling pathways induced following the parasite recognition.

We studied the role of IL-17 receptor (IL-17R) and the implication of MyD88, an adaptor molecule of most of the TLR pathways (receptors of innate immunity), in the survival and the protection of mice following *T. gondii* infection. We thus showed the implication of IL-17R in the induction of a deleterious inflammatory response in C57BL/6 mice. We also determined the crucial role of MyD88 in the survival of BALB/c mice during the chronic phase of the disease, as in the absence of this adaptor molecule animals succumb to a cerebral toxoplasmosis.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
A - TOXOPLASMA GONDII ET TOXOPLASMOSE	
I. <i>Toxoplasma gondii</i>	4
I.1. Origine et classification	4
I.2. Les différentes formes parasitaires	4
I.2.1. Le tachyzoïte	4
I.2.2. Le bradyzoïte	5
I.2.3. Le sporozoïte	6
I.3. Cycle biologique	7
I.3.1. Cycle asexué	7
I.3.2. Cycle sexué	9
I.4. Génotypes	10
II. La toxoplasmose	11
II.1. Modes de contamination	11
I.1.1. La voie digestive	11
I.1.2. La voie transplacentaire	12
I.1.3. Greffe d'organe et transfusion	13
II.2. Prévention	13
II.2.1. Prévention vis-à-vis des kystes	14
II.2.2. Prévention vis-à-vis des oocystes	15
II.3. Diagnostic	16
II.3.1. Méthodes	16
II.3.2. Cinétique d'apparition des immunoglobulines	16
II.3.3. Diagnostic chez la femme enceinte et le fœtus	17
II.3.4. Diagnostic chez le nouveau-né	19
II.3.5. Diagnostic chez l'immunodéprimé	21
II.4. Incidence et traitements chez la femme enceinte	21
II.5. Incidence et traitements chez l'immunodéprimé	22
II.6. Incidence chez l'animal	23
II.7. Toxoplasmose et troubles du comportement	24
II.7.1. Cas de l'animal	24
II.7.2. Cas de l'homme	25
II.7.3. Influence des traitements sur <i>T. gondii</i> et le comportement de l'hôte	25
II.8. Toxoplasmose et lignées de souris	26

B - IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE

I. Réponse humorale	27
I.1. Réponse humorale muqueuse	27
I.2. Réponse humorale systémique	28
II. Réponse cellulaire	30
II.1. La réponse innée	30
II.1.1. Synthèse d'IL-12	30
II.1.2. Synthèse d'IFN- γ	33
II.2. Les cellules dendritiques : des cellules présentatrices d'antigène à l'interface entre immunités innée et acquise	34
II.2.1. Classification selon la localisation anatomique	34
II.2.2. Classification selon les marqueurs de surface exprimés	35
II.2.3. Cellules dendritiques et <i>T. gondii</i>	37
II.3. La réponse adaptative	42
II.3.1. Les lymphocytes T CD4+	42
II.3.2. Les lymphocytes T CD8+	47
III. Voies de signalisation induites par <i>Toxoplasma gondii</i>	50
III.1. Récepteurs Toll-like et protéine adaptatrice MyD88	50
III.1.1. Structure et ligands des récepteurs Toll-like	50
III.1.2. Les voies de signalisation des TLR	52
III.1.3. La régulation des voies de signalisation des TLR	54
III.1.4. TLR/MyD88 et <i>Toxoplasma gondii</i>	55
III.2. Récepteur à l'interleukine-17	59
III.2.1. L'interleukine-17	59
III.2.2. Le récepteur de l'interleukine-17	60
III.2.3. La voie de signalisation de l'IL-17R	61
III.2.4. IL-17R et <i>Toxoplasma gondii</i>	62

C - VACCINATION ANTI-TOXOPLASMIQUE

I. Vaccins vivants atténués	63
II. Vaccination par de l'extrait antigénique de <i>T. gondii</i>	64
III. Vaccination par des antigènes de <i>T. gondii</i>	65
III.1. Les antigènes de surface	65
III.2. Les antigènes de granules denses	68
III.3. Les antigènes de rhoptries	70
III.4. Les antigènes de micronèmes	70
IV. Vaccination par des cellules dendritiques	71

ARTICLE I	75
ARTICLE II	103
ARTICLE III	125
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
ANNEXES	166

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire responsable de la toxoplasmose, une zoonose cosmopolite affectant un tiers de la population mondiale. La contamination de l'hôte immunocompétent passe souvent inaperçue et n'a aucune conséquence sur l'état de santé. En revanche, elle revêt un caractère de grande sévérité dans le cadre de toxoplasmoses cérébrale et congénitale. L'hôte immunodéprimé peut soit subir la réactivation d'une infection antérieurement acquise, soit subir une primo-infection ; les deux donnent lieu à une toxoplasmose cérébrale, fatale si elle reste non traitée. Les atteintes fœtales, lors de la séroconversion de la mère en cours de grossesse, offrent un large spectre de pathologies, de la chorioretinite au retard mental, et peuvent même induire des avortements spontanés dans les cas les plus graves. L'impact en santé animale n'est pas négligeable, essentiellement dans les pays d'élevage où les éleveurs subissent de lourdes pertes économiques suite aux avortements infectieux.

L'infection par *T. gondii* induit la mise en place d'une forte réponse cellulaire Th1, capable d'éradiquer la majeure partie des parasites de l'organisme hôte. Seuls quelques uns subsistent sous forme de kystes, la forme de persistance, qui s'installent dans les sites pauvres en immunité comme les muscles ou le cerveau. Cette persistance permet l'établissement et le maintien d'une immunité anti-toxoplasmique à long terme qui protège l'hôte contre une éventuelle réinfection. Cette caractéristique est en faveur de la faisabilité du développement d'une stratégie vaccinale efficace contre ce parasite. De nombreux essais vaccinaux ont été et sont encore menés, aucun d'entre eux ne permettant une protection totale des animaux. Cependant, des travaux ont donné lieu à la commercialisation d'un vaccin ovin. Ce vaccin est composé de parasites atténués par des passages successifs en culture cellulaire. Sa méthode d'obtention n'exclut donc pas un risque de réversion chez l'hôte vacciné. Il n'est actuellement disponible qu'en Nouvelle-Zélande et n'est plus commercialisé en Europe. Ainsi, le besoin d'un vaccin est toujours d'actualité et son développement est l'un des objectifs de notre laboratoire.

Nos recherches portent notamment sur le rôle joué par les cellules dendritiques (DC) dans la mise en place de l'immunité anti-toxoplasmique. Cette immunité fait appel à des mécanismes innés, comme l'action de l'oxyde nitrique ou la synthèse d'IFN- γ par les cellules NK, mais est surtout médiée par les lymphocytes T (LT) spécifiques. Les LT CD4+ ont un rôle privilégié, par leur synthèse de la cytokine majeure de résistance à *T. gondii* : l'IFN- γ , mais également par leur induction des LT CD8+, eux-mêmes sécréteurs d'IFN- γ . Les DC, indispensables à l'induction des LT spécifiques du parasite, se positionnent ainsi à l'interface

entre immunités innée et acquise. Des études précédentes ont montré que l'immunisation de souris CBA/J avec des DC primaires sensibilisées avec de l'extrait toxoplasmique les protège contre une infection d'épreuve, notamment par l'induction de fortes réponses humorale et cellulaire de type Th1. Cependant, ces études ont mis en évidence la difficulté d'obtention de telles cellules primaires du fait de leur faible nombre en circulation ou dans les organes lymphoïdes. Pour pallier ce problème, notre laboratoire a établi une nouvelle lignée de DC CD8⁺ spléniques murines, de type conventionnel lymphoïde, appelée SRDC. La caractérisation des SRDC a révélé une grande similarité avec les DC primaires correspondantes, tant aux niveaux phénotypique que morphologique et même fonctionnel.

La suite de ces travaux, décrits dans cette thèse, a utilisé cette lignée de DC sensibilisées avec de l'extrait parasitaire en tant qu'agent vaccinant. Ce protocole ayant déjà montré son efficacité, notre but était de décrire quels étaient les mécanismes de protection mis en jeu suite à l'immunisation de souris CBA/J avec ces DC sensibilisées. Grâce à des expériences de déplétion *in vivo*, nous avons pu montrer le rôle primordial des LT CD8⁺ dans la production de cytokines et dans la protection des animaux, ainsi que le rôle accessoire des LT CD4⁺.

Le deuxième volet de nos recherches a porté sur deux voies de signalisation induites par la reconnaissance de *T. gondii*.

La première voie étudiée est celle de l'IL-17 et de son récepteur (IL-17R). La découverte de cette cytokine a permis de caractériser une nouvelle sous-population de LT CD4⁺ helper, appelée Th17, qui se différencie sous l'action combinée du TGF- β et de l'IL-6. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire largement impliquée dans la survenue des maladies autoimmunes telles que la sclérose multiple ou la maladie de Crohn. La description de son rôle dans la toxoplasmose n'a été initiée que récemment. Des travaux préliminaires avec des souris C57BL/6 délétées pour l'IL-17R ont montré une réponse immunitaire spécifique de *T. gondii* normale associée à une meilleure résistance aux dommages tissulaires induits par le parasite que les souris de phénotype sauvage. L'infection des mêmes souris nous a permis de mettre en évidence une meilleure survie, une diminution de l'inflammation intestinale et de l'infiltration par des neutrophiles en comparaison des souris de phénotype sauvage. Nous avons ainsi montré une action délétère de l'IL-17 et de son récepteur dans l'infection à *T. gondii*.

La deuxième voie que nous avons étudiée est celle qui passe par les TLR et plus particulièrement une molécule adaptatrice de cette voie : MyD88. Les TLR sont caractérisés par leur capacité à reconnaître des motifs conservés parmi les pathogènes (MAMP) et à

induire la synthèse de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, en fonction de la nature du ligand. Une seule molécule de *T. gondii* a été identifiée comme ligand d'un TLR chez la souris : la profiline qui se lie au TLR11, mais l'implication de nombreux autres TLR et de la molécule MyD88 a été décrite dans des modèles de souris C57BL/6 délétées. En effet, des C57BL/6 délétées pour le TLR2, TLR9 ou la protéine MyD88 montrent une mortalité accélérée ainsi qu'une déficience dans la mise en place d'une réponse Th1 efficace. Nous avons étudié l'implication de la molécule MyD88 dans un autre modèle murin, plus proche des réponses mises en place chez les hôtes intermédiaires. En effet, les C57BL/6 sont des souris naturellement sensibles à l'infection par *T. gondii* et succombent au cours de la phase aiguë de la maladie. En revanche, les souris BALB/c que nous avons utilisées sont résistantes à la phase aiguë et s'installent dans la chronicité, avec le développement de kystes cérébraux. L'infection de BALB/c délétées pour l'adaptateur MyD88 nous a permis de mettre en évidence le rôle majeur de cette molécule dans la mise en place d'une réponse Th1 anti-toxoplasmique, ces souris succombant, en effet, à une toxoplasmose cérébrale.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1. Photographie de *Ctenodactylus gundi*.
Rongeur nord-africain chez lequel *Toxoplasma gondii* a été identifié en 1908 par Nicole et Manceaux.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/37/Gundi_Ctenodactylus_gundi_051117_2.jpg/800px-Gundi_Ctenodactylus_gundi_051117_2.jpg

A - *TOXOPLASMA GONDII* ET TOXOPLASMOSE

Toxoplasma gondii est un parasite responsable d'une zoonose : la toxoplasmose. Cette pathologie mondialement répandue est le plus souvent bénigne mais revêt un caractère sévère si l'atteinte concerne des sujets immunodéprimés ou des femmes enceintes séronégatives.

I. *Toxoplasma gondii*

I.1. Origine et classification

Ce parasite protozoaire a été initialement décrit en 1908 par Nicolle et Manceaux suite à sa découverte chez un rongeur, à qui il doit son nom, *Ctenodactylus gundi* (Nicolle et Manceaux, 1908) (Fig. 1). Dans un premier temps, il s'est appelé *Leishmania gondii* du fait de sa grande ressemblance avec cet autre parasite. Un an plus tard, il fut rebaptisé *Toxoplasma gondii* du grec « toxon » (arc) et « plasma » (forme) (Nicolle et Manceaux, 1909).

Il a été rattaché au phylum des Apicomplexes majoritairement constitué de parasites intracellulaires obligatoires (Levine, 1977), à la classe des Coccidies grâce à des études de microscopie électronique et plus précisément aux Coccidies formant des kystes tissulaires (Tenter *et al*, 2002 ; Barta, 2001). Finalement, sa classification systématique actuelle est la suivante (Barta, 2001 ; Su *et al*, 2003) :

Règne : *Protista*

Phylum : *Apicomplexa*

Classe : *Coccidia*

Famille : *Sarcocystidae*

Sous-famille : *Toxoplasmatinae*

Genre : *Toxoplasma*

Espèce : *gondii*

I.2. Les différentes formes parasitaires

T. gondii existe sous trois formes infectieuses, selon l'hôte et le stade infectieux considérés.

I.2.1. Le tachyzoïte

La forme tachyzoïte tient son nom, initialement proposé par Frenkel, du grec « tachos » (rapide) (Frenkel, 1973) (Fig. 2A). C'est en effet la forme de multiplication rapide

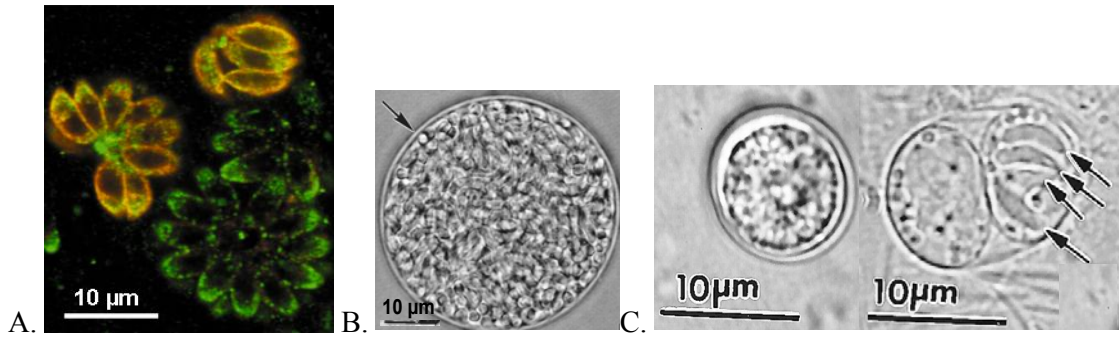


Figure 2. Les trois formes infectieuses de *Toxoplasma gondii*.

A. Tachyzoïtes intracellulaires en rosette, forme caractéristique de leur division. Forme de multiplication rapide.

B. Bradyzoïtes, forme de multiplication lente, contenus dans un kyste cérébral.

C. Oocyste non sporulé (gauche) et oocyste contenant deux sporocystes, dont l'un comptant quatre sporozoïtes (droite). L'oocyste est la forme de résistance dans le milieu extérieur.

A. D'après Meissner *et al.* A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J. Cell Sci.* 2002 ; 115 : 563-574.

B. et C. D'après Dubey *et al.* Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998 ; 11 : 267-299.

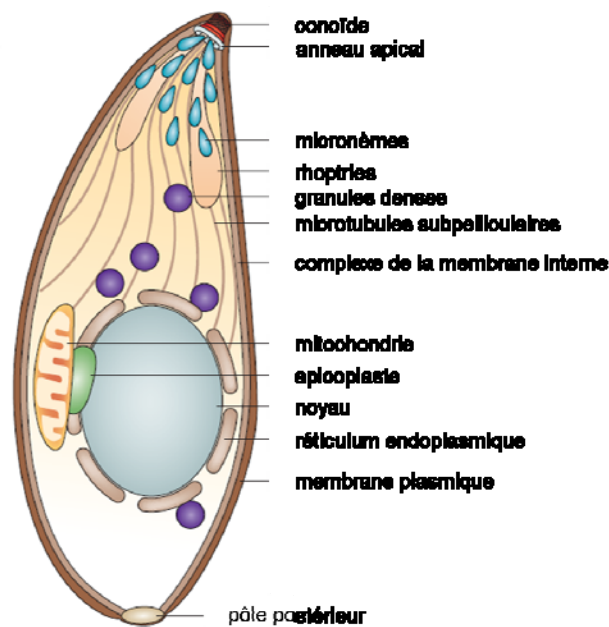


Figure 3. Ultrastructure du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*.

En forme de croissant, le tachyzoïte présente une extrémité arrondie et une extrémité conoïdale. La membrane externe est constituée de trois couches superposées. En plus des organites classiques d'un eucaryote, le tachyzoïte contient des organelles particulières : rhoptries, micronèmes, granules denses, conoïde, apicoplaste, anneaux apicaux, impliqués dans l'invasion des cellules-hôtes.

D'après Baum *et al.* Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006 ; 4 : 621-628.

du parasite, elle peut être retrouvée dans tous les types cellulaires d'un organisme. La multiplication des tachyzoïtes se fait par endodyogénies successives, une forme spécialisée de reproduction asexuée au cours de laquelle deux tachyzoïtes-fils se forment dans le parasite parent. Au cours de l'endodyogénie, l'appareil de Golgi se divise en premier, il est alors doublé au pôle antérieur du noyau. Ensuite, les portions antérieures du complexe de la membrane interne et les microtubules subpelliculaires apparaissent comme deux structures antérieures en forme de dôme puis le noyau prend une forme en fer à cheval et ses extrémités se déplacent dans le dôme antérieur du tachyzoïte en formation. Le complexe membranaire interne et les microtubules subpelliculaires continuent leur expansion vers le pôle postérieur et recouvrent la moitié du noyau qui se divise finalement en deux. Le nouveau tachyzoïte continue à se développer jusqu'à ce qu'il atteigne la surface du tachyzoïte parent. Le complexe membranaire interne de ce dernier disparaît et sa membrane externe devient le plasmalemme du tachyzoïte-fils. Les phénomènes d'endodyogénie successifs ont lieu au sein d'une vacuole parasitophore et aboutissent à la formation d'une structure en rosette. En forme de croissant, le tachyzoïte mesure de 2 à 6 μm et présente deux extrémités différentes, l'une arrondie, l'autre pointue ou conoïdale. La membrane externe de cette forme parasitaire est constituée de trois couches superposées : le plasmalemme associé à deux couches formant un complexe interne de vésicules aplaties. En plus des structures internes classiquement retrouvées chez les organismes eucaryotes (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, microtubules...), il contient des organelles particulières : rhoptries, micronèmes, granules denses, conoïde, apicoplaste, anneaux polaires et apicaux (Fig. 3). Ces organelles ont un rôle essentiel lors de l'invasion des cellules-hôtes (Dubey *et al*, 1998 ; Speer *et al*, 1999).

I.2.2. Le bradyzoïte

Egalement dû à Frenkel, le terme bradyzoïte vient du grec « brady » (lent) et désigne la forme parasitaire qui se multiplie lentement au sein de kystes intracellulaires, des structures sphériques qui protègent le bradyzoïte du système immunitaire, chez l'hôte intermédiaire comme chez l'hôte définitif (Fig. 2B).

Ces kystes grossissent à mesure que les bradyzoïtes, dérivés des tachyzoïtes, se multiplient par endodyogénie mais restent intracytoplasmiques. Leur taille est ainsi très variable, pouvant aller de 5 μm de diamètre à 70 μm dans de rares cas de kystes intracérébraux, et contiennent de deux à plusieurs centaines de bradyzoïtes. Les kystes se localisent préférentiellement dans

les cellules neurales et musculaires où ils persistent tout au long de la vie de l'hôte infecté sans déclencher de réaction inflammatoire.

La paroi du kyste dérive de celle de la vacuole parasitophore. La membrane de cette dernière présente de nombreuses petites invaginations tandis qu'une seconde couche homogène se développe sous la membrane. Les invaginations de la membrane se ramifient et certaines finissent par des bourgeons. La paroi du kyste est lisse et fine (0,5 μm), et ne contient ni glycogène ni aucun autre polysaccharide. Le kyste contient des bradyzoïtes en forme de croissant mesurant chacun $7 \times 1,5 \mu\text{m}$ (Ferguson et Hutchison, 1987 ; Dubey *et al*, 1998).

Les bradyzoïtes diffèrent peu des tachyzoïtes. Le noyau du bradyzoïte est plus postérieur que celui du tachyzoïte, qui a tendance à être central. Les bradyzoïtes sont plus minces que les tachyzoïtes et contiennent des granules d'amylopectine absents ou présents en faible quantité chez les tachyzoïtes. Enfin, les bradyzoïtes sont plus résistants que les tachyzoïtes à une destruction par des enzymes protéolytiques (Dubey *et al*, 1998 ; Speer *et al*, 1999).

Les deux stades, tachyzoïte et bradyzoïte, peuvent également être différenciés par l'expression de certains antigènes malgré leurs caractéristiques morphologiques communes. Des antigènes spécifiques d'un stade ont été mis en évidence et peuvent notamment être utilisés comme marqueurs pour suivre l'interconversion tachyzoïte-bradyzoïte au cours des études réalisées *in vitro*. La plupart des antigènes de surface identifiés, ou SAG, peuvent être classés en deux familles, reliés soit à SAG1 soit à SAG2. La famille de SAG1 compte SAG3, les protéines SRS1 à SRS4 (SAG-related sequences), SAG5 et BSR4 (bradyzoite-specific recombinant). Alors que SAG1 et les SRS1 à 3 sont uniquement présentes sur les tachyzoïtes, BSR4 est restreinte aux bradyzoïtes et SAG3 est présente sur les deux stades. Cette famille de protéines jouerait un rôle dans l'attachement avant l'invasion parasitaire. La famille de SAG2 compte quatre protéines proches, SAG2A à D. Tandis que SAG2A et B sont uniquement exprimées sur les tachyzoïtes, SAG2C et D sont restreintes aux bradyzoïtes. SAG4 et SAG4.2 sont des protéines de surface spécifiques du bradyzoïte additionnelles, sans similarité structurale avec les autres SAG (Lyons *et al*, 2002).

I.2.3. Le sporozoïte

Les sporozoïtes, formes résultant de la multiplication sexuée du parasite, sont contenus dans une structure résistant aux conditions extérieures, l'oocyste (Fig. 2C).

Les oocystes se développent chez l'hôte définitif avant d'être excrétés dans le milieu extérieur où ils sporulent et peuvent persister plusieurs mois tout en gardant leur pouvoir

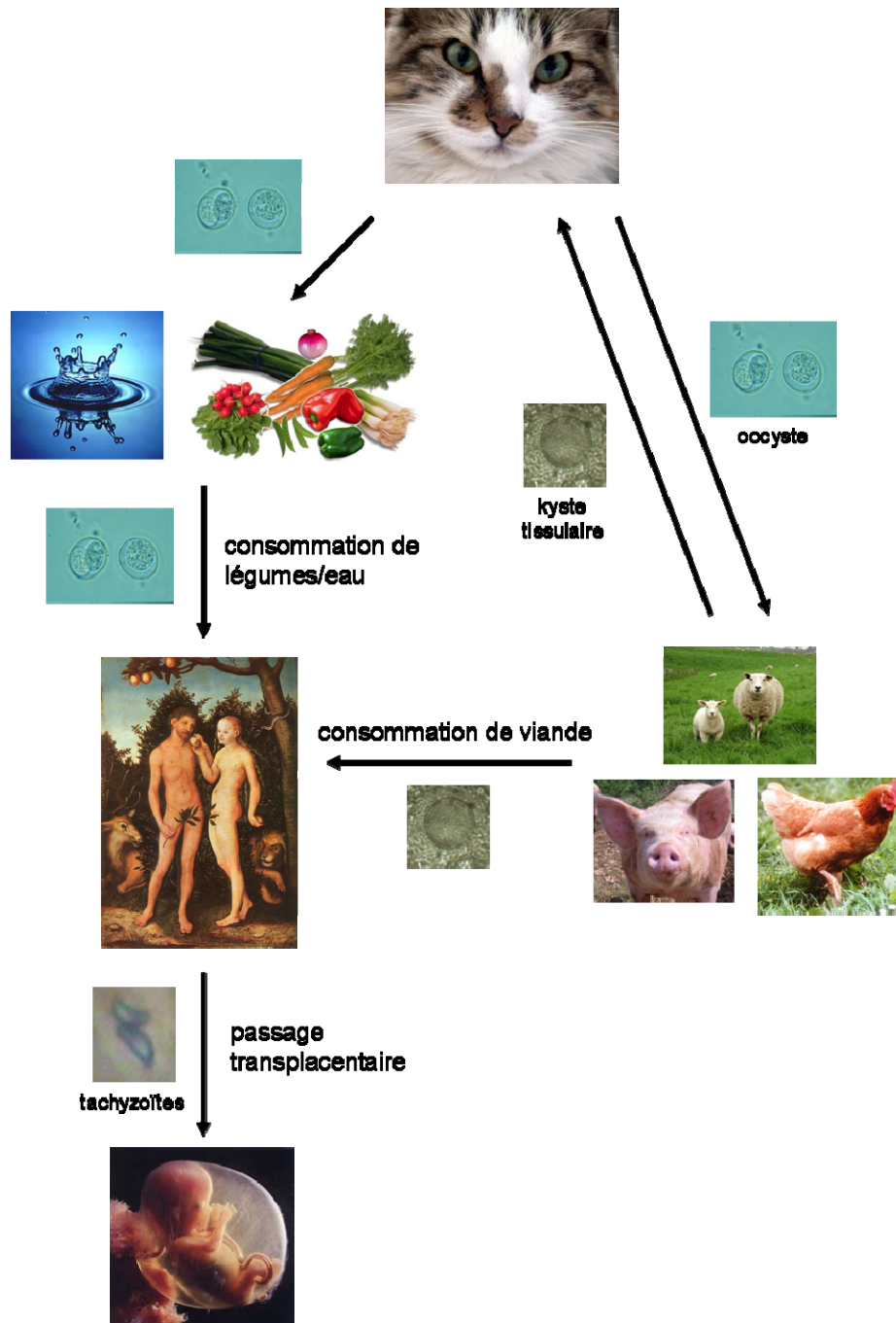


Figure 4. Cycle biologique de *Toxoplasma gondii*.

Les hôtes définitifs (HD), chez lesquels a lieu la reproduction sexuée du parasite, sont les félinés, et en particulier le chat. Les hôtes intermédiaires (HI), chez lesquels a lieu la reproduction asexuée, sont les homéothermes, plus particulièrement l'Homme et les animaux de rente. L'excrétion d'oocystes par l'HD est à l'origine de la contamination du milieu extérieur et par conséquent, de l'Homme et des animaux de rente. La réponse immunitaire chez ces derniers mène à la formation de kystes tissulaires ingérés par les HD comme par les HI lors de la consommation de viande contaminée. Enfin, la contamination de l'HI peut avoir lieu lors du passage transplacentaire de tachyzoïtes au cours d'une primo-infection de la mère. Peinture de Lucas Cranach l'Ancien, 1531.

infectieux. Les oocystes non sporulés ont une structure sphérique de 10 à 12 μm de diamètre alors que la forme sporulée mesure de 11 à 13 μm .

Le cytoplasme d'un oocyste sporulé a un grand noyau avec un nucléole distinct et un nucléoplasme amorphe. Cet oocyste est limité par une membrane unitaire contenant peu de micropores. Le noyau se divise deux fois, donnant ainsi quatre noyaux, situés à la périphérie de l'oocyste non sporulé. Lors de cette étape, une seconde membrane se forme. Une fois le cytoplasme divisé, deux sporoblastes sphériques sont constitués, chacun avec deux noyaux. Par la suite, les sporoblastes s'allongent, devenant ainsi des sporocystes. Les deux membranes externes des sporoblastes deviennent la couche externe de la paroi des sporocystes et le plasmalemme de la masse cytoplasmique devient la couche interne. La formation des sporozoïtes débute avec l'apparition de deux plaques denses aux deux extrémités du sporocyste. Chaque noyau se divise en deux et est incorporé dans l'une des plaques denses en cours d'élongation. Ainsi, les oocystes sporulés contiennent deux sporocystes en forme d'ellipse de 6 à 8 μm et chaque sporocyste renferme quatre sporozoïtes (Dubey *et al*, 1998). La paroi de l'oocyste sporulé est constituée de trois couches : une couche externe dense aux électrons, une couche moyenne réfringente et une couche interne moyennement dense, tandis que celle du sporocyste compte deux couches : une fine couche externe dense aux électrons et une couche interne encore plus fine moyennement dense (Speer *et al*, 1998).

L'ultrastructure du sporozoïte est similaire à celle du tachyzoïte bien que le sporozoïte soit plus riche en micronèmes, rhoptries et granules d'amylopectine (Dubey *et al*, 1998).

I.3. Cycle biologique

T. gondii est un parasite hétéroxène. Son cycle biologique se décompose en deux phases : la phase asexuée qui se déroule chez les hôtes intermédiaires et la phase sexuée qui se déroule chez l'hôte définitif (Fig. 4). C'est un parasite qui a une très large variété d'hôtes intermédiaires puisqu'il peut infecter tous les homéothermes : mammifères, oiseaux et même hommes.

I.3.1. Cycle asexué

T. gondii est certainement l'un des parasites qui a le plus large spectre d'hôtes intermédiaires. Tous ces hôtes sont le siège du cycle asexué du parasite qui peut s'infecter soit par ingestion d'oocystes soit par ingestion de kystes tissulaires. La cinétique du cycle varie en fonction de la forme infectieuse ingérée, oocystes ou kystes.

Suite à l'ingestion d'oocystes, les sporozoïtes sont libérés et entrent dans les entérocytes dans les quatre heures. Dans les six à douze heures suivantes, les sporozoïtes se transforment en tachyzoïtes qui commencent à se diviser dans une vacuole parasitophore au sein des cellules endothéliales capillaires, des macrophages, des lymphocytes, des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules des muscles lisses et des fibroblastes de la lamina propria intestinale. Six jours plus tard, des parasites sont retrouvés dans le cerveau et dès sept jours post-infection, les bradyzoïtes se forment (Dubey, 1998).

Suite à l'ingestion de kystes tissulaires, les bradyzoïtes pénètrent dans les entérocytes et les cellules de la lamina propria dans les deux heures. Quelques heures plus tard, les bradyzoïtes se transforment en tachyzoïtes. Dans les quatre jours suivants, les tachyzoïtes ont atteint le cerveau, les poumons et les autres organes. Deux jours plus tard, les kystes se forment. Leur localisation et leur nombre dépend de l'hôte : chez les rongeurs (souris et rats), les kystes sont plutôt présents dans le cerveau tandis que chez les ruminants (bétail, ovins, chèvres...) ils sont préférentiellement localisés dans les muscles (Dubey, 1998).

In vitro, l'entrée des tachyzoïtes dans des cellules non phagocytaires, comme les fibroblastes, est un processus rapide (15 à 30 secondes) et actif qui implique des moteurs actine/myosine dans le parasite. L'invasion est toujours initiée au pôle apical de *T. gondii*. Le contenu des micronèmes est libéré dès le contact initial du pôle apical avec la surface de la cellule-hôte. Immédiatement après, les rhoptries injectent leur contenu dans le cytoplasme local de la cellule-hôte. Les protéines de rhoptries interviennent dans la biogenèse de la vacuole parasitophore et dans l'association des organelles de l'hôte à cette vacuole. Enfin, alors que le parasite est entièrement encapsulé dans sa vacuole parasitophore, les granules denses libèrent leurs protéines dans le lumen de la vacuole. Ces protéines modifient la vacuole pour permettre l'acquisition de nutriments de la cellule-hôte (Black et Boothroyd, 2000 ; Carruthers, 2002).

La vacuole de *T. gondii* est remarquable par sa capacité à échapper à toute fusion avec des vésicules cytoplasmiques. La paroi de la vacuole est lisse et exempte de presque toute protéine intramembranaire. Vingt pourcents de la vacuole sont fournis par le parasite au cours de l'entrée mais la majorité de la membrane initiale est dérivée de la cellule-hôte (Black et Boothroyd, 2000). Cette membrane intervient dans le réarrangement des microtubules de l'hôte, le recrutement et l'association de haute affinité avec les mitochondries et le réticulum endoplasmique de l'hôte, la capture de divers lipides depuis les mitochondries et le réticulum endoplasmique et la subversion de certains facteurs de transcription, kinases et phosphatases de l'hôte. De plus, les pores de la membrane permettent un accès bidirectionnel au cytoplasme

de l'hôte pour des molécules de taille supérieure à 1300 Daltons comme des nucléotides, des acides aminés ou des sucres simples (Martin *et al*, 2007).

La sortie du parasite est rapide et entraîne la lyse de la cellule-hôte tout en libérant des parasites très mobiles. Aucun événement sécrétoire de la part du parasite n'a été mis en évidence (Black et Boothroyd, 2000). La dissémination des parasites dans l'organisme donne lieu à une phase de parasitémie qui déclenche la réponse immunitaire de l'hôte. Les rares parasites qui échappent à l'élimination par le système immunitaire de l'hôte s'enkystent alors dans les organes cibles.

I.3.2. Cycle sexué

Les hôtes définitifs, chez lesquels a lieu le cycle sexué du parasite, sont définis par la famille des félidés. Le chat est certainement l'espèce la plus représentative en ce qui concerne le portage de la toxoplasmose.

Chez le chat domestique, la contamination naturelle a lieu rapidement après le sevrage par ingestion de kystes tissulaires dans les proies infectées, comme les petits Mammifères ou les oiseaux. D'après des études épidémiologiques, 43 % des chats adultes étaient infectés par *T. gondii* en France, à la fin des années 90. La séroprévalence varie avec l'âge et est plus importante chez les chats errants qui chassent leurs proies que chez les chats domestiques qui sont nourris avec des aliments en conserve (Tenter *et al*, 2000).

Le cycle sexué a essentiellement été décrit suite à une contamination par des kystes tissulaires. Dans les intestins du chat, les bradyzoïtes libérés envahissent les cellules entéroépithéliales afin d'y effectuer leur multiplication asexuée.

La différenciation sexuée en macrogamétocytes femelles ou en microgamétocytes mâles débute trois à quinze jours après la contamination. Dans la lumière intestinale, les microgamétocytes libèrent des microgamètes mâles flagellés qui peuvent alors fertiliser les macrogamètes femelles contenus dans les cellules entéroépithéliales. Des oocystes immatures sont libérés des cellules épithéliales et relargués quotidiennement dans les fécès du chat. Ils ne sont pas directement infectieux pour les animaux ou les humains. Le développement du caractère infectieux, ou sporulation, prend de un à vingt-et-un jours sous des températures de 11 à 25 °C et des conditions d'humidité suffisantes (Dumètre et Dardé, 2003).

Des infections expérimentales ont montré que les félidés excrètent des oocystes dans les fécès trois à dix jours après ingestion de bradyzoïtes, dix-huit jours après ingestion d'oocystes sporulés et treize jours après ingestion de tachyzoïtes (Dubey, 1998).

Un chat peut produire plusieurs millions d'oocystes, la plupart du temps sans signes cliniques, après l'ingestion d'un seul kyste tissulaire. Cependant, cette excrétion a lieu sur une courte durée (une à deux semaines) dans la vie du chat. On estime qu'à un moment donné et dans une population donnée, 1 % à 2 % des chats excrètent des oocystes, ce qui est suffisant pour assurer une contamination efficace du milieu extérieur (Hill et Dubey, 2002 ; Dumètre et Dardé, 2003).

I.4. Géotypes

Les souches de *T. gondii* sont classées en trois géotypes caractérisés par leur virulence *in vivo* en phase aiguë : hautement virulentes (type I) et non virulentes (types II et III). En effet, les souches virulentes sont définies par une DL₁₀₀ d'un seul organisme viable tandis que les souches non virulentes ont des DL₅₀ de plus de 10³ (Sibley et Boothroyd, 1992 ; Sibley, 2003).

Les souches de type I (ex. : souche RH) sont hautement virulentes chez les souris non congéniques et potentiellement chez l'homme.

Les souches de types II et III sont relativement avirulentes et établissent des infections chroniques. Le type II (ex. : souches ME49, 76K) est plus commun que le type III, tant chez les animaux infectés que dans les cas de toxoplasmose humaine. Le type III (ex. : souche M7741) est largement confiné aux animaux (Grigg *et al*, 2001 ; Sibley, 2003).

Ces trois souches sont des lignées clonales qui avaient probablement un ancêtre commun il y a 10 000 ans. Elles conserveraient leur clonalité grâce à deux adaptations :

- 1) les hôtes intermédiaires sont généralement infectés par une seule souche, ainsi lors de leur ingestion par un chat, l'infection est monotypique et ne produit pas de nouveaux géotypes.
- 2) la transmission directe entre les hôtes intermédiaires successifs rend le chat facultatif dans le cycle de vie du parasite, occultant ainsi le cycle sexuel et le risque inhérent de génération de nouveaux géotypes (Sibley et Boothroyd, 1992 ; Sibley, 2003).

La proximité des trois types de souches est révélée par le fait qu'elles ne possèdent que deux allèles différents pour n'importe quel locus. De plus, ces allèles eux-mêmes sont hautement similaires puisqu'identiques à environ 98 % au niveau nucléotidique (Sibley, 2003). Cette faible variation peut s'expliquer par le fait que la plupart des souches actuelles dérive d'un seul croisement génétique entre deux souches parentales (Grigg *et al*, 2001)

Si plus de 94 % des souches entrent dans ces trois géotypes, il existe également des souches rares ou atypiques, isolées d'espèces exotiques ou de régions géographiquement reculées. Ces souches sont des recombinants des types I, II et III (Grigg *et al*, 2001).

Cependant, ces souches exotiques remonteraient à un million d'années. Ainsi, apparues avant les trois lignées actuelles, elles représenteraient plus vraisemblablement un état ancestral (Sibley, 2003).

II. La toxoplasmose

II.1. Modes de contamination

Le cycle met en évidence deux possibilités de contamination (ingestion d'oocystes ou de kystes). A ces circonstances habituelles, on peut ajouter deux autres modes de contamination : une possibilité de transmission au cours de la grossesse chez une femme enceinte primo-infectée par un passage transplacentaire des tachyzoïtes et une possibilité de transmission plus rare au cours d'une greffe ou lors d'une transplantation.

II.1.1. La voie digestive

La voie orale est la voie de prédilection pour la contamination par *T. gondii*. Une analyse multivariée a mis en évidence trois principaux facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose : la viande de mouton ou de bœuf consommée mal cuite, une hygiène incorrecte pour le lavage des mains et des instruments de cuisine et une consommation fréquente de crudités que les femmes ne préparent pas elles-mêmes (Baril *et al*, 1996).

Cette contamination peut avoir lieu soit suite à une ingestion de kystes soit suite à une ingestion d'oocystes.

- **Contamination par les kystes**

Les kystes, très résistants, sont responsables de la contamination par les viandes crues, saignantes ou non congelées. Tous les types de viande peuvent être infectants : mouton, porc, bœuf, poulet, cheval... puisque tous les homéothermes sont susceptibles d'être parasités. La prévalence des kystes tissulaires varie considérablement selon l'animal considéré. En effet, les plus fortes prévalences sont retrouvées chez le mouton (9 à 23 %) et chez le porc (12 à 15 %) tandis que les plus faibles sont chez le bétail (0 à 10 %) et chez les poules (0,3 à 8 %) (Elsheika, 2007).

La température de cuisson joue aussi un rôle dans la contamination. Une étude réalisée en 1990 par Dubey a permis d'établir une courbe de destruction thermique. Il faut atteindre une température de 67 °C au cœur de la viande pour avoir une inactivation totale des kystes (Afssa, 2005). En revanche, une conservation de la viande dans le réfrigérateur (+ 4 °C) ne détruit pas les kystes. Il existe très peu voire pas de risque de contamination par absorption de

lait de vache car il est généralement bouilli ou pasteurisé. Les œufs de poule crus sont quant à eux une source importante de Salmonelles mais présentent très peu de risque de transmission de la toxoplasmose (Hill et Dubey, 2002).

- **Contamination par les oocystes**

Les oocystes sont eux aussi responsables de la contamination par la voie digestive. Cette contamination est essentiellement indirecte car elle implique un contact avec des fruits ou des légumes crus mal lavés, une eau de boisson souillée, une hygiène des mains insuffisante après un contact avec le sol (jardinage) ou lors de contact avec un animal en particulier avec un chat.

II.1.2. La voie transplacentaire

Les tachyzoïtes sont la seule forme parasitaire capable de passer la barrière placentaire. Cependant, ce passage ne peut avoir lieu que lors de la primo-infection de la mère.

Le risque de transmission croît régulièrement avec l'âge gestationnel auquel survient la primo-infection toxoplasmique. La gravité de l'infection du fœtus est fonction du stade de la grossesse au moment de la contraction de la toxoplasmose. La structure et l'irrigation placentaire évoluent durant la grossesse expliquant la fréquence croissante de transmission fœtale en fonction de la période de contamination.

Au cours du premier trimestre, l'infection fœtale est rare en fréquence car le passage placentaire est faible mais elle conduit la plupart du temps à une forme sévère se traduisant par la mort *in utero* du fœtus ou par des lésions cérébrales graves avec un décès à la naissance ou un retard psychomoteur majeur.

Au deuxième trimestre, le risque cumulé de la toxoplasmose congénitale sévère est maximum, avec une prédominance des formes viscérales aiguës d'évolution souvent fatale à la naissance.

Au troisième trimestre, le risque de contamination dépasse 60 % et atteint 80 % en fin de grossesse. A ce stade, un retard de développement reste possible mais les lésions sont le plus souvent infracliniques mais invalidantes pour l'enfant.

Ainsi, l'infection est d'autant plus grave qu'elle survient tôt dans la grossesse bien que le taux de transmission est inversement proportionnel. En effet, la transmission au fœtus a lieu dans 25 % des cas au cours du premier trimestre de grossesse, dans 75 % des cas au cours du troisième trimestre et dans plus de 90 % des cas au cours des dernières semaines (Mets et Chhabra, 2008).

II.1.3. Greffe d'organe et transfusion

La transmission peut également avoir lieu lors de transfusions sanguines ou de transplantations d'organes, par exemple par l'implantation d'un organe ou de moelle osseuse d'un donneur infecté chez un receveur immunodéprimé (Hill et Dubey, 2002). Deux situations peuvent en fait se produire.

Dans le premier cas, le receveur, ayant déjà été contaminé par *Toxoplasma gondii*, peut subir une réactivation des kystes présents dans l'organisme suite à une absence d'immunité. Il développe alors généralement une toxoplasmose cérébrale.

Dans le deuxième cas, le receveur est séronégatif pour la toxoplasmose et le donneur est séropositif. Par l'intermédiaire du greffon, le donneur peut transmettre des kystes de *T. gondii* au receveur. Celui-ci développe alors une primo-infection tout en étant immunodéprimé.

Exceptionnellement, il a été rapporté quelques cas de contamination au cours de transfusion de produits sanguins. Cette contamination peut s'expliquer par le fait que les produits transfusés contiendraient des tachyzoïtes provenant d'une contamination récente.

II.2. Prévention

La prévention de la toxoplasmose congénitale peut s'appliquer à trois niveaux.

La prévention primaire a pour objectif de protéger les femmes enceintes séronégatives des sources de contaminations. Elle permet d'informer les femmes non immunisées sur les précautions d'hygiène à suivre pendant la grossesse. Le dépistage sérologique et le respect des règles hygiéno-diététiques doivent permettre de limiter la toxoplasmose congénitale.

La prévention secondaire a pour objectif de traiter précocément les femmes infectées et de les surveiller tout au long de la grossesse. Elle doit permettre de réduire la sévérité des infections mais elle constitue, en revanche, une source d'angoisse, d'exams multiples et de traitement pour la femme enceinte.

La prévention tertiaire consiste à limiter au maximum les complications plus ou moins tardives chez le nouveau-né par un programme de surveillance clinique et une thérapeutique appropriée. Elle est adaptée en fonction de la présentation clinique du nouveau-né et du résultat des examens complémentaires effectués à la naissance.

Les autorités sanitaires ont instauré un programme de prévention de la toxoplasmose congénitale en imposant aux femmes enceintes non protégées de réaliser un dépistage lors de l'examen prénuptial, depuis 1978, et prénatal, depuis 1985, ainsi qu'une surveillance sérologique des femmes enceintes non immunisées depuis la déclaration de grossesse jusqu'à l'accouchement. La France est un des seuls pays au monde à appliquer un tel programme de

surveillance sérologique mensuelle chez les femmes enceintes à risque. De plus, les médecins doivent informer toutes les femmes enceintes non immunisées sur les différents moyens de prévention de cette maladie.

II.2.1. Prévention vis-à-vis des kystes

Afin de prévenir une contamination humaine, les habitudes alimentaires concernant la cuisson de la viande doivent être surveillées.

L'augmentation de la température permet une baisse de virulence des kystes tissulaires. Actuellement, une cuisson suffisante, atteignant au moins 67 °C dans toute l'épaisseur de la viande pendant trois minutes, est toujours recommandée pendant la grossesse pour tout type de viande (mouton, bœuf, veau, porc, cheval, gibier) (Baril *et al*, 1996). La survie du toxoplasme à de plus faibles températures dépend du temps de cuisson. Dans la viande de porc, les kystes tissulaires sont tués en chauffant la viande parfaitement à 70 °C dans un four traditionnel avant sa consommation (Dubey, 1988). La cuisson au four à micro-ondes, comme celle au barbecue, provoque une répartition inégale de la chaleur, insuffisante pour assurer la destruction du parasite (Nicolas et Pestre-Alexandre, 1993). Les effets de ce mode de cuisson sur *T. gondii* ont été peu étudiés. La cuisson par micro-ondes est moins efficace que les méthodes conventionnelles (four traditionnel) pour détruire les micro-organismes présents dans les aliments même si une température identique est mesurée à la fin de la cuisson. Pour être efficace, il faudrait que la température soit atteinte dans tout le morceau de viande (Lundén et Uggla, 1992).

La consommation de viande crue constitue aussi un risque quelle que soit l'espèce animale. De plus, le fait de manipuler ou de goûter de la viande crue fait partie des risques (Dardé *et al*, 2002). Il est donc indispensable de porter des gants en cas de manipulation ou de se laver les mains à l'eau savonneuse après tout contact avec la viande crue (Hill et Dubey, 2002). Les femmes enceintes séronégatives ne doivent pas goûter la viande pendant la cuisson et ne doivent pas manger de viande saignante. Il en est de même pour les viandes marinées, fumées ou grillées (Cook *et al*, 2000).

Seuls les plats cuisinés industriels en conserve, congelés ou au rayon frais sont sans risque car les conditions de préparation de ces aliments (salaison, cuisson, congélation) permettent de détruire les kystes (Dardé *et al*, 2002).

Les kystes tissulaires survivent à la congélation entre -1 °C et -8 °C pendant plus d'une semaine, mais la congélation de la viande pendant une journée dans un congélateur domestique (entre -8 °C et -12 °C) tue les kystes tissulaires (Lundén et Uggla, 1992). D'autres

études décrivent qu'une congélation à -12 °C durant au moins trois jours ou à -30 °C pendant vingt-quatre heures est nécessaire pour les tuer (Dardé *et al*, 2002). La congélation profonde de la viande, à une température inférieure à -20 °C, réduit le risque associé à la consommation de viande peu cuite parce qu'elle entraîne des changements morphologiques des kystes et une perte de leur caractère infectieux. Cependant, des kystes présents dans la viande restent vivants après la congélation (Lundén et Ugglå, 1992). Seule une cuisson suffisante enlève tout risque d'infection toxoplasmique pour les femmes enceintes. Bien que la congélation ne soit pas une méthode complètement efficace pour tuer les kystes du parasite, elle pourrait tout de même réduire le risque de transmission par la consommation de viande infectée.

II.2.2. Prévention vis-à-vis des oocystes

Le chat peut être caressé sans danger particulier pour la femme enceinte. Afin d'éviter une contamination, il faut contrôler l'alimentation du chat. Il doit être nourri uniquement avec de la nourriture sèche ou cuite (croquettes, boîtes) (Hill et Dubey, 2002). Le propriétaire du chat doit veiller à ce qu'il ne mange pas de viande crue et par conséquent doit l'empêcher de chasser les souris.

Le changement quotidien et la désinfection de la litière sont indispensables afin que la sporulation ne puisse se réaliser. Le nettoyage de la caisse doit être réalisée à l'aide de gants et de préférence par une autre personne que la femme enceinte. Ce nettoyage s'effectue avec de l'eau chaude, à 60 °C, étant donné la sensibilité des oocystes à la température.

Les fruits et les légumes crus des magasins ainsi que ceux des jardins particuliers ont pu être en contact avec des déjections de chat donc avec des oocystes. C'est pourquoi, leur consommation est à proscrire afin de limiter le risque de contamination.

Avant leur consommation, les fruits et les légumes doivent être épluchés ou bien lavés. L'eau de javel diluée n'est pas utilisable pour le lavage des légumes car elle rend les aliments impropres à la consommation. L'eau vinaigrée permet de décoller les débris qui se trouvent sur les légumes, notamment les salades, mais n'a pas d'action destructrice sur les oocystes. Tout comme les légumes, les plantes aromatiques doivent être lavées avant leur consommation (Tenter *et al*, 2000).

Une étude française a mis en évidence une liaison significative entre le niveau d'hygiène incorrecte lors de la préparation de repas et la survenue de séroconversions (Baril *et al*, 1996). Ces résultats laissent supposer que les mains ou le plan de travail de la cuisine peuvent être souillés par les oocystes et servir de vecteur de contamination. Il est donc important de se laver les mains ainsi que les instruments de cuisine à l'eau savonneuse.

II.3. Diagnostic

Le diagnostic de la toxoplasmose chez l'homme peut être établi par des méthodes biologiques, sérologiques, histologiques ou moléculaires. Ces techniques sont nécessaires puisque les signes cliniques de la toxoplasmose (ganglions gonflés, fièvre, fatigue, douleurs musculaires, maux de gorge et de tête) sont non spécifiques et donc insuffisamment caractéristiques pour établir un diagnostic.

II.3.1. Méthodes

Les méthodes biologiques reposent sur l'isolement de *T. gondii* à partir de prélèvements de sécrétions, d'excrétions, de fluides corporels ou de tissus effectués sur des patients.

Les techniques histologiques font suite aux méthodes biologiques par identification du parasite dans les tissus des animaux infectés, par observation directe microscopique, par coloration au Giemsa ou encore par immunohistochimie.

Les méthodes moléculaires viennent compléter les méthodes précédentes par la recherche d'ADN parasitaire par PCR dans les prélèvements cités ci-dessus.

Les techniques sérologiques sont les plus nombreuses. Elles permettent la mise en évidence d'IgG anti-toxoplasmiques dans le sérum des patients. Le test de Sabin-Feldman permet d'observer une lyse de tachyzoïtes vivants mis en présence de concentrations croissantes de sérum. Le test d'hémagglutination indirecte utilise également des dilutions croissantes de sérum mais en contact avec des globules rouges de mouton sensibilisés avec un lysat de parasites. Les tests d'agglutination directe et sur latex font appel respectivement à des parasites formolés ou à des billes de latex coatées avec de l'extrait de parasite qui s'agglutinent en présence de sérum. Les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et IFA (indirect fluorescent antibody) reposent sur la détection d'anticorps spécifiques du parasite après révélation avec des anticorps secondaires couplés soit à une enzyme donnant lieu à une réaction colorimétrique soit à un fluorochrome, respectivement.

Les techniques ELISA et IFA ont été modifiées et sont également utilisées pour la détection des IgM (Hill et Dubey, 2002).

II.3.2. Cinétique d'apparition des immunoglobulines

Cette cinétique est importante à connaître puisque la majorité des tests effectués repose sur la détection de différentes classes d'immunoglobulines.

Les IgA, IgM et IgE sont les premières à être sécrétées après l'infection, c'est pourquoi leur détection indique une toxoplasmose débutante. Elles ont la même cinétique de sécrétion mais leur persistance est variable. Elles apparaissent environ une semaine après l'infection puis leur taux augmente pendant un à deux mois. Les IgA ne sont plus détectables au bout de six mois, les IgM au bout d'un an. Les IgE ne sont jamais détectées au cours de la phase chronique de la maladie.

En ce qui concerne les IgG, leur cinétique varie en fonction de la protéine parasitaire qu'elles reconnaissent. Les immunoglobulines ciblant les antigènes de surface sont les plus précoces puisqu'elles apparaissent une à deux semaines après l'infection pour atteindre un taux maximum vers deux mois. Ce taux maximum peut persister pendant six mois avant de décroître lentement. Les immunoglobulines ciblant les protéines parasitaires sécrétées (rhoptries, micronèmes, granules denses) apparaissent après trois à quatre semaines d'infection, atteignant un taux maximum entre trois et six mois. Les IgG sont les seules immunoglobulines à persister tout au long de la vie de l'hôte. Ainsi, en faible quantité, elles signent une infection chronique.

II.3.3. Diagnostic chez la femme enceinte et le fœtus

La sérologie a deux applications principales chez la femme enceinte. Tout d'abord, elle sert à définir son statut immunitaire et assurer une surveillance sérologique en cas de séronégativité. Ensuite, elle sert à établir le diagnostic d'une toxoplasmose acquise en cours de grossesse. Dans ce cas, la datation de la contamination est essentielle pour apprécier le risque de toxoplasmose congénitale.

- **Le diagnostic clinique**

L'infection d'un fœtus découle d'une infection symptomatique ou asymptomatique durant la grossesse. On observe, chez ces femmes, différents symptômes qui sont : une lymphadénopathie, une asthénie, une présence de fièvre, des douleurs musculaires et des maux de tête ou de gorge.

Ces symptômes ne sont pas caractéristiques et des diagnostics erronés comme celui de la grippe ou d'une mononucléose peuvent être avancés d'où la nécessité de posséder des tests pertinents.

- **Le diagnostic biologique**

Il est basé, chez la femme enceinte, sur une sérologie qui consiste à rechercher des anticorps spécifiques (IgG et IgM).

En France, des contrôles sérologiques sont obligatoires pendant la grossesse. La sérologie mensuelle doit assurer le dépistage rapide d'une séroconversion et permettre ainsi d'établir une thérapeutique précoce. La datation de la présumée séroconversion par rapport à la conception n'est possible qu'au terme d'un suivi cinétique de la réponse immune. Chez les femmes enceintes, le diagnostic obéit à une réglementation particulière.

Si le taux d'IgG est inférieur à 8 UI/mL en début de grossesse, la femme est séronégative. Son suivi sérologique sera mensuel pour les IgM et les IgG jusqu'à l'accouchement afin de détecter une éventuelle séroconversion.

Si le taux d'IgG est compris entre 8 et 300 UI/mL, on peut conclure que l'organisme a déjà été en contact avec le parasite. Il est donc nécessaire de déterminer si la toxoplasmose maternelle est ancienne ou d'évolution récente. Pour cela, il suffit de rechercher les IgM et/ou les IgA et de quantifier les IgG. La sérologie est à renouveler trois semaines plus tard afin d'apprécier la date de la contamination et le risque de transmission au fœtus.

Si le taux d'IgG est supérieur à 300 UI/mL, on peut penser qu'il s'agit d'une toxoplasmose ancienne mais elle doit être confirmée par la recherche des autres immunoglobulines. Une primo-infection est confirmée par l'apparition d'IgM spécifiques quelques jours après la contamination, rapidement suivie des IgA et plus tardivement des IgG. Il existe donc une phase de latence, de quelques jours, entre la contamination parasitaire et le début de la réponse immunitaire spécifique, durant laquelle la sérologie demeure négative (Lebech *et al*, 1996).

- **Le diagnostic *in utero***

Le but est de dépister *in utero* une éventuelle atteinte fœtale chez un enfant dont la mère a présenté une séroconversion en cours de grossesse. Trois investigations sont alors possibles : une échographie, une cordocentèse et une amniocentèse.

En cas de suspicion de séroconversion, une surveillance échographique mensuelle est pratiquée afin de détecter le plus précocement possible les signes évocateurs. S'il apparaît des anomalies échographiques majeures, l'indication d'une interruption médicale de grossesse peut être envisagée. Après l'interruption de grossesse, la recherche de toxoplasmes dans les organes fœtaux et dans le placenta est systématiquement réalisée afin de confirmer le diagnostic.

La cordocentèse est le prélèvement de sang fœtal par ponction directe, à l'aide d'une aiguille, du cordon ombilical. Cette technique guidée par échographie n'est réalisable qu'à partir de la 18^{ème} semaine de grossesse et peut s'effectuer jusqu'au terme (elle s'effectue généralement entre la 20^{ème} et la 24^{ème} semaine de gestation). Le principal avantage de cette

technique est qu'elle permet un accès direct au fœtus. En revanche, les risques d'avortements ne sont pas négligeables, de 3 à 5 %.

Différents examens peuvent ensuite être pratiqués sur le sang fœtal : une mise en évidence du parasite par inoculation à la souris ou en culture cellulaire, un contrôle de la pureté du sang et une sérologie toxoplasmique (recherche IgM et IgA antitoxoplasmiques). L'isolement du parasite dans le sang fœtal constitue une preuve de l'infection mais ne donne pas de valeur pronostic quand à la gravité de l'atteinte fœtale.

L'amniocentèse a constitué un progrès considérable dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale. Toutefois, cet examen peut entraîner un risque de fausse couche allant de 0,5 à 1 %. Cette technique se réalise à partir de la 18^{ème} semaine d'aménorrhée et consiste à prélever stérilement du liquide amniotique (10 à 20 mL) dans lequel baigne le fœtus, sous contrôle échographique. Il est recommandé d'effectuer cet examen au moins quatre semaines après la date présumée de l'infection maternelle pour éviter les faux négatifs dus à un retard dans la transmission du parasite entre la mère et le fœtus.

Sur ce prélèvement, il est recommandé d'effectuer la recherche d'ADN toxoplasmique par PCR et d'y associer une inoculation à la souris. En général, le résultat est connu sous environ deux semaines.

II.3.4. Diagnostic chez le nouveau-né

- **Le diagnostic néonatal**

Ce diagnostic doit être effectué chez tous les nouveau-nés dont les mères ont une histoire sérologique suspecte au cours de la grossesse, avec un diagnostic anténatal négatif ou non pratiqué. Il associe à la fois la recherche du parasite (inoculation à la souris ou PCR) et une sérologie.

À la naissance, les prélèvements à effectuer systématiquement comprennent : un fragment de placenta et du sang du cordon afin de mettre en évidence le toxoplasme et du sang de la mère et de l'enfant pour détecter la synthèse d'anticorps spécifiques.

La sérologie de l'enfant sur le sang du cordon n'est pas vraiment contributive car la détection d'IgM ou d'IgA peut être due à une effraction de sang maternel vers l'enfant lors de l'accouchement. En revanche, une étude des profils immunologiques comparés réalisée sur le sang du cordon et sur le sang de l'enfant permet de superposer les réponses anticorps mère-enfant dès la naissance. Un profil différent mère-enfant avec notamment la présence d'anticorps chez l'enfant n'existant pas dans le profil maternel est un argument de grande valeur en faveur de la contamination du nouveau-né.

Le diagnostic immunologique réalisé quelques jours après l'accouchement repose sur la détection d'anticorps synthétisés par l'enfant ce qui témoigne de son contact avec l'antigène toxoplasmique pendant sa vie intra-utérine. Les IgG et les IgA ne traversent pas la barrière placentaire contrairement aux IgM qui sont par conséquent des excellents témoins de l'infection.

Même en cas de négativité du diagnostic à la naissance, la surveillance sérologique de l'enfant est maintenue.

- **Le diagnostic post-natal**

Le diagnostic postnatal est crucial dans deux cas.

Les signes cliniques apparaissent dans les six premiers mois de la vie de l'enfant (anomalie de l'examen ophtalmologique, de l'analyse du liquide céphalo-rachidien ou de la tomodensitométrie crânienne) et en l'absence d'information sur une éventuelle séroconversion maternelle.

Une séroconversion est diagnostiquée pendant la grossesse mais aucun diagnostic anténatal n'a été réalisé.

Cependant, il existe deux obstacles majeurs à ce diagnostic : la faible sensibilité de certaines techniques de détection de *T. gondii* et la présence d'anticorps maternels chez l'enfant, qui peut retarder le diagnostic car ce dernier conserve jusqu'à l'âge d'environ dix mois la plupart des anticorps maternels transmis passivement.

Dans la majorité des cas, le diagnostic de l'infection s'obtient grâce à une sérologie. La découverte d'anticorps IgM propres au toxoplasme dans le sérum du nourrisson permet de poser un diagnostic d'infection congénitale. Actuellement, on privilégie des tests comme l'ELISA car ils sont moins sensibles aux interférences des anticorps transmis par la mère. Cependant, des études récentes ont montré que les ELISA sur IgM et IgA échouaient dans un cas sur quatre à la naissance tandis qu'un travail récent propose une méthode efficace dès les premiers jours de la vie par la détection de la prolifération spécifique des lymphocytes T (Ciardelli *et al*, 2008). De plus, il est souvent nécessaire d'associer plusieurs techniques dans les cas difficiles. Ce diagnostic est nécessaire pour identifier les enfants qui nécessiteront, par la suite, un traitement.

D'une manière générale, une surveillance sérologique est effectuée tous les deux mois jusqu'à l'âge d'un an. Parallèlement, une surveillance ophtalmique comprenant un examen du fond d'œil est effectuée tous les quatre mois jusqu'à l'âge de trois ans puis annuellement jusqu'à la puberté si aucun signe d'atteinte n'est trouvé. Ce diagnostic est réalisé jusqu'à la puberté car le risque de poussées tardives de chorioretinite est majeur à la période pubertaire.

Si l'infection fœtale est prouvée (diagnostic anténatal positif) ou probable (séroconversion au cours du troisième trimestre), la surveillance sérologique et ophtalmologique est plus étroite et prolongée et est associée à un traitement.

II.3.5. Diagnostic chez l'immunodéprimé

Ce diagnostic revêt une importance vitale chez cette population à risque puisque la réactivation d'une infection antérieure ou une infection nouvellement acquise non traitées peut se révéler fatale.

Le diagnostic se fait essentiellement sur prélèvement sanguin, avec recherche d'anticorps spécifiques. Cependant, certains cas peuvent nécessiter un diagnostic sur des prélèvements complémentaires. Ainsi, la recherche d'IgM et d'IgA peut avoir lieu sur du liquide céphalo-rachidien, du liquide broncho-alvéolaire ou de l'humeur aqueuse. Des PCR sont également effectuées sur le sang et le liquide céphalo-rachidien.

Le diagnostic de la toxoplasmose cérébrale repose majoritairement sur l'imagerie à résonance magnétique, ou IRM. Cette technique très sensible permet de visualiser des abcès résultant de la réactivation de kystes cérébraux. La présence de plus de trois lésions de ce type établit une toxoplasmose cérébrale, contrairement à la sérologie sur sang ou liquide céphalo-rachidien.

II.4. Incidence et traitements chez la femme enceinte

La prévalence de la toxoplasmose congénitale est de 1 à 10 pour 10 000 naissances aux Etats-Unis (Carruthers, 2002 ; Mets et Chhabra, 2008). En France, une étude sur plus de 300 enfants a montré que 24 % des enfants nés de mères ayant subi une séroconversion en cours de grossesse présentaient une toxoplasmose congénitale (Wallon *et al*, 2004).

La mère présente rarement des symptômes d'infection mais elle a une parasitémie temporaire qui entraîne des lésions focales dans le placenta pouvant conduire à l'infection du fœtus. Au début, ce dernier subit une infection généralisée qui disparaît peu à peu des tissus viscéraux et se localise préférentiellement dans le système nerveux central (Hill et Dubey, 2002). On estime que 80 % des enfants qui naissent avec une toxoplasmose congénitale sont asymptomatiques alors que 85 % d'entre eux auront des séquelles plus tard au cours de leur vie, notamment des chorioretinites, une perte d'audition ou encore un retard mental (Elsheikha, 2007). Le spectre des pathologies pouvant affecter le fœtus comprend également l'hydrocéphalie, les convulsions et la calcification intra-cérébrale. L'hydrocéphalie est la conséquence la plus rare mais aussi la plus dramatique, la plus courante étant l'atteinte oculaire (Hill et Dubey, 2002).

Il n'existe aucun consensus en ce qui concerne le traitement de la toxoplasmose congénitale. En France, la spiramycine (antibiotique et coccidiostatique) est immédiatement prescrite après le diagnostic d'une infection maternelle. Si l'infection fœtale est avérée par la suite ou si l'infection est acquise tardivement durant la grossesse, le traitement consiste en une combinaison de pyriméthamine et de sulfonamide (molécules interférant avec la synthèse de l'acide folique nécessaire à la production d'ARN et d'ADN) (Thiébaud *et al*, 2007 ; Mets et Chhabra, 2008). En Autriche, les mères sont initialement traitées avec la combinaison pyriméthamine-sulfonamide puis avec de la spiramycine si le diagnostic fœtal est négatif (Thiébaud *et al*, 2007). La pyriméthamine n'est active qu'en phase aiguë de l'infection, lors de la réplication intensive du parasite tandis que les sulfonamides réduisent le grossissement des kystes tissulaires chez la souris (Hill et Dubey, 2002).

II.5. Incidence et traitements chez l'immunodéprimé

La toxoplasmose de l'immunodéprimé concerne deux types de populations : les patients atteints du SIDA et les patients transplantés.

Des études montrent qu'environ 10 % des personnes atteintes du SIDA meurent de toxoplasmose aux Etats-Unis et plus de 30 % en Europe (Hill et Dubey, 2002), taux qui sont certainement à moduler depuis la mise en place de la quadri-thérapie. Tous les organes peuvent être touchés mais l'encéphalite toxoplasmique est l'infection opportuniste du système nerveux central la plus courante. Elle fait suite à la réactivation d'une infection latente incontrôlée. La diminution du nombre de lymphocytes T et de la production d'IFN- γ favorisent la réversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes qui prolifèrent rapidement dans les astrocytes et la microglie. Cette prolifération aboutit à l'apparition de régions sphériques de tissus nécrosés qui peuvent atteindre jusqu'à 4 cm de diamètre (Carruthers, 2002). La plupart des personnes ayant une atteinte du cerveau souffrent de maux de tête bilatéraux sévères qui répondent peu aux analgésiques. Avec la progression de la maladie, ces maux de tête peuvent aboutir à un état caractérisé par la confusion, la léthargie, l'ataxie et même le coma (Hill et Dubey, 2002).

Le traitement indiqué en cas de toxoplasmose chez les patients atteints du SIDA se compose d'une combinaison de triméthoprim et de sulfaméthoxazole, deux composés qui interviennent dans la voie de synthèse de l'acide folique (Gourishankar *et al*, 2008).

Dans le cadre d'une transplantation d'organes, deux risques menacent le receveur. En effet, il peut y avoir réactivation d'une infection latente chez un receveur immunodéprimé, de la même façon que chez le patient atteint du SIDA. Un receveur séronégatif pour *T. gondii*

peut également être infecté lors de l'implantation d'un organe ou de moelle osseuse venant d'un donneur infecté (Hill et Dubey, 2002).

La séroconversion et la maladie associée à la transmission lors d'une incompatibilité donneur-receveur survient généralement dans les trois premiers mois suivant la transplantation (Gourishankar *et al*, 2008). L'encéphalite et la chorioretinite sont des complications fréquentes après des transplantations de cœur, de moelle osseuse, de cellules souches, de foie ou de rein (Barsoum, 2004). En l'absence de prophylaxie, le risque de déclencher une toxoplasmose primaire sévère s'élève à 75 % lors d'une transplantation cardiaque (Gourishankar *et al*, 2008).

La prophylaxie à appliquer fait débat, deux écoles existent. Certaines études préconisent l'utilisation de la pyriméthamine après des transplantations cardiaques à haut risque du fait de l'incompatibilité donneur-receveur tandis qu'une étude plus récente propose un traitement combinant triméthoprim et sulfaméthoxazole (Gourishankar *et al*, 2008).

II.6. Incidence chez l'animal

La séroprévalence mondiale, notamment chez les animaux de rente, est difficile à estimer étant donné la variabilité existant entre les pays. Cependant, des études récentes menées par pays sont disponibles. En Malaisie, en Chine et en Inde, la séroprévalence chez les vaches est très faible, entre 0 et 3,8 % (Normaznah *et al*, 2004 ; Yu *et al*, 2007 ; Sharma *et al*, 2008). En revanche, la Serbie et l'Iran du Nord présentent des taux de séroprévalence élevés de 84,5 et 35 % chez les moutons, respectivement ; et de 76,3 % chez les vaches en Serbie (Klun *et al*, 2006 ; Sharif *et al*, 2007).

Les pertes chiffrées dues à des infections à *T. gondii* sur les exploitations sont également rares. En Uruguay, le pourcentage de brebis séropositives avant accouplement est de 28,7 % et passe à 38,5 % après l'agnelage, représentant une incidence de 9,8 %. Ainsi les pertes dues au parasite lors de la gestation ont été estimées entre 1,4 et 4,7 millions de dollars pour le pays entier (Freyre *et al*, 1999). En Grande-Bretagne, l'estimation du coût annuel des pertes économiques dans les élevages de moutons est disponible pour l'année 1996. L'incidence de la toxoplasmose s'élève de 1,2 à 2,2 %, pour une perte de production de 12 à 23 millions de livres (Bennett *et al*, 1999).

II.7. Toxoplasmose et troubles du comportement

Au cours des dernières années, les études sur le lien potentiel entre toxoplasmose et troubles du comportement se sont multipliées, tant chez l'homme que chez l'animal.

II.7.1. Cas de l'animal

Chez l'animal, une étude de Berdoy a observé le comportement de rats infectés par *T. gondii* face à différentes odeurs (Berdoy *et al*, 2000). Leur expérience consistait à disposer des bols de nourriture et d'eau à côté d'odeurs telles que de l'urine de lapin (un Mammifère non prédateur), de rat, de chat (un Mammifère prédateur) ou de paille (une odeur neutre). Chaque dispositif est placé dans le coin d'un parc puis l'animal est lâché dans cet espace et ses déplacements sont relevés afin de déterminer le niveau d'aversion ou de préférence envers le chat ou le lapin. Les rats non infectés ont montré une aversion naturelle pour les odeurs de chat tandis que les animaux infectés étaient attirés par les aires montrant une présence féline. Les deux groupes avaient un comportement comparable vis-à-vis des trois autres odeurs. Cependant, les auteurs précisent que l'attraction fatale des rats infectés n'est pas due à des dommages grossiers de leurs facultés olfactives mais plutôt à l'altération subtile, par le parasite, de la perception cognitive des rats face au risque de prédation.

Ces travaux viennent compléter des résultats antérieurs qui ont prouvé que le blocage des récepteurs anxio-géniques NMDA dans la zone amygdalaire du cerveau des rats les faisait s'approcher sans peur des chats. De plus, l'hypothèse que l'infection par *T. gondii* pourrait atténuer la réponse dépendante de la sérotonine induite par le prédateur a également été soulevée. Si elle s'avère exacte, cela impliquerait une diminution des réactions de défense et d'anticipation liées à l'anxiété face au prédateur et par conséquent un effet anxiolytique du parasite (Adamec *et al*, 1999).

Une étude plus récente a confirmé et complété les résultats de Berdoy *et al* en utilisant la même expérience en parc avec des odeurs de lynx et de lapin, avec des rats mais également des souris (Vyas *et al*, 2007). Les deux espèces de rongeurs infectés ont montré une attirance certaine pour l'odeur féline. L'originalité de cette étude réside dans leur observation de la répartition des kystes cérébraux chez les animaux. Les structures amygdalaires du cerveau des animaux infectés présentaient une densité de kystes tissulaires deux fois supérieure à celle des autres structures. Ce résultat rejoint ainsi l'hypothèse des travaux précédents sur l'effet anxiolytique de *T. gondii* par son action dans ces structures cérébrales particulières.

Ainsi, *Toxoplasma gondii* serait capable de manipuler spécifiquement le comportement de ses hôtes afin d'augmenter l'efficacité de sa propre transmission, soit par

son tropisme dans une région particulière du cerveau (zone amygdalaire) soit par neuromodulation (systèmes dopaminergique et noradrénergique).

II.7.2. Cas de l'homme

Des travaux récents ont été menés afin d'évaluer le risque représenté par une exposition maternelle à *T. gondii* en cours de grossesse (Brown *et al*, 2005). Une cohorte de patients atteints de schizophrénie ou de troubles associés et leurs mères ont été suivis. Le dosage des IgM et IgG sériques sur les mères en cours de grossesse a permis d'établir qu'un taux d'IgG anti-toxoplasmiques maternels élevé entraînait 2,5 fois plus de risque d'avoir un enfant schizophrène.

Les études qui ont porté sur des patients adultes atteints de schizophrénie ou de troubles associés ont pu établir une corrélation entre l'élévation du taux d'IgG sériques et la survenue d'un premier épisode de schizophrénie, de même qu'une diminution de ce taux d'anticorps suite à la mise en place d'un traitement anti-psychotique. Les auteurs suggèrent même que la crise psychotique serait liée à une réactivation plutôt qu'à une primo-infection récente. En revanche, les autres agents infectieux testés chez ces patients - HSV-1, HSV-2, EBV, VZV, HHV-6 - n'ont montré aucun lien avec les crises (Yolken *et al*, 2001 ; Leweke *et al*, 2004 ; Wang *et al*, 2006).

Enfin, d'autres travaux ont testé l'influence éventuelle de *T. gondii* sur le comportement. Ces études concernaient essentiellement des groupes de militaires qui ont subi des tests de personnalité en parallèle d'une recherche d'anticorps anti-*T. gondii*. Les auteurs ont décrit une intelligence verbale moindre chez les sujets séropositifs, de même qu'un caractère plus réfléchi, réservé, organisé et méthodique que chez leurs contrôles séronégatifs. De plus, l'intensité de la modification du comportement et le taux d'anticorps sériques spécifiques semblent corrélés (Flegr *et al*, 2003 ; Novotna *et al*, 2005).

II.7.3. Influence des traitements sur *T. gondii* et le comportement de l'hôte

Toutes les études précédentes semblent être confirmées par des recherches sur l'influence du traitement de la schizophrénie ou de troubles associés sur *T. gondii*. En effet, de nombreux anti-psychotiques sont déjà connus pour leurs propriétés anti-parasitaires *in vitro* (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*). En revanche, l'activité anti-protozoaire des régulateurs d'humeur n'avait jamais été prouvée. Les auteurs ont ainsi testé l'effet d'anti-psychotiques et de régulateurs d'humeur sur des cultures cellulaires infectées par *T. gondii*. Certaines molécules ont montré un fort pouvoir inhibiteur de la réplication du parasite comme

l'acide valproïque (régulateur d'humeur) et l'halopéridol (anti-psychotique), et même un effet synergique (Jones-Brando *et al*, 2003).

Ces mêmes molécules et la pyriméthamine (traitement anti-toxoplasmique) ont également été testées *in vivo* chez des rats (Webster *et al*, 2006). Les animaux infectés ont été traités avec de l'acide valproïque, de l'halopéridol, de la pyriméthamine ou de l'eau puis placés dans un parc avec des odeurs de lapin, de rat, de chat et neutre. Il en ressort que les rats infectés non traités sont plus mobiles mais restent immobiles plus longtemps et entretiennent leur pelage en dehors des abris mis à leur disposition par rapport aux rats non infectés et non traités. L'halopéridol et la pyriméthamine diminuent significativement la durée du séjour dans l'aire "chat", la même tendance est observée pour l'acide valproïque. De plus, ces rats passent moins de temps immobiles ou exposés. Une autre équipe a étudié l'effet d'un traitement à l'acide valproïque sur des souris en phase aiguë de toxoplasmose ou sur des animaux infectés chroniquement (Goodwin *et al*, 2008). Contrairement aux effets décrits *in vitro*, *in vivo*, l'acide valproïque ne montre aucune efficacité sur la réplication des tachyzoïtes au cours de la toxoplasmose aiguë ni sur la formation des kystes intracérébraux au cours de la phase chronique de l'infection.

II.8. Toxoplasmose et lignées de souris

Trois lignées de souris consanguines sont principalement utilisées pour la modélisation de l'infection à *T. gondii*, les C57BL/6, les BALB/c et les CBA/J. Chaque lignée répond différemment à l'infection et trouve ainsi son utilité dans l'étude d'une phase particulière de la pathologie.

La lignée C57BL/6 est très sensible à la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*. Elles meurent dans les dix jours d'une nécrose massive de l'iléum. Cette nécrose n'est pas due à une destruction des tissus par les tachyzoïtes mais est médiée par les cellules T, et plus particulièrement par les LT CD4+ et leur surproduction d'IFN- γ (Liesenfeld *et al*, 1996).

La lignée BALB/c est résistante à la phase aiguë de l'infection et s'installe dans la phase chronique, grâce à une production normale d'IFN- γ contre-balancée par une production d'IL-10 (Liesenfeld *et al*, 1996). Ces souris présentent de grandes similitudes avec l'homme quant à la transmission transplacentaire. En effet, une primo-infection des mères entraîne l'infection des fœtus mais les protège contre une réinfection. Les BALB/c sont donc très utilisées dans l'étude de la toxoplasmose congénitale (Roberts et Alexander, 1992).

La lignée CBA/J est également résistante à la phase aiguë et produit de nombreux kystes intracérébraux en phase chronique, très utiles pour estimer la protection conférée à

long terme par un traitement par exemple. Ces souris sont ainsi un modèle de choix pour l'étude de la phase chronique de l'infection et sont très utilisées dans les essais de vaccination (Debard *et al*, 1996).

B - IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE

L'infection par *T. gondii* donne lieu, dans un premier temps, à une réponse innée suivie par une importante réponse adaptative de type Th1 qui aboutit à une protection à long terme contre une éventuelle réinfection.

I. Réponse humorale

I.1. Réponse humorale muqueuse

La réponse muqueuse est caractérisée par la sécrétion d'IgA sécrétoires. De tels anticorps sont retrouvés au niveau intestinal après une infection de souris par *T. gondii* (Chardès et Bout, 1993).

Au moment de leur sécrétion par les plasmocytes, deux IgA sont assemblées par un polypeptide appelé pièce J. Ce complexe se lie à son récepteur situé sur la face baso-latérale des cellules épithéliales intestinales. Il subit alors le phénomène de transcytose par son internalisation puis son transport à travers la cellule avant sa libération dans la lumière intestinale. Une partie du récepteur est libéré en même temps que l'IgA, aboutissant ainsi à la formation d'un IgA sécrétoire (IgAs).

Le lait de mères présentant des profils sérologiques différents (non infectées, en phase aiguë ou en phase chronique de toxoplasmose) a été recueilli. Les femmes en phase aiguë de l'infection montrent les plus forts taux d'IgAs. Le rôle protecteur de ces IgAs a ensuite été déterminé par un test *in vitro*. Des tachyzoïtes préalablement incubés avec du lait ou des IgAs purifiés du lait de mères présentant des statuts immunologiques différents ont été mis au contact d'entérocytes cultivés *in vitro*. La multiplication intracellulaire des tachyzoïtes a ensuite été déterminée par incorporation d'uracile tritié. Les résultats montrent une baisse significative, qui peut aller jusqu'à 50 %, de la répllication des tachyzoïtes lorsque les entérocytes sont infectés en présence de lait de mères en phase aiguë, par rapport à une infection en présence de lait de mères non infectées. En fait, l'observation microscopique des cultures a révélé que le lait de mères en phase aiguë ou les IgAs purifiés de ce lait diminuent à

75 % l'infection des entérocytes mais pas la réplication du parasite intracellulaire mis au contact d'entérocytes (Mack et McLeod, 1992).

I.2. Réponse humorale systémique

Une primo-infection donne lieu à une production d'anticorps sériques spécifiques selon une cinétique particulière. Chez l'Homme, les IgA, IgE et IgM apparaissent précocement et marquent la phase aiguë de l'infection. Ces isotypes ne persistent pas chez l'hôte. Dans les deuxième et troisième semaines d'infection, la sécrétion des IgG sériques débute. Elles caractérisent la phase chronique de l'infection et sont sécrétées tout au long de la vie de l'hôte. Chez la souris, les IgA sont sécrétées dès deux semaines post-infection et persistent pendant au moins 17 semaines. Les réponses IgG et IgM du sérum et du lait débutent en même temps que celles des IgA (Chardès *et al*, 1990).

Les anticorps, seuls ou en coopération avec l'immunité cellulaire, n'ont jamais montré une efficacité totale contre le parasite mais occupent plutôt un rôle de soutien. Ceci peut certainement s'expliquer par le fait que le parasite n'est présent que de façon transitoire dans le milieu extracellulaire, le temps d'infecter de nouvelles cellules, et donc peu accessible aux anticorps circulants. Leur implication dans la limitation du parasite peut se faire selon trois modes : la lyse des tachyzoïtes extracellulaires, la neutralisation de la pénétration des tachyzoïtes dans les cellules et le blocage de la multiplication intracellulaire.

La lyse des tachyzoïtes extracellulaires semble largement dépendante des IgM. Des neutrophiles humains incubés en présence de tachyzoïtes de *T. gondii* et d'IgM sériques de sujets sains montrent une meilleure phagocytose qu'en l'absence d'IgM. De plus, le nombre total de tachyzoïtes est significativement diminué, indiquant une potentialisation des activités microbicides et de phagocytose des neutrophiles par les IgM. Ces IgM non spécifiques, naturellement présents dans le sérum humain, doivent leur efficacité à une présence en grande quantité et restent moins efficaces que des IgM spécifiques présents dans le sérum de patients infectés de façon aiguë ou chronique (Konishi et Nakao, 1992). Une étude plus récente sur des IgM naturelles issues de porcs, de lapins et de chiens sains a montré qu'elles étaient capables d'entraîner la lyse des tachyzoïtes extracellulaires de façon dépendante du complément. Cette lyse n'a pu être observée avec des IgM de chat, suggérant que *T. gondii* peut échapper à la lyse extracellulaire chez son hôte définitif (Kaneko *et al*, 2004).

Le blocage de l'entrée du parasite dans la cellule est le deuxième mode d'action des anticorps. De nombreuses études ont prouvé que des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines de surface (SAG1) de granules denses (GRA2 et GR6) ou de rhoptries (ROP2) sont capables

d'inhiber l'invasion du parasite (Mineo *et al*, 1993 ; Cha *et al*, 2001 ; Mishima *et al*, 2002). Des travaux de 2005 sur des souris IgM^{-/-} n'ont montré aucun rôle pour des IgM non spécifiques contrairement à des IgM spécifiques de *T. gondii* qui empêchent l'invasion cellulaire et limitent la dissémination systémique des tachyzoïtes au cours de la phase aiguë de l'infection. *In vitro*, ces IgM se lient directement à la surface du tachyzoïte afin de limiter l'entrée dans des fibroblastes (Couper *et al*, 2005).

Quelques études ont été menées sur l'inhibition de la réplication intracellulaire du tachyzoïte par les anticorps. En 1993, un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine présente sur des structures vésiculaires cytoplasmiques du parasite a été testé. Les parasites extracellulaires seraient capables d'endocyter cet anticorps. Une fois dans les cellules-hôtes, le nombre de rosettes de parasites est fortement diminué, suggérant que l'incubation des tachyzoïtes avec cet anticorps limite leur réplication intracellulaire (Mineo *et al*, 1994). En revanche, dans un modèle humain, l'opsonisation de tachyzoïtes avec des IgG n'empêche pas la pénétration active du parasite dans des monocytes et a donc peu d'effet sur leur réplication intracellulaire (Fadul *et al*, 1995).

Le rôle des lymphocytes B (LB) n'est pas négligeable dans la lutte anti-toxoplasmique, tant par leur synthèse d'anticorps que par leur interaction avec les autres cellules du système immunitaire.

Des souris déficientes en LB montrent une sensibilité fatale à une réinfection par le parasite tandis que des souris parentales sont protégées par la primo-infection et survivent au challenge. Le mécanisme de résistance ne semble pas impliquer la phagocytose de tachyzoïtes opsonisés ni la lyse des parasites *via* le complément. En revanche, *in vitro*, du sérum immun inhibe l'infection des cellules-hôtes. Les LB apparaissent indispensables dans la protection mise en place contre une réinfection, par leur sécrétion d'anticorps spécifiques qui pourraient bloquer l'entrée des parasites dans les cellules de l'hôte (Sayles *et al*, 2000). De même, au cours d'une infection aiguë, la déficience en LB entraîne une mort précoce des animaux associée à une nécrose importante du cerveau. L'administration de sérum immun anti-*T. gondii* prolonge significativement la survie des souris déficientes en LB, suggérant une action décisive de ces lymphocytes par la synthèse d'anticorps spécifiques (Kang *et al*, 2000).

La coopération entre LB et cellules immunitaires a été montrée récemment. En effet, l'injection de LB spléniques issus de souris infectées à des souris déficientes en LB augmente la survie de ces dernières à 5 mois post-infection contre 18 jours pour les souris déficientes en LB témoins. La résistance accrue des souris ne semble pas dépendre de la production d'anticorps spécifiques mais serait plutôt due à une collaboration des LB avec les LT ou les macrophages

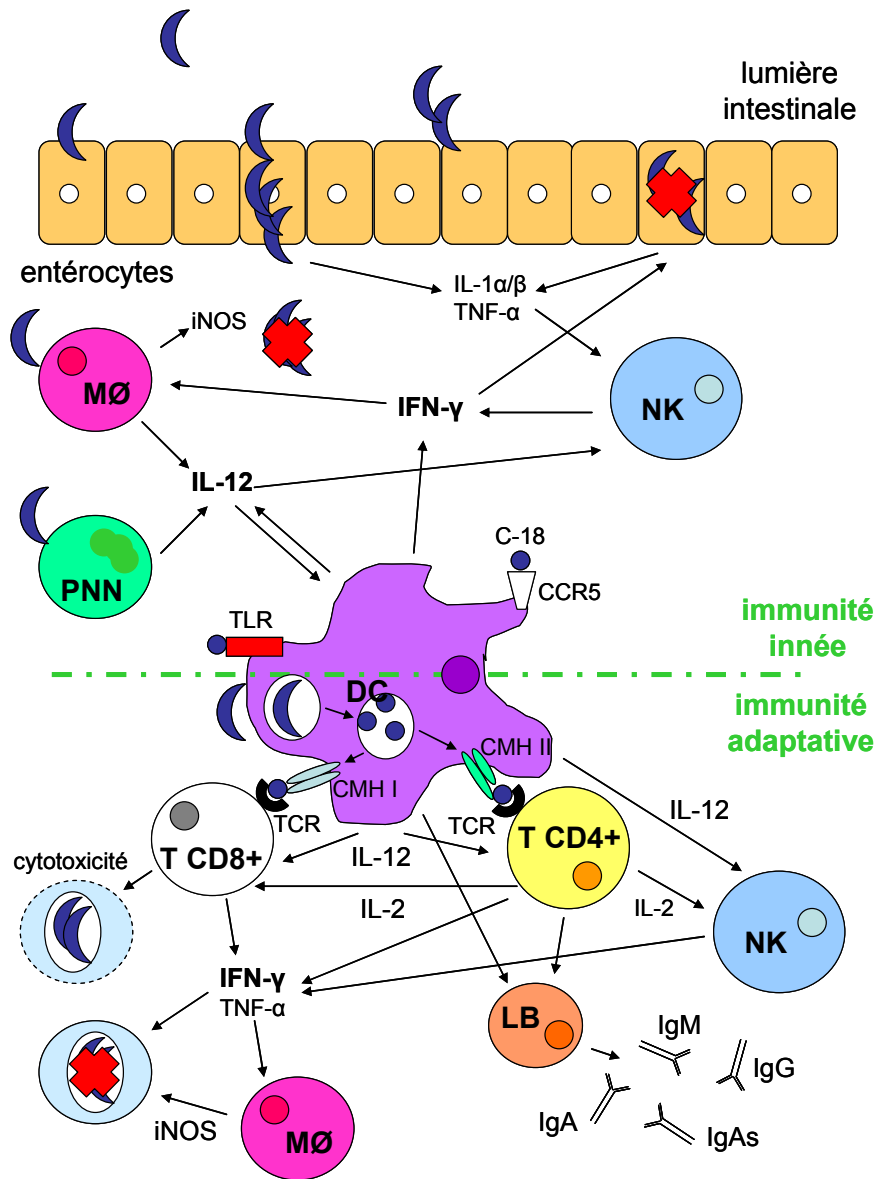


Figure 5. Représentation schématique de l'immunité anti-toxoplasmique.

Dans un premier temps, une immunité innée non spécifique se met en place suite à l'infection des cellules épithéliales de l'intestin. Ces cellules synthétisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF-α) qui activent les cellules Natural Killer (NK). Ces NK sécrètent de l'IFN-γ qui active les macrophages (MØ). Ces cellules synthétisent des dérivés nitrés (iNOS) participant à la limitation de la réplication parasitaire et de l'IL-12 qui entretient la boucle d'activation des NK. Les neutrophiles (PNN) sécrètent également de l'IL-12 en présence de parasites. Les cellules dendritiques (DC) reconnaissent diverses molécules parasitaires, *via* les récepteurs Toll-like (TLR) ou *via* le récepteur CCR5 pour la cyclophiline 18 (C-18), ce qui aboutit à la synthèse de grandes quantités d'IL-12. L'immunité adaptative est initiée grâce aux DC qui présentent l'antigène parasitaire *via* le CMH I, ce qui active les lymphocytes T CD8+ et leur activité cytotoxique. Les DC présentent également les antigènes de *T. gondii* *via* le CMH II afin d'activer les LT CD4+. Ces derniers maintiennent l'activation des LT CD8+ par leur sécrétion d'IL-2. L'IL-12 sécrétée par les DC participe également à l'activation des LT CD8+, LT CD4+ et NK. Ces trois populations synthétisent la cytokine majeure de lutte anti-toxoplasmique, l'IFN-γ, qui active les MØ. Les LB jouent un rôle accessoire dans l'immunité, par leur synthèse de différentes classes d'anticorps spécifiques (IgA, IgAs, IgM et IgG).

(Chen *et al*, 2003). Une seconde étude *in vivo* a montré que des LB sensibilisés par *T. gondii* étaient capables d'augmenter la synthèse d'IFN- γ par les LT spléniques, contrairement à des LB non éduqués. Le contact direct entre ces deux populations est indispensable et nécessite des LB activés mais pas obligatoirement spécifiques de *T. gondii*. L'activation des LT CD8+ par les LB pourrait se faire par la cross-présentation des antigènes parasitaires *via* le CMH I. Les LB peuvent ainsi compléter l'action des LT CD4+. De plus, les LB sont capables de synthétiser du TNF- α et pourraient donc potentiellement jouer un rôle proinflammatoire et participer au recrutement d'autres cellules du système immunitaire (Ménard *et al*, 2007).

II. Réponse cellulaire

II.1. La réponse innée

Dès les premiers heures suivant l'infection, les bradyzoïtes ou sporozoïtes de *T. gondii* se lient aux entérocytes et les infectent (Fig. 5). Cette entrée déclenche une sécrétion d'oxyde nitrique (NO) et de chimiokines qui activent le recrutement de neutrophiles, de macrophages, de monocytes, de cellules dendritiques (DC), de cellules NK et de cellules T CD4+ au niveau de la lamina propria de l'intestin (couche de tissu conjonctif située entre l'épithélium et la sous-muqueuse) (Liesefeld *et al*, 1996). D'après des études *in vitro*, les chimiokines synthétisées par les entérocytes infectés seraient MCP-1/CCL2 (monocyte chemotactic protein-1), IP10/CXCL10 (IFN- γ inducible protein 10), MIP-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4 (monocyte inflammatory protein-1 α et β), MIP-2/CXCL2 et RANTES/CCL5 (regulated on activation and normally T-cell expressed) (Mennechet *et al*, 2002 ; Kasper *et al*, 2004). Les entérocytes infectés participent également directement à l'élimination du parasite par la limitation de la disponibilité en fer intracellulaire (Dimier et Bout, 1998).

II.1.1. Synthèse d'IL-12

- **Rôle des cellules dendritiques**

Le recrutement local des populations cellulaires précédentes déclenche une forte réponse cytokinique caractérisée par la synthèse d'IL-12, cytokine initiatrice de la réponse cellulaire, et d'IFN- γ , cytokine majeure de résistance à l'infection par *T. gondii*.

Trois voies de synthèse de l'IL-12 par les DC ont été décrites suite à une infection par *T. gondii*.

La première voie, également induite chez les macrophages, pourrait impliquer les molécules de glycosylphosphatidyl inositol (GPI), des lipides présents à la surface du parasite et qui seraient les ligands de récepteurs Toll-like (TLR) (*cf.* III.1.1.) (Denkers, 2003). En effet, les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 ont des ligands de nature lipidiques qui ne sont pas tous clairement identifiés (Kaisho et Akira, 2006).

La deuxième voie implique la profiline, une protéine parasitaire intervenant dans la polymérisation de l'actine au cours de son déplacement. Une étude récente a prouvé que cette profiline est capable de se lier au TLR11 et d'induire la synthèse d'IL-12 (Plattner *et al*, 2008).

La troisième voie impliquerait également une protéine parasitaire : la cyclophiline-18, libérée par les tachyzoïtes extracellulaires. Cette cyclophiline se lierait au récepteur de chimiokine CCR5 pour induire la sécrétion d'IL-12 par les DC et les macrophages (Aliberti *et al*, 2003).

Les DC ainsi que les macrophages sont les premières cellules sécrétrices d'interleukine (IL)-12 qui initie la synthèse d'IFN- γ (interféron- γ) par les cellules NK (Suzuki *et al*, 1988 ; Gazzinelli *et al*, 1994 ; Reis e Sousa *et al*, 1997). Cependant, de récents travaux ont montré que les DC sont les principales productrices de l'IL-12 nécessaire à la lutte anti-toxoplasmique. *In vivo*, des expériences de déplétion des DC, induite par la toxine diphtérique, ont montré l'abolition de la production d'IL-12 suite à l'injection d'extrait antigénique de *T. gondii*. De plus, le transfert de DC issues de souris de phénotype sauvage dans des animaux déplétés en DC par la toxine diphtérique juste avant l'infection restaure la production d'IL-12 et d'IFN- γ ainsi que la survie à l'infection. Enfin, le transfert de DC issues de souris déficientes pour la sous-unité p35 de l'IL-12 dans des animaux déplétés en DC puis infectées, est incapable d'induire la production de la forme active de l'IL-12, l'IL-12p70 (Liu *et al*, 2006).

Les DC immatures recrutées au site d'infection sont alors des cellules privilégiées dans le contact avec les antigènes parasitaires ou même le parasite entier au niveau de la lamina propria. Ce contact est rendu possible de trois façons différentes.

La première voie d'échantillonnage des antigènes, a lieu directement dans la lumière intestinale. Après maturation, les cellules dendritiques seraient capables de faire passer des extensions à travers les jonctions serrées de l'épithélium intestinal sans détruire l'intégrité de la couche cellulaire (Rescigno *et al*, 2001).

Une seconde voie, alternative, impliquerait la capture des parasites qui passent la barrière intestinale par les DC.

Une troisième voie d'échantillonnage des antigènes se fait *via* les entérocytes infectés qui entrent en apoptose et sont digérés par les DC (Larsson *et al*, 2001).

Cependant, l'invasion active du parasite des DC murines immatures les rend insensibles à une activation par les TLR ou par le CD40L, inhibant ainsi leur maturation, leur capacité à synthétiser l'IL-12 et le TNF- α et à activer les lymphocytes T non éduqués (McKee *et al*, 2004). En revanche, les DC humaines sont activées par le parasite vivant et initient leur processus de maturation (Subauste *et al*, 2000).

- **Rôle des monocytes/macrophages**

Des travaux récents ont également montré l'importance des monocytes Gr1+ dans la réponse innée contre l'infection par *T. gondii*. Ces cellules sont recrutées *via* le MCP-1 grâce à leur expression du récepteur correspondant, le CCR2. Des souris C57BL/6 infectées déficientes en l'une ou l'autre de ces molécules sont incapables de contrôler leur parasitémie intestinale, au niveau de l'iléon, malgré une synthèse normale de cytokines Th1 au niveau systémique. Cette prolifération parasitaire conduit à un recrutement massif de neutrophiles et à une destruction tissulaire, aboutissant à la mort des animaux par nécrose intestinale. Dans les animaux de phénotype sauvage infectés, des monocytes Gr1+ sont recrutés dans l'iléon, à la place des neutrophiles, jouant ainsi un rôle décisif dans la protection des souris notamment par leur synthèse d'IL-12, de TNF- α et d'oxyde nitrique au niveau de la lamina propria (Dunay *et al*, 2008).

Le récepteur CCR2 jouerait également un rôle important en début de phase chronique de la toxoplasmose. En effet, à ce stade d'infection, des souris déficientes en CCR2 ont quatre fois plus de parasites au niveau de leur système nerveux central que les souris de phénotype parental, montrant leur incapacité à maîtriser la multiplication parasitaire. Ce récepteur intervient en effet dans la migration des cellules CD4+, des monocytes/macrophages, des granulocytes et des cellules NK (Benevides *et al*, 2008).

Dans les macrophages, la réponse dépend largement du génotype de la souche infectieuse. Les souches de type I, très virulentes, induisent une faible production d'IL-12 s'expliquant par une voie de signalisation indépendante de l'adaptateur MyD88 (présent dans la plupart des voies de signalisation de TLR). Au contraire, les souches de type II, plus proches d'une infection naturelle, induisent une forte production d'IL-12 par les macrophages due à l'activation d'une voie de signalisation dépendante de MyD88 (Kim *et al*, 2006). En contraste de la synthèse d'IL-12, l'infection des macrophages par une souche de *T. gondii* de type I entraîne une forte et durable production d'un large panel de chimiokines tandis que les

souches de types II et III entraînent une réponse plus faible. Cette situation a été confirmée *in vivo* et semble dépendre d'une voie de signalisation impliquant la PI 3-kinase (phosphoinositide 3-kinase) et la famille de récepteurs associés (G_i protein-coupled receptor) (Lee *et al*, 2007).

- **Rôle des cellules NK**

In vitro, le dialogue entre les cellules NK et les DC a été mis en évidence. Des cocultures ont montré que la production d'IL-12 par les DC est augmentée en présence de NK et que cette augmentation est en partie due à l'IFN- γ synthétisé par les NK. Un contact direct est également nécessaire entre ces deux populations cellulaires pour une forte production d'IL-12, les ligands impliqués à la surface des DC sont RAE-1 et MULT-1 tandis que le récepteur des NK est NKG2D (Guan *et al*, 2007).

- **Rôle des neutrophiles**

Les neutrophiles jouent un rôle crucial dans la survie en phase aiguë de l'infection. En effet, leur déplétion entraîne la mort précoce des animaux ainsi qu'une réponse Th1 diminuée (baisse de la synthèse d'IL-12, de TNF- α et d'IFN- γ), une charge parasitaire accrue associée à des dommages tissulaires importants (Bliss *et al*, 2001). Un dialogue décisif entre les neutrophiles et les DC a récemment été prouvé. La culture *in vitro* de neutrophiles en présence d'extrait de *T. gondii* entraîne la synthèse des chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES qui sont de puissants attractants pour les DC immatures, de même que la sécrétion de TNF- α qui induit la maturation des DC ainsi que leur production d'IL-12 (Denkers *et al*, 2004 ; Egan *et al*, 2008).

La voie de synthèse de l'IL-12 dans les neutrophiles implique la molécule adaptatrice MyD88, sans qu'un TLR particulier n'ait pu être identifié (Del Rio *et al*, 2004).

II.1.2. Synthèse d'IFN- γ

L'IFN- γ est la cytokine majeure de lutte contre *T. gondii*. En effet, des souris naturellement résistantes ayant reçu un anticorps monoclonal contre l'IFN- γ meurent de l'infection aiguë (Suzuki *et al*, 1988). Cet IFN- γ , en association avec le TNF- α , est à l'origine de l'activation des macrophages qui sécrètent à leur tour du NO, molécule efficace pour limiter la réplication des tachyzoïtes (Hayashi *et al*, 1996 ; Denkers, 2003). De plus, dans les cellules phagocytaires professionnelles ou non, le tryptophane disponible pour le parasite est restreint, suite à sa dégradation par l'indoleamine 2-3 dioxygénase après stimulation par l'IFN- γ , menant ainsi au contrôle de la croissance parasitaire (Kasper *et al*, 2004).

La production d'IFN- γ par les macrophages peut aussi être le fait d'une stimulation autocrine par leur IL-12. Il en est de même pour les DC. L'activation des macrophages et la maturation des DC par l'IL-12 induit une voie de signalisation dépendante de la molécule de transduction Stat4 aboutissant à la synthèse d'IFN- γ , *in vitro* comme *in vivo* (Fukao *et al*, 2001).

Les cellules NK sont activées par l'IL-12 sécrétée par les DC, les macrophages et les neutrophiles. En réponse à cette stimulation, les NK synthétisent de l'IFN- γ et participent ainsi à une immunité non spécifique contre *T. gondii* (Gazzinelli *et al*, 1993).

La production de chimiokines par les cellules endothéliales et épithéliales de l'intestin infecté est importante dans l'établissement d'un gradient chimiotactique qui permet la migration des lymphocytes producteurs d'IFN- γ du flux sanguin vers la muqueuse, à travers l'endothélium. L'IFN- γ et le TNF- α produits par les lymphocytes CD4+ de la lamina propria augmentent la production de plusieurs chimiokines proinflammatoires dont MIP-2, MCP-1, MIP-1 α et IP-10 par les entérocytes infectés. Cette réaction augmente alors l'attraction d'autres cellules inflammatoires (Mennechet *et al*, 2002).

Une sous-population mineure de lymphocytes T, les cellules NKT, partagent des récepteurs des lymphocytes T conventionnels et des cellules NK. Ces cellules sont majoritairement présentes dans le foie, la rate, le thymus et la moelle osseuse et reconnaissent l'antigène par le récepteur CD1d. Une étude de 2005 a identifié des cellules NKT dans la lamina propria suite à une infection par *T. gondii*. Leur absence conduit à une résistance accrue des animaux, résultat renforcé par la découverte que l'activation des NKT est associée à l'initiation précoce de la réponse Th1 (caractérisée par la synthèse d'IFN- γ) au niveau intestinal (Ronet *et al*, 2005). Ces données suggèrent un rôle des cellules NKT au cours de la réponse précoce à l'infection par *T. gondii*, menant à la synthèse d'IFN- γ .

II.2. Les cellules dendritiques : des cellules présentatrices d'antigènes à l'interface entre immunités innée et acquise

II.2.1. Classification selon la localisation anatomique

Les DC et leurs précurseurs circulent en très faible nombre dans l'organisme, ils représentent environ 1 % des PBMC (peripheral blood mononuclear cells).

Dans les tissus non lymphoïdes, des cellules de Langerhans et des DC dermiques existent dans la peau, et des DC interstitielles sont retrouvées dans la plupart des organes, dont le foie, les reins, le cœur et sont souvent associées à des structures vasculaires. Des DC associées à la

surface muqueuse sont présentes dans les muqueuses orales, du tractus intestinal et du tractus respiratoire. Toutes ces cellules se développent à partir de précurseurs sanguins et constituent un système sentinelle dans les tissus périphériques (Sato et Fujita, 2007).

Les tissus lymphoïdes, plus particulièrement les centres germinatifs, dans lesquels sont générés les LB mémoires, contiennent des DC folliculaires et des DC de centre germinatif. Les premières capturent efficacement l'antigène sous forme de complexes immuns et induisent l'activation et la sélection des LB des centres germinatifs. Les secondes sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes pour les LT.

Une fois l'antigène capturé, les DC migrant depuis la peau, les sites interstitiels non lymphoïdes ou les surfaces muqueuses vers la lymphe afférente sont désignées sous le terme de DC lymphatiques afférentes. Au cours de leur migration, ces cellules deviennent des DC interdigitées dans les zones T où elles peuvent initier des réponses immunes par l'activation des LT non éduqués ainsi que des LB. Dans le thymus, les DC thymiques seraient impliquées dans la sélection négative des LT (Sato et Fujita, 2007).

II.2.2. Classification selon les marqueurs de surface exprimés

Deux sous-populations sont définies selon ce critère : les DC conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) bien que des études chez la souris et chez l'homme ont montré quelques différences selon le modèle considéré.

- **Les DC conventionnelles**

Chez la souris, en plus du CD11c et du CMH II, les marqueurs de cellules T, CD4 et CD8, exprimés par les DC sont utilisés pour la classification et pour la différenciation des sous-types. Sur les DC, le CD8 est retrouvé sous la forme homodimérique $\alpha\alpha$ plutôt que sous la forme hétérodimérique $\alpha\beta$, typique des LT. Les DC CD8 α^+ étaient auparavant appelées DC lymphoïdes alors que les DC CD8 α^- étaient désignées sous le terme de DC myéloïdes. Les autres marqueurs utilisés sont le marqueur myéloïde CD11b et le marqueur des DC interdigitées CD205. Grâce à toutes ces molécules, cinq sous-types de DC conventionnelles CD11c+CMH II+ sont définis dans les tissus lymphoïdes de la souris.

La rate contient trois sous-types, dont les DC lymphoïdes CD4 $-$ CD8 α^{high} CD205+CD11b $-$ (20 % des DC spléniques), les DC myéloïdes CD4+CD8 α^- CD205 $-$ CD11b+ (40 % des DC spléniques) et les DC myéloïdes CD4 $-$ CD8 α^- CD205 $-$ CD11b+ (15 % des DC spléniques). Les deux sous-types myéloïdes sont localisés dans la zone marginale, entre la pulpe rouge et

la pulpe blanche des ganglions lymphatiques et de la rate puis migrent vers la zone T après stimulation.

Les ganglions lymphatiques contiennent également deux autres sous-types de DC qui ne se trouvent pas dans la rate et qui arrivent probablement par le système lymphatique. L'un de ces sous-types est la forme mature des DC interstitielles myéloïdes, de phénotype CD4-CD8 α -CD205+CD11b+, tandis que le second sous-type est constitué de cellules de Langerhans myéloïdes, de phénotype CD4-CD8 α lowCD205highCD11b+. Les cellules de Langerhans matures sont restreintes aux ganglions drainants de la peau alors que les DC interstitielles matures sont communes à tous les ganglions lymphatiques (Sato et Fujita, 2007).

Chez l'homme, peu d'études ont été menées pour caractériser les différents sous-types. Les cDC humaines expriment toutes des molécules du CMH II et le CD4 mais n'expriment pas le CD8. De plus, les DC humaines comptent deux sous-types conventionnels myéloïdes CD11c+ ainsi que des sous-types plasmacytoïdes lymphoïdes CD11c-, contrairement aux DC murines qui expriment toutes ce marqueur.

Le sang périphérique contient deux sous-types myéloïdes conventionnels : l'un de phénotype CD4+CD1a+CD11chighBDCA-1/CD1c+ (0,6 % des PBMC) et l'autre de phénotype CD4+CD1a-CD11clowBDCA-3/CD141+ (< 0,05% des PBMC). Le premier sous-type serait le précurseur direct des cellules de Langerhans tandis que le second sous-type serait précurseur des DC interstitielles du sang périphérique (Sato et Fujita, 2007).

- **Les DC plasmacytoïdes**

Cette classe de DC a initialement été identifiée chez l'homme. Les DC plasmacytoïdes murines se trouvent dans la rate (25 % des DC spléniques), la moelle osseuse, le thymus et les ganglions lymphatiques. Alors que les cDC arrivent aux ganglions depuis les tissus périphériques, les pDC arrivent directement depuis le sang à travers les vaisseaux. Des pDC fraîchement isolées présentent un profil typique de grosses cellules rondes avec peu de dendrites et un noyau diffus. Elles expriment les marqueurs B220, Gr-1, CD8 α , CD11c, CD205 et CMH II mais manquent de molécules de costimulation.

Dans des conditions physiologiques normales, les pDC ont un turnover de 2 semaines tandis que les cDC ont un turnover de 3 à 5 jours (Sato et Fujita, 2007).

Chez l'homme, les pDC sont les seules DC d'origine lymphoïde. Elles présentent un phénotype CMH II+CD11c-CD4+CD45RA+CD123+ILT3+ILT1- (0,4 % des PBMC) d'où les autres marqueurs myéloïdes des cDC sont absents. Deux marqueurs supplémentaires

définissent les sous-types restreints aux pDC humaines du sang périphérique et de la moelle osseuse, BDCA-2/CD303 et BDCA-4/CD304 (Sato et Fujita, 2007).

II.2.3. Cellules dendritiques et *T. gondii*

Les DC dites immatures, sont les cellules sentinelles situées dans les tissus périphériques. Leur principale caractéristique est leur grande capacité d'endocytose (Sallusto *et al*, 1995). Des DC immatures ont été décrites dans les plaques de Peyer, formant une couche cellulaire dense dans le dôme subépithélial. Le parasite accèderait aux DC par les cellules M (microfold cell) qui se trouvent dans l'épithélium entourant les plaques de Peyer (Rescigno *et al*, 2001). Ces DC des plaques de Peyer ne joueraient pas un rôle majeur dans le contrôle de la phase intestinale de la toxoplasmose (Dunay *et al*, 2008). Les DC sont également présentes à travers la lamina propria. Une fois les antigènes phagocytés dans les tissus périphériques, les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires initiant alors leur maturation.

- **Migration et maturation des cellules dendritiques**

Le processus de maturation implique des modifications morphologiques (apparition de prolongements cytoplasmiques et réorganisation des réseaux de microfilaments) et d'expression des molécules de surface.

Chez la souris, les DC augmentent notamment l'expression du récepteur CCR7 dont les ligands sont les chimiokines MIP3- β et C6kine produites dans la zone T des ganglions lymphoïdes (Kellermann *et al*, 1999). L'interaction du CCR7 des DC avec leurs ligands permet aux cellules de quitter le site inflammatoire et de migrer vers les ganglions et la rate *via* la lymphe ou le sang. Après une injection d'extrait parasitaire, une augmentation rapide des ligands du récepteur dendritique CCR5, MIP-1 α et MIP-1 β , est observée au niveau des artérioles centrales de la rate. Ces ligands seraient sécrétés par les cellules endothéliales ainsi que par des DC CD11c⁺ résidentes et sont impliqués dans la migration des DC (Aliberti *et al*, 2000). La même équipe a identifié une protéine parasitaire, la cyclophiline-18 (C-18), comme le ligand du CCR5. La C-18 est retrouvée dans le réticulum endoplasmique de *T. gondii* ainsi que dans sa vacuole parasitophore (Aliberti *et al*, 2003).

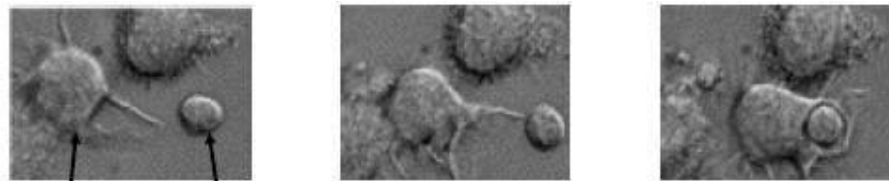
Chez l'homme, une étude a montré que les antigènes excrétés-sécrétés de *T. gondii* recrutent uniquement des DC immatures sans pour autant induire leur maturation. Ce recrutement se fait également *via* le CCR5 porté par les DC mais grâce à un autre de ses ligands, MIP-3 β (Diana *et al*, 2005).

Des travaux *in vitro* sur des DC humaines et murines prouvent que seules des cellules activement infectées par des parasites vivants, et non tués ou par de l'extrait, ont la capacité de migrer à travers une couche cellulaire endothéliale sans ajout de chimiokine et sont même beaucoup plus mobiles que des cellules non infectées. Contrairement aux études précédentes, la migration des DC infectées par des tachyzoïtes vivants ne dépend ni du CCR5 ni du CCR7, mais vraisemblablement d'une voie de signalisation impliquant les protéines hétérotrimériques Gi. *In vivo*, des expériences de transfert passif de DC infectées montrent une migration de ces cellules vers la rate et les ganglions mésentériques, facilitant ainsi la dissémination du parasite dans l'organisme (Lambert *et al*, 2006).

- **Activation des cellules dendritiques**

Chez la souris, les tachyzoïtes de *T. gondii* infectent préférentiellement les DC immatures mais sont capables de se répliquer aussi bien chez les DC immatures que chez les DC matures. Suite à l'infection par des parasites vivants, les DC matures restent activées tandis que les tachyzoïtes se multiplient. L'activation des DC immatures n'est possible qu'avec des tachyzoïtes de *T. gondii* tués ou de l'extrait parasitaire, en aucun cas avec des tachyzoïtes vivants. Ces DC infectées restent immatures, une inhibition de maturation qui est indépendante de la réplication intracellulaire du parasite et qui laisse ces DC dans l'incapacité d'activer les LT (McKee *et al*, 2004). Des résultats contraires ont été observés avec des DC humaines. En effet, ces dernières sont uniquement activées en présence de tachyzoïtes vivants et leur activation entraîne leur maturation, comme indiqué par l'augmentation des molécules de surface CMH II, CD80, CD86 et CD40 (Subauste *et al*, 2000). Chez l'homme, les DC immatures et matures en culture ont une permissivité identique mais les premières présentent une prolifération intracellulaire du parasite réduite. Ces DC immatures ne subissent pas de maturation une fois infectées par *T. gondii*. L'effet toxoplasmostatique des DC immatures pourrait s'expliquer par leur expression d'un récepteur au TNF, le TNF-R2, induite par l'infection. Les DC matures, même infectées, ne l'expriment jamais (Giese *et al*, 2004).

L'activation des DC murines induit leur sécrétion d'IL-12, cytokine critique dans la mise en place de l'immunité anti-toxoplasmique. Dans la rate de souris ayant reçu une injection d'extrait antigénique, des cellules synthétisant l'IL-12 apparaissent dès 3 heures, la production d'IL-12 atteint un pic entre 6 et 12 heures puis diminue jusqu'à 24 heures. La population de DC identifiée comme sécrétrice présente un profil de cellules interdigitées CD8 α + (Reis e Sousa *et al*, 1997). Deux ans plus tard, la même équipe montre, *in vivo*, une paralysie des DC suite à leur activation par un extrait parasitaire, les rendant incapables de sécréter de l'IL-12 en réponse à une nouvelle stimulation. Cette paralysie est totalement levée



Cellule dendritique
mature

Lymphocyte T

Figure 6. Photographies présentant l'activation d'un lymphocyte T naïf par une cellule dendritique.

D'après <http://www.chups.jussieu.fr/polys/immun/immumuqintesti/immumuqintesti2007.pdf>

après 5 à 7 jours et a lieu après une relocalisation normale des DC. Cette paralysie des DC pourrait jouer un rôle crucial dans la protection des souris contre une réponse cytokinique incontrôlée délétère (Reis e Sousa *et al*, 1999).

La synthèse d'IL-12 est partiellement dépendante du CCR5, notamment chez les DC CD8 α +, mais également de MIP-1 β et de RANTES (Aliberti *et al*, 2000). D'autres travaux ont montré que la synthèse d'IL-12 par les DC humaines, de même que la synthèse d'IFN- γ par les LT, est dépendante d'une interaction entre ces deux populations cellulaires et requiert l'engagement du CD28 et du CD40L (Subauste *et al*, 2000). Plus récemment, une protéine de choc thermique de *T. gondii*, la HSP70, a montré sa capacité à induire la maturation de DC humaines en 48 heures, par une augmentation des molécules de costimulation en surface et une baisse de l'activité phagocytaire. La HSP70 semble impliquer une voie de signalisation passant par les MAPK pour induire la maturation des DC et leur synthèse d'IL-12 (Kang *et al*, 2004). La suite de cette étude montre que, contrairement au TLR2, le TLR4 serait impliqué dans la maturation des DC mises en contact avec la HSP70. De plus, le TLR4 est nécessaire pour l'activation des LT par les DC stimulées avec la HSP70. La voie de signalisation induisant la maturation des DC suite à l'engagement du TLR4 ne passe pas par la protéine adaptatrice MyD88 mais par les autres protéines adaptatrices TRAM/TRIF (*cf.* III.1.2.). En revanche, la synthèse d'IL-12 par les DC stimulées par la HSP70 passe par la voie TLR4/MyD88 (Aosai *et al*, 2006).

Une seconde cytokine proche de l'IL-12, l'IL-23, s'est révélée importante pour la survie des souris. L'IL-23 est un membre de la famille de l'IL-6 qui a une structure proche de celle de l'IL-12 puisqu'elles partagent une sous-unité, la p40. L'infection *in vitro* et *in vivo* de DC avec des tachyzoïtes vivants entraîne une augmentation de l'ARNm de l'IL-23, révélant les DC comme la source majeure de cette cytokine après une infection par *T. gondii*. L'injection d'IL-23 exogène augmente la survie des souris indépendamment de l'IL-12 mais n'est pas suffisante pour induire une résistance à long terme contre l'infection (Lieberman *et al*, 2004).

- **Présentation antigénique par les cellules dendritiques**

Les DC activées par la reconnaissance de l'antigène toxoplasmique, activent à leur tour les cellules T non éduquées afin d'initier la réponse adaptative spécifique du parasite (Fig. 6). L'activation des lymphocytes par les DC peut se faire par différentes voies.

Chez l'homme, des DC infectées avec des souches avirulente ou virulente inhibent l'activation des LT. Cette inhibition ne dépend pas de l'invasion mais de la répllication intracellulaire dans les DC. L'immunosuppression a lieu uniquement après un contact entre

DC et LT, cependant les ligands et récepteurs impliqués n'ont pas été identifiés. La seule certitude établie par ces travaux est le caractère non conventionnel de ce mécanisme puisqu'il ne repose pas sur les molécules Fas-FasL par exemple (Wei *et al*, 2002).

Des études *in vitro* ont prouvé que l'activation des LT CD8⁺ se fait par la présentation d'antigènes sur des molécules du CMH I des DC, aussi appelée cross-présentation. Cette activation est augmentée par une activation préalable des DC par de l'IFN- γ et du TNF- α (Dzierszinsky *et al*, 2007). Le mécanisme de présentation par le CMH I impliquerait les transporteurs TAP (transporter associated with antigen processing). Des peptides parasitaires sécrétés hors de la vacuole parasitophore seraient pris en charge par les transporteurs TAP du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique (Gubbels *et al*, 2005).

Ces travaux ont été confirmés *in vivo* chez des souris déficientes en TAP-1. Ces souris sont incapables d'activer les LT CD8⁺ et présentent une sensibilité accrue à l'infection toxoplasmique (Goldszmid *et al*, 2007).

Chez la souris, la maturation des DC induit la formation et le transport à la surface des complexes CMH II-peptide indispensables à l'activation des LT CD4⁺. Des études *in vitro* et *in vivo* utilisant des parasites transgéniques ont montré que la présentation des antigènes par le CMH II des DC est capable d'activer des LT CD4⁺ spécifiques et leur production d'IFN- γ (Pepper *et al*, 2004).

Cette présentation aux LT CD4⁺ *via* le CMH II vient en contradiction des résultats précédemment obtenus par McKee qui a montré que des DC infectées étaient incapables de maturer et donc potentiellement de présenter l'antigène. Cette situation a récemment trouvé une explication par l'identification de différentes sous-populations de DC. Dans le sang des souris infectées, trois populations de DC CD11c⁺ ont été caractérisées : une lymphoïde CD8 α ⁺, une myéloïde CD11b⁺ et une plasmacytoïde PDCA⁺. Suite à l'infection, seules les DC CD8 α ⁺ et les DC plasmacytoïdes augmentent l'expression de leurs molécules de CMH II, jouant ainsi probablement un rôle important dans l'activation des LT CD4⁺. De plus, seules les DC plasmacytoïdes voient leur expression de CD83 augmentée, marqueur de maturation. Ces cellules activées par le parasite produisent de grandes quantités d'IL-12. Leur activation, de même que leur synthèse d'IL-12, passe par le TLR11 et montre leur rôle décisif dans l'activation des LT CD4⁺ suite à une infection toxoplasmique (Pepper *et al*, 2008).

Le transporteur TAP a également été impliqué indirectement dans l'activation des LT CD4⁺ par les DC. En effet, des souris infectées déficientes en TAP-1 ont moins de cellules NK synthétisant de l'IFN- γ par rapport aux souris de phénotype parental. De plus, la rate et le site

péritonéal d'infection de souris déficientes en CD8⁺ et déplétées en cellules NK, ont moins de LT CD4⁺ activés et une synthèse d'IFN- γ par ces LT diminuée, confirmant l'implication des NK dans l'activation des LT CD4⁺ et par conséquent le rôle indirect des molécules TAP dans cette activation (Goldszmid *et al*, 2007).

En plus de la présentation antigénique aux LT CD4⁺, les DC participeraient également à leur orientation vers un profil Th1. Le facteur de transcription T-bet, bien connu pour son rôle dans la différenciation des LT CD4⁺ en lymphocytes Th1 et dans la production d'IFN- γ a récemment été identifié comme l'un des facteurs entrant en jeu dans cette orientation. L'injection d'extrait toxoplasmique à des souris induit l'augmentation des ARNm de T-bet mais également d'IFN- γ dans les splénocytes CD4⁺. Cette augmentation de T-bet dépend de l'IFN- γ mais en aucun cas de l'IL-12. *In vitro*, des DC humaines au repos n'expriment pas T-bet mais de forts taux d'ARNm de T-bet sont retrouvés dans ces mêmes cellules stimulées par de l'IFN- γ . La production d'IFN- γ résultant de l'expression de T-bet dans les DC pourrait jouer un rôle critique dans la différenciation des LT en Th1 (Lighvani *et al*, 2001).

Différents facteurs intracellulaires ont été impliqués dans la présentation optimale des antigènes par les DC.

Parmi eux se trouve le facteur de transcription c-Rel qui est activé après une inflammation. c-Rel fait partie de la famille de NF κ B et est impliqué dans la fonction des LT. Il a également un rôle dans l'immunité innée puisqu'il intervient dans la production des sous-unités constituant l'IL-12 et l'IL-23 dans les DC. Des souris déficientes en c-Rel infectées oralement avec des kystes de la souche avirulente ME49 survivent à la phase aiguë de l'infection mais meurent en phase chronique avec dix fois plus de kystes cérébraux que les souris parentales et des nécroses et des abcès cérébraux. Ces souris c-Rel^{-/-} montrent une production d'IFN- γ suboptimale associée à une prolifération et une activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ diminuées et à une moindre synthèse d'IL-2. Des essais *in vitro* ont montré que les DC c-Rel^{-/-} étaient incapables d'activer les LT. Ces résultats indiquent que le facteur c-Rel est indispensable au processing et à la présentation optimale des antigènes par les DC (Mason *et al*, 2004).

Le second facteur identifié est Gadd45 qui est également impliqué dans la différenciation en Th1. Dans les LT, Gadd45 facilite l'activation des MAPK tout en inhibant celle de la p38. En réponse à de l'extrait parasitaire chez des souris déficientes en Gadd45, les LT montrent une activité p38 augmentée alors que les DC présentent une signalisation par les MAPK et une activation de la p38 suboptimales ainsi qu'une diminution de leur sécrétion d'IL-12. L'augmentation de l'activité p38 dans les LT induit leur différenciation en Th1 mais

uniquement dans un environnement favorable fourni par des DC ayant une p38 active. De plus, l'absence de Gadd45 inhibe l'activation de la p38 dans les DC et induit un défaut de réponse Th1 même en présence de LT ayant une p38 hyperactive. Ces résultats impliquent que la p38 est plus importante dans les DC que dans les LT pour une polarisation Th1 efficace, et indirectement mettent en avant le rôle essentiel de Gadd45 dans l'activation des LT CD4+ par les DC (Jirmanova *et al*, 2007).

II.3. La réponse adaptative

Elle suit la réponse innée non spécifique et repose essentiellement sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Fig. 5).

II.3.1. Les lymphocytes T CD4+

- **Les lymphocytes de la lamina propria**

Les premiers lymphocytes T (LT) à intervenir sont les cellules résidentes du site de l'inflammation : les LT CD4+ de la lamina propria. Ces LT activés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont la plus grande sous-population lymphocytaire de la lamina propria. Les CPA capables d'une telle activation sont les DC et les macrophages ayant infiltré l'épithélium infecté. L'IL-12 sécrété par les CPA est un facteur contribuant à l'activation des CD4+, en plus de l'engagement de leur TCR.

Dans des souris C57BL/6, les LT CD4+ issus de la lamina propria d'animaux infectés synthétisent beaucoup d'IFN- γ et de TNF- α qui participent à la nécrose des villosités de l'intestin grêle. *In vitro*, la co-culture de ces LT CD4+ de lamina propria infectée avec une lignée de cellules intra-épithéliales précédemment infectée par des tachyzoïtes induit l'augmentation d'expression des ARNm de nombreuses chimiokines proinflammatoires : MIP-2, MIP-1 α/β , MCP-1, MCP-3, IP-10 et RANTES. L'ajout d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN- γ et le TNF- α entraîne une diminution, bien qu'incomplète, de ces mêmes ARNm. Enfin, la co-culture de cette lignée de cellules intra-épithéliales et de LT CD4+ issus de souris infectées, en présence de parasites, entraîne une diminution de 50 % de l'incorporation d'uracile tritié, indiquant une inhibition de réplication des tachyzoïtes dans les cellules intra-épithéliales par les LT CD4+ (Mennechet *et al*, 2002).

- **Les lymphocytes Th1**

La migration des DC activées les mène aux organes lymphoïdes secondaires où elles sont capables d'activer les LT CD4+ résidents.

Les LT CD4⁺ activés synthétisent à leur tour de l'IFN- γ et de l'IL-2, cytokines essentielles à la mise en place de l'immunité adaptative. L'IFN- γ a depuis longtemps été décrit comme la cytokine majeure de résistance à *T. gondii*, tant en phase aiguë qu'en phase chronique de l'infection (Suzuki *et al*, 1988 ; Gazzinelli *et al*, 1992). Il permet également la différenciation des précurseurs Th0 en lymphocytes Th1, responsables de la réponse contre les pathogènes intracellulaires comme *T. gondii*. L'IL-2 joue un rôle primordial dans la résistance à la phase aiguë de l'infection. En effet, des souris IL-2^{-/-} infectées, alors qu'elles présentent un taux normal d'IL-12, ont une mortalité précoce associée à une forte parasitémie et une baisse d'IFN- γ sérique. L'ajout d'IL-2 seul ou combiné à de l'IL-12 ne restaure pas la synthèse d'IFN- γ dans des splénocytes de souris IL-2^{-/-}. L'absence d'IL-2 rend donc les souris hautement sensibles à l'infection aiguë par *T. gondii* probablement du fait d'un manque de réponse IFN- γ spécifique de l'antigène (Villegas *et al*, 2002). L'IFN- γ et l'IL-2 sécrétés par les LT CD4⁺ servent également à l'activation des LT CD8⁺. Des essais de vaccination et de déplétion ont montré que les LT CD8⁺ producteurs d'IFN- γ sont les principaux effecteurs de la protection mais que la coopération avec les LT CD4⁺ était indispensable (Gazzinelli *et al*, 1991). Une autre étude a également prouvé que l'absence de LT CD4⁺ n'induit qu'une réponse CD8⁺ partielle, la résistance complète étant accomplie en présence de LT CD4⁺ et d'IL-2 (Denkers *et al*, 1996).

Un autre rôle des LT CD4⁺ apparaît dans le maintien d'une immunité cellulaire efficace. Des souris CD4^{-/-} infectées ne présentent pas de différence dans la génération de précurseurs de LT cytotoxiques ni dans la production d'IFN- γ lorsqu'elles sont comparées à la souche parentale sauvage. Cependant, après 180 jours d'infection ces souris déficientes en CD4 sont incapables de maintenir une immunité CD8⁺ (perte de précurseurs de LT cytotoxiques et baisse d'IFN- γ). Ces travaux prouvent que si les LT CD4⁺ sont accessoires à l'induction d'une réponse CD8⁺, ils sont indispensables à son maintien à long terme (Casciotti *et al*, 2002).

Au niveau cérébral, la déplétion des LT CD4⁺ n'influence pas le recrutement ni la cinétique de recrutement des LT CD8⁺ spécifiques de *T. gondii*. En revanche, elle induit une diminution du nombre de LT CD8⁺ spécifiques producteurs d'IFN- γ ainsi qu'une baisse de leur activité cytotoxique. Les LT CD4⁺ sont donc indispensables pour induire une activation fonctionnelle optimale des LT CD8⁺ cérébraux spécifiques de *T. gondii*, au cours des phases aiguë et chronique de l'infection (Lütjen *et al*, 2006).

- **Les lymphocytes Th2**

En plus du profil Th1 indispensable à la lutte contre le parasite, les LT CD4+ peuvent également se différencier en Th2. Ce profil implique la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et l'IL-4, capables de contrer les effets délétères d'une surproduction d'IFN- γ . Le rôle crucial de l'IL-10 est le plus décrit. Une étude a été menée en parallèle sur des souris délétées pour l'IL-10 dans un fond génétique C57BL/6 sensible à la phase aiguë de l'infection et dans un fond BALB/c résistant. Une infection orale avec des kystes de la souche ME49 de *T. gondii* conduit à la mort précoce des animaux IL-10^{-/-} quel que soit le fond génétique, mortalité associée à une importante nécrose intestinale absente des souris témoins. La survie des souris délétées est significativement allongée par l'injection d'anticorps dirigés contre les LT CD4+, l'IFN- γ et même l'IL-12. Ces résultats montrent que l'IL-10 régule négativement l'expression de l'IFN- γ synthétisé par les LT CD4+, protégeant ainsi les souris de l'inflammation locale létale due à cette cytokine (Suzuki *et al*, 2000). Cette étude confirme et complète des travaux de 1996 menés sur des souris C57BL/10 IL-10^{-/-} infectées par la même souche de *T. gondii* par voie intrapéritonéale (Gazzinelli *et al*, 1996). Au niveau cérébral, l'IL-10 jouerait également un rôle régulateur très important. Dans le cerveau de souris C57BL/6 infectées par voie intrapéritonéale avec une faible dose de kystes ME49 et maintenues en vie par un traitement à la sulfadiazine, la production d'IL-10 est assurée majoritairement par des LT CD4+. Cette production limite la sécrétion locale de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et dans une moindre mesure l'IL-12. Les cerveaux de souris IL-10^{-/-} présentent une sévère inflammation, de nombreux foyers de nécrose ainsi que des infiltrats périvasculaires (Wilson *et al*, 2005).

Une population particulière de LT CD4+ synthétisant de l'IL-10 et de l'IFN- γ a été identifiée récemment dans des souris C57BL/6 infectées. Cette population IL-10+IFN- γ + induit aussi une profonde suppression de la production d'IL-12 par les APC. Parmi les LT double positifs, peu de cellules sécrètent les deux cytokines en même temps (Jankovic *et al*, 2007).

L'IL-4, quant à elle, joue un rôle dans la différenciation des précurseurs de lymphocytes T helpers. Cette cytokine induit l'expression de la molécule de signalisation STAT6, ce qui aboutit à la différenciation des cellules T en lymphocytes de phénotype Th2 (Denkers et Gazzinelli, 1998).

L'IL-4 peut également jouer un rôle protecteur contre l'infection par *T. gondii*. En effet, des souris déficientes pour l'IL-4 infectées par voie orale, présentent une charge parasitaire et une

inflammation exacerbées en phase chronique, suggérant ainsi un rôle protecteur de cette cytokine contre le développement d'une toxoplasmose cérébrale (Suzuki *et al*, 1996).

Une autre étude sur des souris déficientes en IL-4 a montré qu'une infection d'épreuve par voie orale avec des kystes d'une souche peu virulente induit une mortalité en phase aiguë plus forte que chez les souris de phénotype sauvage. Cette mortalité est corrélée à une forte sécrétion d'IFN- γ dans les splénocytes des souris déficientes (Alexander *et al*, 1998).

- **Les lymphocytes T régulateurs**

Une troisième sous-population de LT CD4+, en plus des Th1 et Th2, semble impliquée dans la réponse à *T. gondii*. Cette population, appelée régulatrice (LT reg), a pour caractéristique l'expression du marqueur CD25 et/ou de Foxp3, en plus du CD4. Elle a d'abord été identifiée comme une population de LT CD4+ capable d'inhiber le développement de maladies auto-immunes par la suppression de l'activation et de l'expansion des lymphocytes auto-réactifs. Ces cellules représentent 5 à 10 % des LT CD4+ périphériques chez les souris saines et chez l'homme. Leur implication dans la toxoplasmose est très récente et reste peu décrite. Dans un modèle de souris gestantes, l'infection par le parasite entraîne une diminution simultanée du nombre de cellules CD4+CD25+ spléniques et Foxp3+ placentaires. De plus, le transfert passif de cellules CD4+CD25+ de mères gestantes saines prévient partiellement les avortements dus à une injection d'antigènes toxoplasmiques en cours de gestation (Ge *et al*, 2008).

Récemment, le rôle de cette population de LT CD4+ a été bien décrit dans un modèle parasitaire proche de la toxoplasmose, la leishmaniose. Les deux pathologies ont de nombreux points communs. L'expansion des parasites est contrôlée par une immunité cellulaire mais l'infection persiste tout au long de la vie de l'hôte, le protégeant contre une réinfection. Cependant, en cas d'immunodéficience de l'hôte, une réactivation de l'infection latente est toujours possible. Dans le cas de certaines formes de leishmanioses cutanées, le contrôle de la prolifération parasitaire induit le développement de petites lésions cutanées qui guérissent spontanément en quelques semaines. Elles sont le lieu de résidence des quelques parasites persistants qui confèrent l'immunité protectrice. Chez des souris C57BL/6 résistantes à l'infection par *Leishmania major*, les LT reg s'accumulent dans le derme où ils suppriment, par des mécanismes dépendants et indépendants de l'IL-10, la capacité des LT CD4+ effecteurs à éliminer le parasite du site d'infection. De façon surprenante, l'immunité stérile obtenue chez des souris déficientes en IL-10 est suivie par une perte de l'immunité protectrice contre une réinfection. Ces résultats reflètent l'équilibre fragile existant entre les populations régulatrices et effectrices au site de l'infection chronique (Belkaid *et al*, 2002).

Les LT reg ont également un rôle important au cours de la réactivation d'une infection antérieurement acquise. Malgré l'éradication des parasites aux sites secondaires, une réactivation au site primaire est toujours possible suite à une surinfection. Les LT reg, dont le nombre augmente aux sites de réactivation, seraient directement responsables d'une telle réactivation. En effet, des expériences de transfert montrent que l'injection de LT reg issus de souris récemment infectées dans des souris chroniquement infectées suffit à réactiver l'infection antérieure et inhibe la mise en place d'une réponse effectrice mémoire (Mendez *et al*, 2004).

- **Les lymphocytes Th17**

Enfin, une quatrième sous-population de LT CD4+, les Th17 (*cf.* partie III.2.), entrerait également dans la mise en place de la réponse anti-toxoplasmique. De même que pour les LT reg, les connaissances sont restreintes, une seule étude ayant été menée. Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par leur sécrétion d'IL-17. Des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-17 sont plus sensibles à l'infection que les souris de phénotype sauvage et paradoxalement, cette sensibilité est associée à de moindres dommages muqueux intestinaux. Au niveau cellulaire, les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-17 ont une immunité T spécifique de l'antigène normale, cependant la migration des neutrophiles au site de l'infection est significativement diminuée (Kelly *et al*, 2005).

- **Les lymphocytes cytotoxiques**

Chez l'Homme, le caractère cytotoxique de certains LT CD4+ a été mis en évidence. Des LT cytotoxiques spécifiques de *T. gondii* ont été obtenus à partir de cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains ayant précédemment été en contact avec le parasite. Ces cellules se sont révélées être CD4+ CD8- et capables de lyser les cellules autologues sensibilisées avec de l'antigène toxoplasmique ou infectées par des tachyzoïtes vivants (Curiel *et al*, 1993).

- **Les lymphocytes accessoires**

Les LT CD4+ peuvent influencer la réponse humorale. Des souris CD4^{-/-} infectées ont moins d'IgG2a sériques spécifiques du parasite, présentant de ce fait une réponse de type Th1 diminuée. De plus, la survie de souris infectées chroniquement est améliorée par l'administration de sérum immun anti-*T. gondii*. Toutes ces données semblent indiquer que les LT CD4+ contribuent à la protection en phase chronique *via* leur rôle de cellules accessoires pour la production d'anticorps d'isotype particulier (Johnson et Sayles, 2002).

II.3.2. Les lymphocytes T CD8+

Différentes sous-populations de LT CD8+ ($\gamma\delta$ et $\alpha\beta$) ont été décrites en fonction des sous-unités de leur TCR et de leur CD8.

- **Les lymphocytes intraépithéliaux**

Des lymphocytes intraépithéliaux, ou IEL, CD8 $\alpha\alpha$ exprimant un TCR $\gamma\delta$ ont été décrits dans l'intestin des souris. Le rôle de ces lymphocytes reste inconnu en toxoplasmose mais ils ont montré leur implication dans la résolution d'une inflammation intestinale expérimentale (colite) (Chen *et al*, 2002).

En revanche, les LT $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\beta$ systémiques sont considérés comme une ligne de défense essentielle contre *T. gondii*.

Dans une étude de 1996, des souris C57BL/6 et BALB/c ont été infectées oralement avec des kystes. Leurs splénocytes montrent une augmentation du nombre de cellules exprimant le récepteur $\gamma\delta$ dès 7 jours post-infection, de 3 à 17 % et de 13 à 23 % respectivement. Les mêmes résultats ont été observés après inoculation par voie intrapéritonéale. Cette augmentation s'accompagne d'une synthèse d'ARNm d'IFN- γ multipliée par 8 après une restimulation par de l'antigène toxoplasmique. Des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont ensuite été incubés en présence de parasites puis de LT $\gamma\delta$ afin de déterminer l'action de ces lymphocytes sur des cellules infectées. Ils se sont révélés cytotoxiques envers les macrophages infectés. De plus ces LT $\gamma\delta$ isolés de souris infectées sont capables de protéger partiellement des souris déficientes en β_2 -microglobuline et déplétées de leurs cellules NK et CD4+ (Kasper *et al*, 1996).

Leur rôle dans l'induction des protéines de choc thermique (hsp) par les macrophages a également été démontré, probablement par leur production d'IFN- γ , au cours de la phase aiguë de l'infection. Le traitement de souris infectées par la souche Beverley avec un anticorps monoclonal dirigé contre les cellules T $\gamma\delta$ bloque l'induction de la hsp65 ; or l'induction de la hsp65 empêche les macrophages d'entrer en apoptose suite à leur infection par le parasite (Denkers et Gazzinelli, 1998).

La deuxième sous-population des LT important dans l'immunité anti-toxoplasmique sont les LT $\alpha\beta$.

Parmi cette sous-population, se trouvent également des IEL, premiers LT CD8+ à intervenir lors d'une infection par *T. gondii*. Ces IEL, en plus du TCR $\alpha\beta$, expriment soit un CD8 $\alpha\alpha$ soit un CD8 $\alpha\beta$.

Les CD8 $\alpha\alpha$ auraient un rôle de régulateurs du système immunitaire au niveau mucosal, même si leur implication dans la toxoplasmose n'est pas décrite. Ces cellules expriment en effet de nombreux récepteurs classiquement trouvés sur les cellules NK ainsi que du TGF- β , un puissant immunomodulateur (Denning *et al*, 2007).

Les CD8 $\alpha\beta$ sont considérés comme des lymphocytes activés/mémoires qui ont rencontré l'antigène en périphérie, potentiellement par contact avec des DC, puis qui ont migré vers l'intestin. Ce sont des LT protecteurs lors de l'infection par *T. gondii* comme le montrent l'augmentation de la survie et de la protection des animaux après des expériences de transfert passif d'IEL de souris infectées ou la perte de protection après l'inhibition de la migration de ces lymphocytes vers l'intestin (Lepage *et al*, 1998 ; Buzoni-Gatel *et al*, 1999). Ces IEL ont également montré une activité cytotoxique *via* la perforine ou le mécanisme Fas-FasL (Gelfanov *et al*, 1996).

D'une façon générale, les IEL possèdent une activité cytotoxique restreinte au CMH I et dirigée contre les entérocytes et les macrophages infectés *in vitro*. Ils sont également capables de synthétiser des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF- β (transforming growth factor- β), nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale. En effet, la production de TGF- β par les IEL activés inhibe la production d'IFN- γ par les LT CD4 $^{+}$ de la lamina propria (Luangsay *et al*, 2003 ; Kasper *et al*, 2004). Les IEL sont recrutés au site de l'inflammation par la liaison des chimiokines MIP-1 α et MIP-1 β , sécrétées par les entérocytes infectés, sur le récepteur lymphocytaire CCR5 (Luangsay *et al*, 2003).

- **Les lymphocytes systémiques effecteurs**

Au niveau systémique, les LT CD8 $^{+}$ ont été identifiés comme les principaux effecteurs de l'immunité anti-toxoplasmique. En effet, la déplétion des LT CD8 $^{+}$ chez des souris B10 consanguines naturellement résistantes les rend sensibles à la formation de kystes (Brown et McLeod, 1990). Dans un modèle de SIDA murin, des expériences de transfert passif de LT CD8 $^{+}$ de souris immunisées contre *T. gondii* prévient la réactivation de l'infection chez les animaux chroniquement infectés et immunodéprimés (Khan *et al*, 1999). Cette activité effectrice se fait par une synthèse importante d'IFN- γ (Khan *et al*, 1994).

L'activation des LT CD8 $^{+}$ peut faire intervenir de multiples voies, en fonction des conditions immunitaires de l'hôte notamment.

L'une de ces voies passe par la présentation antigénique par les DC décrite précédemment (*cf.* partie II.2.).

Les cellules NK, en association avec les DC, interviendraient également dans l'induction de l'immunité T CD8+. Des travaux *in vivo* visant à bloquer l'un des récepteurs des cellules NK chez des souris infectées ont montré un poids plus faible, une parasitémie augmentée, une charge kystique cérébrale importante associés à une diminution de la capacité des LT CD8+ à proliférer après restimulation antigénique et une baisse de leur production d'IFN- γ (Guan *et al*, 2007).

En cas de déficience en LT CD4+, l'immunité T CD8+ est mise en place normalement bien qu'elle ne puisse être maintenue à long terme (Casciotti *et al*, 2002). Cette mise en place se ferait une fois de plus grâce aux cellules NK. Des souris déficientes en LT CD4+ et infectées par *T. gondii* montrent une augmentation du nombre de cellules NK prolongée par rapport aux souris de phénotype parental. La déplétion des cellules NK chez les souris CD4^{-/-} entraîne une baisse de la fréquence des LT CD8+ spécifiques de l'antigène, impliquant ces cellules dans l'induction des lymphocytes CD8+ (Combe *et al*, 2005).

- **Les lymphocytes systémiques cytotoxiques**

La cytotoxicité des LT CD8+ est l'une de leurs principales caractéristiques, bien que cette capacité apparaisse accessoire dans la lutte contre *T. gondii* par rapport à la synthèse d'IFN- γ précédemment décrite. Différentes sous-populations de LT CD8+ cytotoxiques (LTc) ont été décrites au niveau du site effecteur dans un modèle d'infection intrapéritonéale. La différenciation de ces sous-populations a été rendue possible par le niveau d'expression d'un marqueur particulier, KLRG1. Cette molécule marquerait les cellules CD8+ effectrices pleinement différenciées, contrairement aux cellules mémoires qui expriment plutôt le récepteur à l'IL-7. L'IL-12 est indispensable à la différenciation des LT CD8+ effecteurs et à leur production d'IFN- γ , tandis que les T mémoires sont indépendants de l'IL-12. De plus, ces deux étapes sont conditionnées par une signalisation intrinsèque et non par l'apport externe d'IL-12 produit par les LT CD4+ (Wilson *et al*, 2008).

Le mécanisme de la cytotoxicité a en partie été révélé en 2001. *In vitro*, des splénocytes de souris immunisées induisent l'apoptose de macrophages infectés par des tachyzoïtes, tout en limitant la prolifération des tachyzoïtes intracellulaires. De plus, la neutralisation de la voie d'exocytose des granules bloque la cytotoxicité de LT CD8+ envers des macrophages infectés, contrairement à la neutralisation du FasL, l'autre voie possible de cytotoxicité des LTc. Ainsi, les LTc agiraient *via* la sécrétion de granules afin de lyser les macrophages infectés et de limiter la réplication parasitaire (Nakano *et al*, 2001).

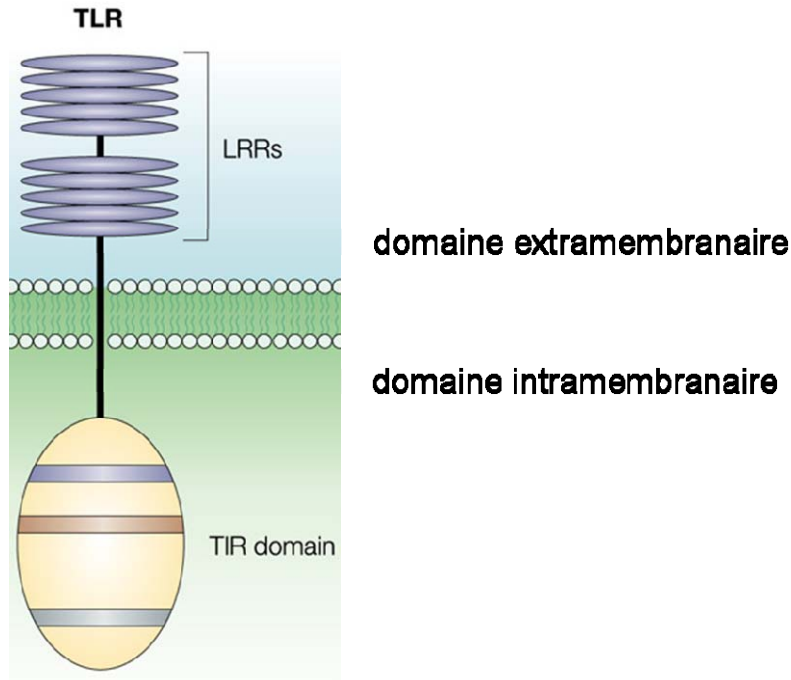


Figure 7. Représentation schématique de la structure des TLR.
 Le domaine extramembranaire comporte des répétitions riches en leucine (LRRs, leucin rich repeat) qui lie les ligands, tandis que le domaine intramembranaire porte un domaine TIR domain (Toll/IL-1 receptor homologous) responsable du recrutement des adaptateurs de la voie de signalisation.
 D'après Akira et Takeda. Toll-like receptor signaling. Nat. Rev. Immunol. 2004 ; 4 : 499-511.

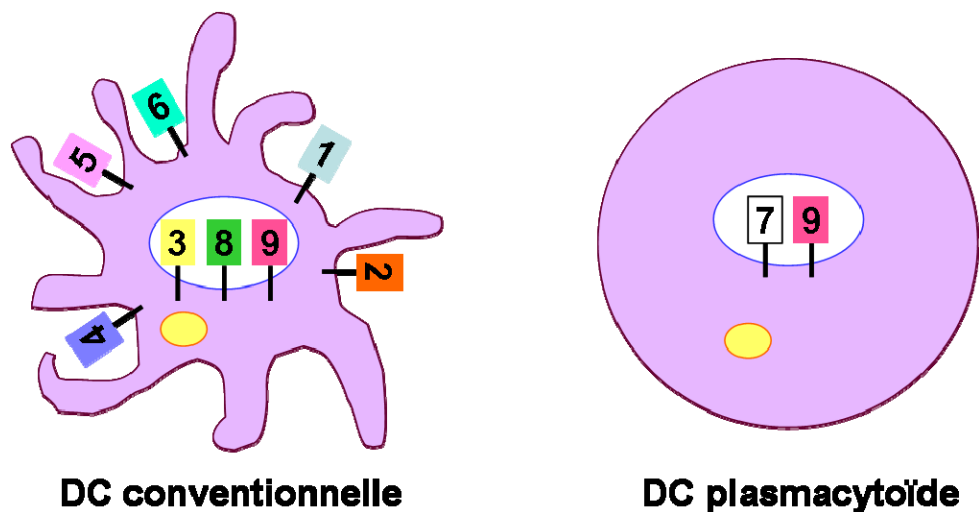


Figure 8. Représentation schématique de l'expression des TLR par les cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes.
 Les DC conventionnelles peuvent exprimer tous les TLR sauf le TLR7. Les DC plasmacytoïdes expriment quant à elles les TLR intracellulaires 7 et 9.

III. Voies de signalisation induites par *Toxoplasma gondii*

III.1. Récepteurs Toll-like et protéine adaptatrice MyD88

III.1.1. Structure et ligands des récepteurs Toll-like

A ce jour, 11 TLR ont été décrits chez l'homme et 13 chez la souris.

Les TLR sont des Pattern Recognition Receptor (PRR) transmembranaires qui reconnaissent des motifs conservés parmi les microorganismes, appelés MAMP (microorganism-associated molecular pattern). Ce sont des protéines membranaires de type I caractérisés par leur domaine extracellulaire porteur de motifs répétés riches en résidus leucine, chacun organisé sous la forme d'un feuillet β lié à une hélice α , qui sont impliqués dans la reconnaissance des MAMP. La région intracellulaire contient une structure commune chez les membres de la famille des TLR et du récepteur de l'IL-1 (IL-1R) appelée domaine TIR (Toll/IL-1 receptor homologous domain), qui est essentiel pour la transduction du signal (Akira *et al*, 2006) (Fig. 7).

La distribution cellulaire des TLR est quasiment ubiquitaire.

Chez l'homme, les monocytes/macrophages expriment la plupart des ARNm des TLR mis à part celui du TLR3 (Muzio, 2000).

L'expression des TLR par les DC varie en fonction de leur sous-type (Fig. 8). Les DC conventionnelles expriment les TLR1-6 et les TLR8-9. Parmi ces DC conventionnelles, les DC myéloïdes expriment les TLR2, 3, 4, 5, 6 et 8. Les DC plasmacytoïdes, quant à elles, expriment uniquement les TLR7 et 9 (Jarrossay *et al*, 2001). L'expression des TLR par les DC varie en fonction de leur état de maturation. Ainsi, les DC immatures diminuent leur expression des TLR1, 2, 4 et 5 au cours de leur maturation tandis que le TLR3 est uniquement exprimé par les DC matures (Mellman et Steinman, 2001).

Les cellules B immatures expriment les mêmes TLR que les DC myéloïdes, à l'exception du TLR7, et diminuent progressivement leur expression au cours de leur processus de maturation en plasmocytes (Zarembek et Godowski, 2002).

Chez l'homme, les cellules T du sang périphérique expriment l'ARNm des TLR1-5, 7 et 9. Quant aux T reg CD4⁺ CD25⁺, ils expriment l'ARNm des TLR5 et 8. Chez la souris, l'expression des TLR par les LT CD4⁺ diffère en fonction des travaux publiés, sans qu'il soit possible de déterminer si les variations observées sont dues aux lignées de souris utilisées ou aux techniques d'étude mises en œuvre. Chez les C57BL/6, les LT CD8⁺ expriment les TLR1, 2, 6, 7 et 9 mais pas ou peu les TLR3-5 et 8. Les LT CD4⁺ mémoires/activés, et

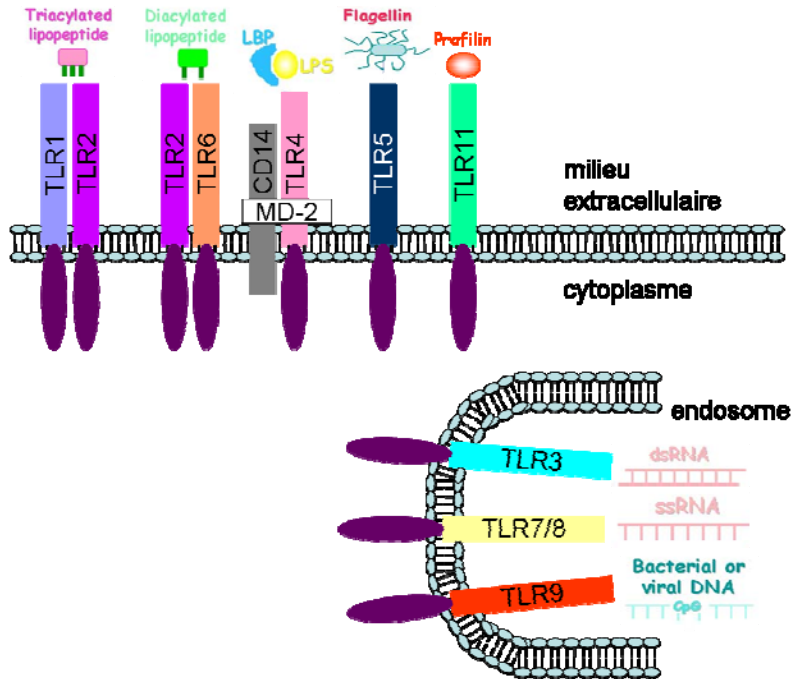


Figure 9. Représentation schématique de l'expression compartimentalisée des TLR et de leur ligand principal.
 Les TLR3, 7-9 sont exclusivement intracellulaires tandis que les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 11 sont exprimés à la surface des cellules.

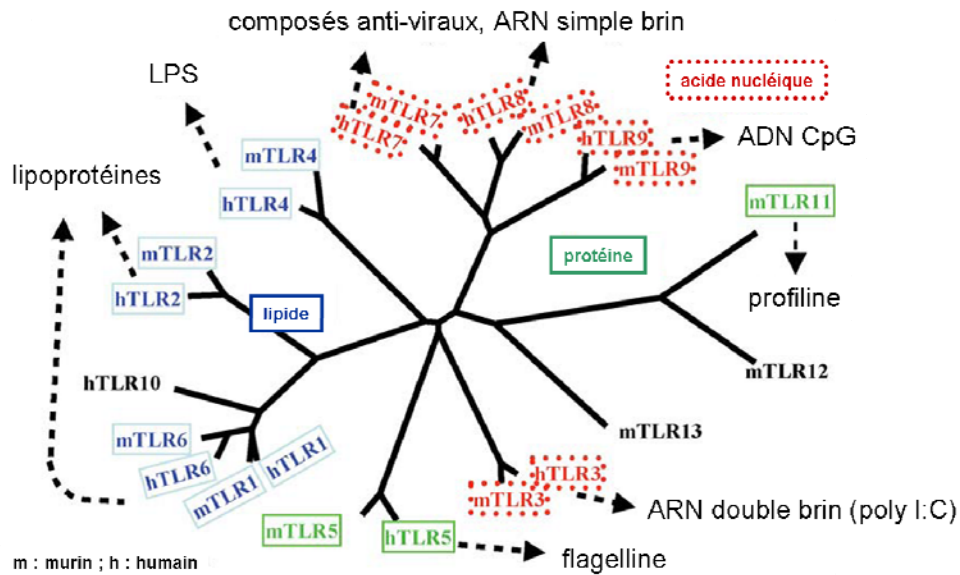


Figure 10. Classification des ligands des récepteurs Toll-like humains (hTLR) et murins (mTLR).
 Les ligands des TLR peuvent être classés en trois catégories : lipidique pour les TLR1, 2, 4 et 6, protéique pour les TLR5 et 11, et acide nucléique pour les TLR3, 7-9.
 D'après Kaisho et Akira. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006 ; 117 : 979-987.

particulièrement les T reg, expriment les ARNm des TLR4 et 5. Les LT CD4+ non éduqués expriment les ARNm des TLR1-3, 6 et 7 mais pas ceux des TLR4, 5 et 9. En revanche, chez les BALB/c, l'ARNm des TLR3-5 et 9 mais pas celui du TLR2 ont été décrits sur les LT CD4+ non éduqués (Kabelitz, 2007).

Les TLR sont également exprimés par les cellules des surfaces épithéliales. Dans l'intestin grêle, les cellules épithéliales expriment les TLR2, 4 et 5 (Cario et Podolsky, 2000). Les cellules épithéliales intestinales expriment les TLR3, 7 et 9 intracellulaires (Pedersen *et al*, 2005 ; Uehara *et al*, 2007).

Chez la souris, le TLR8, dont la fonction reste inconnue dans la toxoplasmose, est exprimé par les neurones et induit l'apoptose de ces cellules (Ma *et al*, 2007).

La localisation subcellulaire des TLR varie en fonction de leur nature (Fig. 9). Certains TLR (TLR1, 2, 4, 5 et 6) sont exprimés à la surface cellulaire tandis que d'autres sont limités à des compartiments intracellulaires (TLR3, 7, 8 et 9) comme les endosomes. Une étude utilisant une protéine chimérique dans laquelle les parties transmembranaire et cytoplasmique du TLR9 sont remplacées par celles du TLR4 suggère que la localisation intracellulaire est importante pour la discrimination entre l'ADN viral et celui de l'hôte. En effet, cette protéine chimérique est exprimée à la surface cellulaire et se trouve de ce fait incapable de reconnaître l'ADN viral normalement reconnu par le TLR9. De plus, lorsque cette protéine est exprimée à la surface de macrophages, les cellules reconnaissent l'ADN du soi, pouvant ainsi mener au développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la localisation intracellulaire du TLR9 serait une sécurité contre de telles réactions (Barton *et al*, 2006). La localisation des TLR3 et 7, bien que tous deux intracellulaires, est due à deux mécanismes différents. Des travaux, également basés sur l'utilisation de protéines chimériques, ont en effet révélé que la localisation du TLR3 se fait grâce à un peptide reliant la partie transmembranaire et le domaine intracellulaire TIR, alors que la localisation du TLR7 est due à son domaine transmembranaire (Nishiya *et al*, 2005).

La plupart des ligands des TLR a été identifiée. Ils peuvent être classés en trois catégories : lipides, protéines et acides nucléiques (Fig. 10).

Le lipopolysaccharide (LPS), composant majeur des parois cellulaires des bactéries Gram-négatives, a le premier été identifié comme ligand de TLR. Il est reconnu par le TLR4, en association complexe avec le CD14 et un facteur soluble associé au TLR4, MD-2. La paroi des bactéries Gram-positives contient, quant à elle, une fine couche de peptidoglycane ainsi que des lipoprotéines ou lipopeptides, reconnus par le TLR2 et ses TLR associés, les TLR1 ou TLR6. Le TLR2 contiendrait plusieurs épitopes pouvant potentiellement interagir avec les

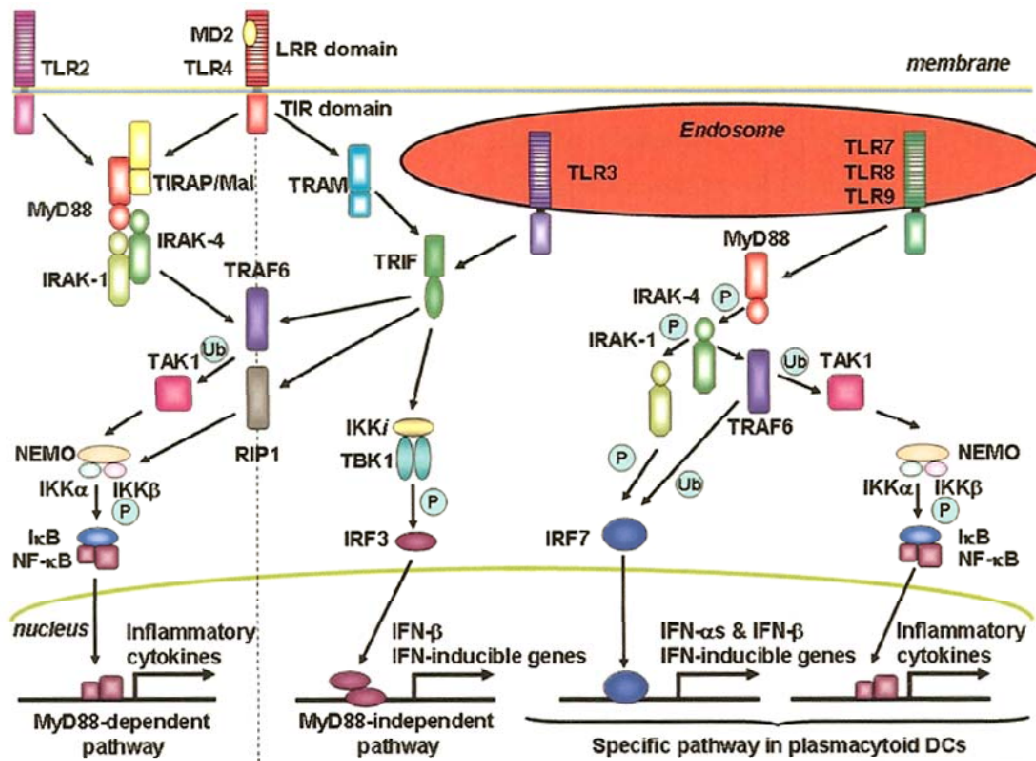


Figure 11. Voies de signalisation des TLR.

Plusieurs adaptateurs peuvent être recrutés par les TLR : MyD88, TIRAP, TRAM ou TRIF. Par la suite des kinases IRAK (IL-1R associated kinase) s'associent à ces adaptateurs. Cette cascade de signalisation aboutit à la translocation de divers facteurs de transcription dans le noyau de la cellule : NF-κB, IRF3 ou IRF7 et à l'expression de cytokines inflammatoires ou d'IFN de type I.
 D'après Akira. TLR signaling. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2006 ; 311 : 1-16.

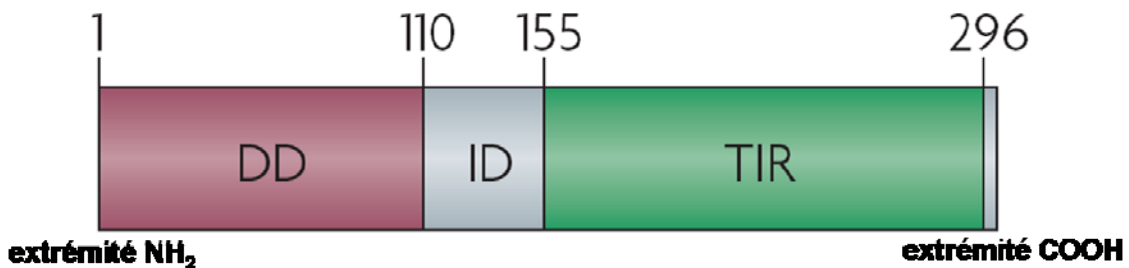


Figure 12. Représentation schématique de la structure protéique de MyD88.

MyD88 contient deux domaines fonctionnels. Le domaine de mort (death domain, DD) ou domaine d'interaction permet le recrutement des kinases de la voie de signalisation. Le domaine TIR (Toll-IL-1 receptor homologous) permet la liaison aux récepteurs Toll (TLR).
 D'après O'Neill et Bowie. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 2007 ; 7 : 353-364.

ligands, ce qui suggère que des régions différentes de la molécule pourraient contribuer à la reconnaissance des agonistes spécifiques (Sabroe *et al*, 2008).

Les TLR peuvent également reconnaître des protéines. Ainsi, le TLR5 reconnaît la flagelline, une protéine entrant dans la composition du flagelle bactérien (Hayashi *et al*, 2001). Le TLR11 murin se lie à une protéine « profilin-like » issue de parasites Apicomplexes (Yarovinsky *et al*, 2005).

Les acides nucléiques sont la troisième catégorie de MAMP reconnus par les TLR intracellulaires. L'ADN viral et bactérien contient de nombreux motifs CpG non méthylés reconnus par le TLR9. Les TLR7 et 8 sont proches du TLR9 et sont impliqués dans la reconnaissance des ARN simple brin viraux. De plus, les ARN double brin générés par les cellules infectés par un virus sont reconnus par le TLR3. Les TLR3, 7, 8 et 9 sont les seuls TLR intracellulaires, situés sur la membrane des endosomes, et nécessiteraient un environnement acide pour réaliser une signalisation efficace (Kaisho et Akira, 2006 ; Sabroe *et al*, 2008).

III.1.2. Les voies de signalisation des TLR

Les TLR sont exprimés par de très nombreux types cellulaires intervenant dans l'immunité innée (DC, cellules NK, macrophages, polynucléaires, cellules épithéliales et endothéliales et même fibroblastes) comme dans l'immunité acquise (LT et LB) (Delneste *et al*, 2007). La plupart des TLR induit des voies de signalisation similaires mais certains d'entre eux ont des voies particulières. Ces profils d'induction différents dépendent en grande partie de la localisation cellulaire du récepteur et des molécules adaptatrices cytoplasmiques qui s'associent à la région intracytoplasmique du TLR (Fig. 11). Deux voies de signalisation se distinguent, la voie dépendante de l'adaptateur Myeloïd Differentiation factor 88 (MyD88) et la voie indépendante de MyD88.

- **Voies dépendantes de MyD88**

Deux voies de signalisation font intervenir l'adaptateur MyD88, celle des TLR de surface et celle des TLR intracellulaires.

MyD88 a été le premier adaptateur critique pour la signalisation TLR identifié (Fig. 11). Cette molécule peut s'associer avec tous les TLR sauf le TLR3 et est requise pour l'induction des cytokines inflammatoires, dont l'IL-6 et l'IL-12. La protéine MyD88 contient un domaine de mort (death domain) et un domaine TIR (Toll/IL-1 receptor homologous) à ses extrémités amino- et carboxy-terminales, respectivement (Fig. 12). Le domaine TIR, composée de 5 feuillets β entourés d'hélices α reliés ensemble par des boucles flexibles, est

impliqué dans l'interaction avec les TLR tandis que le domaine de mort, ou domaine d'interaction, initialement défini dans les protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée, recrute les membres de la famille des kinases associées au récepteur de l'IL-1 (IRAK). Quatre IRAK ont été décrites (IRAK-1, -2, -4 et -M), parmi lesquelles IRAK-4 est celle impliquée dans la voie de signalisation dépendante de MyD88, pour les TLR de surface. TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) est un autre facteur important de cette voie de signalisation puisqu'il active la TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) par ubiquitination et grâce aux kinases I κ B classiques, IKK α et IKK β . Ces kinases phosphorylent alors I κ B, le rendant sensible à la dégradation, ce qui permet la translocation nucléaire et l'activation de NF- κ B. Cette voie de signalisation peut également mener à l'activation de MAPK, comme la p38 et JNK. Cette voie de signalisation dépendante de MyD88 aboutit à l'expression de gènes de cytokines inflammatoires. Une autre protéine adaptatrice contenant un domaine TIR (TIRAP) a été décrite. Des souris déficientes en TIRAP ont montré les mêmes défauts que des souris déficientes en MyD88 en terme de réponse induites par les TLR2 et TLR4, indiquant que la protéine TIRAP agit avec MyD88 dans les voies TLR2 et TLR4 (Kaisho et Akira, 2006).

La voie de signalisation dépendante de MyD88 des TLR intracellulaires (TLR7 et TLR9) induit non seulement les cytokines inflammatoires mais également les IFN de type I (IFN- α et - β). Tous ces effets sont dépendants de MyD88 mais ne nécessitent aucune autre protéine adaptatrice, comme TIRAP. En aval de MyD88, la voie se divise en deux : la voie passant par NF- κ B et celle passant par IRF-7 (IFN regulatory factor). NF- κ B est requis pour l'expression des gènes de l'inflammation tandis que IRF-7 est essentiel à l'induction des gènes de l'IFN de type I. Ces deux facteurs de transcription résident dans le cytoplasme sous une forme inactive et sont transloqués dans le noyau après stimulation. Le facteur IRF-7 est essentiellement utilisé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Il peut s'associer directement avec MyD88 ou avec TRAF6, formant ainsi un large complexe moléculaire qui mène à la production d'IFN de type I. La kinase IRAK-1 s'associe également avec IRF-7 et est essentiel à l'activation d'IRF-7 et à l'induction des gènes de l'IFN de type I. L'activation de NF- κ B ou d'IRF-7 par le complexe moléculaire comprenant MyD88, IRAK-1 et IRF-7 reste incomprise. Un autre facteur apparaît essentiel dans cette voie, TRAF3. En effet, la déficience en TRAF3 induit le manque de transcription de l'IFN de type I par les voies TLR7/9, ainsi que l'absence de production d'IL-10, ce qui entraîne la surproduction des cytokines inflammatoires (Kaisho et Akira, 2006).

- **Voie indépendante de MyD88**

Cette voie de signalisation intervient en aval des TLR3 (intracellulaire) et TLR4 (de surface). On doit sa découverte au délai de réponse au LPS chez des souris déficientes en MyD88. En effet, la signalisation par le TLR4 chez ces souris peut activer le NF- κ B et les MAPK mais à retardement (Kawai *et al*, 1999). L'adaptateur TRIF (TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β) a ainsi été identifié. Les TLR3/4, *via* TRIF, activent NF- κ B ou IRF-3. Le TLR3 peut directement s'associer avec TRIF alors que le TLR4 requiert un autre adaptateur, TRAM (TRIF-related adapter molecule) (Yamamoto *et al*, 2003). TRIF peut interagir avec la kinase I κ B IKK ϵ et la kinase TBK1 (TANK-binding kinase 1). IRF-3 est phosphorylé par ces kinases, transloqué dans le noyau afin d'induire la transcription de divers gènes cibles, dont le gène de l'IFN- β . TRIF peut également activer NF- κ B *via* TRAF6. Cette activation mène à l'expression de gènes de cytokines inflammatoires et de l'IFN- β (Kaisho et Akira, 2006).

L'absence de MyD88, comme celle de TRIF, inhibe l'activation de NF- κ B en réponse à la signalisation par le TLR4. Cependant, les deux mécanismes sont différents. La déficience en MyD88 entraîne un défaut précoce d'activation tandis que celle de TRIF entraîne un défaut tardif d'activation de NF- κ B (Covert *et al*, 2005).

III.1.3. La régulation des voies de signalisation des TLR

La régulation des voies de signalisation des TLR est une étape importante afin d'éviter toute réponse immunitaire incontrôlée et ses effets délétères pour l'organisme.

En particulier, un groupe de protéines de suppression de la signalisation cytokinique (SOCS) a été identifié. La famille des SOCS contient huit membres très proches structurellement et fonctionnellement.

L'implication des SOCS a d'abord été identifiée grâce à l'étude du TLR9 sur des macrophages et des DC murins. La liaison des îlots CpG sur le TLR9 induit la production de SOCS, d'une façon partiellement dépendante des MAP kinases. Des résultats similaires ont été obtenus après la liaison de LPS sur le TLR4. L'induction des protéines SOCS pourrait réguler la sensibilité des cellules portant les TLR activés envers différentes cytokines. Des expériences ont ainsi montré que la surexpression de SOCS1 inhibe l'activation des macrophages par l'IFN- γ , l'IL-6 ou le GM-CSF.

Dans le contexte d'une infection par *T. gondii*, une induction différente des SOCS dans les macrophages a été mise en évidence selon la virulence des souches utilisées. Cette induction

n'est d'ailleurs possible qu'avec des parasites vivants et ne dépend pas de la voie de signalisation des TLR. La protéine induite, SOCS1, participerait en fait à l'échappement du parasite au système immunitaire par l'inhibition de l'activité anti-parasitaire dépendante de l'IFN- γ (Dalpke *et al*, 2008).

D'autres voies de régulation des voies de signalisation des TLR existent en dehors des SOCS. Elles font intervenir des régulations internes des voies de signalisation des TLR mais également des interactions avec d'autres voies de signalisation.

La régulation, aussi bien positive que négative, peut se faire grâce à l'ubiquitination des molécules de la cascade de signalisation, comme TRAF (effet positif) ou I κ B (effet négatif). De plus, l'action de nombreuses tyrosine kinases et phosphatases a également été décrite. L'action de glucocorticoïdes sur la voie NF κ B a été prouvée, notamment par l'inhibition de l'activation de la MAP kinase p38 par les TLR.

Enfin, la régulation pourrait aussi avoir lieu grâce à la synergie apportée par d'autres voies de signalisation, comme la voie des récepteurs NOD qui reconnaissent des résidus de peptidoglycanes. De même, les récepteurs de lectine de type C seraient impliqués dans l'augmentation d'activation des TLR, comme le montre la synergie entre le récepteur Dectin-1, reconnaissant des pathogènes fongiques, et le TLR2, bien que le ligand fongique du TLR2 reste encore à découvrir (O'Neill, 2008).

III.1.4. TLR/MyD88 et *Toxoplasma gondii*

Tous les travaux portant sur l'implication des TLR dans la réponse à une infection par *T. gondii*, décrits ci-après, ont été menés sur des souris C57BL/6 sensibles à la phase aiguë, invalidées pour un TLR.

Une étude sur des souris infectées par voie intrapéritonéale avec une forte dose de kystes d'une souche avirulente (Fukaya) a montré une mortalité associée à la déficience en TLR2, ainsi qu'une incapacité à produire de l'oxyde nitrique, un profil cytokinique Th2 et une charge parasitaire élevée dans les poumons (Mun *et al*, 2003). La même étude a montré que des souris déficientes en TLR4 avaient un comportement identique aux souris de type parental suite à l'infection par *T. gondii* (Mun *et al*, 2003). Ainsi, le TLR2 semble essentiel pour la mise en place d'une réponse efficace contre le parasite tandis que le TLR4 n'interviendrait pas.

Une étude complémentaire semble indiquer que le TLR2 est en fait indispensable à la sécrétion de CCL2/MCP-1, un facteur chémoattractant des monocytes, par les neutrophiles.

De plus, le TLR2 est impliqué dans la synthèse d'IL-12 et de CCL2 par les macrophages mais pas par les DC spléniques (Del Rio *et al*, 2004). Le rôle accessoire du TLR2 dans l'induction de la synthèse d'IL-12 s'explique par un rôle dominant du TLR11 dans l'induction de cette synthèse d'IL-12 dans les DC, décrit ci-dessous (Yarovinsky 2008).

Une étude semble remettre en cause le manque d'implication du TLR4 dans la réponse à l'infection par *T. gondii*. En effet, les ancras glycosylphosphatidylinositol (GPI) du parasite induisent une voie de signalisation *via* le TLR4. De plus, les souris déficientes pour le TLR2 et le TLR4, montrent une totale inhibition de la production de TNF en réponse aux GPI, contrairement aux animaux uniquement déficients en TLR2. Ces résultats suggèrent donc que le TLR4 pourrait coopérer avec le TLR2 au cours de l'infection toxoplasmique (Debierre-Grockiego *et al*, 2007 ; Yarovinsky 2008).

Des travaux récents remettent en cause les résultats précédents en ce qui concerne l'implication du TLR4 en réponse à une infection par *T. gondii*. La protéine de choc thermique Hsp70 du parasite induit un choc anaphylactique fatal chez des souris infectées, ce choc impliquant la production de lipides pro-inflammatoires, les PAF (platelet-activating factors). La réaction anaphylactique n'a pas été observée chez des souris déficientes en TLR4, qui présentent une augmentation de l'enzyme dégradant le PAF. De même, la réaction inflammatoire est absente des souris déficientes en MyD88 mais présente chez des souris déficientes en TRIF. Ces résultats prouvent donc la production de PAF, médiateur puissant de l'inflammation, par une voie dépendante du TLR4 et de MyD88, suite à une infection toxoplasmique (Fang *et al*, 2008).

Des souris déficientes en TLR9, infectées par voie orale avec une souche kystogène (76K), survivent plus longtemps que les souris de souche parentale, perdent moins de poids suite à l'infection, ont une inflammation intestinale réduite bien qu'ayant une parasitémie supérieure, ont une réponse Th1 diminuée sans pour autant subir une conversion vers une réponse Th2 (Minns *et al*, 2006).

En 2005, une équipe a tenté de déterminer la molécule de *Toxoplasma gondii* responsable de l'induction d'IL-12 dans les cellules dendritiques, par une voie indépendante du récepteur CCR5 et de la cyclophiline parasitaire. Ils ont pour cela fractionné un extrait parasitaire afin d'isoler la protéine déclenchant la synthèse d'IL-12 dans des DC issues de souris déficientes en CCR5. Le séquençage de la protéine précédemment identifiée a permis d'établir qu'elle partageait des motifs consensus retrouvés chez les profilines, des protéines de liaison à l'actine, et plus particulièrement celles des profilines d'autres protozoaires apicomplexes. Parmi les TLR reconnaissant des ligands protéiques, seul le TLR11 a montré une activation

du facteur NF- κ B suite à une stimulation par la profiline de *T. gondii*. La déficience en TLR11 entraîne une inhibition de production de l'IL-12, *in vitro* comme *in vivo*. Les souris TLR11^{-/-} survivent à la phase aiguë d'une infection par une souche avirulente (ME49) mais présentent cinq fois plus de kystes cérébraux que les souris parentales au cours de la phase chronique (Yarovinsky *et al*, 2005). Ainsi, le TLR11 apparaît essentiel dans l'induction de la synthèse d'IL-12 par les DC et est unique par sa reconnaissance d'une protéine parasitaire. La suite de cette étude a montré que l'immunogénicité de la profiline de *T. gondii* est entièrement dépendante de la voie TLR11/MyD88 et qu'elle requiert plus précisément l'expression de MyD88 et de molécules du CMH II sur la même population cellulaire. De plus, la voie TLR11/MyD88 augmente la capture et la présentation de la profiline par les DC aux LT CD4⁺ *in vivo*, entraînant ainsi une réponse spécifique de l'antigène (Yarovinsky *et al*, 2006). D'une façon surprenante, le gène du TLR11 humain contient plusieurs codons stop, et code donc pour une protéine tronquée. Cette déficience s'expliquerait par le fait que la profiline existe également chez l'homme, l'absence de son récepteur serait donc un moyen de se protéger contre des réponses contre le soi (Lauw *et al*, 2005 ; Balenga 2007).

La délétion indépendante du TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 ou du TLR9 n'entraîne aucune augmentation particulière de la charge parasitaire, suggérant que ces TLR considérés indépendamment ne sont pas nécessaires au contrôle de l'infection par *T. gondii* (Hitziger *et al*, 2005).

L'étude de l'implication de l'adaptateur MyD88 a également été rendue possible grâce à des souris délétées pour cet adaptateur. L'infection de souris C57BL/6 déficientes pour MyD88 par voie intrapéritonéale avec une souche avirulente de *T. gondii* (ME49) induit la mort de tous les animaux en phase aiguë de l'infection, associée à une très forte parasitémie. Les souris sont incapables de produire l'une des cytokines majeures de lutte contre le parasite, l'IL-12, que ce soit *via* les neutrophiles, les macrophages et même les DC. Ce défaut de production ne passe pas par les TLR2/4, confirmant ainsi les résultats d'autres équipes. Cette étude a mis en évidence l'existence d'une seconde voie de production d'IL-12 par les DC, passant par MyD88 et indépendante du récepteur CCR5 et de la cyclophiline 18 (Scanga *et al*, 2002).

L'importance de l'adaptateur MyD88 a été confirmée chez des souris C57BL/6 infectées par une souche non virulente de *T. gondii* exprimant la luciférase. La bioluminescence *in vivo* a permis de mettre en évidence une dissémination plus rapide chez les souris MyD88^{-/-} que chez les souris contrôles, ainsi qu'une charge parasitaire plus importante, même dans des organes

distants du point d'infection. De plus, ces souris infectées délétées meurent plus rapidement que les témoins (Hitziger *et al*, 2005).

Des travaux récents sur des souris C57BL/6 viennent compléter les études précédentes. L'infection des souris déficientes en MyD88 par voie orale avec la souche ME49 induit leur mort dans les deux semaines suivant l'infection tandis que toutes les souris de phénotype sauvage survivent. Au niveau de la muqueuse intestinale, la production d'IFN- γ par les lymphocytes T, de même que le recrutement des neutrophiles apparaissent dépendants de l'adaptateur MyD88 dans la phase précoce de l'infection. L'implication de cette molécule dans la phase tardive a été étudiée grâce à une expérience de vaccination. Les souris ont été vaccinées par voie intrapéritonéale avec une souche avirulente de *T. gondii* puis challengées avec des tachyzoïtes RH par voie sous-cutanée. Suite à ce protocole, les souris déficientes en MyD88 sont protégées et produisent une forte réponse IFN- γ . Les auteurs montrent ainsi que l'adaptateur MyD88 est nécessaire pour contrôler l'infection précoce par *T. gondii* alors que le parasite peut induire une immunité adaptative indépendamment de cette molécule (Sukhumavasi *et al*, 2008).

Dans les neutrophiles, la production d'IL-12 n'est pas sous la dépendance du CCR5 mais d'une voie dépendante de MyD88, ce qui suggère que *T. gondii* possède de multiples molécules induisant différentes cascades de signalisation dépendantes de MyD88 (Del Rio *et al*, 2004).

Toutes les études précédentes ont été menées sur des souris délétées, ce qui ne permet pas d'identifier l'implication éventuelle d'une population en particulier. L'importance de MyD88 dans les lymphocytes T a été montrée *in vivo*, grâce à des souris ayant une moelle osseuse chimère, possédant des cellules T qui n'expriment pas MyD88. Chez ces animaux, la réponse innée, attestée par la production d'IL-12, est efficace et mène au contrôle du pathogène au site d'infection. En revanche, la réponse adaptatrice est déficiente. En effet, en phase chronique, les souris à moelle osseuse chimère présentent des zones de nécrose cérébrale associées à la présence de tachyzoïtes libres, contrairement aux souris parentales qui présentent des kystes cérébraux. Cette absence de réponse est due au fait que les souris chimères génèrent moins de cellules T productrices d'IFN- γ spécifiques du parasite alors que leur expansion et survie sont normales (LaRosa *et al*, 2008).

III.2. Récepteur à l'interleukine-17

La famille de l'interleukine-17, ou IL-17, compte six ligands (IL-17A-F) pour cinq récepteurs (IL-17RA-E) (Maitra *et al*, 2007).

III.2.1. L'interleukine-17

L'IL-17A a été la première cytokine de cette famille à être décrite, en 1993 (Rouvier *et al*, 1993) et est souvent désignée en tant qu'IL-17. La découverte de cette nouvelle cytokine a permis la caractérisation d'une nouvelle sous-population lymphocytaire T CD4⁺ helper (Th) synthétisant l'IL-17, baptisée Th17. Si l'IL-17 est majoritairement synthétisée par ces cellules, elle l'est également par des lymphocytes T CD8⁺ (Maitra *et al*, 2007). En fait, l'IL-17A serait synthétisée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires activés (Kikly *et al*, 2006).

Les cellules précurseurs Thp se différencient en cellules Th17 sous l'action combinée du TGF- β et de l'IL-6. L'IL-23 sécrétée par les cellules présentatrices d'antigène est un facteur d'expansion et de survie des Th17. A l'inverse, leur différenciation est inhibée en présence d'IFN- γ et d'IL-4. Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17A et de l'IL-17F (cytokines très proches qui partagent 55 % d'identité), mais également des facteurs connus pour induire une réponse inflammatoire dont le TNF- α , l'IL-6 ou encore le GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Kikly *et al*, 2006).

L'IL-17 et son récepteur ont d'abord été étudiés pour leur implication dans les maladies autoimmunes, notamment l'encéphalite autoimmune expérimentale qui est le modèle murin de la sclérose multiple humaine, le lupus érythémateux disséminé ou encore l'arthrite. En effet, chez des patients atteints de sclérose multiple, l'expression de l'IL-17 est augmentée dans les lésions cérébrales ainsi que dans les cellules mononucléées isolées du sang et du fluide cérébrospinal. Dans le modèle expérimental, l'absence d'IL-17 retarde la survenue de la maladie et lorsqu'elle est déclarée, les animaux ont de moindres dommages tissulaires et guérissent plus vite que les animaux de phénotype parental (Komiyama *et al*, 2006). Une autre pathologie inflammatoire autoimmune de l'intestin, la maladie de Crohn occupe une place de choix dans les études sur l'IL-17. En effet, des échantillons de tissus colorectaux issus de patients atteints de la maladie de Crohn montrent une inflammation des muqueuses associée à une expression d'IL-17 par les cellules T et les macrophages, toutes deux absentes des patients sains (Fujino *et al*, 2003).

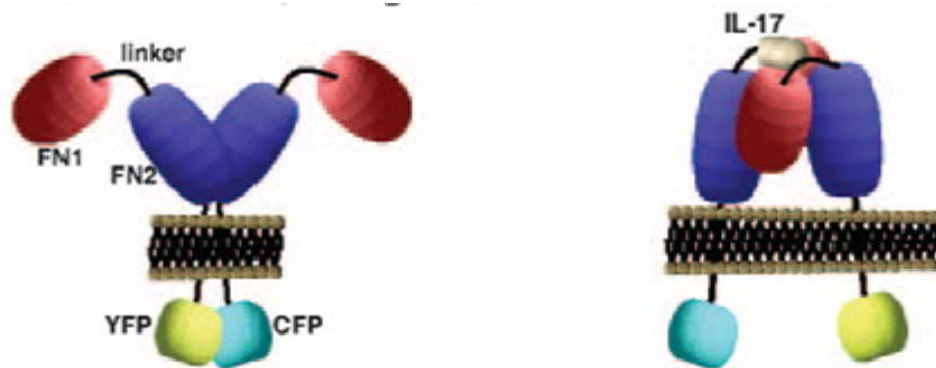


Figure 13. Représentation schématique de la dimérisation du récepteur à l'IL-17 en présence du ligand.

L'IL-17R est constitué de deux domaines fibronectin-like (FN) associés par un linker. Il se présente sous forme d'un dimère assemblé dans la membrane cytoplasmique. La liaison de son ligand, l'IL-17, entraîne la séparation physique des deux domaines cytoplasmiques et l'activation de la voie de signalisation.

D'après Kramer *et al.* Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J. Immunol.* 2007 ; 179 : 6379-6383.

Le rôle de l'IL-17 a également été décrit dans de nombreuses maladies infectieuses. Certaines bactéries extracellulaires parmi lesquelles *Klebsiella pneumoniae* induisent l'expression d'IL-17. Dans le cas de cette bactérie, l'IL-17 est protectrice contre l'infection contrairement à son rôle délétère dans les maladies autoimmunes. La réponse Th17 est également protectrice lors de son induction par *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie intracellulaire. L'IL-17 participerait également à la protection contre les infections fongiques, par *Candida albicans* ou *Cryptococcus neoformans*. Enfin, le rôle de l'IL-17 dans les infections virales reste à définir clairement ; en effet, la cytokine a un effet plus délétère que protecteur suite à une infection par les virus herpes simplex alors qu'elle a un rôle protecteur dans les infections à rotavirus (Matsuzaki et Umemura, 2007).

Le principal rôle de l'IL-17 dans l'inflammation est sa capacité à recruter les neutrophiles. En effet, le surnageant de culture de fibroblastes, de cellules endothéliales ou épithéliales traitées par de l'IL-17 stimule la migration des neutrophiles, *via* l'induction de chimiokines. *In vivo*, ces résultats ont été confirmés grâce à des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-17. Ces souris présentent une expression réduite de MIP-2, une chimiokine spécifique des neutrophiles, et du G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), ce qui aboutit à un recrutement défectueux des neutrophiles au site d'infection (Witowski *et al*, 2004).

III.2.2. Le récepteur de l'interleukine-17

Le récepteur à l'IL-17, ou IL-17R, désigne généralement l'IL-17RA. Des analyses prédictives informatiques du domaine extracellulaire de l'IL-17RA ont révélé deux domaines fibronectine III-like (FN1 et FN2), dont un seul (FN2) est responsable de l'oligomérisation du récepteur, l'autre (FN1) servant à moduler les interactions dynamiques entre les sous-unités du récepteur. Ces deux domaines seraient reliés par un linker qui pourrait stabiliser le récepteur multimérique mais qui est avant tout porteur du domaine de fixation du ligand (Kramer *et al*, 2007 ; Shen et Gaffen, 2008). Chez la souris, le récepteur est un complexe d'au moins deux sous-unités IL-17RA pré-assemblées dans la membrane en absence de ligand. Cette oligomérisation sans ligand est également caractéristique d'autres systèmes de récepteurs, dont les TLR (Kramer *et al*, 2007). C'est la liaison du ligand qui entraîne la séparation physique des domaines cytoplasmiques (Fig. 13). Cette séparation des queues cytoplasmiques de l'IL-17RA faciliterait le recrutement d'un autre récepteur, l'IL-17RC. Les récepteurs et leurs ligands diffèrent en fonction de l'espèce considérée. En effet, chez l'homme, l'IL-17RC lie l'IL-17A et l'IL-17F. Ce récepteur est exprimé dans les tissus non hématopoïétiques. L'IL-17RA lie uniquement l'IL-17A et ce récepteur est exprimé de façon

ubiquitaire mais encore plus sur les cellules hémopoïétiques. Chez la souris en revanche, l'IL-17RC lie uniquement l'IL-17F tandis que l'IL-17RA lie l'IL-17A et l'IL-17F (Kuestner *et al*, 2007).

III.2.3. La voie de signalisation de l'IL-17R

La voie de transduction du signal suivant la liaison de l'IL-17 à son récepteur est encore peu décrite.

L'IL-6 a été le premier gène rapporteur de l'IL-17 et reste le test standard de l'activité IL-17. L'IL-6 est un médiateur de l'inflammation mais est également essentielle au développement des Th17, ce qui suggère une boucle de contrôle positif induite par la signalisation IL-17. La plupart des cytokines et chimiokines induites par l'IL-17 sont régulées de façon synergique, mécanisme encore peu décrit. Cependant, il semble que l'IL-17 augmente la stabilité des ARNm de certains gènes, notamment ceux qui contiennent des éléments riches en adénine-uracile en leur extrémité 3'-UTR (région non traduite). Cette caractéristique est présente dans de nombreux transcrits de cytokines et chimiokines. La stabilisation des ARNm implique la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et en particulier ERK (extracellular signal-related kinase) et p38 MAPK qui sont phosphorylées suite à une stimulation par l'IL-17. En plus de l'IL-6, les chimiokines CXCL sont un groupe majeur de gènes cibles de l'IL-17. En effet, ces dernières sont responsables de l'un des principaux rôles de l'IL-17 *in vivo* qui est le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. Certaines chimiokines, de motif CC, sont également des cibles de l'IL-17, comme le CCL2/MCP-1 ou le CCL5/RANTES.

Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes cibles de l'IL-17 sont nombreux et toujours en partie inconnus. Des travaux ont montré que l'IL-17 et le TNF- α activent le promoteur de l'IL-6 de façon additive. Cette régulation ne se fait pas *via* NF- κ B mais par des facteurs de transcription, les CCAAT/Enhancer binding proteins (C/EBP β et C/EBP δ), induits par l'IL-17 et le TNF- α . En plus de l'IL-6, les promoteurs de nombreux gènes inflammatoires comptent des éléments de liaison aux C/EBP, ces protéines pouvant parfois interagir avec le NF- κ B afin d'activer la transcription. Si l'IL-17 active le facteur de transcription NF- κ B, de même que les TLR et l'IL-1R, l'activation d'un gène rapporteur lié à NF- κ B n'a jamais pu être mise en évidence. Ainsi, l'IL-17R n'est pas simplement un doublon de la signalisation par les TLR et l'IL-1R. L'implication du facteur de transcription AP-1 reste encore controversée puisque son site est facultatif dans le promoteur de l'IL-6 pour induire la

transcription par l'IL-17. L'étude des promoteurs des gènes cibles de l'IL-17 a également mis en évidence la fréquence accrue des sites de liaison du facteur de transcription Oct-1.

La similarité entre les voies de signalisation IL-17R et TLR/IL-1R est renforcée par le fait que l'IL-17 est incapable d'activer NF- κ B dans des fibroblastes déficients en TRAF6, un adaptateur essentiel à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK par de nombreux stimuli. Cependant, l'IL-17RA n'a aucun motif évident de liaison à TRAF6, ce qui suggère que TRAF6 interagit avec l'IL-17RA *via* un autre adaptateur. Ce dernier a pu être identifié grâce à des analyses bio-informatiques qui ont révélé l'existence d'un motif homologue au domaine TIR des TLR, nommé SEFIR. Ce motif SEFIR est retrouvé dans la plupart des membres de la famille IL-17R, de même que dans la molécule adaptatrice Act1. Des études ont par la suite montré que Act1 était effectivement capable de se lier à l'IL-17R *via* leur domaine SEFIR. Cet événement est suivi par le recrutement du complexe TAK1/TRAF6, la dégradation d'I κ B α puis l'activation de NF- κ B (Maitra *et al*, 2007 ; Shen et Gaffen, 2008).

III.2.4. IL-17R et *Toxoplasma gondii*

Lors d'une infection à *T. gondii*, les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées au site de l'inflammation. Des souris déplétées en neutrophiles sont incapables de survivre à une infection aiguë, présentent des lésions sur de nombreux organes ainsi qu'une importante diminution des cellules T et NK dans la rate. En effet, ces cellules sécrètent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires possédant un fort pouvoir attractant pour les cellules dendritiques immatures. Les neutrophiles seraient donc des cellules cruciales dans les premiers stades de l'infection à *T. gondii* pour le recrutement et l'activation des cellules dendritiques, menant finalement au développement d'une réponse Th1 efficace contre le parasite (Bliss *et al*, 2001 ; Bennouna *et al*, 2003).

L'IL-17 est la cytokine majeure du recrutement des neutrophiles grâce à son fort pouvoir inflammatoire (Ye *et al*, 2001). Cependant, son rôle au cours d'une infection par *T. gondii* a peu été étudié. Une seule étude a été menée sur des souris C57BL/6 déficientes en IL-17R. Ces souris ont montré une sensibilité accrue à une infection orale par faible dose, par rapport aux souris C57BL/6 de phénotype sauvage. En revanche, l'examen des organes internes (foie et iléum) a révélé de moindres dommages tissulaires chez les animaux déficients, parallèles à un influx de neutrophiles diminué. Les auteurs en concluent que l'absence de signalisation par

l'IL-17R ralentit le recrutement de neutrophiles, empêchant ainsi la résolution de l'infection et aboutissant à la mort des animaux déficients en IL-17R (Kelly *et al*, 2005).

C - VACCINATION ANTI-TOXOPLASMIQUE

La persistance de kystes à vie, associée à une réponse protectrice à long terme contre une éventuelle réinfection de l'hôte, permettent raisonnablement d'envisager la mise au point d'un protocole vaccinal efficace contre l'infection toxoplasmique. De nombreux essais de vaccination ont été et sont encore réalisés. Aucun ne confère une immunité totale face au parasite et une seule stratégie a donné lieu à un vaccin animal commercialisé. Cependant, ce dernier reste contraignant en raison d'une atténuation non maîtrisée et de la nécessité d'un rappel tous les trois ans. Aucun vaccin humain n'est actuellement disponible. Cette partie ne se veut pas exhaustive mais décrit des exemples représentatifs de chaque stratégie envisagée.

I. Vaccins vivants atténués

Très tôt, des essais de vaccination ont été réalisés grâce à des souches parasitaires atténuées.

La première créée est la souche ts-4 issue de la souche virulente RH (Pfefferkorn et Pfefferkorn, 1976). C'est une souche thermosensible incapable de se multiplier à 37 °C. Chez la souris, la souche ts-4 reste avirulente, même à très fortes doses, ne persiste pas à long terme, n'entraîne pas la formation de kystes cérébraux et induit une forte production d'anticorps (Waldeland *et al*, 1983). Cependant, alors qu'elle ne passe pas la barrière placentaire en cas d'injection en cours de gestation, elle est à l'origine d'états sévères et même de la mort de jeunes souriceaux infectés peu après leur naissance (Pinckney *et al*, 1995).

Isolée en Nouvelle-Zélande et atténuée par 3000 passages sur souris, la souche S48 est la seule à avoir donné naissance à un vaccin vétérinaire commercialisé sous le nom d'Ovilis Toxovax[®] (Buxton *et al*, 1991). Testée sur des brebis gestantes, elle protège les agneaux à 75 % en moyenne mais son utilisation reste très contraignante. En effet, une injection est nécessaire tous les trois ans afin de perpétuer son efficacité. Ce vaccin n'est plus commercialisé en Europe bien qu'il soit encore utilisé en Nouvelle-Zélande. De plus, son utilisation en médecine humaine est inenvisageable étant donné les risques de réversion qui pourraient avoir des conséquences dramatiques, notamment chez les sujets immunodéprimés.

Une troisième stratégie a consisté en la mise au point d'un tachyzoïte RH transgénique, délété pour deux gènes de micronèmes, MIC1 et MIC3. Ces tachyzoïtes ont été utilisés pour vacciner des souris non consanguines Swiss par voie intrapéritonéale. Cette immunisation induit une forte réponse humorale spécifique ainsi qu'une forte réponse Th1 par les splénocytes restimulés (synthèse d'IFN- γ et d'IL-2). Les souris vaccinées ont ensuite subi une infection d'épreuve par des kystes de la souche 76K. Un mois plus tard, elles présentent une réduction de leur charge parasitaire cérébrale d'au moins 96 % par rapport aux souris témoins (Ismael *et al*, 2006).

La vaccination des chats, hôtes définitifs responsable de la dissémination d'oocystes contaminant l'eau et la terre, est un autre enjeu majeur des essais de vaccination.

Une souche mutante, T-263, ayant perdu sa faculté de former des oocystes a été développée et testée chez des chatons. Leur vaccination par des bradyzoïtes de la souche T-263 a empêché l'excrétion d'oocystes par 84 % des chatons (Frenkel *et al*, 1991).

Une autre option est le recours à des parasites irradiés. Des essais sur les souches RH (type I) et Beverley (type II) ont montré qu'elles conservaient leur pouvoir invasif et leurs propriétés antigéniques tout en ayant perdu leur potentiel de multiplication intracellulaire. La vaccination de souris par l'une ou l'autre des ces souches irradiées conduit à la résistance contre un challenge virulent par la souche RH. En revanche, la vaccination des chatons par la souche Beverley n'entraîne qu'une inhibition partielle de l'excrétion d'oocystes après challenge homologue. De plus, leur vaccination par la souche RH irradiée ne limite pas du tout la dissémination après challenge par la souche Beverley (Omata *et al*, 1996). Une étude récente utilisant des tachyzoïtes irradiés a mis en évidence une réponse cellulaire (synthèse de cytokines) identique à celle obtenue lors d'une infection chronique, après restimulation des splénocytes par de l'antigène toxoplasmique (Hiramoto *et al*, 2002).

II. Vaccination par de l'extrait antigénique de *T. gondii*

L'extrait total soluble de *T. gondii* a largement été testé dans des protocoles de vaccination, seul, associé à des adjuvants variés ou en tant qu'agent stimulant de cellules.

La vaccination de souris BALB/c avec un extrait antigénique soluble de tachyzoïtes induit une immunité cellulaire bien que de meilleurs résultats soient obtenus avec ce même extrait inclus dans des vésicules de surfactant non ionique (Roberts *et al*, 1994).

De nombreux autres adjuvants ont été testés. L'adjuvant complet de Freund n'a pas montré une efficacité suffisante pour envisager de l'inclure dans une formulation vaccinale (Roberts *et al*, 1994). En revanche, le couplage à la toxine cholérique pour une immunisation de souris

C57BL/6, avant un challenge par la souche 76K, augmente fortement la réponse Th1 splénique spécifique de l'antigène ainsi que la protection des animaux (Bourguin *et al*, 1993). Les oligodéoxynucléotides contenant des motifs CG immunostimulants (ODN CpG) sont connus pour leur capacité à induire une réponse Th1, potentiellement par leur liaison au TLR9. Ils ont donc été testés en tant qu'adjuvant vaccinal en association avec de l'extrait antigénique parasitaire chez des souris sensibles C57BL/6. Le challenge a été effectué avec la souche Beverley, moyennement virulente. La vaccination ODN CpG et antigène parasitaire a augmenté la survie des animaux tout en les protégeant contre la formation de kystes, grâce à la mise en place d'une forte réponse immunitaire orientée vers un profil Th1 marqué dès la phase d'immunisation (El-Malki *et al*, 2005).

L'encapsulage de l'extrait soluble dans des liposomes a montré une grande efficacité puisque 100 % des souris Swiss résistent à un challenge par des kystes alors que 90 % des souris immunisées avec des liposomes seuls meurent (Elsaid *et al*, 1999).

Chez la brebis, l'immunisation intranasale avec des microparticules de polymères poly(D,L-lactide-co-glycolide), ou PLG, contenant l'extrait parasitaire induit une immunité cellulaire systémique ainsi qu'une forte réponse IgA mucoale spécifique de *T. gondii*. Ces IgA reconnaissent majoritairement la protéine de surface SAG1, antigène majeur largement étudié en vaccination (voir ci-après) (Stanley *et al*, 2004).

L'injection d'extrait antigénique soluble et d'IL-12 augmente la survie des animaux à un challenge avec des tachyzoïtes RH mais n'empêche pas la formation de pseudo-kystes cérébraux (Yap *et al*, 1998).

III. Vaccination par des antigènes de *T. gondii*

La vaccination avec différentes protéines de surface, de granules denses, de rhoptries ou de micronèmes a été expérimentée sous forme protéique ou sous forme d'acides nucléiques codant ces protéines.

III.1. Les antigènes de surface

Ces antigènes, et plus particulièrement la protéine SAG1, ont depuis longtemps soulevé un grand intérêt en tant que candidat pour la vaccination anti-toxoplasmique. Cet intérêt vient en partie du fait que cette protéine a de fortes propriétés immunogènes. En effet, c'est la protéine majoritairement reconnue par le sérum (pour les IgG) ou les sécrétions (pour les IgA) d'animaux ou de patients infectés (Chardès *et al*, 1990 ; Mack et McLeod, 1992).

L'autre intérêt de cibler cette protéine est qu'elle est caractéristique du stade invasif (tachyzoïte) : SAG1 est impliquée dans l'attachement à la cellule-hôte (Mineo *et al*, 1994).

La première utilisation de SAG1 dans un protocole vaccinal a été réalisée en 1985. L'immunisation de souris BALB/c par la SAG1 purifiée couplée à l'adjuvant de Freund entraîne la synthèse d'IgM et d'IgG spécifiques, d'une façon dépendante de la dose. Cependant, les souris immunisées montrent une mortalité ainsi qu'une charge parasitaire accrues après un challenge par une souche peu virulente (Kasper *et al*, 1985). Malgré ce premier essai peu concluant, une étude de 1991 a montré que l'inclusion de la SAG1 purifiée dans des liposomes protégeait des souris Swiss face à une infection par la même souche que celle utilisée par Kasper (Bülow et Boothroyd, 1991).

De nombreux adjuvants ont été testés afin d'améliorer l'efficacité vaccinale des protéines de surface de *T. gondii*.

L'immunisation de souris non consanguines NMRI avec une SAG1 recombinante exprimée chez *E. coli* et de l'alun induit une forte production d'IgG1, caractéristique d'une réponse de type Th2 et n'induit qu'une protection partielle contre une infection par des tachyzoïtes de la souche fortement virulente RH ou des bradyzoïtes de la souche avirulente SSI119 par la réorientation de la réponse vers un type Th1 (Petersen *et al*, 1998).

Chez des souris consanguines CBA/J, l'immunisation avec de la protéine SAG1 recombinante issue d'*Escherichia coli* couplée à de l'IL-12 recombinante réoriente également la réponse vers un profil Th1 mais n'aboutit qu'à 40 % de réduction du nombre de kystes cérébraux après une infection avec des kystes de la souche avirulente PRU (Letscher-Bru *et al*, 1998).

Un essai de vaccination avec la protéine SAG3 recombinante couplée ou non avec de la saponine Quil A a été mené sur des souris BALB/c par voie intrapéritonéale. Ces souris montrent alors une réponse plutôt orientée Th1, tant au niveau de la production d'anticorps qu'au niveau de la synthèse de cytokines par les splénocytes. Elles présentent également une sécrétion accrue d'oxyde nitrique par les macrophages péritonéaux. Les souris ont ensuite subi un challenge léthal par infection avec des kystes de la souche ME49. Le taux de survie atteint 20 % avec la SAG3 seule et monte à 30 % avec la SAG3 couplée à la saponine Quil A. Lorsque le challenge a été réalisé avec une dose non létale, l'immunisation avec la protéine seule ou avec l'adjuvant conduit à une meilleure protection contre la formation de kystes cérébraux (Lee *et al*, 2007).

La protéine SAG2 recombinante produite chez la levure *Pichia pastoris* et injectée trois fois à sept jours d'intervalle à des souris ICR permet d'augmenter significativement leur survie à une infection d'épreuve par des tachyzoïtes RH (Lau et Fong, 2008).

D'autres travaux ont utilisé des pathogènes atténués en tant que vecteur de protéines parasitaires.

Une souche de *Salmonella typhimurium* dont la virulence est atténuée, BRD509, a été transformée avec un plasmide codant les protéines SAG1 et SAG2 associées à la sous-unité A2/B de la toxine cholérique. L'immunisation intragastrique de souris BALB/c par ces bactéries modifiées montre une réponse orientée Th1, contrairement aux souris ayant reçu des bactéries ne codant pas la toxine cholérique qui présentent un profil Th2. Les bactéries codant le plasmide entier protègent partiellement les souris contre une infection d'épreuve avec des tachyzoïtes de la souche RH (40 % de survie contre 0 % pour les souris témoins) (Cong *et al*, 2005).

Des adénovirus non répliquatifs ont également été testés en tant que vecteurs. Trois préparations ont été utilisées. La première code la protéine SAG1 privée de son ancre GPI, la seconde code la SAG2 privée de son ancre GPI et la troisième code la SAG3 privée de cette même ancre et de sa séquence signal, remplacée par la séquence signal de l'hémagglutinine du virus de la grippe. Ces préparations et une combinaison des trois ont été inoculées à des souris BALB/c. La production d'IgG spécifiques est supérieure chez les souris immunisées avec la SAG2 et le mélange des trois protéines. En revanche, seule l'immunisation par la SAG1 induit un profil Th1 (plus d'IgG2a que d'IgG1). Un challenge avec des kystes de la souche kystogène P-Br a permis d'évaluer la protection conférée par les préparations. La vaccination par SAG1 entraîne 55 % de protection, 65 % pour le groupe SAG2, 70 % pour le groupe SAG3 et 80 % pour le groupe ayant reçu le mélange des trois préparations. Cependant, aucune des préparations ne protège les souris contre un challenge virulent par des tachyzoïtes RH (Caetano *et al*, 2006).

Une troisième stratégie consiste à vacciner les souris directement avec des plasmides codant un ou plusieurs antigènes toxoplasmiques.

L'immunisation par voie intramusculaire de souris C3H et BALB/c à l'aide d'un plasmide codant SAG1 induit une protection significative contre une infection létale par des tachyzoïtes. Cette protection est en partie conférée par les LT CD8⁺ (Nielsen *et al*, 1999). Le même protocole d'immunisation permet également la protection en phase chronique, par la réduction du nombre de kystes cérébraux, chez des souris BALB/c infectées par des kystes de la souche Beverley (Couper *et al*, 2003).

Des souris BALB/c vaccinées avec un plasmide codant pour les protéines de surface SAG1 et de rhoptrie ROP2 présentent un meilleur taux de survie après un challenge par des tachyzoïtes RH, survie améliorée par la co-administration d'un plasmide codant pour l'IL-12. La réponse

induite par les deux plasmides conjugués est de type Th1 et supérieure à celle induite par les plasmides codant un seul antigène (Zhang *et al*, 2007). En revanche, la co-administration d'un plasmide codant pour la sous-unité A2/B de la toxine cholérique n'a aucune incidence sur la survie des souris après challenge (Xue *et al*, 2008).

Un essai avec un plasmide codant pour SAG1, SAG2 et ROP2, en association avec un plasmide codant pour l'IL-12 a également montré l'induction d'une forte réponse humorale et cellulaire de type Th1 ainsi qu'une certaine efficacité contre un challenge léthal avec des tachyzoïtes RH (Cui *et al*, 2008).

III.2. Les antigènes de granules denses

L'administration par voie sous-cutanée des protéines recombinantes GRA2 et GRA6 formulées dans des MPL (monophosphoryl lipid A), séparément ou ensemble a récemment été testée chez des souris CBA/J. L'immunisation par l'une ou l'autre des protéines conduit à la production d'environ quatre fois plus d'IgG2a que d'IgG1 spécifiques, soit un profil Th1. Ce profil est renforcé par la synthèse d'IFN- γ et d'IL-2 par les splénocytes restimulés *in vitro* suite à l'injection de GRA2, et de façon moins importante pour GRA6. Aucun effet cumulatif n'a été observé après immunisation par un mélange des deux protéines. Après un challenge intrapéritonéal avec des kystes de la souche avirulente Pru, la vaccination par GRA2 montre une protection de 70 % alors que GRA6 n'a aucun effet bénéfique. Le mélange des deux protéines protège à 48 % (Golkar *et al*, 2007).

Une étude sur l'immunisation intranasale de souris BALB/c avec un mélange des protéines GRA5, GRA7 et ROP2, additionné de toxine cholérique, a récemment été publiée. Cette formule vaccinale permet une protection de 58 % de souris après un challenge avec des kystes de la souche VEG (Igarashi *et al*, 2008).

Des travaux originaux ont eu recours à des fimbriae d'*E. coli* exprimant des épitopes de diverses protéines de *T. gondii* : SAG1, GRA1 et MAG1, la dernière étant une protéine recouvrant l'intérieur du kyste tissulaire. Des souris consanguines C3H/HeJ ont ensuite reçu ces fimbriae modifiés émulsifiés dans de l'adjuvant de Freund ou un mélange des protéines recombinantes avec ce même adjuvant avant de subir un challenge avec des kystes de la souche faiblement virulente DX. Seule la combinaison des trois protéines recombinantes avec l'adjuvant de Freund induit une forte production d'anticorps spécifiques et protège les souris en phase chronique (89 % de baisse du nombre de kystes cérébraux), la préparation de fimbriae chimériques n'induisant que peu d'anticorps spécifiques et ne conférant aucune protection (Gatkowska *et al*, 2008).

La vaccination génique a également été testée avec des gènes codant pour des protéines de granules denses.

Une étude de 2007 a montré qu'une stratégie de prime-boost hétérologue, utilisant un plasmide codant GRA4 et le virus de la vaccine exprimant la même protéine de granule dense, induit une forte production d'anticorps spécifique et d'IFN- γ ainsi qu'une protection totale contre un challenge létal (Zhang *et al*, 2007).

Des souris C57BL/6, C3H/HeN et BALB/c ont été immunisées avec des plasmides codant pour GRA1, GRA7 et ROP2. Cette immunisation induit la production d'IFN- γ par les splénocytes quelle que soit la lignée de souris considérée. En ce qui concerne la production d'anticorps spécifiques et de protection, les meilleurs résultats ont été observés chez les souris C3H. En effet, ces dernières présentent un profil de réponse humorale Th1 marqué ainsi qu'une résistance à la phase chronique après un challenge avec deux souches différentes de *T. gondii*. Aucune protection des souris C57BL/6 et BALB/c n'a été obtenue par cette vaccination (Vercammen *et al*, 2000). La suite de ces travaux a prouvé que la vaccination des souris C3H entraîne une réponse cellulaire T CD8+ cytotoxique impliquée dans la résistance à la phase aiguë de l'infection toxoplasmique ainsi qu'une réponse cellulaire T CD4+ indispensable à la résistance contre la phase chronique de l'infection (Scorza *et al*, 2003).

Des souris C57BL/6 immunisées par voie intramusculaire avec un plasmide codant pour la protéine GRA4 ou avec ce plasmide et un second codant pour le GM-CSF, avant un challenge oral avec des kystes 76K. 62 % des souris n'ayant reçu que le plasmide GRA4 survivent, taux légèrement augmenté à 75 % pour le lot ayant reçu les deux plasmides. Les deux lots de souris ne présentent pas de charge parasitaires cérébrales significativement différentes. L'immunisation avec l'une ou l'autre des préparations induit une réponse humorale de type Th1, une prolifération des splénocytes spécifique de GRA4 et un profil cytokinique mixte Th1/Th2. L'injection d'un plasmide codant pour l'IL-12 en même temps que celui codant pour GRA4 diminue la protection obtenue avec l'injection du plasmide GRA4 seul (Desolme *et al*, 2000).

Enfin, l'immunisation de souris C57BL/6 avec un mélange de plasmides codant GRA4 et SAG1 les protège significativement contre la phase aiguë de l'infection (75 % de survie), résultat amélioré par la co-injection d'un plasmide codant le GM-CSF (87 % de survie). De plus, cette immunisation multiantigénique en combinaison avec le GM-CSF protège les souris Swiss au cours de l'infection chronique (Mévélec *et al*, 2005).

III.3. Les antigènes de rhoptries

Ces protéines sont moins étudiées que les précédentes mais quelques études originales sont disponibles.

Une protéine ROP2 recombinante fusionnée à une protéine de choc thermique de *Leishmania infantum* HSP83 a été mise au point puis injectée à des souris C57BL/6, C3H et BALB/c. Cette protéine de fusion induit de plus fortes réponses humorale et cellulaire qu'une immunisation avec un mélange des deux protéines isolées. Cette réponse est de type Th1, comme le montrent la forte production d'IgG2a et la sécrétion d'IFN- γ , contrairement à la réponse initiée par la protéine ROP2 seule ou en mélange avec la protéine HSP83 qui est de type mixte Th1/Th2. De plus, la vaccination avec la protéine de fusion protège les souris C57BL/6 et C3H d'une infection orale avec des kystes de la souche ME49 ainsi que les souris BALB/c et C57BL/6 contre un challenge létal (Echeverria *et al*, 2006).

La protéine ROP2 a également été clonée sous la dépendance du promoteur de la protéine de choc thermique HSP60 du bacille de Calmette-Guérin (BCG). Après sa production dans des BCG, les protéines sont inoculées à des souris BALB/c. Cette immunisation retarde significativement leur mortalité après une infection intrapéritonéale par des tachyzoïtes RH (Wang *et al*, 2007).

Une vaccination multigénique formulée dans des liposomes a été testée sur des souris BALB/c. Un plasmide portant un gène hybride codant les protéines ROP1 et SAG1, contenu dans un liposome, a été injecté par voie intramusculaire aux animaux. Les souris immunisées produisent des anticorps spécifiques ainsi que de l'IFN- γ et de l'IL-2 (Chen *et al*, 2003).

Un plasmide codant les protéines SAG1, ROP2 et GRA2 a été utilisé pour immuniser des souris BALB/c par voie intramusculaire, en co-injection ou non avec un plasmide codant l'IL-12. L'immunisation par le plasmide codant les trois protéines induit une forte réponse Th1 (taux élevé d'IgG2a), augmentée par l'adjuvant testé. Après challenge intrapéritonéal avec des tachyzoïtes RH, ce protocole d'immunisation augmente de façon significative la survie des souris : les témoins meurent entre 4 et 8 jours alors que les souris immunisées avec le plasmide multiantigénique et l'IL-12 meurent entre 17 et 23 jours post-infection (Xue *et al*, 2008).

III.4. Les antigènes de micronèmes

L'injection de protéines MIC1 et MIC4 à des souris C57BL/6 induit une forte réponse humorale Th2 alors que la réponse cytokinique des splénocytes restimulés est plutôt de type Th1. Après un challenge par une faible dose de kystes ME49, les souris immunisées

présentent une réduction de 68 % de leur charge parasitaire cérébrale par rapport aux contrôles. Après un challenge par une forte dose des mêmes kystes, l'immunisation protège 80 % de souris alors que toutes les souris témoins meurent en phase aiguë. Les souris témoins montrent un nombre de parasites bien supérieur au niveau des poumons et de l'intestin ainsi que des signes de nécrose intestinale, contrairement aux souris immunisées (Lourenço *et al*, 2006).

L'immunisation de souris CBA/J avec un plasmide codant pour la protéine MIC3 par voie intramusculaire induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire systémique. La sécrétion d'IgG2a, d'IFN- γ et d'IL-2 par les splénocytes restimulés prouvent une orientation Th1 de cette réponse. Cette dernière est améliorée par la co-injection d'un plasmide codant pour le GM-CSF, aboutissant à une protection de 71 % en terme de charge parasitaire cérébrale (Ismael *et al*, 2003).

Une vaccination multiantigénique reposant sur les gènes des protéines de micronème MIC2, M2AP, AMA1 et BAG1 a été testée par inoculation *via* la technique du gene gun. AMA1 induit une réponse humorale spécifique de type Th1 chez des souris C57BL/6 comme chez des BALB/c. MIC2 a le même effet, mais uniquement chez les C57BL/6. Le profil humoral induit par AMA1 est confirmé par la forte synthèse d'IFN- γ initiée par les splénocytes restimulés. Les souris ont ensuite été infectées par des kystes de la souche Beverley. Chez les BALB/c, l'immunisation par AMA1 augmente la survie de 60 % par rapport au témoin, MIC2 l'augmente de 40 % et les deux autres plasmides ne l'augmentent pas par rapport au plasmide témoin. Chez les souris C57BL/6, l'immunisation par les plasmides AMA1 et MIC2 donnent les mêmes résultats de survie (37,5 %), le plasmide BAG1 induit 12,5 % de survie tandis que les plasmides M2AP et témoin ne protègent pas les animaux (Dautu *et al*, 2007).

IV. Vaccination par des cellules dendritiques

L'extrait antigénique a également été utilisé pour stimuler des cellules-clés de l'immunité, les cellules dendritiques. Ce sont ces cellules sensibilisées *in vitro* qui sont ensuite injectées aux animaux.

Les premières expériences ont été réalisées sur des cellules dendritiques primaires purifiées à partir de rates entières. Après leur sensibilisation avec de l'extrait soluble antigénique, elles ont été transférées à des souris de même lignée, CBA/J. Les DC pulsées par l'extrait sont activées par ce traitement comme le prouve leur sécrétion d'IL-12 contrairement aux DC non pulsées qui n'en synthétisent pas dans le milieu de culture. Le challenge est ensuite effectué avec des kystes de la souche 76K. Les souris ayant reçu les DC pulsées

présentent 70 % de réduction des kystes intracérébraux par rapport aux souris immunisées avec des DC non pulsées. Cette résistance accrue s'explique par le fait que l'immunisation avec des DC pulsées induit une forte réponse Th1 humorale (IgG2a) comme cellulaire (IFN- γ et IL-2) par les cellules des ganglions mésentériques restimulés par de l'extrait parasitaire (Bourguin *et al*, 1998).

Une étude similaire a été menée à partir de DC issues des ganglions mésentériques (MLNDC) de souris CBA/J et C57BL/6. Contrairement aux DC spléniques, les DC de ganglions mésentériques synthétisent de grandes quantités d'IL-10 et un peu de TGF- β . Les DC de ganglions de C57BL/6 se rapprochent des DC spléniques par une forte sécrétion d'IL-12, contrairement aux DC de ganglions de CBA/J. Les souris C57BL/6 infectées par une faible quantité de kystes survivent à 90 % après immunisation avec des MLNDC pulsées alors que 70 % des souris non traitées meurent. Ces mêmes souris présentent 85 % de réduction du nombre de kystes comparées aux souris contrôles. Une excellente protection de 93 % a également été observée chez les souris CBA/J. Cette protection des souris est couplée à une forte réponse cellulaire locale et systémique quel que soit le fond génétique. Chez les CBA/J, l'immunisation par les MLNDC pulsées entraîne une réponse cytokinique de type Th2, tant au niveau des ganglions qu'au niveau de la rate. En revanche chez les C57BL/6, une réponse de type Th2 est observée dans les ganglions tandis que les splénocytes présentent une synthèse de cytokines de type Th1 (Dimier *et al*, 2003).

Une lignée de DC spléniques, appelée SRDC, a été mise au point afin de s'affranchir des difficultés d'obtention des DC primaires. La lignée présente les mêmes caractéristiques morphologiques, le même profil de sécrétion de cytokines et induit les mêmes réponses immunitaires que des cellules primaires isolées de rates lorsqu'elles sont pulsées et utilisées pour immuniser des souris CBA/J (Ruiz *et al*, 2005 ; article fourni en annexe).

Des particules dérivées de DC, les exosomes, sont une alternative à la vaccination par des DC entières. Les exosomes sont des vésicules sécrétées par les cellules hématopoïétiques, dont les DC font partie. Ils résultent de la fusion d'endosomes multivésiculaires tardifs avec la membrane plasmique.

Les exosomes de DC dérivées de monocytes humains sont riches en molécules du CMH I comme du CMH II et forment une population homogène de 60 à 90nm. *In vitro*, des exosomes dérivés de DC sensibilisées par le peptide MART-1 (marqueur de mélanome) sont capables de stimuler spécifiquement la sécrétion d'IFN- γ par des LT CD8+, de même que la prolifération de LT cytotoxiques spécifiques du peptide utilisé pour la sensibilisation. Chez la

souris, les exosomes de DC dérivées de moelle osseuse sont également porteurs de molécules de CMH I et de CMH II, en plus de molécules de co-stimulation CD86 ; cependant ils ne constituent pas une population de tailles homogènes. *In vivo*, les exosomes issus de DC murines dérivées de moelle osseuse, sensibilisées avec des peptides tumoraux, sont capables d'induire un rejet des tumeurs ou un retard de croissance de ces tumeurs. De plus, le mécanisme d'action de ces exosomes passe par l'induction de LT cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Zitvogel *et al*, 1998).

La caractérisation approfondie des exosomes murins dérivés d'une lignée de DC spléniques a été effectuée l'année suivante. Cette étude révèle que la production des exosomes est régulée en fonction de l'état de maturation des DC : la sécrétion des exosomes se fait en grande quantité chez les DC immatures et diminue chez les DC matures qui perdent leur capacité d'endocytose. Ces travaux mettent également en évidence le recrutement particulier de quelques protéines dans les exosomes. Parmi elles se trouvent des protéines transmembranaires (CMH II, Mac-1 et CD9) ou cytosoliques (annexine II, hsc73...). L'accumulation préférentielle de la protéine de choc thermique hsc73 expliquerait notamment les propriétés anti-tumorales des exosomes (Théry *et al*, 1999). Plus récemment, il a été montré que les exosomes allogéniques étaient internalisés activement puis processés par les DC spléniques immatures. Seules les DC CD8 α ⁺ sont alors capables de présenter les peptides allogéniques dérivés des exosomes aux LT CD4⁺ et d'induire leur activation *in vitro* et *in vivo* (Morelli *et al*, 2004).

Des essais de vaccination anti-toxoplasmique ont ensuite été menés, notamment avec des exosomes dérivés d'une lignée de DC pulsée avec de l'extrait antigénique, les DC2.4. La prolifération des splénocytes après restimulation par extrait antigénique est doublée chez les souris ayant reçu des exosomes issus de DC pulsées par rapport aux souris immunisées avec des DC pulsées. De plus, les exosomes induisent une augmentation de sécrétion des cytokines de type Th1 par les splénocytes restimulés. Suite à un challenge par des kystes de *T. gondii*, 67 % des souris ayant reçu des exosomes survivent contre 20 % pour les souris témoins. En phase chronique, une protection de 75 % est obtenue grâce à l'immunisation avec des exosomes. Cette protection est inférieure à celle observée chez les souris ayant reçu des DC pulsées (Aline *et al*, 2004).

Une seconde étude a porté sur des exosomes dérivés de SRDC, chez des souris syngéniques (CBA/J) et allogéniques (C57BL/6). Après un challenge avec des kystes toxoplasmiques, l'immunisation de souris syngéniques par des exosomes issus de SRDC pulsées avec de l'extrait de *T. gondii* protège ces animaux contre la formation de kystes cérébraux (baisse de

60 % par rapport aux souris contrôles). La protection se fait grâce à la production d'IgA intestinales et d'IgG sériques spécifiques du parasite. Les exosomes issus de SRDC pulsées protègent également les souris allogéniques en terme de survie au challenge (100 % de survie contre 25 % pour des souris non traitées) ; cette protection fait intervenir des IgG sériques spécifiques mais pas d'IgA intestinales (Beauvillain *et al*, 2007, article fourni en annexe).

Il est difficile de dégager un protocole vaccinal consensus efficace à cause de la variété des lignées de souris étudiées, des antigènes utilisés, de la formulation et de la voie d'administration testées.

ARTICLE 1

CD8+ but not CD4+ T cells are the major effectors of *Toxoplasma gondii* protective immunity induced by dendritic cell vaccination

Introduction

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire obligatoire qui infecte un tiers de la population mondiale et est responsable de la zoonose appelée toxoplasmose. Asymptomatique chez l'hôte immunocompétent, elle revêt une grande sévérité en cas de toxoplasmose congénitale ou de toxoplasmose cérébrale chez les hôtes immunodéprimés. Chez l'animal, ce parasite est responsable de nombreux avortements entraînant de lourdes pertes financières pour les éleveurs. De plus, les animaux infectés sont un réservoir parasitaire impliqué dans la contamination humaine.

La primo-infection par *T. gondii* aboutit à la mise en place d'une réponse immune spécifique et efficace qui confère une protection à long terme. Ce résultat suggère que le développement d'un vaccin efficace est un objectif réalisable. La résistance de l'hôte repose sur la production d'une cytokine essentielle : l'IFN- γ , tant au cours de la réponse innée par les cellules NK, qu'au cours de la réponse adaptative par les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Cependant, si l'IFN- γ est la cytokine majeure de résistance à *T. gondii*, l'IL-12 est essentielle à l'induction de la sécrétion d'IFN- γ et donc à l'initiation d'une réponse cellulaire efficace. Cette cytokine est principalement synthétisée par les cellules dendritiques (DC) en réponse à *T. gondii*. Ainsi, les DC ont un rôle privilégié, à l'interface entre immunités innée et adaptative. Malgré une efficacité prouvée suite à des immunisations par des DC primaires ou une lignée de DC (SRDC) contre un challenge virulent, leur utilisation n'est pas envisageable dans une stratégie vaccinale rationnelle. Cependant, la description des mécanismes effecteurs induits par une telle vaccination est une étape décisive dans la mise au point de nouveaux vaccins qui cibleraient les populations dendritiques endogènes, ce ciblage ayant pour but de reproduire les réponses précédemment décrites.

Objectif

- déterminer la ou les populations T responsables de la protection obtenue par la vaccination de souris CBA/J avec des DC pré-sensibilisées ou non par de l'antigène toxoplasmique

Méthodes

- sensibilisation ou non de SRDC avec de l'extrait antigénique de *T. gondii*
- immunisation des souris CBA/J avec l'une ou l'autre des populations dendritiques précédemment obtenues
- déplétion des LT CD4⁺ ou CD8⁺ par injection intra-péritonéale d'anticorps monoclonaux
- infection d'épreuve par une dose létale de 80 kystes de la souche 76K
- évaluation de la réponse cellulaire 30 jours post-infection au niveau de la rate et des ganglions mésentériques
- évaluation de la protection des souris en phase chronique par détermination du nombre de kystes intracérébraux

Résultats

LT CD4⁺ : **cellules minoritairement impliquées** dans la mise en place d'une réponse immune protectrice

- LT CD8⁺ : **cellules sécrétrices** d'IFN- γ dans la rate
cellules régulatrices de la synthèse des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les ganglions mésentériques
cellules effectrices majeures de la protection des souris

Conclusion

Les LT CD8⁺ sont les effecteurs majeurs de l'immunité protectrice mise en place chez des souris CBA/J suite à une vaccination par des DC sensibilisées et un challenge virulent.

Article actuellement **soumis** dans Immunology and Cell Biology

CD8+ but not CD4+ T cells are the major effectors of *Toxoplasma gondii* protective immunity induced by dendritic cell vaccination : mechanism of dendritic cell vaccination

Rachel Guiton^a, Rachid Zagani^a, Isabelle Dimier-Poisson^{a*}

^aUMR 483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies anti-infectieuses, Université François Rabelais, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

*Corresponding author, Tel: +33 2 47 36 71 83, Fax: +33 2 47 36 72 52
Email address: dimier@univ-tours.fr

Abstract

The protozoan *Toxoplasma gondii* is the causative agent of toxoplasmosis, a worldwide zoonosis for which an effective vaccine is needed. Dendritic cells are key cells of both innate and acquired immunity that trigger early and specific immune responses in murine toxoplasmosis. They synthesize IL-12 and activate a protective Th1 response. Vaccination with pulsed dendritic cells is very efficient but their use in a vaccination protocol is unconceivable. Nevertheless, unravelling the induced effector mechanisms is crucial to design new vaccine strategies. This knowledge would allow to specifically induce the previously identified protective immune response *via* the *in vivo* targeting of endogenous dendritic cell populations.

Therefore, we carried out *in vivo* depletion of the two major lymphocyte populations, CD4⁺ or CD8⁺ in mice immunized with parasite extract pulsed dendritic cells and studied the subsequent cellular immune response and protective mechanisms induced. Our findings suggested that CD4⁺ T lymphocytes were not implicated either in spleen and mesenteric lymph node cytokine secretion or in mice protection. By contrast, the increasing number of intracerebral cysts and depletion of CD8⁺ T cells were strongly correlated, revealing a prominent role for CD8⁺ lymphocytes in the protection of mice. Splenic CD8⁺ T lymphocytes induce a strong Th1 response controlled by a Th2 response whereas CD8⁺ cells from mesenteric lymph nodes inhibit both Th1 and Th2 responses. We concluded that CD8⁺ cells are the main effectors following dendritic cell vaccination and *Toxoplasma gondii* infection. This contrasts with *T. gondii* infection alone which elicits the generation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that produce IFN- γ and provide protective immunity.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan that infects one-third of the world population. Asymptomatic in immunocompetent hosts, toxoplasmosis has severe consequences in immunosuppressed individuals and can even lead to death.^{1,2} Congenital toxoplasmosis causes development of sequelae later in life, including chorioretinitis, hearing loss or mental retardation.³ Recent findings strongly suggest a link between *T. gondii* seropositivity and schizophrenia.⁴ In animals, *T. gondii* is responsible for numerous abortions thus causing substantial reproductive and economic losses.⁵ Additionally, these infected animals are a parasitic reservoir involved in human contamination.

Primary infection with *T. gondii* results in the setting of both humoral and cell-mediated immune responses and confers long-term protection. This suggests that the development of an efficient vaccine is a realistic goal. Therefore, many studies have investigated possible solutions for an efficient vaccine.^{6,7} The immune response set following a *T. gondii* infection firstly needs to be clearly defined before a vaccine can be developed.

Host resistance seems to occur *via* synthesis of IFN- γ by NK cells and adaptive T lymphocytes.⁸ Following infection, macrophages synthesize TNF- α and IL-12 which induce NK cells to secrete IFN- γ . The combined action of IL-12 and IFN- γ induce a strong differentiation of T helper precursors into Th1 lymphocytes. These CD4+ T cells then synthesize large amounts of IFN- γ and IL-2. These two cytokines finally induce CD8+ T lymphocytes proliferation and IFN- γ secretion.⁸ Thus protection against *T. gondii* infection is mainly attributed to cell-mediated immunity. Previous studies have shown that both CD4+ and CD8+ T-cell subtypes are involved in the protection. The relative contribution of these two populations was investigated by adoptive transfer or *in vivo* depletion.⁹ All these data suggest a prominent role of CD8+ cells with a supporting role for CD4+ cells during the acute phase as well as during the chronic phase of infection. If IFN- γ is the major cytokine of

resistance to *T. gondii*,¹⁰ IL-12 is a crucial initiation cytokine to trigger an efficient cell-mediated immunity. Indeed, IL-12 is a major cytokine secreted by neutrophils, macrophages and dendritic cells (DCs), that triggers the early IFN- γ secretion following *T. gondii* infection. DCs are the first producers of IL-12 in response to *T. gondii* antigens.¹¹ We have previously demonstrated that primary DCs or a dendritic cell line (SRDCs) pulsed *ex vivo* with *T. gondii* antigen induced a protective cellular immune response to a virulent oral challenge.^{12, 13} Although dendritic cell vaccination is very efficient, its use in a vaccination protocol is unconceivable. However, the description of the effector mechanisms induced following such vaccination is a key step to design new vaccines that target *in vivo* endogene dendritic cell populations. This targeting would aim at triggering the previously described efficient immune response.

In this study, for the first time, we investigated the roles of two main lymphocytic populations, CD4+ and CD8+, in the protective response to *T. gondii* in CBA/J mice chronically infected, following a dendritic cell vaccination. We demonstrated that CD4+ T lymphocytes were not implicated either in spleen or mesenteric lymph node cytokine secretion or in long-term protection of mice. On the contrary, CD8+ T lymphocytes appeared as the main effectors, inducing a strong Th1 response in spleen while inhibiting both Th1 and Th2 responses in mesenteric lymph nodes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents for cell culture were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and Sigma-Aldrich (St-Louis, USA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reagents and recombinant cytokines were from BD Pharmingen (San Diego, USA), unless otherwise stated.

2.2. Mice

Seven-week-old CBA/J mice (H-2k) (Janvier, France) were maintained in pathogen-free conditions. Groups of 12 mice were used for the chronic toxoplasmosis model.

2.3. Parasites and *T. gondii* extract (voir supplément matériels et méthodes en annexe)

Tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* were harvested from infected monolayers of human foreskin fibroblasts Hs 27 (ATCC CRL-1634) and were the source of *T. gondii* extract (TE).¹²

Cysts of the *T. gondii* strain 76K were obtained from brains of CBA/J mice orally infected one month earlier with 80 cysts.

2.4. Immunizations (voir supplément matériels et méthodes en annexe)

SRDC (H-2^k),¹³ were cultured in IMDM supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin (50 U.ml⁻¹)/streptomycin (50 µg.ml⁻¹), β-mercaptoethanol (50 µM) and L-glutamine (2 mM). Cells were pulsed with 50 µg.ml⁻¹ of TE (TE-SRDC) or unpulsed (NP-SRDC). Cells were harvested after 24 hours and resuspended (2.5 × 10⁶ cells.ml⁻¹) in RPMI. Mice were subcutaneously (s.c.) injected with 5 × 10⁵ TE-SRDC or NP-SRDC. A second injection was carried out 15 days later. Control mice were untreated.

2.5. Efficiency of immunizations

Two weeks after the second injection efficiency of immunizations was tested. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus of mice and spleens were harvested as described in 2.7. Immunization efficiency was tested by ELISA on *T. gondii* specific IgG and by specific proliferation and cytokine secretion assays on spleen cells. 96-well plates were coated with 10 µg.ml⁻¹ TE and incubated overnight at 4 °C. Wells were then saturated with 4% bovine serum albumin and processed as previously described.¹⁴ Sera were diluted 1:50, 1:100 and 1:200.

Spleen cells were collected and prepared as described in 2.7. Cell culture supernatants were tested for the presence of IFN-γ, IL-2, IL-10 and IL-4 (see 2.7.). The measurement of antigen-specific proliferative response was also assessed on these cells.¹²

2.6. Depletion and *Toxoplasma* challenge

To obtain monoclonal antibodies (mAbs) directed against CD4⁺ and CD8⁺ cells, GK1.5 (rat IgG_{2b}, ATCC TIB-207) and H35-17.2 (rat IgG_{2b})¹⁵ hybridomas were cultured in RPMI/DMEM (1:1) supplemented with 20% or 10% FCS, respectively. Supernatants were collected, centrifuged 20 min at 1500 × g, filtered using a membrane with 0.45 μm pores to remove residual cell fragments, and were purified using HiTrap Protein G affinity columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Two weeks after the second immunization, mice were intraperitoneally (i.p.) injected on three consecutive days with 0.6 mg or 0.3 mg of anti-CD4 or anti-CD8 mAb, respectively. Mice were then injected every six days until they were killed.

On the third day of depletion, mice were challenged by oral administration of 80 cysts from the 76K strain of *T. gondii*.

Depletion was assessed by reacting spleen cells of mice killed at different times, with a fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody against CD4 (GK1.5) or CD8 (53-5.8) (all from BD PharMingen). Before all labeling experiments, Fc receptors were blocked by incubating cells with the 2.4G2 mAb for 10 min. Unrelated isotype-matched mAbs were used for a control. Analysis was performed using FACScan apparatus (Becton Dickinson & Co., San Diego, USA) and CellQuest v3.3 software. The efficacy of depletion was >90 % for CD4⁺ and >99 % for CD8⁺ cells.

2.7. Measurement of cytokine and nitric oxide concentrations

Spleen cells and MLN cells were collected at the end of the experiment and pressed through a stainless steel mesh. Single-cell suspensions were obtained by filtration through nylon mesh to remove tissue debris. The spleen erythrocytes were destroyed by hypotonic shock, and spleen and MLN cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, HEPES (25 mM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), β-mercaptoethanol (5×10^{-5} M) and

penicillin (50 U.ml^{-1})/streptomycin ($50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$). Cells were then cultured in 24-well plates at 10^6 cells per well in 1 ml of culture medium, alone or containing TE ($10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$). Plates were incubated for four days in 5% CO_2 at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Cell-culture supernatants were harvested between 24 h and four days and IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4 and nitric oxide (NO) concentrations were measured.

Cytokine concentrations were evaluated using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. They were determined from standard curves constructed with known amounts of mouse recombinant IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ . The sensitivity limits for the assays were 3.1 pg.ml^{-1} for IL-2, 7.8 pg.ml^{-1} for IL-4 and 31.3 pg.ml^{-1} for IL-10 and IFN- γ .

NO concentration was evaluated using the Griess test. Briefly, Griess reagents (sulfanamide 1% and naphthylethylenediamine 0.1%, ratio 1:1) (Sigma) were added to the culture supernatants. Absorbance was measured at 540 nm. NO concentration was determined using a standard curve established with a 20 nM sodium nitrite solution. The sensitivity limit was 2 μM .

Results are presented as mean \pm SEM.

2.8. Intracellular IFN- γ assay

The frequency of IFN- γ producing CD8 $^+$ and CD4 $^+$ splenocytes of immunized and challenged CBA/J mice (three per group) was detected one month after oral challenge. CD8 $^+$ or CD4 $^+$ cells were isolated and purified by positive selection using microbeads coated with monoclonal antibodies to CD8 or CD4 according to the instructions provided by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) to yield populations consisting of $>98 \%$ CD8 $^+$ or CD4 $^+$. CD8 $^+$ or CD4 $^+$ T cells were seeded at 10^6 cells per well in a 24-well plate and were stimulated with 10^6 irradiated unpulsed or TE-pulsed SRDC cells (5000 Rads) for 1 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ followed by an additional 4 h stimulation in the presence of $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ brefeldin A (Golgi

Plug; 2301 KZ, PharMingen) per 2×10^6 cells. Permeabilization of the cells was performed using a proprietary solution (Becton Dickinson). Cells were stained for surface CD8 or CD4 and intracellular IFN- γ expression using directly conjugated monoclonal antibodies according to the manufacturer's recommendations, and isotype-matched negative controls were used for all antibodies. For analysis, 150 000-200 000 cells were acquired on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

2.9. Evaluation of protection in mice

Brains were harvested one month after oral challenge and homogenized in 5 ml of RPMI 1640 with a pestle and mortar. Cysts in brain homogenates were counted microscopically ($10 \times 10 \mu\text{l}$). Results are expressed as mean \pm SEM for each group.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test (InStat 2.01 software) to analyze the observed differences in cytokine productions and cyst counts. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Efficiency of immunizations

Two weeks after the second immunization, efficiency of immunizations was assessed at humoral and cellular levels.

T. gondii-specific production of IgG was exclusively observed in mice immunized with pulsed dendritic cells (data not shown).

According to our previous published results,¹³ the proliferation assay demonstrated that splenocytes from TE-SRDC-immunized mice were unique in their capacity to proliferate following restimulation with parasite extract and that this proliferation was dose-dependent (data not shown). At the same time, cell culture supernatants presented a specific Th1 (IFN- γ

and IL-2) response controlled by a Th2 (IL-10 and IL-4) response in these splenocytes (data not shown).

We concluded that immunizations were efficient and induced a specific response directed against *T. gondii*. We next tested our vaccination protocol by oral infection of mice.

3.2. Post-infection cellular response following CD4⁺ depletion

Mice were killed one month after oral challenge. Spleens and MLNs were harvested and cells were cultured in the presence of TE (10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) or medium alone. Supernatants were collected at various times and cytokine and NO productions were determined.

In spleens (Fig. 1), IFN- γ levels were similar for CD4⁺-depleted (NP-SRDC α -CD4) and non-depleted (NP-SRDC) splenocytes of NP-SRDC mice (14 058 and 15 082 pg.ml^{-1} , respectively) and of TE-SRDC mice (25 758 and 25 380 pg.ml^{-1} , respectively). Nevertheless, there is a significant difference between TE-SRDC and NP-SRDC mice (25 380 and 15 082 pg.ml^{-1} , respectively; $p < 0.01$). The CD4 depletion did not impair IFN- γ secretion observed following immunization with pulsed-dendritic cells.

There was no significant difference in IL-2 levels from depleted or non-depleted groups, either for NP-SRDC mice (15 and 23.8 pg.ml^{-1} , respectively) or for TE-SRDC mice (31.1 and 28.1 pg.ml^{-1} , respectively).

We could not see any statistical difference between the groups among IL-10 levels in spleens (1 830 pg.ml^{-1} for control mice, 1 772 pg.ml^{-1} for NP-SRDC mice, 1 806 pg.ml^{-1} for depleted NP-SRDC mice, 1 944 pg.ml^{-1} for TE-SRDC mice and 1 825 pg.ml^{-1} for depleted TE-SRDC mice).

We were unable to detect IL-4 secretion.

NO production in spleens was similar between depleted and non-depleted groups for both NP-SRDC and TE-SRDC mice. Indeed, CD4 depletion had no effect on NO production in NP-SRDC mice (11.3 (depleted) and 12.3 μM (non-depleted)) as well as in TE-SRDC mice (11.5

(depleted) and 14 μM (non-depleted)). Nevertheless, a significant increase was observed in TE-SRDC mice when compared to the control group (14 and 8 μM , respectively; $p < 0.05$). Thus, CD4^+ cells are not implicated in NO secretion in spleens.

These findings seem to indicate that CD4^+ lymphocytes have a minor role, during the chronic phase, in the secretion of type I and II cytokines following DC vaccination and challenge.

In MLNs no statistical difference was observed between the groups whatever the considered cytokine, even concerning NO production (data not shown).

These findings suggest that CD4^+ T lymphocytes are not implicated in either Th1 and Th2 cytokine secretion or nitric oxide production in MLNs.

3.3. Post-infection cellular response following CD8^+ depletion

Splenocytes from CD8^+ -depleted and non-depleted NP-SRDC mice did not secrete significantly different levels of $\text{IFN-}\gamma$ (18 866 and 15 082 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively) (Fig. 2). On the other hand, depleted TE-SRDC mice secreted significantly lower $\text{IFN-}\gamma$ levels than non-depleted mice (10 254 and 25 380 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; $p < 0.01$). Thus the CD8^+ cells seem to be the cell population responsible for splenic $\text{IFN-}\gamma$ synthesis during the chronic phase, in this DC vaccination protocol.

Depleted groups of both NP-SRDC and TE-SRDC mice showed a significantly lower IL-2 secretion than their non-depleted control groups (9.3 and 23.8 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in NP-SRDC mice, $p < 0.05$; 9.5 and 28.1 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in TE-SRDC mice, $p < 0.05$). CD8^+ splenocytes also seem to be a major source of IL-2.

Similar changes were observed for IL-10 secretion to those observed for IL-2: depleted groups had markedly decreased IL-10 levels (1 009 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (depleted) and 1 772 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (non-depleted) for NP-SRDC mice, $p < 0.05$; 1 138 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (depleted) and 1 944 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (non-depleted) for TE-SRDC mice, $p < 0.05$). Contrary to $\text{IFN-}\gamma$, secretions of IL-2 and IL-10 do

not seem to be *T. gondii*-specific as a decrease is observed when both TE-SRDC and NP-SRDC mice are depleted.

No IL-4 secretion was observed among the groups. These findings reveal an important role for CD8⁺ T splenocytes in type I cytokine secretion (IFN- γ and IL-2) and in IL-10 secretion. NO production was significantly decreased in depleted groups. Indeed, NO concentrations in spleen cell supernatants were 12.3 μ M for non-depleted NP-SRDC mice and 5.8 μ M for CD8⁺-depleted mice ($p < 0.05$). In TE-SRDC mice, NO concentrations reached 14 μ M for non-depleted mice and 8.8 μ M for depleted mice ($p < 0.05$). Thus CD8⁺ T lymphocytes are also implicated in NO synthesis following dendritic cell vaccination and challenge in mice.

In MLNs (Fig. 3), a small decrease in IFN- γ secretion was observed in depleted NP-SRDC mice (220 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$; 332 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in non-depleted controls; not significant), whereas depleted TE-SRDC mice had significantly higher levels of IFN- γ secretion than TE-SRDC mice (8 964 and 2 391 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; $p < 0.05$). Likewise, TE-SRDC mice had a marked increase in IFN- γ secretion compared to the control group (2 391 and 172 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; $p < 0.05$). Thus, CD8⁺ cells seem to exert a strong down-regulation of IFN- γ synthesis.

IL-2 secretion profile was similar to that observed for IFN- γ . Indeed, TE-SRDC mice produced significantly more IL-2 than the control group (2 and 0 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; $p < 0.05$) contrary to NP-SRDC mice (1.25 and 0 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; not significant). There was no significant difference between CD8⁺-depleted NP-SRDC mice and their control group (0.25 and 1.25 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively). Finally, a significant increase in IL-2 secretion was observed following CD8⁺ depletion among TE-SRDC mice (6.75 and 2 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively; $p < 0.05$). Thus as for IFN- γ , IL-2 would be down-regulated by CD8⁺ T lymphocytes. These results must be taken with care given that the concentrations of IL-2 are mainly under the sensitivity limit.

IL-10 secretion was similar among most groups (57 pg.ml⁻¹ for control mice, 33 pg.ml⁻¹ for NP-SRDC mice, 51 pg.ml⁻¹ for depleted NP-SRDC mice and 109 pg.ml⁻¹ for TE-SRDC mice). Depleted TE-SRDC mice were the only ones to show a significant increase compared to their own control group (1 132 and 109 pg.ml⁻¹, respectively; $p < 0.05$). These results imply a great role for CD8⁺ cells in both Th1 and Th2 cytokine down-regulation in MLNs.

NO production was not significantly different between either NP-SRDC mice and the control group (15.8 and 23.3 μ M, respectively) or NP-SRDC and depleted NP-SRDC mice (15.8 and 13.2 μ M, respectively). On the contrary, TE-SRDC mice and the control group had significantly different NO levels (9.5 and 23.3 μ M, respectively; $p < 0.05$) as for depleted and non-depleted TE-SRDC mice (16.4 and 9.5 μ M, respectively; $p = 0.01$). CD8⁺ lymphocytes are also implicated in NO down-regulation in MLNs.

3.4. Intracellular IFN- γ assay

We tried to confirm the predominant role of CD8⁺ cells by quantifying the IFN- γ -producing CD4⁺ or CD8⁺ splenic T lymphocytes (Fig. 4).

One month after their oral challenge mice were sacrificed and CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separated on microbeads. They were then cocultured with NP-SRDC or TE-SRDC before staining of intracellular IFN- γ and surface CD4 or CD8 molecules.

Analysis of IFN- γ positive CD8 T cells (Fig. 4, upper panel) revealed no difference between CD4-depleted and non-depleted immunized mice (6.1 and 5.9 % for NP-SRDC mice; 13.9 and 13.8 % for TE-SRDC mice). Moreover, there was an increased percentage of IFN- γ -positive in TE-SRDC-immunized groups compared to NP-SRDC-immunized groups (13.9 and 6.1 %, respectively). These data further indicate that CD8⁺ cells are the IFN- γ -secreting cells induced following vaccination and challenge.

Analysis of CD4 T cells (Fig. 4, lower panel) showed that mice immunized with NP-SRDC and CD4-depleted mice immunized with NP-SRDC or TE-SRDC had similar percentages of

IFN- γ -positive cells (1.8, 1.9 and 1.7 %, respectively). Mice immunized with TE-SRDC showed a slight increase of IFN- γ -positive CD4 T cells (4.2 %). Vaccinating mice with TE-SRDC could induce a small part of the CD4+ population to secrete IFN- γ . Surprisingly, this population gets back to a basal level when CD8+ cells are depleted, reinforcing the major role played by these CD8+ cells.

3.5. Post-infection protection of CBA/J mice following CD4+ depletion

Brain cysts were counted to evaluate protection of depleted mice (Fig. 5). Mice immunized with NP-SRDC had a similar number of cysts (6 094 cysts/brain) to the control group (5 875 cysts/brain). However, mice immunized with TE-SRDC had a significantly lower parasitic load than controls (2 245 and 5 875 cysts/brain, respectively; $p < 0.01$). This decrease represented a protection level of 62 %. CD4 depleted groups for both NP- and TE-SRDC mice tended to have a slightly, but not significantly, higher number of brain cysts than their respective control group (7 659 and 6 094 cysts/brain for NP-SRDC; 2 595 and 2 245 cysts/brain for TE-SRDC). Nevertheless, TE-SRDC mice depleted of CD4+ cells still had a 56 % protection level. These data indicate that TE-SRDC vaccination protects mice from cyst formation and that CD4+ T lymphocytes play a minor role in this protection mechanism.

3.6. Post-infection protection of CBA/J mice following CD8+ depletion

CD8+-depleted NP-SRDC mice had a higher number of brain cysts although the difference was not statistically significant (7 047 and 6 094 cysts/brain, respectively) (Fig. 6). On the contrary, depleted TE-SRDC mice had significantly more cysts than their non-depleted control group (4 620 and 2 245 cysts/brain, respectively; $p < 0.05$). This finding suggests that CD8 depletion results in a loss of protection following a vaccination with pulsed DCs and an oral challenge (62 % for non-depleted TE-SRDC mice; 21 % for CD8+-depleted TE-SRDC mice).

4. Discussion

Several previous studies suggest that DCs play an important role in the setting of the immune response to the intracellular parasite *T. gondii* during the early and chronic phases of infection. For instance, *T. gondii* extract-pulsed DCs administered *in vivo* induce a strong humoral and cellular immune response and promote protection against a virulent challenge.¹³ Thus, DCs can effectively process *T. gondii* antigens for presentation *in vivo* but their use in a vaccine strategy is not acceptable. It is of interest to study the effector mechanisms induced by *T. gondii*-sensitized dendritic cells as a well-described protective immune response would help the development of new efficient vaccine strategies. This is why we investigated the relative contribution of the CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes subpopulations in a model of chronically infected mice vaccinated with *T. gondii* extract-pulsed dendritic cells and depleted of these lymphocytes.

We first determined the role of CD4⁺ T lymphocytes after an efficient depletion of over 90%. The results revealed a minor role for these cells since CD4-depleted or non depleted mice have similar cytokine secretion profiles in spleen as well as in MLNs. Moreover, depleted mice did not show any significant loss of protection in terms of brain cyst load. These results contrast with those obtained by Casciotti in 2002.⁹ They demonstrated that CD4⁺ T cells are important for early IFN- γ production during *T. gondii* infection and that lack of CD4⁺ lymphocytes leads to parasite multiplication in the tissues. Moreover CD4 deficient mice exhibited parasite burdens in the brain. Johnson and Sayles also showed the implication of CD4⁺ cells as they induce CD8⁺ T cells through the production of IL-2 and maintain CD8⁺ T cells effector immunity.¹⁶ CD4⁺ T lymphocytes also contributed significantly to protection against chronic infection *via* their role as helper cells for production of isotype-switched antibodies. The contradictory results obtained following infection alone or following vaccination plus infection could result from a particular orientation of the immune response.

Indeed, in our protocol dendritic cells could directly prime CD8⁺ T lymphocytes *via* cross-presentation of *T. gondii* antigens, as previously demonstrated by Gubbels *et al.*¹⁷

For this reason, we next studied the implication of CD8⁺ T lymphocytes. In spleens CD8⁺ cells seem to be responsible for cytokine synthesis. Indeed, their depletion leads to a significant decrease of both Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokines. We further confirmed these data by identifying the CD8⁺ T cells as the IFN- γ -producing cells. These results are in accordance with another vaccination assay where Gazzinelli *et al.* got similar results. They vaccinated BALB/c mice with the mutant *T. gondii* strain TS-4 before depleting them of CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes and challenging them with a lethal dose of tachyzoites. They identified IFN- γ -producing CD8⁺ T cells as the major effectors of immunity *in vivo*.¹⁸ Moreover, in our experiment, CD8⁺ cells depletion induced a loss of protection in mice previously immunized with pulsed dendritic cells, so CD8⁺ cells are crucial for CBA/J mice resistance to *T. gondii* infection. In the early 90's Brown and McLeod demonstrated that naturally resistant C57BL/10 mice depleted of CD8⁺ T lymphocytes became sensitive to cyst formation following *T. gondii* infection.¹⁹ CD8⁺ cells also appear to play a major role in *Trypanosoma cruzi* infection. Mice lacking CD8⁺ T-cell function fail to control a normally non-lethal infection and die early in the acute phase. Moreover, depletion of CD8⁺ T cells in the chronic phase results in increased parasite load.²⁰

In contrast to spleens, MLNs showed increased secretions of cytokines following CD8⁺ depletion suggesting that CD8⁺ T lymphocytes could act as regulatory cells. A recent review summarizes the current knowledge on CD8⁺ Tregs, a newly described CD8⁺ lymphocyte subtype with dedicated suppressor function.²¹ Although not proven in parasitic infections, their importance in autoimmunity is well-documented and they could be responsible for the moderation of the immune response set in local lymph nodes. It would be of importance to determine which cell population is responsible for the MLN IFN- γ secretion. It has been

demonstrated that splenic NK cells could produce this cytokine in response to *T. gondii* in MHC-I deficient mice thus unable to activate CD8+ T cells.²²

This is the first study to point to CD8+ lymphocytes as the unique effector population responsible for the protection of mice following efficient DC vaccination and subsequent virulent challenge. This is partly in accordance with a previous description of CD8+ T cells as effector lymphocytes while CD4+ T cells were crucial for the regulation of the immune response in a very different vaccination assay.¹⁸

Finally, we provide further insight into the long-term immunity that protects mice against *T. gondii*, a ubiquitous parasite resulting in severe sequelae in immunocompromised individuals. Future studies will be needed to determine if *T. gondii* antigens are presented to CD8+ lymphocytes by SRDCs. A recent study showed encouraging results. Indeed, the authors demonstrated that CD8+ DCs, like SRDCs are, were very efficient in processing and cross-presenting exogenous antigen to CD8+ T cells. They also highlighted CD24 as an essential co-stimulatory molecule required for CD8+ DCs to generate CD8+ and CD4+ T-cell responses.²³ The possible roles of various CD4+ lymphocyte subtypes and other immune cell populations during the chronic phase of the disease also need to be elucidated, with a view to developing an effective vaccine to be used in animals that serve as a natural reservoir for human contamination.

A new vaccine strategy could be achieved by the direct *in vivo* targeting of endogenous dendritic cell populations to initiate the required immune response. Such protocol has already been successfully described. Chua *et al.* showed that branched cationic peptides ligated to a cargo peptide consisting of a T-helper epitope and a CTL epitope from influenza virus were efficiently translocated into DCs and induced an antigen-specific CD8+ T cell response in presence of maturation factors.²⁴ In another viral model, Sabado *et al.* described HIV uptake

by DCs, probably *via* lectines, and subsequent processing via TAP1/2 and loading onto MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum.²⁵

5. Acknowledgements

We are grateful to J. Pierre, D. Tabareau, S. Bigot and T. Papin for technical and typing assistance. R.Guiton is grateful for a fellowship from the Région Centre.

References

- 1 Hoffmann C, Ernst M, Meyer P, Wolf E, Rosenkranz T, Plettenberg A *et al.* Evolving characteristics of toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus-1: clinical course and *Toxoplasma gondii*-specific immune responses. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13: 510-15.
- 2 Barsoum RS. Parasitic infections in organ transplantation. Exp. Clin. Transplant. 2004; 2: 258-67.
- 3 Elsheikha HM. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. Public Health. 2008; 122: 335-53.
- 4 Yolken RH, Bachmann S, Rouslanova I, Lillehoj E, Ford G, Fuller Torrey E *et al.* Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. Clin. Infect. Dis. 2001; 32: 842-44.
- 5 Bennett R, Christiansen K, Clifton-Hadley R. Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. Prev. Vet. Med. 1999; 39: 155-71.
- 6 Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. Vet. Rec. 1991; 129: 89-93.

- 7 Bourguin I, Chardès T, Bout D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 1993; 61: 2082-88.
- 8 Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1994; 153: 2533-43.
- 9 Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA. CD8⁺-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.* 2002; 70: 434-43.
- 10 Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988; 240: 516-18.
- 11 Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN *et al.* In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1819-29.
- 12 Dimier-Poisson I, Aline F, Mévélec MN, Beauvillain C, Buzoni-Gatel D, Bout D. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun.* 2003; 71: 5254-65.
- 13 Ruiz S, Beauvillain C, Mévélec MN, Roingard P, Breton P, Bout D *et al.* A novel CD4-CD8 α +CD205+CD11b⁻ murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis. *Cell. Microbiol.* 2005; 7: 1659-71.
- 14 Chardès T, Bourguin I, Mévélec MN, Dubremetz JF, Bout D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.* 1990; 58: 1240-46.

- 15 Pierres M, Goridis C, Golstein P. Inhibition of murine T cell-mediated cytotoxicity and T cell proliferation by a rat monoclonal antibody immunoprecipitating two lymphoid cell surface polypeptides of 94000 and 180000 molecular weight. *Eur. J. Immunol.* 1982; 12: 60-69.
- 16 Johnson LL, Sayles PC. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect. Immun.* 2002; 70: 185-91.
- 17 Gubbels MJ, Striepen B, Shastri N, Turkoz M, Robey EA. Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2005; 73: 703-11.
- 18 Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 1991; 146: 286-92.
- 19 Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 1990; 145: 3488-41.
- 20 Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 2004; 201: 304-17.
- 21 Smith TR, Kumar V. Revival of CD8+ T reg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 2008; 29: 337-42.
- 22 Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1465-72.
- 23 Askew D, Harding CV. Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4+ and CD8+ dendritic cells. *Immunology.* 2008; 123: 447-55.

- 24 Chua BY, Eriksson EM, Poole DP, Zeng W, Jackson DC. Dendritic cell acquisition of epitope cargo mediated by simple cationic peptide structures. *Peptides*. 2008; 29: 881-90.
- 25 Sabado RL, Babcock E, Kavanagh DG, Tjomsland V, Walker BD, Lifson JD *et al.* Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1752-63.

Figure 1

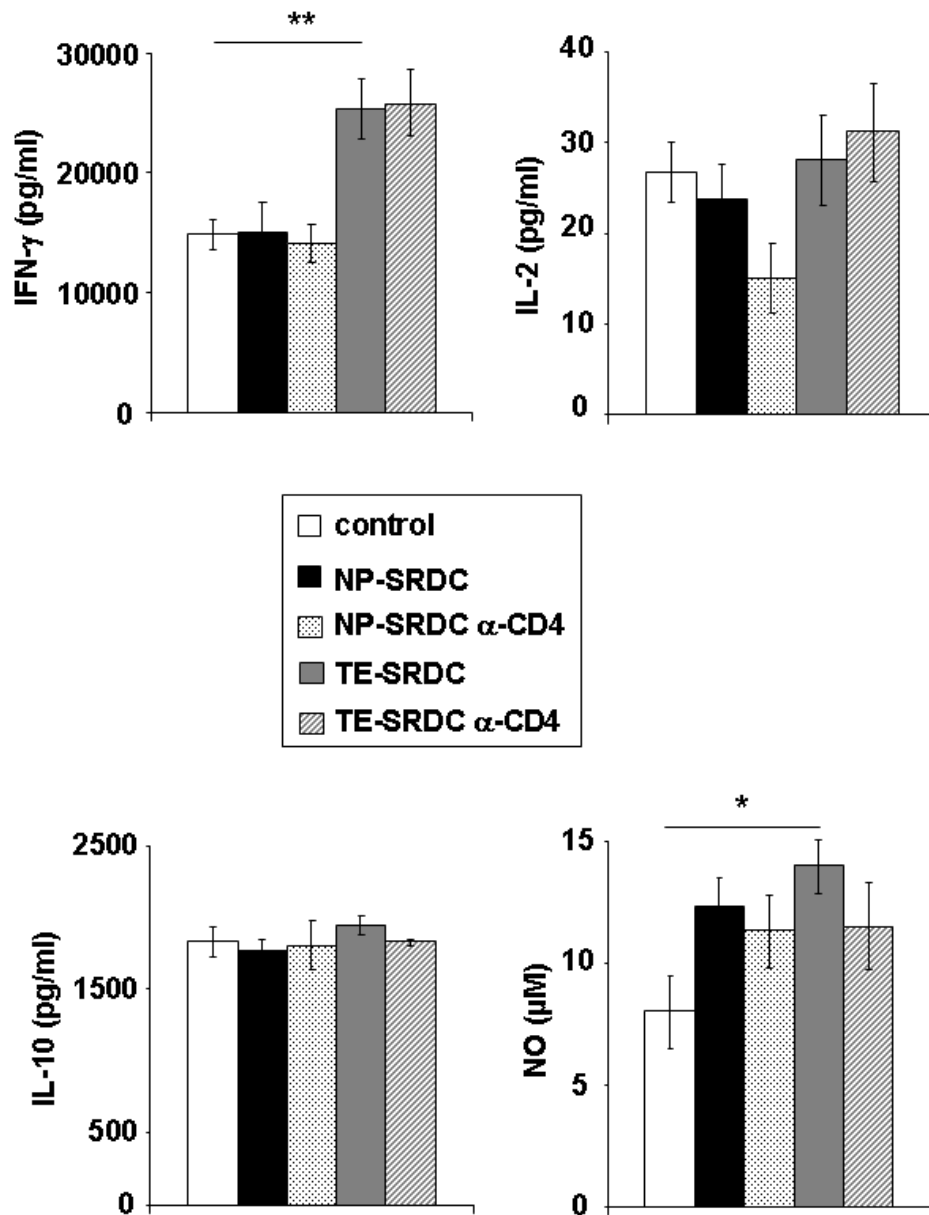


Fig. 1. Post-infection cellular response in spleen following CD4+ depletion.

CBA/J mice were immunized twice with DCs pulsed (TE-SRDC) or not (NP-SRDC) with *T. gondii* extract (TE). Fifteen days post-immunization, mice were depleted with a monoclonal antibody (α -CD4) or not and were all orally challenged with 80 cysts from the 76K strain of *T. gondii*. Control mice were only infected. One month after oral challenge mice were killed. Spleen cells were cultured in the presence of *T. gondii* extract ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and supernatants were collected between 24 and 96 h to determine cytokine levels (IL-4 and NO at 24 h, IL-2 at 48 h, IL-10 at 72 h and IFN- γ at 96 h). These results are representative of three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 2

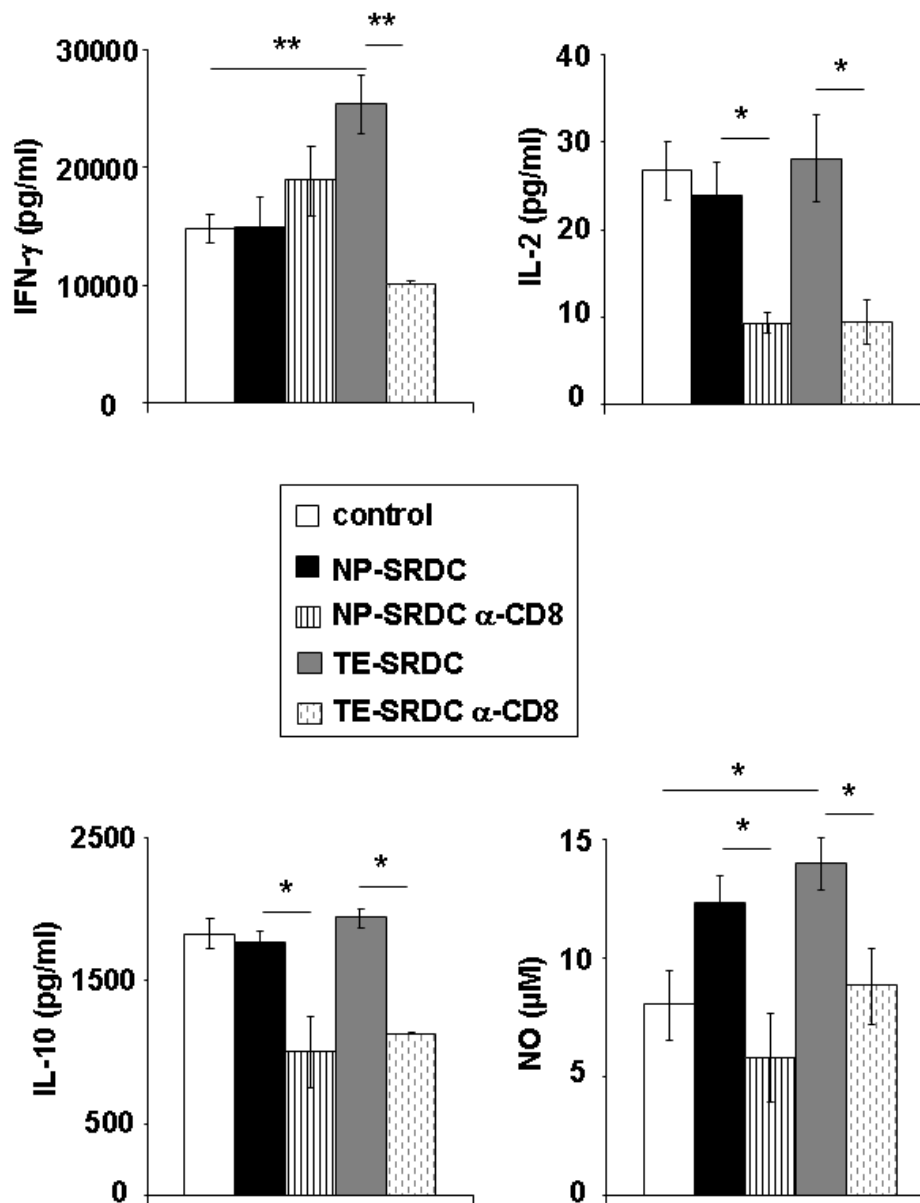


Fig. 2. Post-infection cellular response in spleen following CD8+ depletion.

CBA/J mice were immunized twice with DCs pulsed (TE-SRDC) or not (NP-SRDC) with *T. gondii* extract (TE). Fifteen days post-immunization, mice were depleted with a monoclonal antibody (α -CD8) or not and were all orally challenged with 80 cysts from the 76K strain of *T. gondii*. Control mice were only infected. One month after oral challenge mice were killed. Spleen cells were cultured in the presence of parasite extract ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and supernatants were collected between 24 and 96 h to determine cytokine levels (IL-4 and NO at 24 h, IL-2 at 48 h, IL-10 at 72 h and IFN- γ at 96 h). Results shown are representative of three independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01).

Figure 3

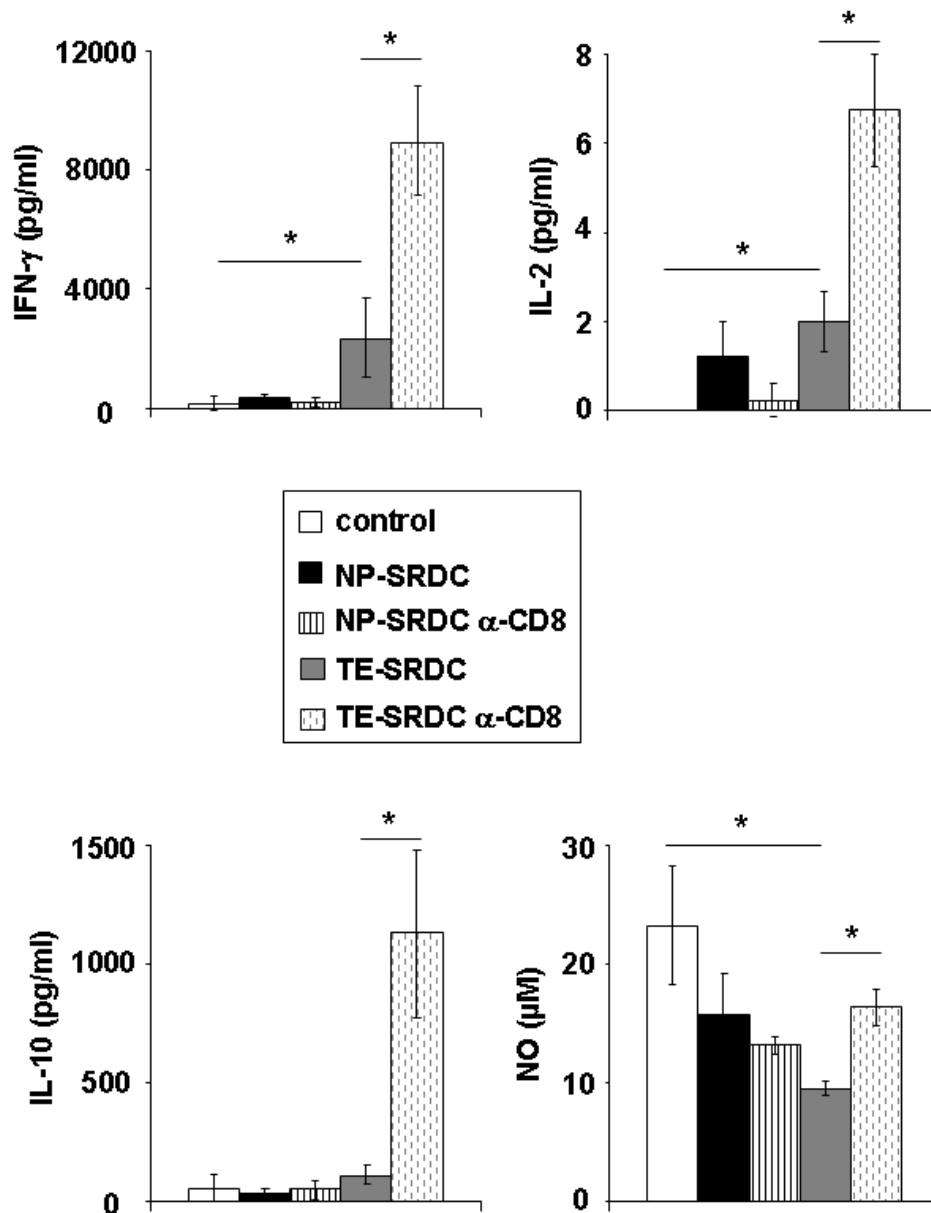


Fig. 3. Post-infection cellular response in MLNs following CD8+ depletion.

CBA/J mice were immunized twice with DCs pulsed (TE-SRDC) or not (NP-SRDC) with *T. gondii* extract (TE). Fifteen days post-immunization, mice were depleted with a monoclonal antibody (α -CD8) or not and were all orally challenged with 80 cysts from the 76K strain of *T. gondii*. Control mice were only infected. One month after oral challenge mice were killed. MLN cells were cultured in the presence of parasite extract ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and supernatants were collected between 24 and 96 h to determine cytokine levels (IL-4 and NO at 24 h, IL-2 at 48 h, IL-10 at 72 h and IFN- γ at 96 h). Results shown are representative of three independent experiments (* $p < 0.05$).

Figure 4

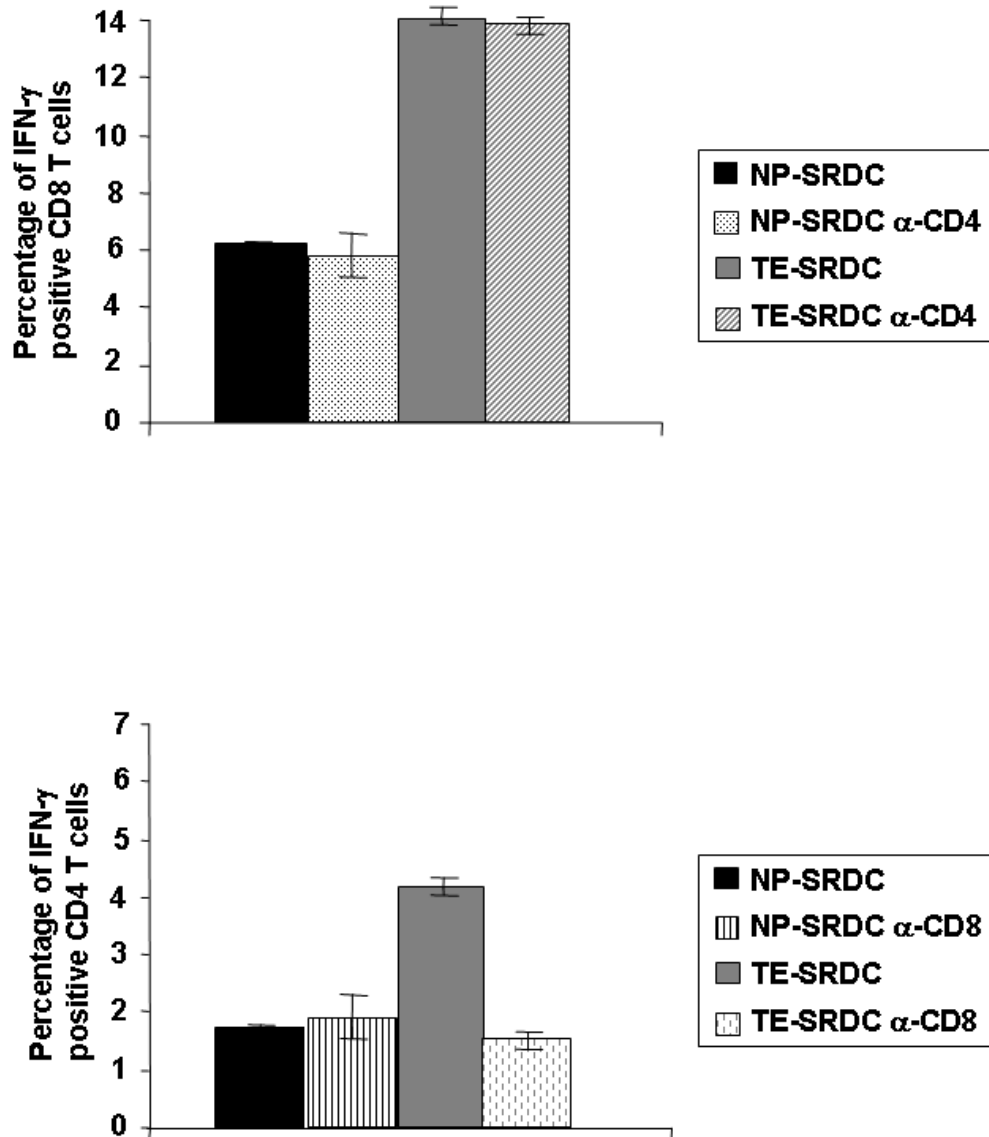


Fig. 4. Intracellular IFN- γ assay.

One month after oral challenge, CD4⁺ and CD8⁺ spleen cells from mice of all groups were separated on microbeads and cocultured with TE-SRDC or NP-SRDC. Secretion of intracellular proteins was blocked using brefelding A. Intracellular IFN- γ was then stained with monoclonal antibodies and cells were analyzed by flow cytometry. Results are presented as percentage of IFN- γ -positive cells cultured with TE-SRDC minus percentage of IFN- γ -positive cells cultured with NP-SRDC \pm SD.

Figure 5

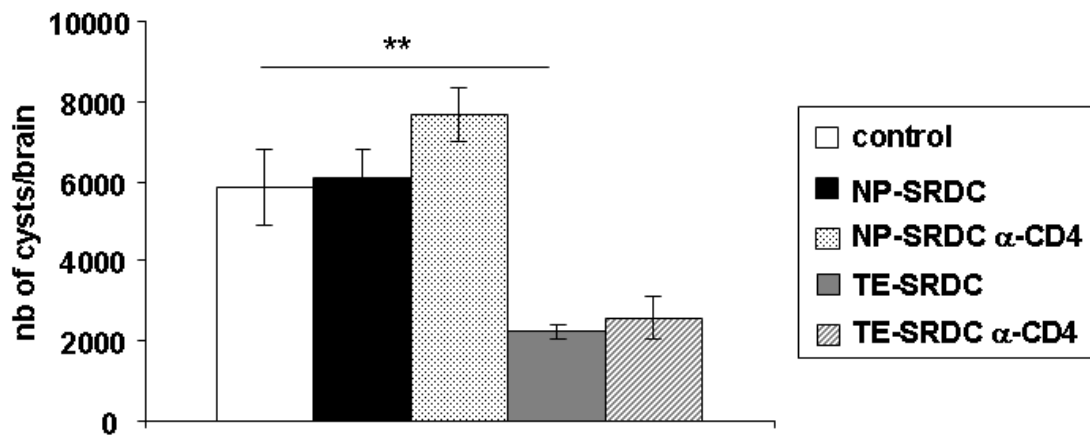


Fig. 5. Post-infection protection in CBA/J mice following CD4+ depletion.

Protection was evaluated by mouse brain cyst load one month after oral challenge. Results presented are mean number of cysts \pm standard deviation (** $p < 0.01$).

Figure 6

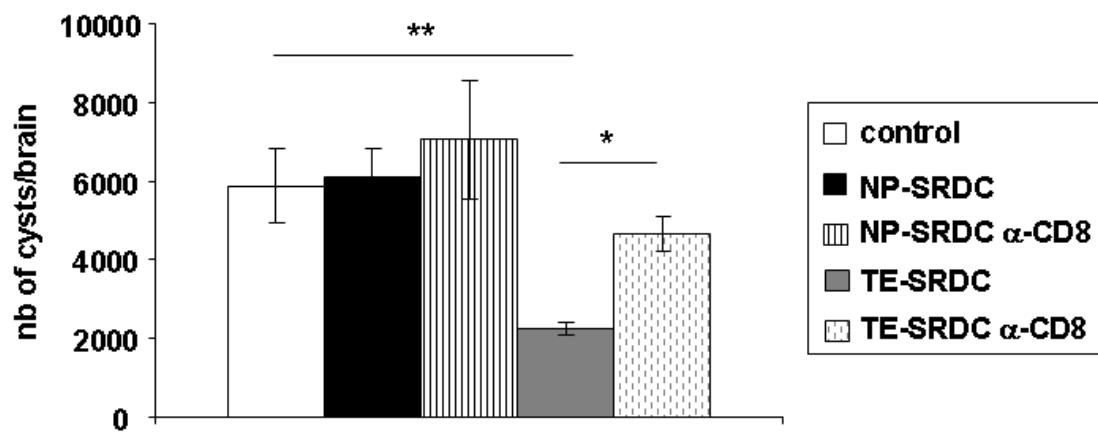


Fig. 6. Post-infection protection in CBA/J mice following CD8+ depletion.

Protection was evaluated by mouse brain cyst load one month after oral challenge. Results presented are mean number of cysts \pm standard deviation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

ARTICLE 2

IL-17 increases inflammation and reduces protection upon experimental infection with *Toxoplasma gondii*: implication of IL-17R in *Toxoplasma gondii* infection

Introduction

La réponse innée mise en place suite à une infection par *Toxoplasma gondii* est caractérisée par un recrutement rapide de neutrophiles au site d'infection. Cette population cellulaire sécrète de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-12 et le TNF- α . La déplétion des neutrophiles suite à une infection toxoplasmique induit le développement de lésions dans de nombreux organes ainsi qu'une augmentation de leur charge parasitaire. D'autres chimiokines sécrétées par les neutrophiles sont de puissants attractants de cellules dendritiques immatures, facilitant ainsi la mise en place d'une réponse adaptative Th1 efficace.

Le recrutement des neutrophiles se fait grâce à l'IL-17, un puissant médiateur pro-inflammatoire. Le récepteur de cette cytokine, l'IL-17R, exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, est à l'origine d'une voie de signalisation qui reste encore à établir clairement. Le rôle de l'IL-17 et de son récepteur a été très étudié dans le cadre de maladies auto-immunes, comme la maladie de Crohn, ou d'infections par divers pathogènes, comme l'helminthe *Schistosoma mansoni*. Dans la majorité des pathologies étudiées, la cytokine présente des effets délétères pour l'hôte. Malgré ces nombreuses implications, le rôle de l'IL-17 au cours de l'infection par *T. gondii* reste peu décrite.

Objectifs

- déterminer le rôle de l'IL-17 dans la mise en place de la réponse immune anti-toxoplasmique au cours de la phase aiguë et dans la protection des souris au cours de la phase chronique de l'infection

Méthodes

- infection *per os* de souris C57BL/6 déficientes (IL-17R^{-/-}) ou non (WT) en IL-17R avec des kystes de la souche 76K de *T. gondii*
- suivi du poids et de la mortalité des souris
- observations macroscopique et microscopique des organes cibles du parasite en phase aiguë de l'infection
- évaluation de la réponse humorale en phases aiguë et chronique
- évaluation de la réponse cytokinique en phase aiguë
- évaluation de la protection des souris en phase chronique

Résultats

- les souris IL-17R^{-/-} survivent à l'infection, tout en présentant moins de dommages tissulaires que les souris WT
- les souris IL-17R^{-/-} ont une réponse humorale inférieure à celle des souris WT en phase aiguë (IgM), situation qui s'inverse en phase chronique (IgG)
- les souris IL-17R^{-/-} ont une meilleure réponse cytokinique (Th1 et Th2) que les souris WT
- les souris IL-17R^{-/-} sont plus protégées que les souris WT lors de la phase chronique de l'infection

Conclusion

L'IL-17 est impliqué dans l'induction de la réponse inflammatoire délétère chez les souris C57BL/6, suite à une infection par *T. gondii*.

Article actuellement **soumis** dans Infection and Immunity

IL-17 increases inflammation and reduces protection upon experimental infection with *Toxoplasma gondii*: implication of IL-17R in *Toxoplasma gondii* infection

Rachel Guiton^a, Virginie Vasseur^b, Bernhard Ryffel^b, Isabelle Dimier-Poisson^{a*}

^aUMR 0483 Université-INRA Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies anti-infectieuses, Université François Rabelais, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

^bUMR 6218 Université-CNRS Immunologie et Embryologie Moléculaire, Institut de Transgénose, 3B rue de la Férollerie 45071 Orléans, France.

*Corresponding author, Tel: +33 2 47 36 71 83, Fax: +33 2 47 36 72 52
Email address: dimier@univ-tours.fr

Abstract

Th17 cells are involved in host defense to several pathogens. Here we investigated the role of IL-17 in the host resistance to oral *T. gondii* infection. Using IL-17R deficient mice we demonstrate reduced ileitis with diminished neutrophil recruitment and inflammatory lesions in the ileum, in the regional lymph node and in the liver at day 7 and prolonged survival upon *T. gondii* infection. Reduced inflammation was associated with augmented IFN γ serum levels, enhanced production of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and MCP-1 upon antigen restimulation from cultured splenocytes. Finally, the surviving mice had reduced number of cysts in the brain. Therefore, IL-17 induced upon *T. gondii* infection contributes to the inflammatory pathology and IL-17 neutralization therapy might attenuate inflammation.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an opportunistic parasite with a worldwide distribution. It triggers an innate immune response characterized by a rapid recruitment of neutrophils to the site of infection before a strong Th1 protective response settles. This cell population secretes several proinflammatory cytokines, including IL-12 and TNF- α , important to develop an efficient Th1 protective response. In this way, neutrophils are complementary to dendritic cells and macrophages, the two other populations known to synthesize IL-12 early after the infection.¹ Bliss *et al.* showed that neutrophil depletion at the time of *T. gondii* infection led to development of lesions in multiple organs and was associated with an impaired ability to produce early IFN- γ , TNF- α and IL-12 and an increased parasite burden.² Parasite-triggered neutrophils also release chemokines that display potent chemotactic activity for immature bone marrow-derived dendritic cells, further promoting the Th1-inducing properties of these cells.¹ Thus neutrophils appear to be decisive cells in early *T. gondii* infection.

IL-17 is the major cytokine for neutrophil recruitment following infection and is a potent proinflammatory mediator. Its receptor, IL-17R, is ubiquitously expressed. Murine IL-17 signals through a complex consisting of at least two IL-17R subunits, which are preassembled in the membrane in the absence of ligand.³ Stimulation of IL-17R with IL-17 induces a physical separation of the cytoplasmic domains, leading to the activation of various transcription factors expression including NF- κ B or AP-1.⁴ However, the exact signaling pathway is still unknown. A recent work suggests a model in which IL-17R interacts with Act 1 to recruit TRAF6, leading to the degradation of I κ B α and subsequent IL-17-dependent activation of NF- κ B.⁴

The implication of IL-17R during *T. gondii* infection lacks understanding. We conducted a study on IL-17R deficient mice on C57BL/6 background orally infected with low doses of

76K strain cysts. Our results show that mice lacking IL-17R are more resistant to *T. gondii* infection, present less inflammation, tissue damage, produce more cytokines and are partially protected as compared to C57BL/6 WT mice, suggesting that IL-17 has a detrimental role on *T. gondii* infection.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents for cell culture were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and Sigma-Aldrich (St-Louis, USA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reagents and recombinant cytokines were from BD Pharmingen (San Diego, USA), unless otherwise stated.

2.2. Mice

IL-17R deficient mice (IL-17R ^{-/-}) were obtained from Jay K. Kolls (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA).⁵ C57BL/6 control mice (WT) were purchased from Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA or from Janvier, France. Adult males of 20-25g and 10-12 weeks old were used in this study. All mice were bred under specific-pathogen-free conditions at the Transgenose Institute (CNRS, Orléans, France). The animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

2.3. Parasites and *T. gondii* extract

Tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* were harvested from infected monolayers of human foreskin fibroblasts Hs 27 (ATCC CRL-1634) and were used as source of *T. gondii* extract (TE).⁶

Cysts of the 76K strain of *T. gondii* were obtained from brains of CBA/J mice that had been orally infected with 80 cysts one month earlier.

2.4. Infections and humoral response

C57BL/6 mice were orally infected with 15 or 30 cysts of the 76K strain obtained as described above. IgM or total IgG with IgG1 and IgG2a subtypes were tested, 10 or 30 days later respectively, thanks to an ELISA on sera from blood harvested at the retro-orbital sinus level. 96-well plates were coated with $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of TE and incubated overnight at 4°C . Wells were then saturated with 4% bovine serum albumin in PBS-Tween 0.05% for 1 h 30 at 37°C . Serial dilutions (1:50, 1:100 and 1:200 for IgGs and 1:100 to 1:3200 for IgM) were then plated and incubated for 1 h at 37°C . Bound antibodies were detected by addition of an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgM (1:10000, Sigma, A-9688) or IgG (1:5000, Sigma, A-3438), or of a horseradish peroxidase-conjugated rat anti-mouse IgG1 or IgG2a (1:1000, BD Biosciences, 559626 and 553391) for 1 h 30 at 37°C , and revealed by a p-nitrophenyl phosphate-containing substrate solution (Sigma, N-9389) or by a TMB substrate solution (Sigma, T-8665) for 20 min at room temperature. Absorbance was measured at 405 nm on a Wallac 1420 multilabel counter.

2.5. Antigen-induced cytokine production in culture

Spleens and mesenteric lymph nodes (MLNs) were harvested 10 days after the infection and pressed through a stainless steel mesh. Single-cell suspensions were obtained by filtration through nylon mesh to remove tissue debris. Spleen erythrocytes were lysed by hypotonic shock, and spleen and MLN cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, HEPES (25 mM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), β -mercaptoethanol (5×10^{-5} M) and penicillin ($50 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$)/streptomycin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Spleen and MLN cells were cultured in 24-well plates at 10^6 cells per well in 1 ml of culture medium, alone or containing TE ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The plates were incubated for 4 days in 5% CO_2 at 37°C . Cell culture supernatants were harvested between 24 h and 4 days and kept at -20°C until cytokine assays.

2.6. Cytokine and nitric oxide concentration measurement

Spleen and MLN cell supernatants were tested for IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , MCP-1, TNF- α and nitric oxide (NO) activities. Cytokine productions were evaluated using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Concentrations were determined by reference to standard curves constructed with known amounts of mouse recombinant IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , MCP-1, TNF- α . The sensitivity limits for the assays were 3.1 pg.ml⁻¹ for IL-2, 7.8 pg.ml⁻¹ for IL-4, 15.6 pg.ml⁻¹ for MCP-1 and TNF- α , 31.3 pg.ml⁻¹ for IL-10 and IFN- γ and 62.5 pg.ml⁻¹ for IL-12.

The nitric oxide production was evaluated using the Griess method.⁷ Briefly, Griess reagents (sulfanamide 1% and naphthylethylenediamine 0.1%, ratio 1:1) (Sigma) are added to the culture supernatants. The absorbance was measured at 540 nm. The nitric oxide concentration was determined thanks to a standard curve established with a 20 nM sodium nitrite solution. The sensitivity limit was 2 μ M.

2.7. Macroscopic and microscopic investigations of the organs

Proximal ileum, mesenteric lymph node, liver, spleen and brain were collected 10 days after the infection, macroscopically observed to identify major alterations, fixed in 4% buffered formaldehyde and processed under standard conditions. Tissue sections (3 μ m) were stained with haematoxylin and eosin and analysed semi-quantitatively for inflammation and other alterations using a semi-quantitative score (0-5) as described before.⁸

2.8. Cyst counts in the brain

Brains were harvested 40 days after infection and homogenized in 5 mL of RPMI 1640 with a pestle and mortar. The cysts in each brain homogenate were counted under a microscope (10 counts, each on 10 μ l). The results are expressed as means \pm SEM for each group.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test (InStat 2.01 software) to analyze the observed differences in cytokine and Ig productions and cyst counts. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Survival of mice

To determine the implication of IL-17R in host resistance WT and IL-17R *-/-* mice were infected with 15 or 30 cysts of *T. gondii*. Clinical signs, weight and survival of mice were studied for 7 weeks following the low dose infection and for 3 weeks following the high dose infection. At the lower dose of infection (Fig. 1A and 1B) no difference was seen between WT and IL-17R *-/-* mice until day 9 post-infection, both groups underwent similar loss of weight (81% of initial weight for WT mice versus 84% for KO mice). On day 10 post-infection, 30% of WT mice were dead. At the end of the experiment and before sacrifice, we observed 100% survival for IL-17R *-/-* mice and 70% for WT mice. This difference in survival could not be explained by different weight averages between the two phenotypes (80% of initial weight for WT mice; 86% for KO mice).

At the higher oral infectious dose of 30 cysts (Fig. 1C and 1D), WT mice rapidly lost body weight with 100% of the mice dying within 8 days, while the IL-17R *-/-* mice survived longer, 30 % of them surviving the experimental period. Thus the data suggest that endogenous IL-17 may have a detrimental role in infection, as IL-17R *-/-* mice display a partial protection of the clinical signs including survival upon *T. gondii* infection.

3.2. Reduced ileitis and organ alterations in the absence of IL-17R signaling

Then we investigated whether the injury of the common target organs of *T. gondii* infection is attenuated in the absence of IL-17R signaling. First, macroscopically, WT mice at 7 days after

infection with 30 cysts of *T. gondii* presented distinct signs of ileitis with enlargement and distension of the ileum as compared to IL-17R ^{-/-} mice (Fig. 2A). Microscopic examinations of the ileum revealed erosions and ulcers of the epithelium of the vili with infiltration of mononuclear cells in the lamina propria in C57BL/6 WT mice. By contrast, IL-17R ^{-/-} mice exhibited little epithelial damage or cellular infiltration upon *T. gondii* infection. The liver showed multiple focal lesions which clearly were more pronounced in WT than in IL-17R ^{-/-} mice (Fig. 2B). Microscopic examinations of livers from WT mice revealed focal inflammation, characterized by mononuclear cell and neutrophil recruitment, single cell necrosis thrombotic lesions in the portal areas. These changes were less pronounced in the liver of IL-17R ^{-/-} mice. The WT spleen appears enlarged, granular and half-sized when compared to the IL-17R^{-/-} spleen (Fig. 2C). Microscopically, WT spleens showed congestion in the red pulp and lymphocyte depletion in the white pulp while these changes were less prominent in the IL-17R ^{-/-} mice (Fig. 2C, right panel). The mesenteric lymph nodes examination from WT mice revealed an increased size (Fig. 2D) and an effacement and destruction of follicles associated with necrosis while the inflammatory response was less severe in IL-17R ^{-/-} mice.

The data suggest that IL-17R signaling augments inflammatory pathology and reduces survival to the acute phase of *T. gondii* infection.

3.3. Heightened IgG antibody response in the absence of IL-17R

Ten days post-infection, mice infected with 15 cysts were tested for antigenic specific serum IgM by ELISA (Fig. 3, upper panel). IL-17R KO mice showed significantly lower IgM level than WT mice as revealed by ODs (0.205 and 0.627, respectively; $p < 0.05$).

By 30 days post-infection KO mice showed significantly more IgG than WT mice (lower left panel) (0.964 and 0.729, respectively; $p < 0.05$). We then tested IgG subtypes to determine the immune response orientation. We could not detect IgG1 in the sera (data not shown). IgG2a

(lower right panel) were significantly more present in sera from IL-17R KO mice than in sera from WT mice (1.2 and 0.514, respectively; $p < 0.05$). Thus, although IL-17R deficient mice showed less IgM than WT mice, they finally displayed a significant increase of antigen specific IgG2a, which indicates a Th1 orientation of the humoral response.

3.4. Increased cytokine production in the absence of IL-17R signaling

To explain the higher survival rate of IL-17R KO mice we next studied cytokine secretion in serum, spleens and mesenteric lymph nodes (MLNs) during the acute phase of infection (Fig. 4). Ten days post-infection, spleens and MLNs were harvested and single-cell suspensions were cultured without or with *T. gondii* extract. Supernatants were collected from 24h to 96h to test Th1 and Th2 cytokines secretion, as well as IL-12, MCP-1 and TNF- α .

IFN- γ serum levels were significantly higher in IL-17R KO mice (32,163 pg/ml and 15,918 pg/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4A), and IFN- γ production was significantly increased by cultured splenocytes in KO mice (325 pg/ml) compared to WT mice (123 pg/ml) (Fig. 4B). The same profile was seen for IL-2 production (Fig. 4C) (12 pg/ml for KO mice and 3 pg/ml for WT mice; $p < 0.05$).

Th2 cytokine profiles were also higher in KO mice than in WT mice. IL-10 secretion in splenocytes (Fig. 4D) was 31 pg/ml for WT mice and 111 pg/ml for KO mice ($p < 0.05$). IL-4 production (Fig. 4E) reached 3 pg/ml in WT mice, that is below the sensitivity limit, and 17 pg/ml in KO mice but the difference was not significant.

MCP-1 secretion (Fig. 4F) was also higher in KO mice but not significantly different from the WT mice level (638 and 225 pg/ml, respectively).

IL-12 as well as TNF- α could not be detected in supernatants from spleen and MLN cells (data not shown).

In MLNs the results were not significantly different between the two phenotypes but they tend to show the same profile as in spleens (data not shown).

Our results indicate that IL-17R KO mice display a more efficient response than WT mice, in spleen and in MLNs, and that this response would have a Th1 profile controlled by a Th2 one.

3.5. Reduced cysts in the brain of IL-17R KO mice

Fourty days after *T. gondii* infection, that is during the chronic phase of the disease, surviving mice were killed and their brains were collected. Respective brain cyst loads were evaluated in brain homogenates (Fig. 5). IL-17R KO mice have significantly fewer cysts than WT mice (5245 and 2285 cysts per brain, respectively). These results imply that IL-17R also plays a role in the protection of long term-infected C57BL/6 mice.

4. Discussion

IL-17, a potent proinflammatory cytokine, has first been implicated in autoimmunity and its role in various infectious diseases is emerging. Using IL-17R-deficient mice we studied this signaling pathway during a parasitic infection with *T. gondii*. Infection with low doses of parasites resulted in reduced ileitis and inflammatory lesions in the ileum of IL-17R-deficient mice, suggesting that IL-17 plays an important role in the setting of intestinal inflammation. Similar results were observed in patients with Crohn's disease or ulcerative colitis. Colorectal tissue samples of these patients showed inflamed mucosa associated with IL-17 expression by T cells and macrophages, both absent from normal individuals. An increased IL-17 expression was also detected in sera from patients with inflammatory bowel disease.⁹ We showed reduced inflammation in the liver of IL-17R-deficient mice. The crucial role of this cytokine in parasitic infection-induced hepatic granuloma inflammation has already been observed. Indeed, the infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni* causes hepatointestinal granuloma formation mediated by CD4 T cells specific for egg antigens. As for *T. gondii*, high pathology is genetically determined and linked with an excessive Th1 response. A recent study pointed to IL-17 as the CD4 T cell-derived cytokine most directly associated with the

severity of hepatic granulomatous inflammation, indicating that an IL-17-producing T cell, probably driven by IL-23, is a major force behind severe pathology in schistosomiasis.¹⁰

We found that IL-17R-deficient mice had a prolonged survival compared to parental mice. This totally contrasts with the only previous work on the relationship between IL-17 and *T. gondii*.¹¹ Using the same infection doses and mouse strain they found that IL-17R-deficient mice had increased mortality while parental C57BL/6 mice, known to be highly susceptible to *T. gondii* infection, survived with 15 cysts. This survival was associated with low parasite burden in organs, close to that observed in non infected controls, suggesting that parental mice were able to resolve the low dose infection. Consistent with our results they showed that IL-17R-deficient mice had less severe tissue damage, particularly in the liver and small intestine. These findings were correlated with reduced polymorphonuclear cells recruitment in liver and intestine, reduced neutrophil recruitment in peritoneal cavity and normal antigen-specific T cell immunity.¹¹ As shown by increased IgGs, IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 levels in sera and/or in restimulated splenocyte supernatants, we also concluded that absence of IL-17R did not alter the *T. gondii*-specific response.

Moreover, although we observed an increased MCP-1 production in spleen of IL-17R-deficient mice, they did not show increased tissue damage. This could be explained by the fact that MCP-1 is a potent chemoattractant for T cells and NK cells but not for neutrophils, suggesting that Th1 and Th2 cytokines were normally secreted while the setting of an overwhelming inflammation remained impossible due to the lack of infiltrating neutrophils. MCP-1 production was not assessed in liver and intestine in IL-17R-deficient mice but the macroscopic and microscopic observations showed less neutrophil infiltration in these organs, which suggests an important secretion of MCP-1 or of a closely related chemokine.

Thus in this study we showed that IL-17 plays a major role in the setting of strong inflammation following *T. gondii* infection, potentially implicated in inducing of uncontrolled lethal response in C57BL/6 susceptible mice.

Our results also suggest that IL-17 could be important in resistance to the chronic phase of infection given that IL-17R-deficient mice had decreased brain cysts compared to parental mice. IL-17 has already been implicated in a brain pathology, experimental autoimmune encephalomyelitis, the murine model of human multiple sclerosis. Its pathology is characterized by inflammation of central nervous system associated with demyelination and the infiltration of inflammatory cells including neutrophils and antigen-specific CD4+ T cells. In multiple sclerosis patients, IL-17 mRNA and protein are increased in both brain lesions and mononuclear cells isolated from blood and cerebrospinal fluids. A recent study on the experimental autoimmune encephalomyelitis revealed that the onset was delayed in IL-17-deficient mice and that these mice had less severe histological changes and early recovery. The authors demonstrated that IL-17 is secreted by CD4+ T cells and is important in the activation of antigen-specific T cells.¹²

Given the crucial implication of IL-17 in the induction of tissue damage and increased mortality following *T. gondii* infection, it would be of interest to target this cytokine *in vivo* as an efficient treatment to moderate the deleterious effect of IL-17 expression.

IL-17 direct or indirect targeting has already been tested in several autoimmune pathologies where IL-17, as in *T. gondii* infection, has a detrimental role. The use of a monoclonal antibody directed against IL-17 before the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis resulted in attenuated clinical course of the disease. Injection of a soluble IL-17R-Fc fusion protein to neutralize circulating IL-17 after onset of symptoms also showed improvement of clinical symptoms.¹³ Immunization of mice with virus-like particles conjugated with recombinant IL-17 is another efficient strategy. Their use induced lower

incidence of disease, slower progression to disease and reduced severity in both collagen-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis.¹⁴ An indirect targeting of IL-17 activity can be accomplished by the neutralization of IL-23. Indeed, this cytokine is essential for the development of IL-17-producing T cells. Efficacy of such strategy has already been proven in an experimental model of colitis in mice. The injection of a monoclonal antibody to the p19 subunit of IL-23 prevented and treated active colitis by down-regulating several inflammatory cytokines and chemokines in the colon. Moreover, this monoclonal antibody induced apoptosis in pathogenic Th17 cells.¹⁵

References

1. **Bennouna, S., S. K. Bliss, T. J. Curiel, and E. Y. Denkers.** 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* **171**:6052-6058.
2. **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.
3. **Kramer, J. M., W. Hanel, F. Shen, N. Isik, J. P. Malone, A. Maitra, W. Sigurdson, D. Swart, J. Tocker, T. Jin, and S. L. Gaffen.** 2007. Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J. Immunol.* **179**:6379-6383.
4. **Shen, F., and S. L. Gaffen.** 2008. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine.* **41**:92-104.
5. **Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Shurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls.** 2001. Requirement of interleukin 17

- receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**:519-527.
6. **Dimier-Poisson, I., F. Aline, M.-N. Mévélec, C. Beauvillain, D. Buzoni-Gatel, and D. Bout.** 2003. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun.* **71**:5254-5265.
 7. **Langermans, J.A.M., M.E.B. Van Der Hulst, P.H. Nibbering, P.S. Hiemstra, L. Fransen, and R. Van Furth.** 1992. IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **148**:568-574.
 8. **Minns, L.A., L. C. Ménard, 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.
 9. **Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama.** 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* **52**:65-70.
 10. **Rutitzky, L.I., J.R. Lopes da Rosa, and M. J. Stadecker.** 2005. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J. Immunol.* **175**:3920-3926.
 11. **Kelly, M.N., J.K.Kolls, K. Happel, J.D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, M. Moretto, I.A. Khan.** 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* **73**:617-621.

12. **Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura.** 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **177**:566-573.
13. **Hofstetter, H.H., S.M. Ibrahim, D. Koczan, N. Kruse, A. Weishaupt, K.V. Toyka, and R. Gold.** 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* **237**:123-130.
14. **Röhn, T.A., G.T. Jennings, M. Hernandez, P. Grest, M. Beck, Y. Zou, M. Kopf, and M.F. Bachmann.** 2006. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **36**:2857-2867.
15. **Elson, C.O., Y. Cong, C.T. Weaver, T.R. Schoeb, T.K. McClanahan, R.B. Fick, and R.A. Kastelein.** 2007. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology.* **132**:2359-2370.

Figure 1

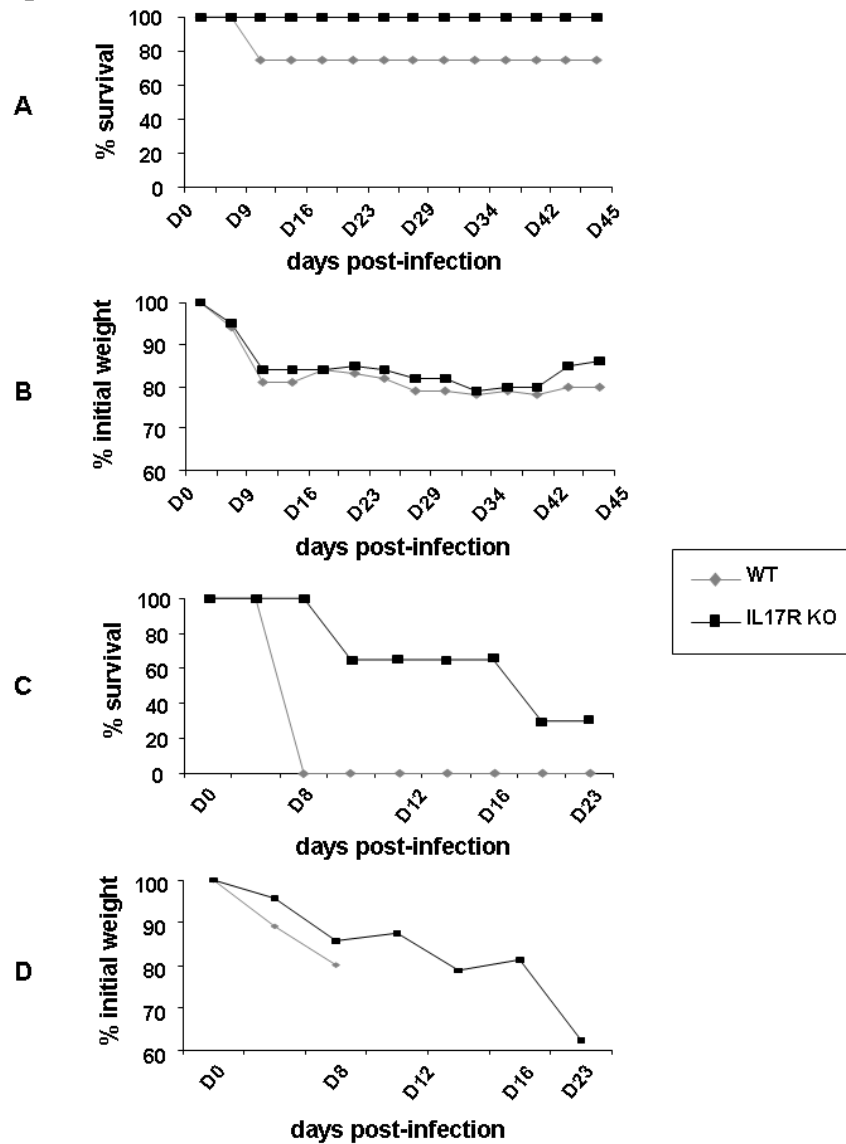


Fig. 1. Survival and loss of weight.

Wild type (WT) and IL-17R deficient (KO) C57BL/6 mice were orally given 15 cysts from the 76K *T. gondii* strain. Mortality (A) and loss of weight (B) were followed up during the course of experimentations. The experiment was repeated with 30 cysts (C and D). Groups of 6 to 11 mice were monitored. This result is representative of three independent experimentations.

Figure 2

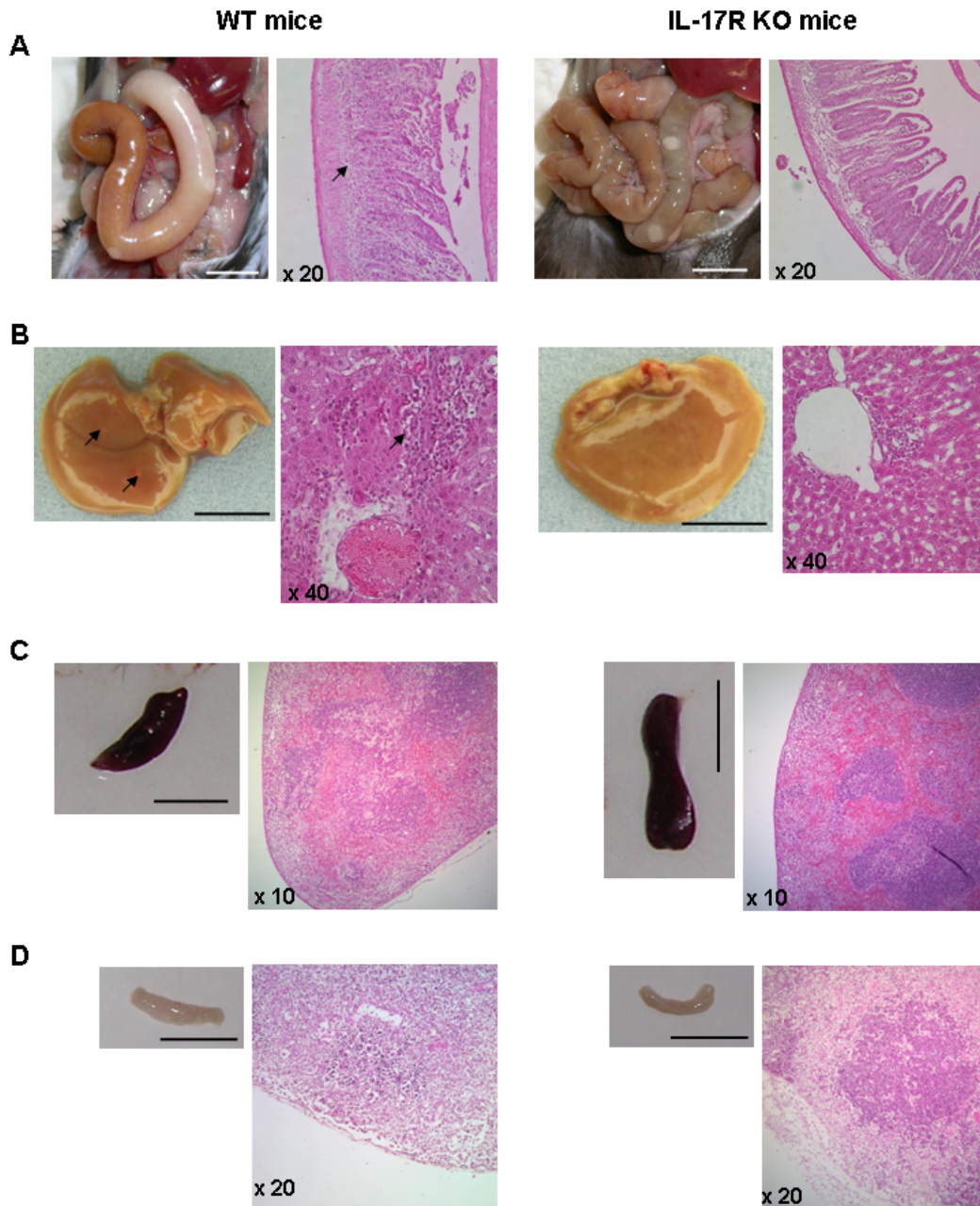


Fig. 2. Anatomohistology of *T. gondii* target organs at 7 days post-infection.

Internal organs of WT and IL-17R ^{-/-} mice were collected during the acute phase of *T. gondii* infection. Macroscopic observations of ileum (A), liver (B), spleen (C) and mesenteric lymph node (D) are aside of the corresponding microscopic observations. Wild type (WT) animals represent the left panel while IL-17R deficient mice (KO) represent the right panel. Tissue lesions in WT liver as well as cellular infiltration in all organs are shown with arrows. Histological studies were conducted on formaldehyde fixed organs which were stained with haematoxylin and eosin. Scale bars represent 1 cm.

Figure 3

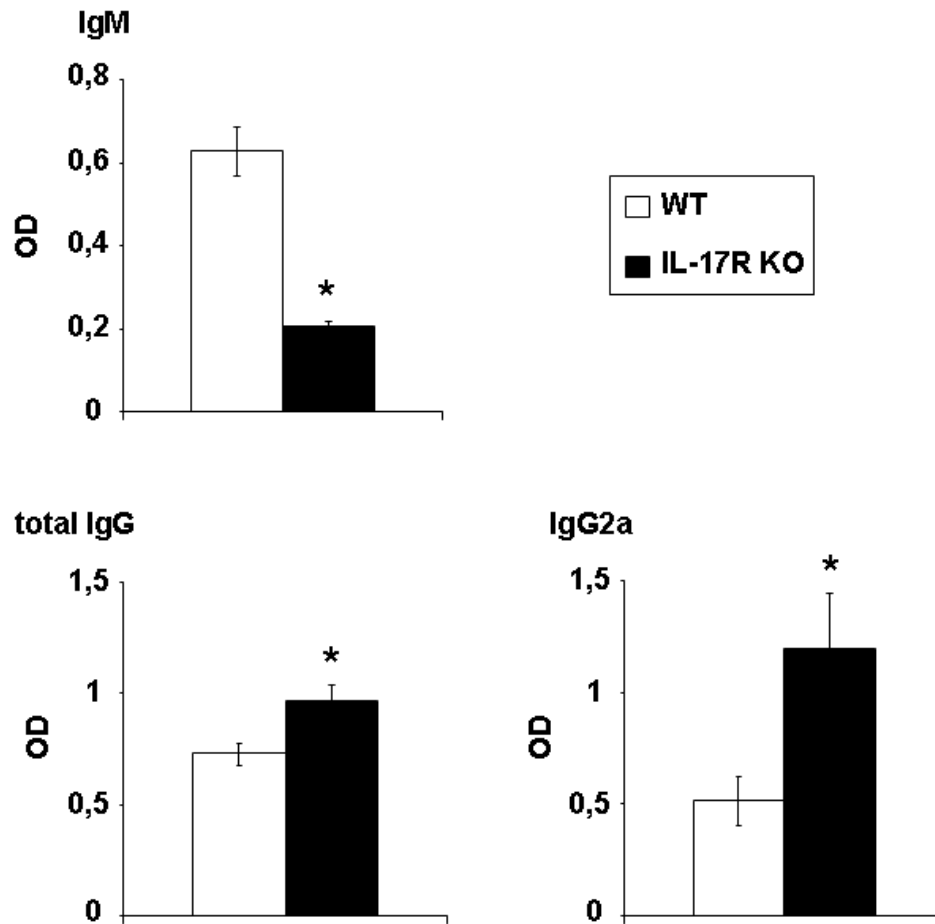


Fig. 3. Humoral response induced by infection.

Ten or thirty days post-infection blood was collected and sera were tested for *T. gondii* extract-specific IgM or IgG and subtypes (IgG1, IgG2a), respectively. Results are expressed as mean ODs \pm SEM for WT (white bars) and IL-17R deficient (black bars) mice.

Figure 4

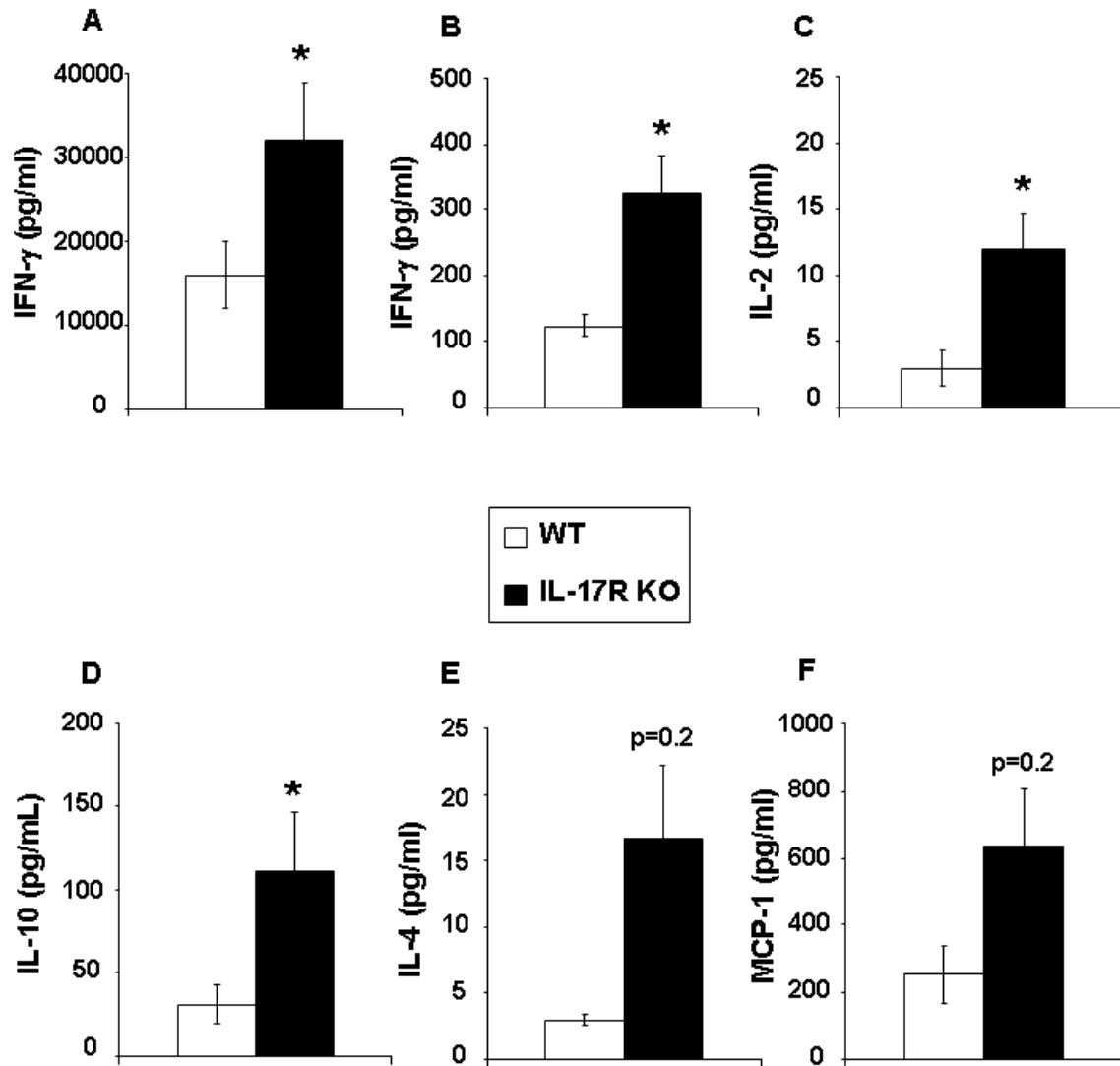


Fig. 4. Cytokine production induced by infection.

Ten days post-infection, blood samples were collected before mice were sacrificed and spleens were harvested. Splenocytes were cultured with *T. gondii* extract (10 μ g/ml) or medium alone. Supernatants were collected between 24 and 96 h to determine cytokine levels (IL-4 and MCP-1 at 24 h, IL-2 at 48 h, IL-10 at 72 h and IFN- γ at 96 h). Cytokine secretion was evaluated in sera (A) or supernatants (B-F) from WT (white bars) and IL-17R deficient mice (black bars) (n=5). Results are presented as means \pm SEM and are representative of three independent experiments. Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney U test (* p < 0.05).

Figure 5

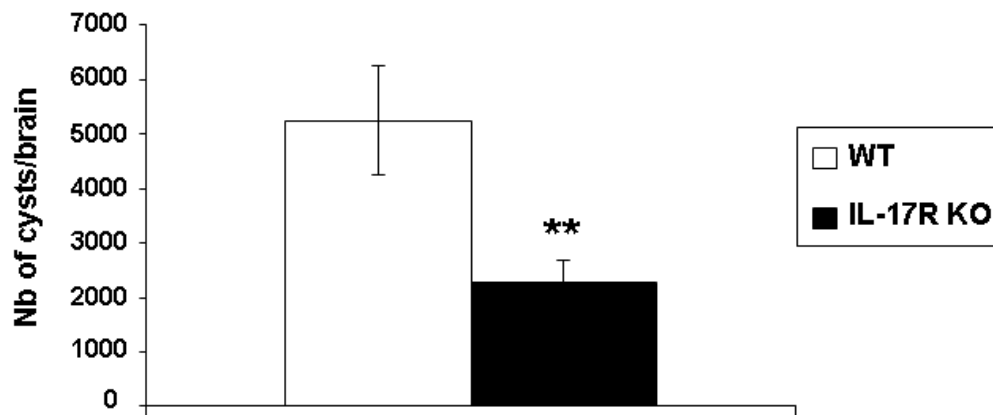


Fig. 5. Reduced parasite load in brains of IL-17R deficient mice.

Forty days post-infection the protection of WT (white bar) and IL-17R KO (black bar) mice was evaluated *via* their brain cyst load. Results are cumulative of three independent experiments (n = 12) and are presented as mean number of cysts ± SEM (** p < 0.01).

ARTICLE 3

MyD88-deficient BALB/c mice succumb to cerebral toxoplasmosis following experimental oral infection

Introduction

La réponse innée contre une infection par *Toxoplasma gondii* est en partie initiée par la reconnaissance du parasite par des récepteurs Toll-like (TLR). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de différents TLR, et plus particulièrement les TLR2, TLR9 et TLR11, dans le contrôle de l'infection toxoplasmique. Cependant, un seul ligand parasitaire a été défini, une protéine « profilin-like », capable de se lier au TLR11. La liaison de la profiline sur le TLR11 induit la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques, une cytokine clé dans l'établissement d'une réponse adaptative Th1 efficace contre *T. gondii*. Cette synthèse d'IL-12 dans les cellules dendritiques est dépendante de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, initiée par la protéine MyD88.

MyD88 est une molécule adaptatrice retrouvée dans la plupart des voies de signalisation des TLR. Cette protéine est composée de deux domaines fonctionnels. L'extrémité amino-terminale comporte un domaine d'interaction, ou domaine de mort, qui recrute des kinases intervenant dans la voie de signalisation. L'extrémité carboxy-terminale est composée d'un domaine TIR (Toll/IL-1 receptor homologous) capable de se lier à la partie intracytoplasmique du TLR.

De nombreuses études utilisant des souris C57BL/6 délétées pour l'adaptateur MyD88 ont montré son importance dans la mise en place d'une réponse efficace contre une infection toxoplasmique. En effet, ces souris meurent en phase aiguë d'une répllication parasitaire incontrôlée due à un défaut de synthèse d'IL-12. En phase chronique, l'expression de MyD88 par les LT est cruciale dans l'induction de la synthèse d'IFN- γ , autre cytokine majeure de résistance, dont l'absence induit des nécroses cérébrales.

Toutes les études réalisées à ce jour ont utilisé des souris C57BL/6, naturellement sensibles à la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*. C'est pourquoi, il nous a paru pertinent d'étudier des souris BALB/c, naturellement résistantes à l'infection et qui s'installent dans la chronicité, mimant ainsi l'infection naturelle survenant chez les hôtes intermédiaires. Ces souris constituent ainsi un meilleur modèle d'étude de la toxoplasmose.

Objectifs

- déterminer le rôle de la protéine adaptatrice MyD88 dans la mise en place de la réponse anti-toxoplasmique en fin de phase aiguë et dans la protection des souris BALB/c naturellement résistantes à la toxoplasmose

Méthodes

- infection *per os* de souris BALB/c déficientes (MyD88^{-/-}) ou non (WT) en MyD88 avec des kystes de la souche 76K de *T. gondii*
- suivi de la mortalité et du poids des souris
- observation macroscopique des organes cibles du parasite en phase aiguë de l'infection
- évaluation de la réponse cytokinique en phase aiguë
- évaluation de la protection des souris en fin de phase aiguë

Résultats

- les souris MyD88^{-/-} succombent rapidement à l'infection
- les souris MyD88^{-/-} présentent de sévères altérations des organes internes (rate, ganglions mésentériques, cerveau)
- les souris MyD88^{-/-} ont une réponse cytokinique Th1 et Th2 très diminuée par rapport à celle des souris WT
- les souris MyD88^{-/-} succombent à une toxoplasmose cérébrale

Conclusion

La molécule adaptatrice MyD88 est essentielle à la mise en place d'une réponse immune protectrice contre la toxoplasmose cérébrale chez les souris BALB/c.

Article en cours de rédaction

MyD88-deficient BALB/c mice succumb to cerebral toxoplasmosis following experimental oral infection

Rachel Guiton^a, Virginie Vasseur^b, Bernhard Ryffel^b, Isabelle Dimier-Poisson^{a*}

^aUMR 0483 Université-INRA Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies anti-infectieuses, Université François Rabelais, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.

^bUMR 6218 Université-CNRS Immunologie et Embryologie Moléculaire, Institut de Transgénose, 3B rue de la Férellerie 45071 Orléans, France.

*Corresponding author, Tel: +33 2 47 36 71 83, Fax: +33 2 47 36 72 52
Email address: dimier@univ-tours.fr

Abstract

The innate immune response to *Toxoplasma gondii* is known to be partially mediated by TLR recognition. MyD88 is a crucial adaptor molecule in most of the TLR signaling pathways. Several studies showed the implication of MyD88 during both the acute and the chronic phase of *T. gondii* infection. However, all works were conducted on C57BL/6 mice, naturally highly susceptible to the acute phase of the disease. Here we used naturally resistant BALB/c mice deficient for MyD88 that were orally infected with *T. gondii* cysts. We demonstrated that MyD88 is essential for the early survival of mice and to limit the alterations of lymphoid organs during the acute phase of infection. This experimental model also allowed us to suggest that MyD88 is implicated in mice resistance to the chronic phase of the disease as MyD88 deficient mice are likely to succumb to a cerebral toxoplasmosis.

1. Introduction

The innate immune response against *Toxoplasma gondii* is partially mediated by Toll-like receptors (TLRs). These receptors, called TLRs, are members of the pattern recognition receptors which are activated *via* ligation of PAMPs (pathogen associated molecular patterns) from bacteria or parasites for example. Numerous studies have demonstrated the implication of various TLRs in the setting of the innate immune response to *T. gondii*. Among them, the TLR2 has been the most studied. As its depletion triggers a Th2 cytokine profile, it has been shown to be critical for the survival of C57BL/6 mice to an avirulent toxoplasmic infection, for the production of nitric oxide and for the control of the early parasite replication.¹ TLR2 is also essential for the CCL2/MCP-1 secretion by neutrophils and for the synthesis of IL-12 and CCL2/MCP-1 by macrophages.² TLR9 is another innate receptor implicated in the response to *T. gondii*. It would have a deleterious effect on the survival of mice, on the intestinal inflammation and on the development of an efficient Th1 response.³ Today, only one parasitic protein, a highly conserved profilin-like protein from Apicomplexa, has been identified as a TLR11 ligand.⁴ This binding induces IL-12 secretion by dendritic cells *via* the activation of the transcription factor NF- κ B. A complementary study has identified an essential adaptor molecule in the TLR11 signaling pathway, that is MyD88. Indeed, the immunogenicity of *T. gondii* profilin is totally dependent on TLR11/MyD88 signaling which augments the profilin capture by dendritic cells and its subsequent presentation to CD4⁺ T lymphocytes, thus leading to an antigen-specific response.⁵

MyD88 (myeloid differentiation factor 88) is an adaptor molecule found in most of the TLR signaling pathways. Many studies showed its implication in the immune responses against *T. gondii* thanks to C57BL/6 mice deficient for MyD88 infected with an avirulent strain. MyD88 was essential for the early production of IL-12, neutrophil recruitment at the site of infection and T lymphocytes IFN- γ production.^{6,7} Moreover, chimeric bone marrow mice showed that

the absence of MyD88 expression on T lymphocytes leads to impaired adaptive responses following *T. gondii* infection.⁸

All the studies were conducted on C57BL/6 mice, known to be naturally susceptible to the acute phase of *T. gondii* infection and to develop a lethal intestinal inflammation. On the contrary, BALB/c mice are naturally resistant to the acute phase of the disease and develop a chronic infection. They thus mimic the natural infection that takes place in intermediate hosts and constitute a much better model than C57BL/6 mice. For the first time, in our study, we showed that BALB/c mice deficient for MyD88 were susceptible to an experimental *T. gondii* infection during the acute phase of the disease. Moreover, we demonstrated that these mice did not succumb to intestinal inflammation but rather died of a cerebral toxoplasmosis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents for cell culture were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and Sigma-Aldrich (St-Louis, USA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reagents and recombinant cytokines were from BD Pharmingen (San Diego, USA), unless otherwise stated.

2.2. Mice

MyD88 deficient mice (MyD88 $-/-$) were kindly provided by Dr B. Ryffel. BALB/c control mice (WT) were purchased from Janvier, France. Adult females of 20-25g were used in this study. All mice were bred under specific-pathogen-free conditions. The animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

2.3. Parasites and *T. gondii* extract

Tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* were harvested from infected monolayers of human foreskin fibroblasts Hs 27 (HFF, ATCC CRL-1634) and were used as source of *T. gondii* extract (TE).⁹

Cysts of the 76K strain of *T. gondii* were obtained from brains of CBA/J mice that had been orally infected with 80 cysts one month earlier.

2.4. Infection and antigen-induced cytokine production in culture

BALB/c mice were orally infected with 80 cysts of the 76K strain obtained as described above.

Spleens and mesenteric lymph nodes (MLNs) were harvested 13 days after the infection and pressed through a stainless steel mesh. Single-cell suspensions were obtained by filtration through nylon mesh to remove tissue debris. Spleen erythrocytes were lysed by hypotonic shock, and spleen and MLN cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, HEPES (25 mM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), β -mercaptoethanol (5×10^{-5} M) and penicillin (50 U.ml⁻¹)/streptomycin (50 μ g.ml⁻¹). Spleen and MLN cells were cultured in 24-well plates at 10^6 cells per well in 1 ml of culture medium, alone or containing TE (10 μ g.ml⁻¹). The plates were incubated for 4 days in 5% CO₂ at 37 °C. Cell culture supernatants were harvested between 24 h and 4 days and kept at -20 °C until cytokine assays.

2.5. Cytokine and nitric oxide concentration measurement

Spleen and MLN cell supernatants were tested for IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ and nitric oxide (NO) activities. Cytokine productions were evaluated using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Concentrations were determined by reference to standard curves constructed with known amounts of mouse recombinant IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ . The sensitivity limits for the assays were 3.1 pg.ml⁻¹ for IL-2, 7.8 pg.ml⁻¹ for IL-4 and 31.3 pg.ml⁻¹ for IL-10 and IFN- γ .

To test the presence of pro- and anti-inflammatory cytokines in brains of infected animals, brains were harvested 13 days after infection and homogenized in 5 mL of RPMI 1640 with a pestle and mortar. Organs were then centrifuged for 5 min at 10 000×g and the supernatants

were tested for the presence of IFN- γ , TNF- α and IL-10 by ELISA as described above. The sensitivity limit was 15.6 pg/ml for TNF- α .

The nitric oxide production was evaluated using the Griess method.^{langermans} Briefly, Griess reagents (sulfanamide 1% and naphthylethylenediamine 0.1%, ratio 1:1) (Sigma) are added to the culture supernatants. The absorbance was measured at 540 nm. The nitric oxide concentration was determined thanks to a standard curve established with a 20 nM sodium nitrite solution. The sensitivity limit was 2 μ M.

2.6. Qualitative assessment of parasite load in infected organs

Following sacrifice, some organs were collected on MyD88 deficient and WT mice: brain, liver, spleen, kidney. These organs were homogenized under sterile conditions. They were then deposited on a monolayer of HFF in 25 cm² flasks. The medium was changed the next day to eliminate dead cells and the flasks were observed daily for the arising of free tachyzoites, intracellular tachyzoites or lysed HFF.

2.7. Cyst counts in the brain

Brains were harvested 17 days after infection on surviving mice and homogenized in 5 mL of RPMI 1640 with a pestle and mortar. The cysts in each brain homogenate were counted under a microscope (10 counts, each on 10 μ l). The results are expressed as means \pm SEM for each group.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test (InStat 2.01 software) to analyze the observed differences in cytokine and Ig productions and cyst counts. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. MyD88 deficient BALB/c mice would have a diminished humoral response to *T. gondii* infection

On day 13 post-infection, the IgG level of both groups was tested in sera. A two-fold decrease could be observed in MyD88 deficient mice (OD 0.371) compared to WT animals (OD 0.794) but the values failed to reach significance threshold of 0.05 (data not shown).

3.2. MyD88 deficient mice succumb to *T. gondii* infection in the early chronic phase of the disease

After WT and MyD88 deficient BALB/c mice infection with 80 cysts of the 76K strain of *T. gondii*, we followed up their loss of weight and survival during 30 days.

Concerning the loss of weight, both groups underwent a similar and regular decrease of their body mass that reached 20 % by day 20 post-infection (Fig. 1A). However only WT mice were able to recover and even regained their initial weight after 30 days of infection.

Eighty percent of WT mice survived until the end of the experiment while MyD88 deficient mice progressively died (Fig. 1B). As soon as 13 days after infection mice began to die, there were only 70 % left on day 16 and all mice were dead at day 21.

These data indicated that MyD88 deficient mice were more sensitive than their parental counterparts.

3.3. Splens from MyD88 deficient mice show impaired morphology and cellular response

Thirteen days after infection three mice from both groups were sacrificed and their spleens were macroscopically observed (Fig. 2A). Spleens from WT animals were remarkably enlarged while spleens from MyD88 deficient mice looked anormally small and thin. This difference was assessed by the number of cells (2.8×10^8 cells for WT and 2.5×10^6 cells for MyD88 deficient spleens) obtained when preparing the restimulation assay. Following *in vitro*

restimulation of splenocytes with *T. gondii* extract, the amount of type I and II cytokines and nitric oxide was tested in the supernatants. Nitric oxide and all cytokines examined showed a dramatic decrease in MyD88 deficient mice compared to their wild type counterparts: 54 and 3404 pg/ml of IFN- γ respectively ($p < 0.001$; Fig. 2B), 1 and 10.1 pg/ml of IL-2 ($p < 0.01$; Fig. 2C), 11 and 278 pg/ml of IL-10 ($p < 0.001$; Fig. 2D) and 0.5 and 8 μ M of NO ($p < 0.01$; Fig. 2E). We could not detect IL-4 in the supernatants of either WT or MyD88 deficient mice. These results suggest an almost total loss of cellular response in the spleens of mice deficient for the MyD88 adaptor molecule.

3.4. Mesenteric lymph nodes from MyD88 deficient mice show impaired morphology and cellular response

Thirteen days post-infection, MLN of the sacrificed mice also underwent macroscopic observation. Contrary to the spleens of WT mice, their MLN appeared to have a classical size and morphology (Fig. 3A). MLN from the MyD88 deficient mice looked very enlarged and granulous. The number of cells could not explain that expansion as both WT and MyD88 deficient MLN had similar number of cells (3.6×10^6 cells for WT and 3×10^6 cells for MyD88 deficient MLN). We next restimulated the MLN cells with *T. gondii* extract and evaluated their cytokine and NO secretion in the culture supernatants. As for the spleens, the IFN- γ and IL-10 secretions were dramatically diminished in MyD88 deficient mice compared the WT animals: 37 and 3059 pg/ml of IFN- γ respectively ($p < 0.05$; Fig. 3B) and 9 and 103 pg/ml of IL-10 ($p < 0.05$; Fig. 3D). IL-2 and NO levels were not significantly different from MyD88 deficient mice and WT mice: 1.8 and 0.8 pg/ml of IL-2 respectively ($p = 0.8$; Fig. 3C) and 0.8 and 0.4 μ M of NO, that is under the sensitivity limit ($p = 0.7$; Fig. 3E). IL-4 could not be detected in the supernatants. So as the spleens, the MLN from MyD88 deficient mice seem unable to mount an efficient cellular response against *T. gondii* infection.

3.5. The particular case of the brain

Observation of infected MyD88 deficient mice presenting signs of neurotoxoplasmosis thirteen days post-infection, that is moving around in a circle with the head tilted to one side (Fig. 4A), retained our attention.

We consequently conducted the macroscopic observation of brains from MyD88 deficient and WT mice (Fig. 4B). The deficient mice seemed to have more irrigated, bloody brains than WT controls. These organs were subsequently homogenized and pro- and anti-inflammatory cytokines were investigated in the supernatants. We could not observe any significant difference between the groups concerning the amount of IL-10 and TNF- α (data not shown). On the other hand, there was a significant decrease of IFN- γ in MyD88 deficient mice compared to WT animals: 509 and 1414 pg/ml respectively (* p <0.05; Fig. 4C). Thus, MyD88 deficient mice would have less inflammation in brains than WT controls.

Finally, we investigated the protection of mice. We sacrificed mice from both groups just before they died, that is at seventeen days post-infection. Their brains were then collected and homogenized so that the cysts could be microscopically counted. We observed a loss of protection in mice deficient for MyD88 compared to the WT controls: 750 and 65 cysts per brain respectively (Fig. 4D). These data miss samples to reach significance but they seem to indicate that the adaptor molecule MyD88 is crucial in the protection of BALB/c mice during the chronic phase of *T. gondii* infection.

3.6. MyD88 deficiency leads to uncontrolled parasite replication

The deposit of homogenized organs on HFF monolayers showed great differences between MyD88 deficient and WT mice (data not shown). Free tachyzoites were seen after as soon as 3 days in flasks containing MyD88 deficient brains. Six days after the deposit, lysed HFF were observed in flasks containing MyD88 deficient kidneys and livers. The onset of lysed cells was delayed to 10 days post-deposit for deficient spleens and for all WT organs.

4. Discussion

MyD88 (myeloid differentiation factor 88) is an adaptor molecule found in most of the TLR signaling pathways. MyD88 protein contains two functional domains: a death domain, also called interaction domain, located at the NH₂-end that recruits kinases to transduce the signal and a TIR (Toll/IL-1 receptor homologous) domain, located at the COOH-end that interacts with the death domain of the upstream TLR.¹⁰

We found that BALB/c mice lacking MyD88 all died within three weeks following an oral infection, contrary to WT mice which all survived. This strongly suggests that MyD88 is crucial for the resistance to the early chronic phase of the disease. In fact, the implication of this protein during the immune response against *T. gondii* has first been shown by Scanga *et al.* Using MyD88 deficient C57BL/6 mice intraperitoneally infected with an avirulent strain of *T. gondii*, they demonstrated that MyD88 was essential for the survival to the acute phase of infection and for the early parasite replication control. Moreover such mice were unable to produce IL-12, a major cytokine in the setting of an efficient Th1 response.⁶ A recent work on C57BL/6 infected *via* the oral route had similar results: MyD88 deficient mice died earlier than wild type mice.⁷ We also observed that absence of MyD88 led to uncontrolled parasite burden in organs (data not shown). Indeed, homogenized spleens, MLNs, livers and brains were incubated on a human fibroblast (HFF cell line) monolayers. All cultures containing organs from MyD88 deficient mice rapidly showed free live tachyzoites which destroyed the monolayer by intensive replication. The onset of free tachyzoites in cultures containing WT organs was obviously delayed and there were much fewer tachyzoites.

Besides the parasite burden, internal organs had major morphological changes. Spleens from MyD88 deficient BALB/c mice were thinner and smaller than the WT ones while the MLNs from MyD88 deficient mice were enlarged and granulous compared to normal WT MLNs. These changes observed in mice lacking MyD88 were associated with impaired cytokine

responses. Indeed, these Th1 and Th2 responses as well as the secretion of nitric oxide were almost completely inhibited in the absence of the adaptor molecule MyD88 in spleens and in MLNs. Such structural destructions and subsequent impaired cytokine responses have already been shown in various infectious models. In another parasitic model, MyD88 $-/-$ C57BL/6 mice infected with *Leishmania major* appear to develop large nonhealing lesions, marked parasitism and a nonprotective Th2 immune response, suggesting the involvement of the adaptor protein in the protective immunity against leishmaniasis.¹¹ Concerning bacterial models, C57BL/6 mice deficient for MyD88 fail to control *Mycobacterium avium* proliferation in lung and liver and die of the infection, contrary to wild type mice that all survive. Moreover, in the deficient infected mice, there is a lack of IFN- γ production by CD4+ T lymphocytes.¹² Another work on *Brucella abortus* showed that C57BL/6 mice lacking MyD88 have a complete abrogation of IFN- γ production by lymph node cells, produce less nitric oxide and fail to develop activated Th1 lymphocytes.¹³

All works previously published were conducted on C57BL/6 mice, which are naturally susceptible mice and die during the acute phase of infection of an intestinal inflammation due to overproduction of IFN- γ . We got interested in BALB/c mice that are naturally resistant and thus mimic the natural infection taking place in the intermediate hosts. In our study, we demonstrated that MyD88 $-/-$ BALB/c mice did not die of an overproduction of IFN- γ at the intestinal level and consequently investigated the possible cause of their death. We reported neurotoxoplasmosis in infected mice lacking the adaptor molecule MyD88 which led us to hypothesize that these mice could develop a lethal cerebral toxoplasmosis. We showed that mice deficient for MyD88 presented a bloody brain compared to WT animals so we determined the presence of pro-inflammatory cytokines and the protection in terms of cyst number. We found that deficient mice had less IFN- γ than WT mice and were less protected as shown by the high number of brain cysts. Moreover, following the incubation of brain

extracts on HFF cells, cultures containing MyD88 deficient brains were the first to present free tachyzoites among all the tested organs. However, these findings have to be confirmed, particularly by brain histology. A recent work on mice with chimeric bone marrow showed that the absence of MyD88 expression on T lymphocytes leads to the impairment of adaptive response following *T. gondii* infection. During the chronic phase of the disease, chimeric mice have cerebral necrotic zones associated with free tachyzoites while the wild type mice have classical cerebral cysts. This impairment is due to a lack of *T. gondii*-specific IFN- γ -producing T lymphocytes.⁸ This study, although conducted in C57BL/6 mice, and our results led us to propose a model in which MyD88 deficient BALB/c mice succumb to a cerebral toxoplasmosis due to a defect in the parasite replication control and in the setting of an efficient Th1 cellular response.

References

1. **Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A.** TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int. Immunol.* 2003; **15**: 1081-1087.
2. **Del Rio L, Butcher BA, Bennouna S, Hieny S, Sher A, Denkers EY.** *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.* 2004; **172**: 6954-6960.
3. **Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, Buzoni-Gatel D, Kasper LH.** TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2006; **176**: 7589-7597.

4. **Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A.** TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005; **308**: 1626-1629.
5. **Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, Coffman RL, Sher A.** Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4⁺ T cell response. *Immunity*. 2006; **25**: 655-664.
6. **Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A.** Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol*. 2002; **168**: 5997-6001.
7. **Sukhumavasi W, Egan CE, Warren AL, Taylor GA, Fox BA, Bzik DJ, Denkers EY.** TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J. Immunol*. 2008; **181**: 3464-3473.
8. **LaRosa DF, Stumhofer JS, Gelman AE, Rahman AH, Taylor DK, Hunter CA, Turka LA.** T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *PNAS*. 2008; **105**: 3855-3860.
9. **Dimier-Poisson I, Aline F, M ev elec MN, Beauvillain C, Buzoni-Gatel D, Bout D.** Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun*. 2003; **71**: 5254-65.
10. **O'Neill LAJ, Bowie AG.** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2007; **7**: 353-364.
11. **Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y.** Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to

Leishmania major infection associated with a polarized Th2 response. J. Immunol. 2003; **170**: 4237-4241.

12. **Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM, Cheever AW, Hieny S, Caspar P, Sher A.** Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2-) and TLR4-deficient animals. J. Immunol. 2003; **171**: 4758-4764.
13. **Costa Macedo G, Matos Magnani D, Barbosa Carvalho N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Costa Oliveira S.** Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. J. Immunol. 2008; **180**: 1080-1087.

Figure 1

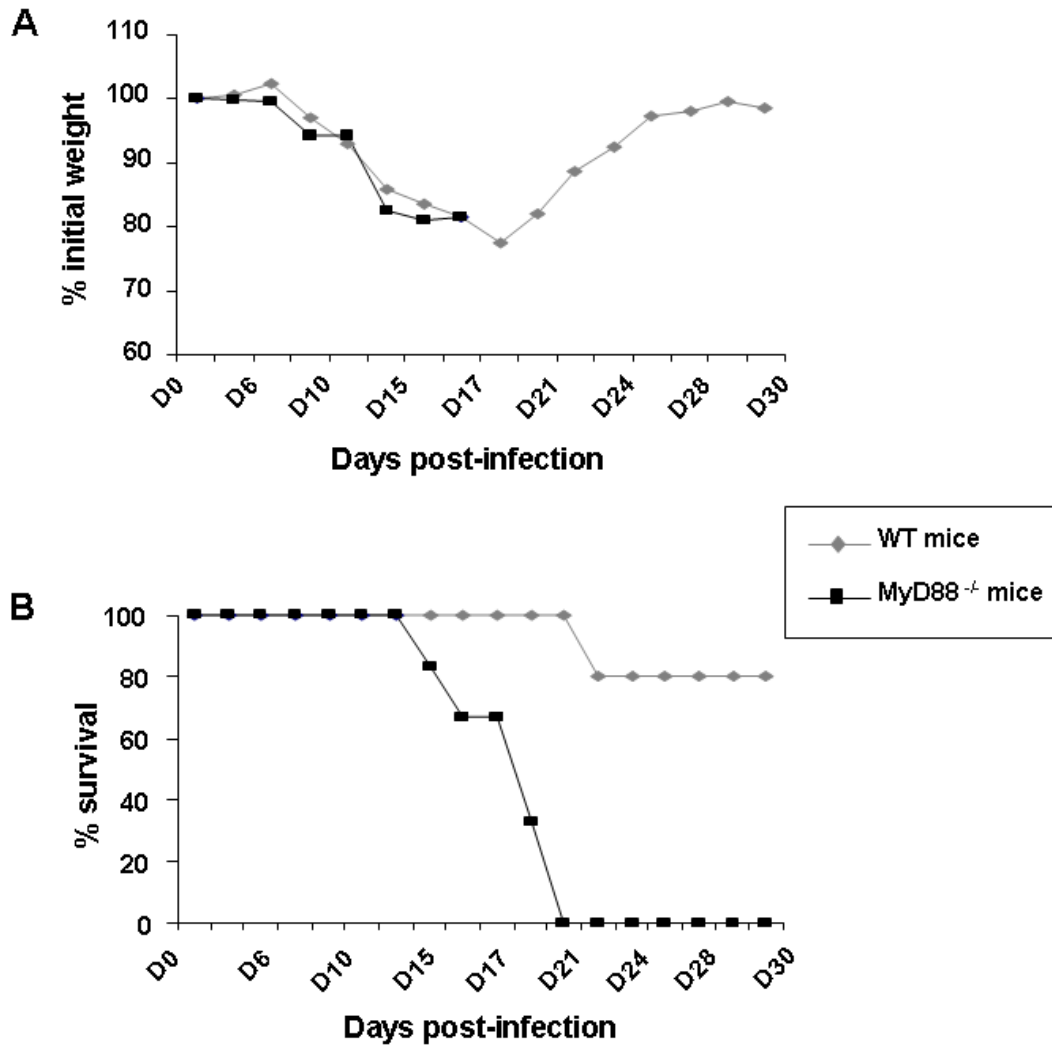


Fig. 1. Survival and body weight.

Wild type (WT) and MyD88 deficient (MyD88^{-/-}) BALB/c mice were orally infected with 80 cysts of the 76K strain of *T. gondii*. Their loss of weight (A) and survival (B) were monitored during 30 days post-infection. The data presented here are representative of four independent experiments on groups of six mice.

Figure 2

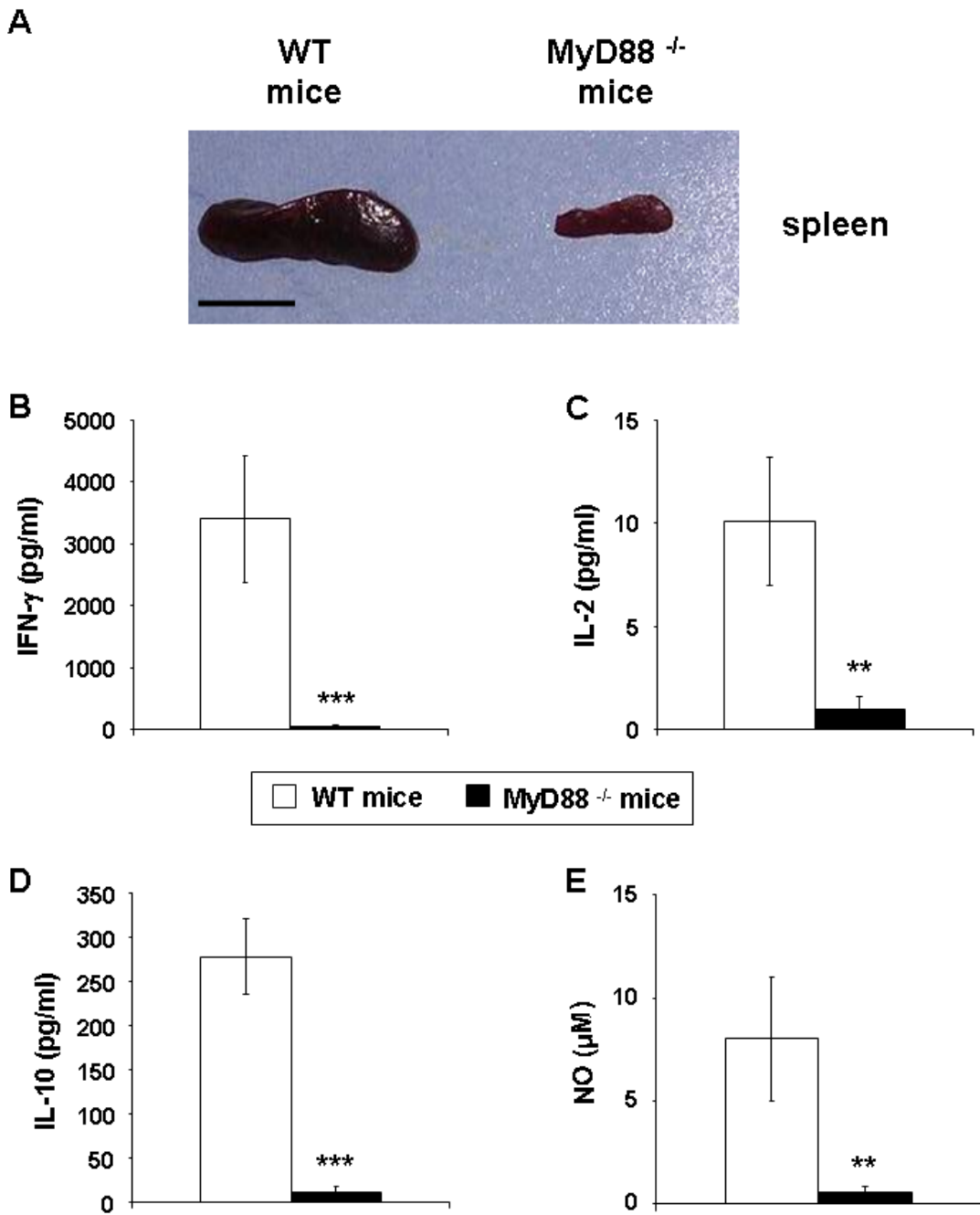


Fig. 2. Anatomy and immune response of the spleen.

(A) Thirteen days post-infection, wild type (WT) and MyD88 deficient (MyD88^{-/-}) BALB/c mice were sacrificed and their internal organs were observed macroscopically. The black bar represents 1 cm. (B-E) At the same time post-infection, splenocytes from WT (white bars) and MyD88^{-/-} deficient (black bars) mice were restimulated with *T. gondii* extract (10 μ g/ml). The supernatants were tested by ELISA for the presence of IFN- γ (B), IL-2 (C), IL-10 (D) and NO (E). ** p <0.01 and *** p <0.001. The data are presented as means \pm SEM and are cumulative of four independent experiments on groups of three mice.

Figure 3

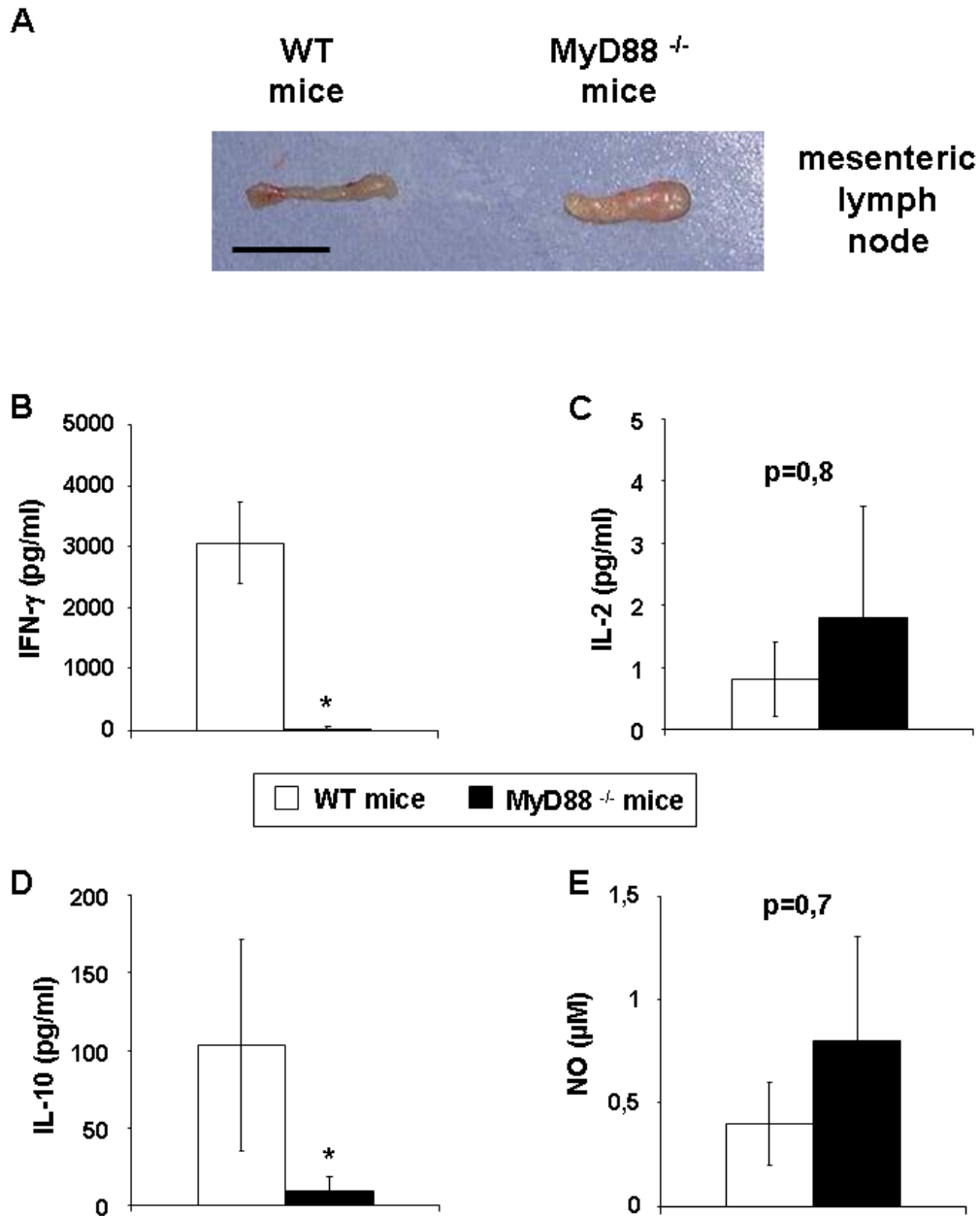


Fig. 3. Anatomy and immune response of the mesenteric lymph nodes.

(A) Thirteen days post-infection, wild type (WT) and MyD88 deficient (MyD88^{-/-}) BALB/c mice were sacrificed and their internal organs were observed macroscopically. The black bar represents 1 cm. (B-E) At the same time post-infection, mesenteric lymph node cells from WT (white bars) and MyD88^{-/-} deficient (black bars) mice were restimulated with *T. gondii* extract (10 µg/ml). The supernatants were tested by ELISA for the presence of IFN- γ (B), IL-2 (C), IL-10 (D) and NO (E). * $p < 0.05$. The data are presented as means \pm SEM and are cumulative of four independent experiments on groups of three mice.

Figure 4

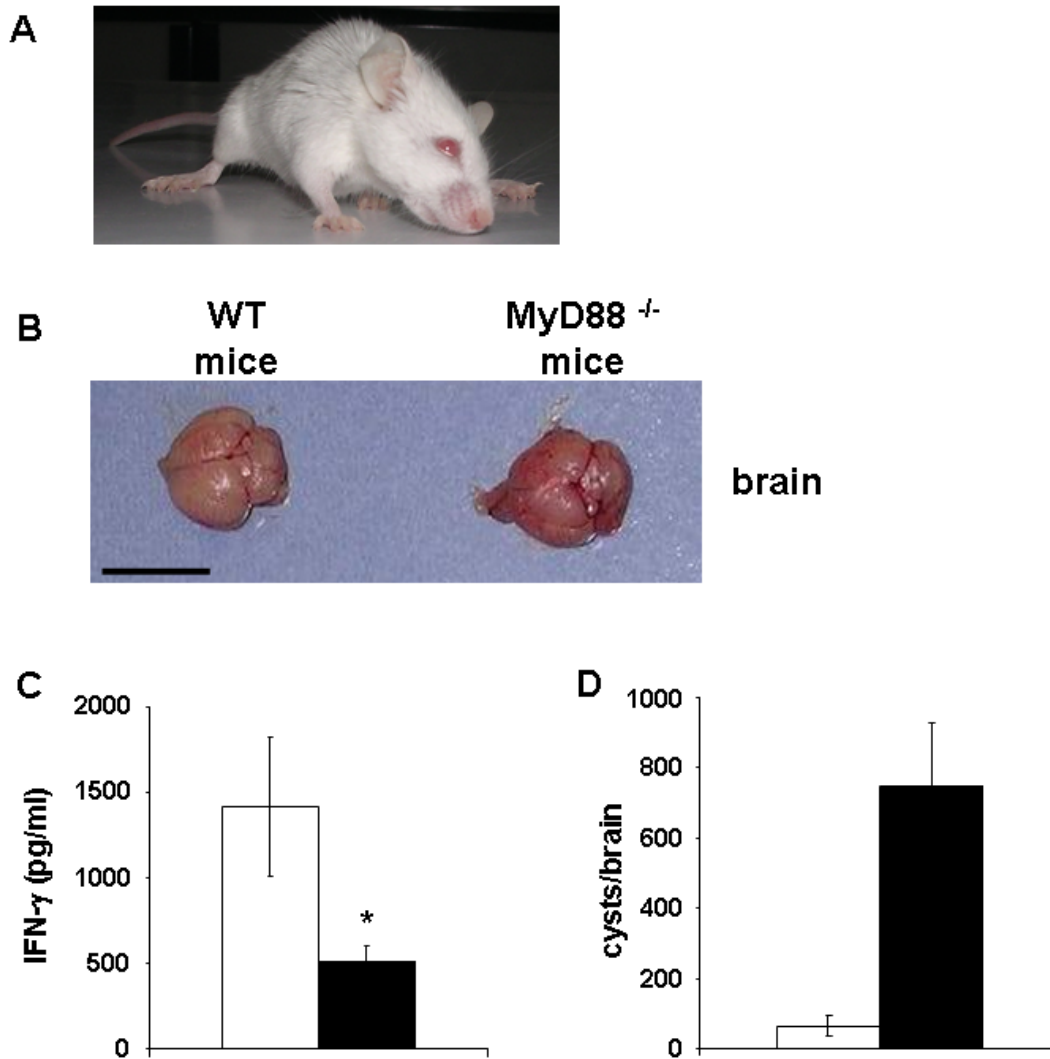


Fig. 4. At the brain level.

(A) Thirteen days post-infection, a MyD88 deficient mice was observed with signs of neurotoxoplasmosis. (B) Macroscopic observation of the brains from WT and MyD88 deficient BALB/c mice. The bar represents 1 cm. (C) Brains were homogenized and the supernatants were recovered to test the presence of IFN- γ . * $p < 0.05$ (D) Seventeen days post-infection, mice from both groups were sacrificed, their brains were homogenized and the cysts they contained were microscopically counted to assessed the protection of mice. The data are presented as means \pm SEM and are cumulative of four independent experiments (5 WT mice and 2 KO mice).

*CONCLUSION ~
PERSPECTIVES*

Toxoplasma gondii est le parasite responsable de la zoonose appelée toxoplasmose. Cette pathologie est bénigne et passe inaperçue chez les hôtes immunocompétents. Cependant, ses conséquences peuvent être dramatiques dans le cas de toxoplasmoses congénitales ou de toxoplasmoses cérébrales. Les premières donnent lieu à un large éventail de malformations et peuvent même aboutir à l'avortement dans le cadre du passage des parasites de la mère primo-infectée au fœtus. Les deuxièmes résultent d'une primo-infection d'un sujet immuno-déprimé ou de la réactivation d'une infection latente et peuvent également être fatales en l'absence de traitement. En médecine vétérinaire, les éleveurs subissent de lourdes pertes financières, conséquence des avortements infectieux engendrés par *T. gondii*.

En Europe, aucun vaccin n'est disponible, ni en médecine humaine ni en médecine vétérinaire. La nécessité d'un protocole vaccinal efficace est donc d'actualité et réaliste étant donné qu'une primo-infection par *T. gondii* confère une immunité protectrice définitive contre une éventuelle réinfection.

Le rôle d'une population cellulaire particulière, les cellules dendritiques, a été mis en avant au cours des dernières décennies. Ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles sont à l'interface entre les immunités innée et adaptative. En effet, l'immunité anti-toxoplasmique est à médiation cellulaire, avec un rôle prépondérant des cellules T CD4⁺ de type Th1 et de la cytokine majeure de résistance à l'infection, l'IFN- γ . Les DC sont les premières cellules sécrétrices d'IL-12, une cytokine à l'origine de la synthèse d'IFN- γ par les LT CD4⁺ notamment. De plus, les DC sont uniques dans leur capacité à activer directement les LT non éduqués. Ce double rôle en fait des cellules-clés de la mise en place de l'immunité anti-toxoplasmique.

Dans la première partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à cette population dendritique, en tant que vecteur vaccinal. Des travaux précédents ayant montré un rôle protecteur pour des DC primaires et une lignée de DC (SRDC) sensibilisées avec de l'extrait parasitaire (Dimier-Poisson *et al*, 2003 ; Ruiz *et al*, 2005), nous avons déterminé quelle population lymphocytaire était à l'origine de la réponse immunitaire protectrice contre un challenge virulent. Pour cela, nous avons établi un protocole de déplétion *in vivo* des LT CD4⁺ ou des LT CD8⁺. Des souris CBA/J ont été immunisées avec la lignée SRDC sensibilisée ou non avec de l'extrait parasitaire avant d'être déplétées et de subir une infection d'épreuve par voie orale.

Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence le rôle primordial des LT CD8⁺ dans la protection des souris. Cependant, le mécanisme d'action de ces lymphocytes semble

dépendre de l'organe considéré. En effet, ce sont les cellules sécrétrices d'IFN- γ dans la rate mais ce sont les cellules régulatrices de la synthèse des cytokines, notamment de l'IFN- γ , dans les ganglions mésentériques. Enfin, dans notre protocole, les LT CD8+ sont les effecteurs principaux de la protection des souris en phase chronique de l'infection, comme le montre l'augmentation du nombre de kystes cérébraux suite à leur déplétion. Bien qu'ayant utilisé un autre modèle vaccinal, nos résultats recourent ceux de Gazzinelli qui a montré l'importance des LT CD8+ suite à une vaccination de souris BALB/c par la souche atténuée TS-4 de *T. gondii* (Gazzinelli *et al*, 1991).

Les perspectives de ce travail sont nombreuses.

Bien qu'elles ne soient pas les cellules effectrices principales, nous ne pouvons pas exclure un rôle pour les cellules T CD4+. Il serait particulièrement intéressant d'étudier les LT reg, dont l'implication au cours de la toxoplasmose a récemment été mise en évidence et qui semblent jouer un rôle important dans le maintien de l'immunité à long terme contre *Leishmania major*, un parasite proche de *T. gondii* (Ge *et al*, 2008 ; Belkaid *et al*, 2002).

Un second point à éclaircir est l'implication ou non de sous-populations T CD8+ différentes dans la rate et dans les ganglions mésentériques, étant donné les rôles opposés joués par les LT CD8+ dans ces deux organes. Une population de T CD8+ régulateurs caractérisée depuis plus de quarante ans est bien décrite dans les maladies auto-immunes telles que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris, la sclérose multiple ou les maladies inflammatoires intestinales chroniques chez l'homme (Koh *et al*, 1992 ; Brimnes *et al*, 2005). De plus, leur induction semble dépendre des LT CD4+ régulateurs (Cantor *et al*, 1978).

La troisième perspective de ce travail sera de déterminer quelle population cellulaire est responsable de la synthèse des cytokines dans les ganglions mésentériques, puisque ni les LT CD4+ ni les LT CD8+ ne semblent être impliqués. Une piste de recherche serait d'étudier les cellules NK. En effet, des travaux ont montré qu'elles étaient capables de synthétiser de l'IFN- γ dans la rate de souris déficientes en CMH I et par conséquent en LT CD8+ activés (Denkers *et al*, 1993).

Enfin, le décryptage des mécanismes mis en œuvre suite à la vaccination par des DC sensibilisées est réalisé dans le but de les reproduire suite à un ciblage des populations dendritiques endogènes dans le cadre d'une nouvelle stratégie vaccinale efficace. Ce ciblage spécifique a déjà été décrit avec succès dans des modèles viraux (Sabado *et al*, 2007 ; Chua *et al*, 2008).

La deuxième partie de notre travail a porté sur l'étude de deux voies de signalisation induites par la reconnaissance de *T. gondii* suite à une infection expérimentale.

En premier lieu, nous avons étudié la voie de signalisation du récepteur à l'IL-17 (IL-17R), une cytokine qui a particulièrement été décrite dans les maladies autoimmunes inflammatoires dans lesquelles elle a majoritairement un rôle délétère, notamment chez les patients atteints d'inflammations intestinales chroniques comme la maladie de Crohn (Fujino *et al*, 2003). Les symptômes de cette maladie sont en effet très proches de ceux observés chez les souris C57BL/6 infectées par *T. gondii*, qui meurent d'une iléite en phase aiguë. L'IL-17 est une puissante cytokine pro-inflammatoire, responsable du recrutement des neutrophiles au site de l'infection.

Nous avons utilisé des souris C57BL/6 déficientes pour ce récepteur, infectées par voie orale avec des kystes toxoplasmiques, afin d'apprécier les réponses humorale et cellulaire mises en place au cours de l'infection aiguë. Les souris C57BL/6 sont naturellement sensibles à cette phase aiguë et meurent rapidement d'une surproduction d'IFN- γ , aboutissant à une nécrose intestinale fatale.

Grâce à notre modèle expérimental, nous avons pu mettre en évidence une diminution des dommages muqueux au niveau de l'intestin des souris C57BL/6 déficientes en IL-17R en phase aiguë de l'infection ainsi qu'une meilleure survie que celle des souris parentales. Ce résultat va à l'encontre de ceux déjà publiés sur le même modèle (Kelly *et al*, 2005). Cependant, nos résultats suggèrent que, d'une façon comparable à ce qui se passe dans la maladie de Crohn, l'IL-17 est impliquée dans la mise en place de l'inflammation intestinale des souris C57BL/6. Parallèlement, nous avons établi que l'absence d'IL-17R n'altère pas la réponse cellulaire spécifique de *T. gondii*, confirmant ainsi l'unique étude ayant été publiée sur la relation entre l'IL-17R et ce parasite (Kelly *et al*, 2005). Ces résultats peuvent s'expliquer par la découverte que les souris déficientes en IL-17R sécrètent plus de MCP-1, une cytokine recrutant les cellules T et NK mais pas les neutrophiles, réduisant ainsi la possibilité de créer une inflammation au site d'infection. Au cours de la phase chronique de l'infection, l'IL-17 semble jouer un rôle délétère sur la protection des animaux. En effet, l'absence de signalisation par le récepteur à l'IL-17 induit une diminution du nombre de kystes cérébraux par rapport aux souris parentales. Cet effet néfaste a également été reporté dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Komiyama *et al*, 2006).

Etant donné les nombreux effets délétères de la signalisation par l'IL-17R au cours de l'infection toxoplasmique, la perspective majeure de ce travail serait de tester l'inhibition spécifique de cette voie de signalisation. Cette stratégie thérapeutique ou même préventive a

été utilisée avec succès dans des modèles de maladies auto-immunes, comme l'EAE ou l'arthrite (Hofstetter *et al*, 2005 ; Röhn *et al*, 2006).

Une autre poursuite serait l'étude de souris BALB/c déficientes pour l'IL-17R, étant donné qu'elles miment de façon plus parfaite l'infection naturelle des hôtes définitifs de *T. gondii*.

En second lieu, nous avons étudié la molécule adaptatrice MyD88, retrouvée dans la plupart des voies de signalisation des TLR. L'importance de cette molécule a déjà été prouvée lors de l'infection de souris C57BL/6 déficientes en MyD88 par une souche avirulente de *T. gondii* (Scanga *et al*, 2002). Ces souris meurent rapidement d'une répllication parasitaire incontrôlée, notamment due à l'absence d'IL-12, cytokine d'induction de la réponse cellulaire anti-toxoplasmique. Nous avons eu recours au modèle BALB/c, plus proche de l'infection naturelle. Ainsi, des souris BALB/c déficientes pour cette molécule ont été infectées par voie orale avec des kystes de *T. gondii*. Leur survie ainsi que leur réponse cellulaire en phase aiguë et leur protection ont été suivies. Ce modèle nous a permis de confirmer des études menées sur des souris C57BL/6, rendues encore plus sensibles à l'infection en l'absence de MyD88 (Scanga *et al*, 2002). En effet, les souris BALB/c naturellement résistantes succombent rapidement à l'infection si elles sont délétées pour l'adaptateur MyD88. De plus, elles subissent d'importantes altérations morphologiques au niveau des organes lymphoïdes (rate et ganglions mésentériques) associées à une perte de la capacité de synthèse des cytokines Th1 et Th2, ainsi que de l'oxyde nitrique, par ces mêmes organes. Ces déficiences ont également été décrites dans des modèles d'infections bactériennes chez des souris C57BL/6, notamment par *Mycobacterium avium* et *Brucella abortus* (Feng *et al*, 2003 ; Costa Macedo *et al*, 2008). Enfin, nous avons déterminé que les souris BALB/c déficientes en MyD88 meurent probablement d'une toxoplasmose cérébrale, et non d'une iléite. Bien que restant à établir définitivement par des expériences complémentaires, ce résultat pourrait s'expliquer par un défaut de contrôle de la répllication parasitaire, par l'oxyde nitrique qui participe à l'élimination des parasites intracellulaires et par la réponse Th1 (*via* l'IFN- γ). Ces mêmes parasites pourraient s'établir dans le système nerveux central, plus particulièrement dans le cerveau, où ils entraîneraient la destruction massive des cellules par leur multiplication intensive, sans conversion vers le stade bradyzoïte.

La suite de ce travail doit porter sur la confirmation des résultats, notamment par la réalisation d'analyses histologiques sur la rate, les ganglions mésentériques et le cerveau. Ces expériences permettraient notamment de vérifier si les changements morphologiques impliquent le recrutement ou la fuite de populations cellulaires particulières, ou s'ils résultent

d'une parasitémie incontrôlée. Dans le cerveau, la mise en évidence de zones nécrotiques permettrait de confirmer notre hypothèse.

A plus long terme, l'étude des souris BALB/c déficientes pour MyD88 pourrait être complétée par l'étude de souris BALB/c déficientes pour l'IL-17R. En effet, toutes les isoformes des récepteurs à l'IL-17 contiennent une séquence conservée qui partage des résidus similaires dans deux des trois motifs du domaine TIR. La protéine MyD88 possède un domaine TIR entier, qui est responsable de l'interaction avec le domaine TIR des TLR. Il serait ainsi concevable que l'adaptateur MyD88 interagisse avec le récepteur à l'IL-17. Des études ont montré que la voie de signalisation de ce récepteur était indépendante de MyD88 (Chang *et al*, 2006). Cependant, d'autres travaux récents ont mis en évidence un défaut de différenciation des cellules Th17, produisant l'IL-17, dans des cellules T déficientes en MyD88, dans le cadre d'une inflammation intestinale chronique expérimentale (Fukata *et al*, 2008). Ainsi, l'étude du mécanisme d'action de la molécule MyD88 sur la différenciation des Th17 et donc sur la production d'IL-17 par les LT CD4+ pourrait apporter de nouvelles solutions dans le ciblage de cette cytokine au cours d'une infection par *T. gondii*.

La mise au point d'une stratégie vaccinale contre *T. gondii* est un sujet de recherches intensives, qui nécessite la poursuite de l'étude des mécanismes de protection. L'identification de récepteurs pouvant lier tout ou partie du parasite ou de molécules intervenant dans leurs voies de signalisation est une étape cruciale dans le ciblage de nouvelles molécules thérapeutiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behaviour produced by the stress of predator exposure - implications for anxiety associated with post-traumatic stress disorder. *Physiol. Behav.* 1999 ; **65** : 723-737.

Afssa (rapport du groupe de travail *Toxoplasma gondii*). Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. 2005 ; 199-205.

Akira S. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006 ; **311** : 1-16.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 ; **124** : 783-801.

Alexander J, Jebbari H, Bluethmann H, Brombacher F, Roberts CW. The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 1998 ; **28** : 113-120.

Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2000 ; **1** : 83-87.

Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2003 ; **4** : 485-490.

Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii*-antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect. Immun.* 2004 ; **72** : 4127-4137.

Anders HJ, Zecher D, Pawar RD, Patole PS. Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. *Arthritis Res. Ther.* 2005 ; **7** : 215-224.

Aosai F, Rodriguez Pena MS, Mun HS, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, Kang HK, Bae YS, Yano A. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones.* 2006 ; **11** : 13-22.

Balenga NA. Human TLR11 gene is repressed due to its probable interaction with profilin expressed in human. *Med. Hypothesis.* 2007 ; **68** : 456.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Tirard V, Carme B. Facteurs de risque d'acquisition de la toxoplasmose chez les femmes enceintes en 1995. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 1996 ; **16** : 73-75.

Barsoum RS. Parasitic infections in organ transplantation. *Exp. Clin. Transplant.* 2004 ; **2** : 258-267.

Barta JR. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Vet. Parasitol.* 2001 ; **101** : 175-186.

Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self-DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 2006 ; **7** : 49-56.

Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect.* 2007 ; **9** : 1614-1622.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002 ; **420** : 502-507.

Benevides L, Milanezi CM, Yamauchi LM, Benjamim CF, Silva JS, Silva NM. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *Am. J. Pathol.* 2008 ; **173** : 741-751.

Bennett R, Christiansen K, Clifton-Hadley R. Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 1999 ; **39** : 155-171.

- Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY.** Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 2003 ; **171** : 6052-6058.
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW.** Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. Biol. Sci.* 2000 ; **267** : 1591-1594.
- Black MW, Boothroyd JC.** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000 ; **64** : 607-623.
- Bliss SK, Gavrilesco LC, Alcaraz A, Denkers EY.** Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* 2001 ; **69** : 4898-4905.
- Bourguin I, Chardès T, Bout D.** Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 1993 ; **61** : 2082-2088.
- Bourguin I, Moser M, Buzoni-Gatel D, Tielemans F, Bout D, Urbain J, Leo O.** Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. *Infect. Immun.* 1998 ; **66** : 4867-4874.
- Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L.** Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 2005 ; **174** : 5814-5822.
- Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP, Liu L, Babulas VP, Susser ES.** Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am. J. Psychiatry.* 2005 ; **162** : 767-773.
- Brown CR, McLeod R.** Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 1990 ; **145** : 3438-3441.
- Bülow R, Boothroyd JC.** Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 1991 ; **147** : 3496-3500.
- Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ.** Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet. Rec.* 1991 ; **129** : 89-93.
- Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, Kasper LH.** Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J. Immunol.* 1999 ; **162** : 5846-5852.
- Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Penido MLO, Gazzinelli RT.** Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum. Gene Ther.* 2006 ; **17** : 415-426.
- Cantor H, Hugenberg J, McVay-Boudreau L, Eardley DD, Kemp J, Shen FW, Gershon RK.** Immunoregulatory circuits among T-cell sets. Identification of a subpopulation of T-helper cells that induces feedback inhibition. *J. Exp. Med.* 1978 ; **148** : 871-877.
- Cario E, Podolsky DK.** Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 2005 ; **68** : 7010-7017.
- Carruthers VB.** Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2002 ; **81** : 111-122.
- Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA.** CD8+-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4+ T cells. *Infect. Immun.* 2002 ; **70** : 434-443.
- Cha DY, Song IK, Lee GS, Hwang OS, Noh HJ, Yeo SD, Shin DW, Lee YH.** Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *Korean J. Parasitol.* 2001 ; **39** : 233-240.

- Chang SH, Park H, Dong C.** Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J. Biol. Chem.* 2006 ; **281** : 35603-35607.
- Chardès T, Bourguin I, Mévélec MN, Dubremetz JF, Bout D.** Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.* 1990 ; **58** : 1240-1246.
- Chardès T, Bout D.** Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res. Immunol.* 1993 ; **144** : 57-60.
- Chen H, Chen G, Zheng H, Guo H.** Induction of immune responses in mice by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Chin. Med. J.* 2003 ; **116** : 1561-1566.
- Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R.** Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *PNAS.* 2002 ; **99** : 14338-14343.
- Chua BY, Eriksson EM, Poole DP, Zeng W, Jackson DC.** Dendritic cell acquisition of epitope cargo mediated by simple cationic peptide structures. *Peptides.* 2008 ; **29** : 881-90.
- Ciardelli L, Meroni V, Avanzini MA, Bollani L, Tinelli C, Garofoli F, Gasparoni A, Stronati M.** Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008 ; **27** : 125-129.
- Combe CL, Curiel TJ, Moretto MM, Khan IA.** NK cells help to induce CD8⁺-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.* 2005 ; **73** : 4913-4921.
- Cong H, Gu QM, Jiang Y, He SY, Zhou HY, Yang TT, Li Y, Zhao QL.** Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2005 ; **27** : 29-35.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT.** Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ.* 2000 ; **321** : 142-147.
- Costa Macedo G, Matos Magnani D, Barbosa Carvalho N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Costa Oliveira S.** Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J. Immunol.* 2008 ; **180** : 1080-1087.
- Couper KN, Nielsen HV, Petersen E, Roberts F, Roberts CW, Alexander J.** DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. *Vaccine.* 2003 ; **21** : 2813-2820.
- Couper KN, Roberts CW, Brombacher F, Alexander J, Johnson LL.** *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect. Immun.* 2005 ; **73** : 8060-8068.
- Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D.** Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation. *Science.* 2005 ; **309** : 1854-1857.
- Cui YL, He SY, Xue MF, Zhang J, Wang HX, Yao Y.** Protective effect of a multiantigenic DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* with co-delivery of IL-12 in mice. *Parasite Immunol.* 2008 ; **30** : 309-313.
- Curiel TJ, Krug EC, Purner MB, Pognard P, Berens RL.** Cloned human CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells. *J. Immunol.* 1993 ; **151** : 2024-2031.
- Dalpke A, Heeg K, Bartz H, Baetz A.** Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology.* 2008 ; **213** : 225-235.
- Dardé ML, Peyron F, Denis F.** Les bactéries, les champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. *John Libbey Eurotest.* 2002 ; 317-347.

Dautu G, Munyaka B, Carmen G, Zhang G, Omata Y, Xuenan X, Igarashi M. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. *Exp. Parasitol.* 2007 ; **116** : 273-282.

Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect. Immun.* 1996 ; **64** : 2158-2166.

Debierre-Grockieo F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2007 ; **179** : 1129-1137.

Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. Innate immunity: structure and function of TLRs. *Med. Sci.* 2007 ; **23** : 67-73.

Del Rio L, Butcher BA, Bennouna S, Hieny S, Sher A, Denkers EY. *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.* 2004 ; **172** : 6954-6960.

Denning TL, Granger S, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, Zhang W, Honey K, Rasmussen JP, Cheroutre H, Rudensky AY, Kronenberg M. Mouse TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J. Immunol.* 2007 ; **178** : 4230-4239.

Denkers EY. From cells to signaling cascades : manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003 ; **39** : 193-203.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998 ; **11** : 569-588.

Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1993 ; **178** : 1465-72.

Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.* 2004 ; **34** : 411-421.

Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Caspar P, Sher A. A role for CD4+NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J. Exp. Med.* 1996 ; **184** : 131-139.

Desolme B, Mévélec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine.* 2000 ; **18** : 2512-2521.

Diana J, Vincent C, Peyron F, Picot S, Schimtt D, Persat F. *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clin. Exp. Immunol.* 2005 ; **141** : 475-484.

Dimier IH, Bout DT. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication : a role for intracellular iron. *Immunology.* 1998 ; **94** : 488-495.

Dimier-Poisson I, Aline F, Mévélec MN, Beauvillain C, Buzoni-Gatel D, Bout D. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun.* 2003 ; **71** : 5254-5265.

Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.* 1988 ; **49** : 910-913.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 1998 ; **28** : 1019-1024.

- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998 ; **11** : 267-299.
- Dumètre A, Dardé ML.** How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 2003 ; **27** : 651-661.
- Dunay IR, DaMatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD.** Gr1+ inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2008 ; **29** : 306-317.
- Dzierszinsky F, Pepper M, Stumhofer JS, LaRosa DF, Wilson EH, Turka LA, Halonen SK, Hunter CA, Roos DS.** Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* 2007 ; **75** : 5200-5209.
- Echeverria PC, de Miguel N, Costas M, Angel SO.** Potent antigen-specific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-*Leishmania infantum* Hsp83 fusion protein. *Vaccine.* 2006 ; **24** : 4102-4110.
- Egan CE, Sukhumavasi W, Bierly AL, Denkers EY.** Understanding the multiple functions of Gr-1+ cell subpopulations during microbial infection. *Immunol. Res.* 2008 ; **40** : 35-48.
- El-Malki M, Shaohong L, Kumagai T, Yabu Y, Noureldin MS, Saady N, Maruyama H, Ohta N.** Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. *Microbiol. Immunol.* 2005 ; **49** : 639-646.
- Elsaid MM, Vitor RW, Frézard FJ, Martins MS.** Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999 ; **94** : 485-490.
- Elsheikha HM.** Congenital toxoplasmosis : priorities for further health promotion action. *Public Health.* 2008 ; **122** : 335-353.
- Fadul CE, Channon JY, Kasper LH.** Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. *Infect. Immun.* 1995 ; **63** : 4290-4294.
- Fang H, Mun HS, Kikumura A, Sayama Y, Norose K, Yano A, Aosai F.** *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 induces lethal anaphylactic reaction through activation of cytosolic phospholipase A and platelet-activating factor via Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88. *Microbiol. Immunol.* 2008 ; **52** : 366-374.
- Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM, Cheever AW, Hieny S, Caspar P, Sher A.** Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2-) and TLR4-deficient animals. *J. Immunol.* 2003 ; **171** : 4758-4764.
- Ferguson DJP, Hutchison WM.** An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 1987 ; **73** : 483-491.
- Flegr J, Preiss M, Klose J, Havlicek J, Vitakova M, Kodym P.** Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis ? *Biol. Psychol.* 2003 ; **63** : 253-268.
- Frenkel JK, Pfefferkorn ER, Smith DD, Fishback JL.** Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am. J. Vet. Res.* 1991 ; **52** : 759-763.
- Freyre A, Bonino J, Falcon J, Castells D, Correa O, Casaretto A.** The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 1999 ; **81** : 85-88.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y.** Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003 ; **52** : 65-70.

- Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S.** Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 2001 ; **166** : 4446-4455.
- Gatkowska J, Gasior A, Kur J, Dlugonska H.** *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. *Exp. Parasitol.* 2008 ; **118** : 266-270.
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A.** Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 1991 ; **146** : 286-292.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A.** Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *PNAS.* 1993 ; **90** : 6115-6119.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A.** Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1994 ; **153** : 2533-2543.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Schariton-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A.** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 1996 ; **157** : 798-805.
- Gazzinelli RT, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A.** Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1992 ; **149** : 175-180.
- Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu W, Liang YJ, Wang Y.** In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4(+)CD25(+)-regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 2008; in press.
- Gelfanov V, Gelfanova V, Lai YG, Liao NS.** Activated alpha beta-CD8+, but not alpha alpha-CD8+, TCR-alpha beta+ murine intestinal intraepithelial lymphocytes can mediate perforin- based cytotoxicity, whereas both subsets are active in Fas-based cytotoxicity. *J. Immunol.* 1996 ; **156** : 35-41.
- Giese A, Stuhlsatz S, Däubener W, MacKenzie CR.** Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF- α receptor 2. *J. Immunol.* 2004 ; **173** : 3366-3374.
- Goldszmid RS, Bafica A, Jankovic D, Feng CG, Caspar P, Winkler-Pickett R, Trinchieri G, Sher A.** TAP-1 indirectly regulates CD4+ T cell priming in *Toxoplasma gondii* infection by controlling NK cell IFN- γ production. *J. Exp. Med.* 2007; **204** : 2591-2602.
- Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C.** Evaluation of protective effect of recombinant dense granules antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine.* 2007 ; **25** : 4301-4311.
- Goodwin DG, Strobl J, Mitchell SM, Zajac AM, Lindsay DS.** Evaluation of the mood-stabilizing agent valproic acid as a preventative for toxoplasmosis in mice and activity against tissue cysts in mice. *J. Parasitol.* 2008 ; **94** : 555-557.
- Gourishankar S, Doucette K, Fenton J, Purych D, Kowalewska-Grochowska K, Preiksaitis J.** The use of donor and recipient screening for *Toxoplasma* in the era of universal trimethoprim sulfamethoxazole prophylaxis. *Transplantation.* 2008 ; **85** : 980-985.
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC.** Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 2001 ; **294** : 161-165.
- Guan H, Moretto M, Bzik DJ, Gigley J, Khan IA.** NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J. Immunol.* 2007 ; **179** : 590-596.

- Gubbels MJ, Striepen B, Shastri N, Turkoz M, Robey EA.** Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2005 ; **73** : 703-711.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001 ; **410** : 1099-1103.
- Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG.** Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J. Immunol.* 1996 ; **156** : 1476-1481.
- Hill D, Dubey JP.** *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002 ; **8** : 634-640.
- Hiramoto RM, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF Jr.** 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine.* 2002 ; **20** : 2072-2081.
- Hitziger N, Dellacasa I, Albiger B, Barragan A.** Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell. Microbiol.* 2005 ; **7** : 837-848.
- Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R.** Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* 2005 ; **237** : 123-130.
- Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, Vidotto MC, Garcia JL.** *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 2008 ; **118** : 386-392.
- Ismael AB, Dimier-Poisson I, Lebrun M, Dubremetz JF, Bout D, Mévélec MN.** Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *J. Infect. Dis.* 2006 ; **194** : 1176-1183.
- Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mévélec MN.** The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 2003 ; **71** : 6222-6228.
- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A.** Conventional T-bet⁺Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 2007 ; **204** : 273-283.
- Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A.** Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2001 ; **31** : 3388-3393.
- Jirmanova L, Jankovic D, Fornace AJ, Ashwell JD.** Gadd45 α regulates p38-dependent dendritic cell cytokine production and Th1 differentiation. *J. Immunol.* 2007 ; **178** : 4153-4158.
- Johnson LL, Sayles PC.** Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect. Immun.* 2002 ; **70** : 185-191.
- Jones-Brando L, Fuller Torrey E, Yolken R.** Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophr. Res.* 2003 ; **62** : 237-244.
- Kabelitz D.** Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 2007 ; **19** : 39-45.
- Kaisho T, Akira S.** Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006 ; **117** : 979-987.

- Kaneko Y, Takashima Y, Xuaun X, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Otsuka H.** Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway. *Parasitology*. 2004 ; **128** : 123-129.
- Kang H, Remington JS, Suzuki Y.** Decrease resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol*. 2000 ; **164** : 2629-2634.
- Kang HK, Lee HY, Lee YN, Jo EJ, Kim JI, Aosai F, Yano A, Kwak JY, BaeYS.** *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004 ; **322** : 899-904.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D.** *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol*. 2004 ; **34** : 401-409.
- Kasper LH, Currie KM, Bradley MS.** An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*. 1985 ; **134** : 3426-3421.
- Kasper LH, Matsuura T, Fonseka S, Arruda J, Channon JY, Khan IA.** Induction of $\gamma\delta$ T cells during murine acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*. 1996 ; **157** : 5521-5527.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999 ; **11** : 115-122.
- Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, Liu YJ, McEvoy LM.** The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J. Immunol*. 1999 ; **162** : 3859-3864.
- Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA.** Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun*. 2005 ; **73** : 617-621.
- Khan IA, Ely KH, Kasper LH.** Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol*. 1994 ; **152** : 1856-1860.
- Khan IA, Green WR, Kasper LH, Green KA, Schwartzman JD.** Immune CD8+ T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. *Infect. Immun*. 1999 ; **67** : 5869-5876.
- Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD.** The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol*. 2006 ; **18** : 670-675.
- Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY.** *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J. Immunol*. 2006 ; **177** : 2584-2591.
- Klun I, Djurkovic-Djakovic O, Katic-Radivojevic S, Nikolic A.** Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol*. 2006 ; **135** : 121-131.
- Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, Mak TW.** Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice. *Science*. 1992 ; **256** : 1210-1213.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, IwakuraY.** IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2006 ; **177** : 566-573.
- Konishi E, Nakao M.** Naturally occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 1992 ; **104** : 427-432.
- Kramer JM, Hanel W, Shen F, Isik N, Malone JP, Maitra A, Sigurdson W, Swart D, Tocker J, Jin T, Gaffen SL.** Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J. Immunol*. 2007 ; **179** : 6379-6383.

- Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Aujla SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z, Levin SD.** Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J. Immunol.* 2007 ; **179** : 5462-5473.
- Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A.** Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell. Microbiol.* 2006 ; **8** : 1611-1623.
- LaRosa DF, Stumhofer JS, Gelman AE, Rahman AH, Taylor DK, Hunter CA, Turka LA.** T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *PNAS.* 2008 ; **105** : 3855-3860.
- Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N.** Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001 ; **22** : 141-148.
- Lau YL, Fong MY.** *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Exp. Parasitol.* 2008 ; **119** : 373-378.
- Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT.** Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* 2005 ; **26** : 509-511.
- Lebech M, Joynson DH, Seitz HM, Thulliez P, Gilbert RE, Dutton GN, Ovlisen B, Petersen E.** Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996 ; **15** : 799-805.
- Lee CW, Sukhumavasi W, Denkers EY.** Phosphoinositide-3-kinase-dependent, MyD88-independent induction of CC-type chemokines characterizes the macrophage response to *Toxoplasma gondii* strains with high virulence. *Infect. Immun.* 2007 ; **75** : 5788-5797.
- Lee YH, Shin DW, Lee JH, Nam HW, Ahn MH.** Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. *Yonsei Med. J.* 2007 ; **48** : 396-404.
- Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT, Kasper LH.** Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1998 ; **161** : 4902-4908.
- Letscher-Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP, Kien TT.** Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect. Immun.* 1998 ; **66** : 4503-4506.
- Levine ND.** Taxonomy of *Toxoplasma*. *J. Protozool.* 1977 ; **24** : 36-41.
- Leweke FM, Gerth CW, Koethe D, Klosterkötter J, Ruslanova I, Krivogorsky B, Fuller Torrey E, Yolken RH.** Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2004 ; **254** : 4-8.
- Lieberman LA, Cardillo F, Owyang AM, Rennick DM, Cua DJ, Kastelein RA, Hunter CA.** IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J. Immunol.* 2004 ; **173** : 1887-1893.
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y.** Association of CD4+ Tcell-dependent, interferon- γ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 1996 ; **184** : 597-607.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ.** T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *PNAS.* 2001 ; **98** : 15137-15142.

- Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J.** Cutting edge: dendritic cells are essential for *in vivo* IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 2006 ; **177** : 31-35.
- Lourenço EV, Bernardes ES, Silva NM, Mineo JR, Panunto-Castelo A, Roque-Barreira MC.** Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2006 ; **8** : 1244-1251.
- Luangsay S, Kasper LH, Rachinel N, Minns LA, Mennechet FJD, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D.** CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8⁺ lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003 ; **125** : 491-500.
- Lundén A, Uggla A.** Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int. J. Food Microbiol.* 1992 ; **15** : 357-363.
- Lütjen S, Soltek S, Virna S, Deckert M, Schlüter D.** Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. *Infect. Immun.* 2006 ; **74** : 5790-5801.
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW.** *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. 2002 ; **18** : 198-201.
- Ma Y, Haynes RL, Sidman RL, Vartanian T.** TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle.* 2007 ; **6** : 2859-2868.
- Mack DG, McLeod R.** Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J. Clin. Invest.* 1992 ; **90** : 2585-2592.
- Maitra A, Shen F, Hanel W, Mossman K, Tocker J, Swart D, Gaffen SL.** Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *PNAS.* 2007 ; **104** : 7506-7511.
- Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai AP.** The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane : transactions across the border. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2007 ; **54** : 25-28.
- Mason NJ, Liou HC, Hunter CA.** T cell-intrinsic expression of c-Rel regulates Th1 cell responses essential for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2004 ; **172** : 3704-3711.
- Matsuzaki G, Umemura M.** Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol.* 2007 ; **51** : 1139-1147.
- McKee AS, Dzierszynski F, Boes M, Roos DS, Pearce EJ.** Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2004 ; **173** : 2632-2640.
- Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Toursel C, Tomavo S, Ajioka JW, Soldati D.** A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J. Cell Sci.* 2002 ; **115** : 563-574.
- Mellman I, Steinman RM.** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001 ; **106** : 255-258.
- Ménard LC, Minns LA, Darche S, Mielcarz DW, Foureau DM, Roos D, Dzierszynski F, Kasper LH, Buzoni-Gatel D.** B cells amplify IFN- γ production by T cells via a TNF- α -mediated mechanism. *J. Immunol.* 2007 ; **179** : 4857-4866.
- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y.** Role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J. Exp. Med.* 2004 ; **200** : 201-210.
- Mennechet FJD, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D.** Lamina propria CD4⁺ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J. Immunol.* 2002 ; **168** : 2988-2996.

- Mets MB, Chhabra MS.** Eye manifestations of intrauterine infections and their impact on childhood blindness. *Surv. Ophthalmol.* 2008 ; **53** : 95-111.
- Mévélec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magné R, Bruneel O, Buzoni-Gatel D.** Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine.* 2005 ; **23** : 4489-4499.
- Mineo JR, Khan IA, Kasper LH.** *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. *Exp. Parasitol.* 1994 ; **79** : 351-361.
- Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH.** Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 1993 ; **150** : 3951-3964.
- Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, Buzoni-Gatel D, Kasper LH.** TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2006 ; **176** : 7589-7597.
- Mishima M, Xuan X, Yokoyama N, Igarashi I, Fujisaki K, Nagasawa H, Mikami T.** Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen induces protective immunity in cats. *Parasitol. Res.* 2002 ; **88** : 144-149.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Thomson AW.** Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 2004 ; **104** : 3257-3266.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A.** TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int. Immunol.* 2003 ; **15** : 1081-1087.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A.** Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 2000 ; **164** : 5998-6004.
- Nakano Y, Hisaeda H, Sakai T, Zhang M, Maekawa Y, Zhang T, Nishitani M, Ishikawa H, Himeno K.** Granule-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by CD8+ T cells. *Immunology.* 2001 ; **104** : 289-298.
- Nicolas JA, Pestre-Alexandre M.** Toxoplasmosis : une zoonose transmissible à l'homme. *Med. Mal. Infect.* 1993 ; **23** : 129-138.
- Nicolle C, Manceaux L.** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1908 ; **146** : 207-209.
- Nicolle C, Manceaux L.** Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 1909 ; **148** : 369-372.
- Nielsen HV, Lauemoller SL, Christiansen L, Buus S, Fomsgaard A, Petersen E.** Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect. Immun.* 1999 ; **67** : 6358-6363.
- Nishiya T, Kajita E, Miwa S, DeFranco AL.** TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 2005 ; **280** : 37107-37117.
- Normaznah Y, Saniah K, Fuzina Noor H, Naseem K, Khatijah M.** Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among farmers and cattle in Gombak District, Selangor, Malaysia - a preliminary report. *Trop. Biomed.* 2004 ; **21** : 157-159.

- Novotna M, Harusova J, Klose J, Preiss M, Havlicek J, Roubalova K, Flegr J.** Probable neuroimmunological link between *Toxoplasma* and cytomegalovirus infections and personality changes in human host. *BMC Infect. Dis.* 2005 ; **5** : 54.
- Omata Y, Aihara Y, Kanda M, Saito A, Igarashi I, Suzuki N.** *Toxoplasma gondii*: experimental infection in cats vaccinated with 60Co-irradiated tachyzoites. *Vet. Parasitol.* 1996 ; **65** : 173-183.
- O'Neill LAJ.** When signaling pathways collide: positive and negative regulation of Toll-like receptor signal transduction. *Immunity.* 2008 ; **29** : 12-20.
- O'Neill LAJ, Bowie AG.** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 ; **7** : 353-364.
- Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J.** Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin. Exp. Immunol.* 2005 ; **141** : 298-306.
- Pepper M, Dzierszinsky F, Crawford A, Hunter CA, Roos D.** Development of a system to study CD4⁺-T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 2004 ; **72** : 7240-7246.
- Pepper M, Dzierszinsky F, Wilson E, Tait E, Fang Q, Yarovinsky F, Laufer TM, Roos D, Hunter CA.** Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. *J. Immunol.* 2008 ; **180** : 6229-6236.
- Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J.** Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 1998 ; **16** : 1283-1289.
- Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC.** *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* 1976 ; **39** : 365-376.
- Pinckney RD, Lindsay DS, Blagburn BL.** Further characterization of the TS-4 temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii* in mice. *J. Parasitol.* 1995 ; **81** : 118-121.
- Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, Soldati-Favre D.** *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe.* 2008 ; **3** : 77-87.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2001 ; **2** : 361-367.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A.** In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 1997 ; **186** : 1819-1829.
- Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A.** Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity.* 1999 ; **11** : 637-647.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2001 ; **2** : 361-367.
- Roberts CW, Alexander J.** Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology.* 1992 ; **104** : 19-23.

- Roberts CW, Brewer JM, Alexander J.** Congenital toxoplasmosis in the BALB/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine*. 1994 ; **12** : 1389-1394.
- Röhn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF.** Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 2006 ; **36** : 2857-2867.
- Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D.** NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2005 ; **175** : 899-908.
- Ruiz S, Beauvillain C, Mévélec MN, Roingeard P, Breton P, Bout D, Dimier-Poisson I.** A novel CD4-CD8 α +CD205+CD11b- murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis. *Cell. Microbiol.* 2005 ; **7** : 1659-1671.
- Sabado RL, Babcock E, Kavanagh DG, Tjomsland V, Walker BD, Lifson JD, Bhardwaj N, Larsson M.** Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1. *Eur. J. Immunol.* 2007; **37**: 1752-63.
- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MKB.** The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.* 2008 ; **214** : 126-135.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995 ; **182** : 389-400.
- Sato K, Fujita S.** Dendritic cells-nature and classification. *Allergol. Int.* 2007 ; **56** : 183-191.
- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A.** Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 2002 ; **168** : 5997-6001.
- Scorza T, D'Souza S, Laloup M, Dewit J, De Braekeleer J, Verschueren H, Vercammen M, Huygen K, Jongert E.** A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8+ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 2003 ; **71** : 309-316.
- Sharif M, Gholami S, Ziaei H, Daryani A, Laktarashi B, Ziapour SP, Rafiei A, Vahedi M.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats slaughtered for food in Mazandaran province, Iran, during 2005. *Vet. J.* 2007 ; **174** : 422-424.
- Sharma S, Sandhu K, Bal M, Kumar H, Verma S, Dubey JP.** Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep, cattle and buffaloes in Punjab, India. *J. Parasitol.* 2008 ; in press.
- Shen F, Gaffen SL.** Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*. 2008 ; **41** : 92-104.
- Sibley LD.** Recent origins among ancient parasites. *Vet. Parasitol.* 2003 ; **115** : 185-198.
- Sibley LD, Boothroyd JC.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992 ; **359** : 82-85.
- Speer CA, Clark S, Dubey JP.** Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1998 ; **84** : 505-512.
- Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA.** Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 1999 ; **29** : 1509-1519.
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF.** Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine*. 2004 ; **22** : 3929-3941.

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 2003 ; **299** : 414-416.

Subauste CS, Wessendarp M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN- γ . *J. Immunol*. 2000 ; **165** : 1498-1505.

Sukhumavasi W, Egan CE, Warren AL, Taylor GA, Fox BA, Bzik DJ, Denkers EY. TLR adaptator MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J. Immunol*. 2008 ; **181** : 3464-3473.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1988 ; **240** : 516-518.

Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang H, Gufwoli E. IL-10 is required for prevention of necrosis of the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*. 2000 ; **164** : 5375-5382.

Suzuki Y, Yang Q, Yang SM, Nguyen N, Lim S, Liesenfeld O, Kojima T, Remington JS. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. *J. Immunol*. 1996 ; **157** : 2564-2569.

Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RC, Conrad PA. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol*. 2002 ; **32** : 595-616.

Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol*. 2000 ; **30** : 1217-1258.

Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell. Biol*. 1999 ; **147** : 599-610.

Thiébaud R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007 ; **369** : 115-122.

Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol*. 2007 ; **44** : 3100-3111.

Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun*. 2000 ; **68** : 38-45.

Villegas EN, Lieberman LA, Carding SR, Hunter CA. Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon. *Infect. Immun*. 2002 ; **70** : 4757-4761.

Vincent MS, Gumperz JE, Brenner MB. Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat. Immunol*. 2003 ; **4** : 517-523.

Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007 ; **104** : 6442-6447.

Waldeland H, Pfefferkorn ER, Frenkel JK. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice. *J. Parasitol*. 1983 ; **69** : 171-175.

Wallon M, Kodjikian L, Binquet C, Garweg J, Fleury J, Quantin C, Peyron F. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics*. 2004 ; **113** : 1567-1572.

- Wang H, Liu Q, Liu K, Zhong W, Gao S, Jiang L, An N.** Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Int.* 2007 ; **56** : 263-268.
- Wang HL, Wang GH, Li QY, Shu C, Jiang MS, Guo Y.** Prevalence of *Toxoplasma* infection in first-episode schizophrenia and comparison between *Toxoplasma*-seropositive and *Toxoplasma*-seronegative schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.* 2006 ; **114** : 40-48.
- Webster JP, Lamberton PHL, Donnelly CA, Torrey EF.** Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc. Biol. Sci.* 2006 ; **273** : 1023-1030.
- Wei S, Marches F, Borvak J, Zou W, Channon J, White M, Radke J, Cesbron-Delauw MF, Curiel TJ.** *Toxoplasma gondii*-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. *Infect. Immun.* 2002 ; **70** : 1750-1760.
- Wilson DC, Matthews S, Yap GS.** IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN- γ production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 2008 ; **180** : 5935-5945.
- Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA.** A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 2005 ; **165** : 63-74.
- Witowski J, Ksiazek K, Jörres A.** Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004 ; **61** : 567-579.
- Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H.** Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Int.* 2008. in press.
- Xue M, He S, Zhang J, Cui Y, Yao Y, Wang H.** Comparison of cholera toxinA2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of *Toxoplasma* multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Exp. Parasitol.* 2008 ; **119** : 352-357.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hishino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S.** TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2003 ; **4** : 1144-1150.
- Yap GS, Scharton-Kersten T, Ferguson DJ, Howe D, Suzuki Y, Sher A.** Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1998 ; **66** : 4382-4388.
- Yarovinsky F.** Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Lett.* 2008 ; **119** : 17-21.
- Yarovinsky F, Kanzler H, Hieny S, Coffman RL, Sher A.** Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. *Immunity.* 2006 ; **25** : 655-664.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A.** TLR11 activation of dendritic cells by protozoan profilin-like protein. *Science.* 2005 ; **308** : 1626-1629.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK.** Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 2001 ; **194** : 519-527.
- Yolken RH, Bachmann S, Rouslanova I, Lillehoj E, Ford G, Fuller Torrey E, Schroeder J.** Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. *Clin. Infect. Dis.* 2001 ; **32** : 842-844.
- Yu J, Xia Z, Liu Q, Liu J, Ding J, Zhang W.** Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. *Vet. Parasitol.* 2007 ; **143** : 79-85.

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J. Immunol.* 2002 ; **168** : 554-561.

Zhang G, Huong VT, Battur B, Zhou J, Zhang H, Liao M, Kawase O, Lee EG, Dautu G, Igarashi M, Nishikawa Y, Xuan X. A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing GRA4, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology.* 2007 ; **134** : 1339-1346.

Zhang J, He S, Jiang H, Yang T, Cong H, Zhou H, Zhang J, Gu Q, Li Y, Zhao Q. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 2007 ; **101** : 331-338.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic-cell derived exosomes. *Nat. Med.* 1998 ; **4** : 594-600.

ANNEXES

Original article

A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice

Céline Beauvillain^{a,b,c,*}, Sophie Ruiz^{a,1}, Rachel Guiton^a,
Daniel Bout^a, Isabelle Dimier-Poisson^a

^a Université François-Rabelais, INRA, UMR 0483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie,

IFR des Agents Transmissibles et Infectiologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31, Avenue Monge, 37200 Tours, France

^b Unité Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 564, University Hospital, 4, rue Larrey, 49933 Angers, France

^c Immunology and Allergology Laboratory, University Hospital, Angers, France

Received 20 October 2006; accepted 7 July 2007

Available online 15 July 2007

Abstract

Our results show that exosomes secreted by SRDC pulsed *in vitro* with *Toxoplasma gondii*-derived antigens (Exo-TAG) induced protective responses against infection with the parasite in both syngeneic and allogeneic mice. After oral infection, syngeneic CBA/J mice exhibited significantly fewer cysts in their brains and allogeneic C57BL/6 mice survived. This protection was associated with strong humoral responses *in vivo* in serum from both CBA/J and C57BL/6 mice, and with high levels of anti-TAG IgA antibodies in intestinal secretions from CBA/J mice alone. Furthermore, strong cellular responses *in vivo* were observed in both mouse models. Cellular proliferation was associated with cytokines production by spleen and mesenteric lymph node cells. The results presented here show that exosomes are nucleic acid free vesicles that are able to induce immune responses correlated with protection against parasitic infections in both syngeneic and allogeneic mice. They could constitute an efficient tool for use in vaccination and antitumor strategies based on exosomes.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Exosomes; Dendritic cells; *Toxoplasma gondii*; Vaccine

1. Introduction

The coccidian protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an obligate intracellular parasite responsible for toxoplasmosis [1]. After a primary infection in immunocompetent individuals, the replication of tachyzoites is limited, resulting in the formation of bradyzoite forms, a dormant stage of the parasite. Usually asymptomatic, toxoplasmosis can lead to severe damage if associated with immunosuppression due to the

reactivation of encysted parasites or transmission to the fetus during pregnancy. Several studies aim to identify protective anti-*T. gondii* vaccine. Attenuated *T. gondii* tachyzoite vaccines have been successfully used for animal use [2], but vaccination with live organisms cannot be safely performed in humans. Protective antigens were identified among parasite surface molecules such as SAG1 [3] and induced the development of significant but partial protection in animal models.

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells that control the outcome of the immune response [4]. Due to these properties, DCs have been proposed as vaccine vectors [5]. We previously reported that transfer of DCs pulsed with *T. gondii* antigens (TAG) to healthy mice induced protection against a virulent oral challenge of *T. gondii* [6]. However, this approach is limited due to difficulty to obtain high quantity of DCs suitable for vaccination [7].

* Corresponding author at: Unité Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 564, University Hospital, 4, rue Larrey, 49933 Angers, France. Tel.: +33 (0)2 4135 4733; fax: +33 (0)2 4173 1630.

E-mail address: celine.beauvillain@univ-angers.fr (C. Beauvillain).

¹ Authors contribute equally to this work. CB is a fellow from Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche.

The ability of exosomes, especially those derived from DCs, to induce protective immune responses offers an alternative to DC-based vaccines. Exosomes are cell-free membrane vesicles and secreted by several cell types [8–10]. Exosomes display functional MHC class I and class II and T-cell costimulatory molecules on their surface [8]. Exosomes derived from the DC cell line D1 and loaded with tumor peptides induce a protective immune response, leading to the eradication of established tumors in mice [11]. The potential of exosome-based vaccines was evidenced in a Phase I clinical trial in stage IV melanoma patients (long-term safety and *in vivo* bioactivity) [12].

We recently reported that SRDC (CD8 α + CD4 $^{-}$ DC cell line) elicit protection in syngeneic mice against *T. gondii* infection [13]. In this study, we evaluated whether SRDC-derived exosomes may induce a protective immune response against *T. gondii* in syngeneic CBA/J mice and in allogeneic C57BL/6 mice.

2. Materials and methods

2.1. Mice

All *in vivo* immunization experiments were carried out using female CBA/J (H-2^k) and C57BL/6 (H-2^b) mice (Janvier, France) and maintained in a pathogen-free environment. CBA/J mice are resistant to the acute phase of infection by *T. gondii* resulting in brain cyst formation whereas C57BL/6 mice are sensitive and die 8–10 days after the oral challenge.

2.2. Parasites

Tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* were harvested from the peritoneal fluid of Swiss OF1 mice, intraperitoneally infected 3–4 days earlier. Tachyzoites were washed with RPMI 1640 medium (Invitrogen), sonicated and centrifuged at 2000 \times g for 30 min at 4 °C. The supernatant from the last centrifugation was concentrated through dialysis tubing to produce aliquots. A protein assay reagent kit (MicroBCA; Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) was used to determine the protein concentration. Cysts of the *T. gondii* 76K strain were obtained from the brain of orally infected CBA/J mice with 80 cysts one month earlier.

2.3. Exosome purification

The previously described [13], DC cell line SRDC was cultured for 18 h without or with 25 μ g ml⁻¹ of TAg. The supernatants were recovered and centrifuged twice for 30 min at 4 °C, at 3000 and 10,000 \times g, respectively. Exosomes were pelleted at 100,000 \times g for 1 h at 4 °C, washed in PBS and ultracentrifuged again. After resuspension, the protein concentration was determined using micro-BCA kit. A total of 10 μ l of exosome solution was used for microscopy observation, made with a Jeol 1010 XC electron microscope (Tokyo, Japan).

2.4. Quantitation of *Toxoplasma antigen* in the preparations of exosomes

The content of free TAg into the purified exosomes was determined by competitive inhibition ELISA. Briefly, wells coated with 5 μ g ml⁻¹ TAg, and blocked with 2% BSA, were incubated with serial 2-fold dilution of purified TAg standard or TAg-exosomes diluted in a 1/100 dilution of mouse anti-toxoplasma sera. Control-exosomes were used as negative controls. The Ig binding was detected with a goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) diluted 1:5000 in BSA 4%. The limit of detection of the assay was 5 ng ml⁻¹ TAg.

2.5. Adoptive immunizations and *Toxoplasma* challenge

Exosomes isolated from unpulsed-SRDC (Exo-NP) or TAg-pulsed-SRDC (Exo-TAg) supernatants were purified as previously described. Mice (12 by groups) received intravenously 5 μ g of Exo-NP, Exo-TAg, TAg or 5 μ g of Exo-NP co-injected with 5 μ g of TAg (Exo-NP + TAg) in 200 μ l of PBS at day 0 and day 15. CBA/J and C57BL/6 mice were orally challenged with 80 cysts and 30 cysts of *T. gondii* 76K strain, respectively, at day 30. Serum, intestinal secretions, spleen and mesenteric lymph nodes were harvested 10–13 days after each passive exosome transfer. At day 30 post-oral challenge CBA/J mice were sacrificed and each brains were recovered separately for cerebral cyst counting. Results are expressed as cyst number (mean \pm SD). For the C57BL/6 mice, the mortality was followed daily from day 9 to 21 after the oral challenge.

2.6. Analysis of humoral and cellular immune response

Serums and intestinal secretions were recovered and stored at -20 °C. Immunoblotting was performed as previously described, using TAg [14]. Serum and intestinal secretions from infected mice and 1E5 mAb (anti-SAG1) were used as positive controls. For lymphocytes proliferation and cytokine analysis, spleen and MLN cells from CBA/J and C57BL/6 mice were seeded in triplicate in 96-well culture plates (5 \times 10⁵ cells/well) and cultured 3 days in supplemented RPMI medium without or with 2–10 μ g ml⁻¹ TAg. Cells were pulsed with 0.5 μ Ci ³H-thymidine per well for 18 h. Radioactivity was measured by liquid scintillation counting. Results are expressed as a stimulation index defined as follows: A/B where A and B are the cpm values obtained with TAg-stimulated and non-stimulated cells, respectively. Culture supernatants were harvested at different times, from 24 h to 96 h and assayed for IL-2, IL-4, IL-10, and IFN- γ production using commercial ELISA kits following to the manufacturer's instructions (BD pharmingen, San Diego, California, USA).

2.7. Short-term homing

Freshly-purified exosomes from SRDC-cells were labeled with 1 μ Ci of ⁵¹Cr per μ g of exosomes for 2 h at 37 °C and washed by successive centrifugations. Exosomes (10 μ g) were injected into the tail vein of CBA/J and C57BL/6 mice.

Mice were sacrificed 2 h, 6 h, 12 h and 24 h after the passive transfer. Organs were collected and homogenized in 3 ml of distilled water containing 1% triton X-100 (Sigma) and the radioactivity was measured using a gamma counter (Perkin-Elmer, MA, USA). Values were expressed as the percentage of radioactivity recovered in the organ. Each experiment was done three times.

2.8. Statistical analysis

The Mann–Whitney test (InStat 2.01 software) was applied to reveal significant differences in protection against *T. gondii* infection. $P < 0.05$ was taken as the level of significance.

3. Results

3.1. SRDC cells secrete exosomes

In a first set of experiments, we evaluated whether the SRDC cells may produce exosomes. Electron microscopy analysis of ultracentrifuged SRDC culture supernatants revealed the presence of vesicles with a characteristic “cup-shaped” morphology, and with a diameter ranging from 40 to 120 nm (mean = 80 nm) (Fig. 1), characteristics consistent with the observed size and morphology of internal vesicles in multi-vesicular endosomes [8].

3.2. Homing of SRDC cell-derived exosomes following adoptive transfer

A radioisotope trafficking study was done with exosomes from SRDC cells to find out where and when they home to host organs. The localization of the ^{51}Cr -labeled exosomes in CBA/J and C57BL/6 mice was analyzed at 2, 6, 12 and 24 h after injection (Fig. 2). Two hours after injection of the

recipient CBA/J and C57BL/6 mice, radioactivity was accumulated in the spleen (20 and 13%, respectively) and at a lower level, in the small intestine (14 and 15%, respectively). After 12 h, level of radioactivity increased in the spleen (25 and 38%) where it remained high until 24 h (45 and 30%), whereas it began to decrease in the small intestine of the two mouse strains. Throughout this time, radioisotope activity increased in the liver and kidneys, organs of elimination. Collectively, these results show that, following *i.v.* injection, profiles of SRDC-derived exosomes localization were similar in CBA/J and C57BL/6 mice, indicating a preferential homing in the small intestine and spleen.

3.3. Purified exosomes pulsed with TAG do not contain serologically detectable TAG

We wanted to determine the potential presence of serologically free TAG within the purified exosomes. Using a high-titered mouse anti-TAG sera in a competitive inhibition ELISA, we determined that TAG was not serologically detectable (<0.05% protein or <5 ng of TAG in 10 μg of exosomes) (data not shown). The pulse of SRDC with TAG did not affect the purity of the exosomes.

3.4. Exo-TAG efficiently protect syngeneic CBA/J mice against *T. gondii*

The ability of exosomes to protect against *T. gondii* infection was evaluated in syngeneic CBA/J mice that received two *i.v.* injections of exosomes derived from TAG-pulsed-SRDC (Exo-TAG). Control mice were injected with exosomes derived from unpulsed-SRDC (Exo-NP), TAG alone, exo-NP co-injected with TAG (Exo-NP+ TAG) or PBS (untreated). Brain cysts load was determined 30 days after the oral challenge. CBA/J mice injected intravenously twice with 5 μg of

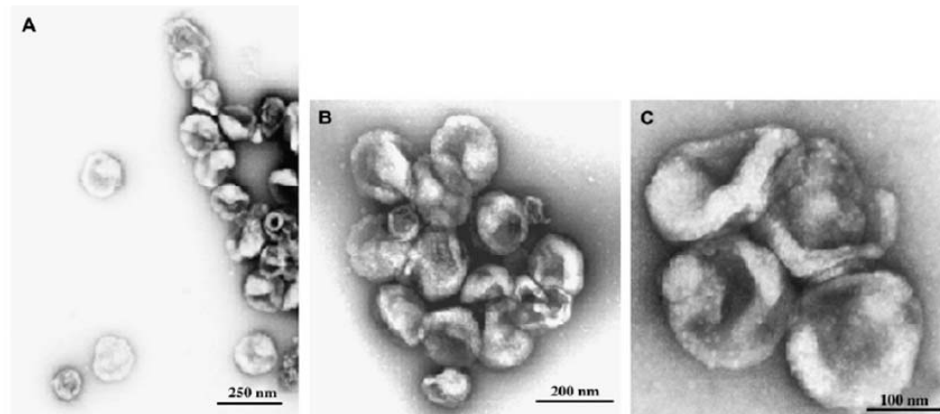


Fig. 1. SRDC cells secrete exosomes. SRDC-culture supernatants were ultracentrifuged and the pellet analyzed by electron microscopy. The pellets contain membrane vesicles of 40 nm–120 nm diameter. Magnification: $\times 20,000$ (A), $\times 25,000$ (B) and $\times 50,000$ (C).

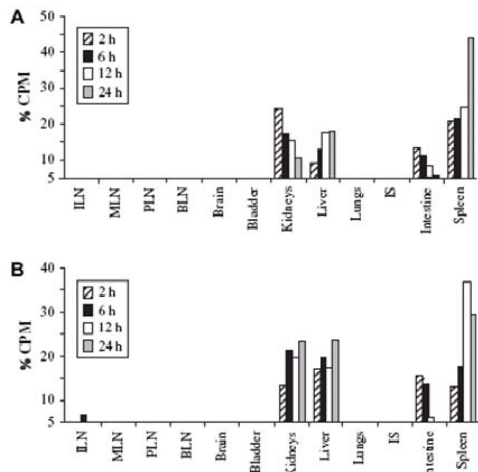


Fig. 2. Homing of exosomes derived from SRDC cell line in syngeneic CBA/J (A) and allogeneic C57BL/6 mice (B) after intravenous injection. Mice were injected with 5 μ g ^{51}Cr -labeled-exosomes. The indicated organs were recovered from two mice at 2, 6, 12 and 24 h to measure the radioactivity. Results, expressed as the ratio between radioactivity measured in each organ and the total radioactivity in the mouse, are representative of three experiments. ILN, inguinal lymph nodes; MLN, mesenteric lymph nodes; PLN, popliteal lymph nodes; BLN, brachial lymph nodes; IS, intestinal secretion.

Exo-TAg exhibited a strong resistance to brain cyst formation (1900 \pm 356 cysts) compared to untreated mice (4720 \pm 922 cysts) or mice injected with 5 μ g of Exo-NP (5430 \pm 1791 cysts) or TAg (3500 \pm 359 cysts) or 5 μ g of Exo-NP co-injected with 5 μ g of TAg (3320 \pm 419 cysts) (Fig. 3A). In mice immunized with Exo-TAg, the brain parasite burden was significantly lower (60% decrease) compared to the other groups ($p < 0.01$) (Fig. 3A). These results show that adoptive transfer of exo-TAg induces protection in sensitive syngeneic CBA/J mice against *T. gondii* infection.

3.5. Exo-TAg protect C57BL/6 mice against *T. gondii*

The ability of Exo-TAg to induce protection of allogeneic recipients against parasite infection was evaluated in C57BL/6 mice that are susceptible to the acute phase of infection. C57BL/6 mice were intravenously injected twice with 5 μ g of TAg, Exo-NP, Exo-NP co-injected with 5 μ g of TAg or Exo-TAg. The mice were then challenged orally with 30 cysts of *T. gondii* 15 days after the last injection. The mortality was determined daily throughout the acute phase of infection (9–21 days after the oral challenge). All the mice immunized with Exo-TAg (8/8) survived at day 21 post infection. The survival ratio of TAg, Exo-NP and Exo-NP + TAg-injected C57BL/6 mice were 60%, 50% and 50%, respectively (Fig. 3B). The survival ratio observed in the untreated mice

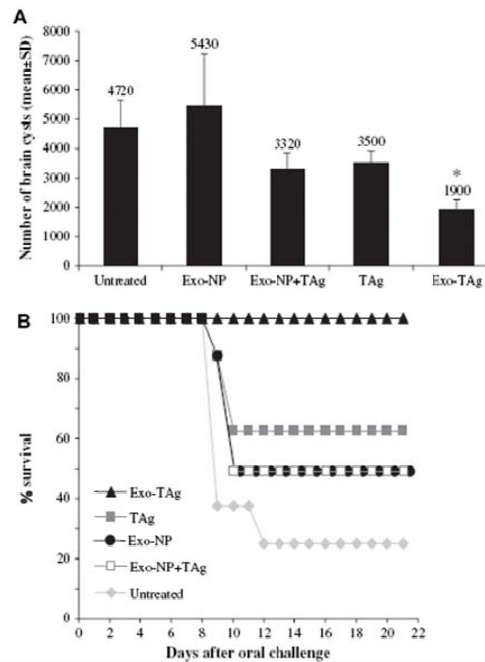


Fig. 3. Induction of protective immunity in syngeneic CBA/J and allogeneic C57BL/6 mice against infection with *T. gondii* after injection of Exo-TAg. CBA/J and C57BL/6 mice were either untreated or injected twice with 5 μ g of exosomes derived from unpulsed SRDC dendritic cells (Exo-NP), exosomes derived from TAg-pulsed SRDC (Exo-TAg), Exo-NP co-injected with 5 μ g of TAg (Exo-NP + TAg) or with 5 μ g of TAg. Mice were then orally infected at day 30 with 80 cysts for CBA/J and with 30 cysts of *T. gondii* 76K strain. (A) The brain cyst load was evaluated 30 days post challenge in CBA/J mice. Values indicate the mean number of brain cysts (\pm SD), and are representative of three independent experiments, * $p < 0.01$. (B) C57BL/6 mice were observed daily for mortality from day 0 to day 21 post infection. Results expressed as a percentage of animal survival, are representative of three independent experiments.

was 25%. These results show that adoptive transfer of exo-TAg induces protection in sensitive allogeneic C57BL/6 mice against *T. gondii* infection.

3.6. Protection against *T. gondii* infection is associated with the production of TAg-specific-IgA antibodies in the intestinal secretions of Exo-TAg-immunized-CBA/J mice

Previous studies underlined the protective role of secretory IgA in inducing protection against *T. gondii* [15]. We then evaluated whether the protective immune response generated by Exo-TAg was related to the production of anti-*T. gondii* IgA. Only syngeneic CBA/J mice immunized with Exo-TAg generated IgA antibodies specific for *T. gondii* antigens in their intestinal secretions (Fig. 4A, left panel). Two injections

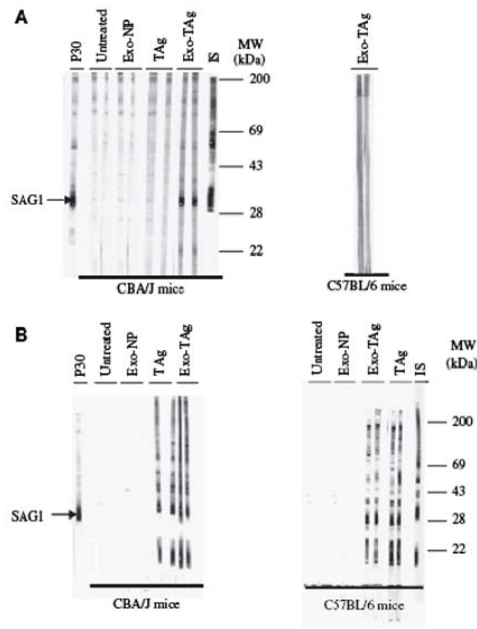


Fig. 4. Western blotting analysis of anti *T. gondii* humoral responses generated in syngeneic CBA/J and allogeneic C57BL/6 mice. A) Analysis of intestinal secretory anti-*T. gondii* IgA antibodies. Each lane corresponds to intestinal secretions from mice from the different groups analyzed. Intestinal secretions from infected mouse (lane IS) and the 1E5 (anti-p30 [SAG1]) mAb (lane P30) were used as positive controls. B) Analysis of serum IgG anti-*T. gondii* antibodies. Each lane corresponds to serum from mice from the different groups analyzed. Serum from infected mouse (lane IS) and 1E5 (anti-p30 [SAG1]) mAb (lane P30) were used as positive controls.

of Exo-TAg were required to induce anti-TAg IgA-Ab that recognized mainly a *T. gondii* antigen with an apparent molecular weight similar to the one recognized by the anti-SAG1 mAb 1E5. No specific anti-TAg IgA Abs were detected in intestinal secretions of allogeneic C57BL/6 mice, even after 2 injections with Exo-TAg (Fig. 4A, right panel) as well as in intestinal secretions from untreated mice or mice injected with Exo-NP or TAg, in both syngeneic and allogeneic recipients (Fig. 4A and data not shown). These results suggest that exo-TAg induce a mucosal humoral response in CBA/J syngeneic mice.

3.7. Protection against *T. gondii* infection is associated with the production of TAg-specific IgG antibodies in the serum of Exo-TAg-immunized-CBA/J and C57BL/6 mice

This study was carried out following the same experimental procedure as previously described for the analysis of *T. gondii*-specific-IgA responses. We analyzed the circulating anti-*T. gondii* Ab responses induced in the 4 groups of mice. Several *T. gondii* antigens are recognized by circulating IgG

from CBA/J (Fig. 4B, left panel) and C57BL/6 mice (Fig. 4B, right panel). Serum from TAg and Exo-TAg mice, as serum from infected mice, recognized several *T. gondii* antigens in both the CBA/J and C57BL/6 mice. No differences, in term of antigen recognition, were observed between the two groups. No *T. gondii* Ab were detected in the serum of untreated mice or mice injected with Exo-NP (Figs. 4A,B). These results show that Exo-TAg induce a strong and polyclonal *T. gondii*-specific humoral response in both syngeneic and allogeneic recipient mice.

3.8. Injection of Exo-TAg induces a strong *T. gondii*-specific proliferative response in CBA/J and C57BL/6 mice

We next analyzed whether Exo-TAg may induce the generation of *T. gondii* antigen-specific T cells by evaluating the proliferation of spleen and mesenteric lymph node (MLN) cells from syngeneic CBA/J and allogeneic C57BL/6 mice after injection of TAg, Exo-NP or Exo-TAg.

Spleen cells from Exo-TAg injected CBA/J mice exhibited a strong and dose-dependent proliferative response to *T. gondii* antigens (stimulation index (SI) = 7.5 using $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAg) (Fig. 5A). A similar response was observed using MLN cells (SI = 4 using $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAg) (Fig. 5B). No cellular expansion was observed using spleen and MLN cells from untreated mice or mice injected with TAg or Exo-NP (Figs. 5A,B). In Exo-TAg-immunized C57BL/6 mice, a dose-dependent proliferative response was observed after two immunizations using spleen (Fig. 5C) or MLN cells (Fig. 5D) (SI = 4 and 6, respectively, after re-stimulation with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAg). These results show that *i.v.* injection of exo-TAg triggers both systemic and local cell-mediated immunity to *T. gondii* in both syngeneic CBA/J and allogeneic C57BL/6 mice.

3.9. Analysis of the cytokines produced by TAg-stimulated spleen and MLN cells from syngeneic CBA/J mice and allogeneic mice injected with Exo-TAg

IL-2, -4, -10 and IFN- γ production was assessed in the supernatants of *in vitro* TAg-stimulated spleen and MLN cells from untreated CBA/J or C57BL/6 mice or mice immunized with TAg, Exo-NP or Exo-TAg, before oral challenge (Table 1). IL-2 was produced by TAg-stimulated spleen and MLN cells from Exo-TAg immunized CBA/J mice (35 and 18 pg ml^{-1} , respectively). Both cell types produced IL-4 in a similar range (20 pg ml^{-1}). A specific release of IL-2, but not of IL-4, by spleen and MLN cells from TAg immunized CBA/J mice was also detectable (93 and 28 pg ml^{-1}). IL-2 and IL-4 by spleen or MLN cells from untreated and immunized C57BL/6 mice were not detected in the culture supernatants. Spleen cells, and, in a lower extent, MLN cells from Exo-TAg injected CBA/J mice, produced IL-10 (7000 and 210 pg ml^{-1} , respectively) in response to TAg, in contrast to control groups expected for TAg-group in spleen (1890 pg ml^{-1}). For untreated, TAg- and Exo-NP-immunized C57BL/6 mice, a weak expression of

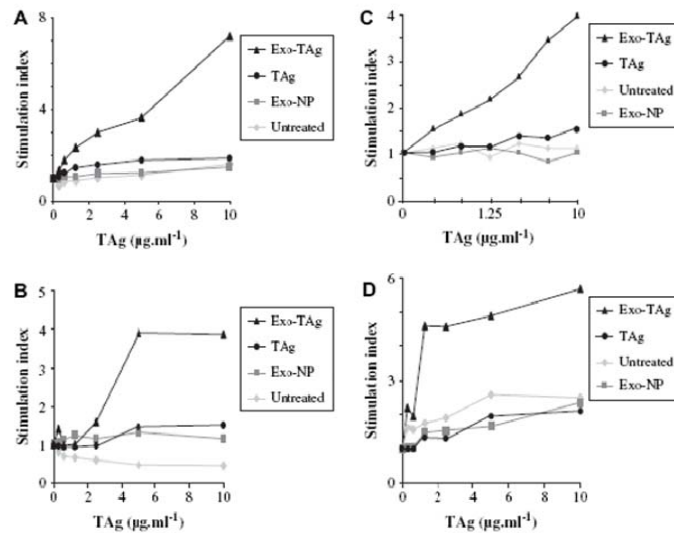


Fig. 5. In vitro proliferation of spleen (A, C) and mesenteric lymph node (B, D) cells from syngeneic CBA/J (A, B) and allogeneic C57BL/6 mice (C, D) after TAG restimulation. Mice were injected intravenously twice with 5 µg of Exo-TAG, Exo-NP or TAG. Control mice were untreated. Spleen and MLN cells were isolated 15 days after the second injection and stimulated in vitro with 2–10 µg/ml of TAG. Results are expressed as stimulation index and are representative of one of three experiments.

IL-10 was detected in spleen and MLN cell cultures after TAG restimulation. In contrast, a strong increase of IL-10 production was observed in spleen cells and MLN cells from Exo-TAG-injected C57BL/6 mice after TAG restimulation (500 pg ml⁻¹ and 250 pg ml⁻¹, respectively). A high IFN-γ production by spleen and MLN cells from CBA/J mice immunized with Exo-TAG was detected (6000 and 7660 pg ml⁻¹, respectively). Spleen and MLN cells from TAG injected CBA/J mice also produced significant levels of IFN-γ (2000 and 2700 pg ml⁻¹, respectively) after TAG-restimulation. A weak expression of IFN-γ was also observed in spleen and MLN cells isolated from Exo-NP (500 and 70 pg ml⁻¹, respectively) and untreated CBA/J mice (340 and 80 pg ml⁻¹, respectively). After TAG-restimulation, MLN cells from untreated, TAG- and Exo-NP-immunized C57BL/6 mice produced similar levels of IFN-γ (600, 900 and 500 pg ml⁻¹, respectively); these levels markedly increased in supernatants of MLN cells from Exo-TAG-injected mice, reaching a concentration of 3000 pg ml⁻¹. TAG-stimulated spleen cells from TAG- and Exo-NP-immunized mice produce IFN-γ (3500 and 2000 pg ml⁻¹ respectively). TAG-stimulated spleen cells from Exo-TAG-injected mice produced the highest levels of IFN-γ (6500 pg ml⁻¹). TAG-stimulated spleen cells from untreated mice produce lower levels of IFN-γ (500 pg ml⁻¹). These results show that intravenous injection of exo-TAG triggers both systemic and local cell-mediated immunity to *T. gondii*, with a Th1/Th2 cytokine balance in syngeneic CBA/J mice and with a Th1 cytokine profile in allogeneic C57BL/6 mice.

4. Discussion

This study shows that exosomes derived from TAG-pulsed SRDC induce protective immunity against parasite infection in both syngeneic and allogeneic mouse models. Immune protection is associated with the induction of humoral and cellular TAG-specific responses. Previously, we demonstrated that DC pulsed with TAG induce protection in syngeneic mouse, suggesting that DC may be useful vectors for vaccination against parasite infection [6,13,16]. However, even promising, this approach is expensive and difficult to standardize. We then evaluated whether DC-derived exosomes may also induce protection in both syngeneic and allogeneic models. Exosomes have been shown to mediate antigen presentation [11,17] and are implicated in the transfer of biological material from one cell to another [17]. DC-derived exosomes have been used in antitumor immunotherapies, inducing tumor regression mediated by the generation of CTL responses [11]. In a previous study, we observed that exosomes used as vaccine against *T. gondii* induced a protection in syngeneic models (67% survival in C57BL/6 mice immunized with Exo-TAG [18]).

Exosomes produced by SRDC cell could act *in vivo* as efficient stimulatory vehicles for antigen delivery and not simply as an adjuvant; thus we were unable to detect free TAG in our preparation of TAG exosomes. They induce a potent systemic TAG-specific humoral response in both allogeneic and syngeneic models, as well as a local humoral response in the intestine

Table 1
Cytokine production by spleen and mesenteric lymph node (MLN) cells from syngeneic CBA/J and allogeneic C57BL/6 mice after *in vitro* TAg restimulation

Groups ^a		Cytokines (pg/ml) ^b				
		IFN- γ	IL-2	IL-10	IL-4	
CBA/J	Spleen	Exo-TAg	6000	35	7000	20
		Exo-NP	500	0	100	0
		TAg	2000	93	1890	0
		Untreated	340	0	31	0
CBA/J	M	Exo-TAg	7660	18	210	20
		Exo-NP	70	0	40	0
	L	TAg	2700	28	6	0
	N	Untreated	80	0	5	0
C57BL/6	Spleen	Exo-TAg	6500	0	500	0
		Exo-NP	2000	0	10	0
		TAg	3500	0	60	0
		Untreated	500	0	10	0
C57BL/6	M	Exo-TAg	3000	0	250	0
		Exo-NP	500	0	90	0
	L	TAg	900	0	80	0
	N	Untreated	600	0	60	0

^aSpleen and MLN cells from mice injected with Exo-TAg, Exo-NP and TAg or untreated were isolated 15 days after the second injection, and stimulated *in vitro* with 10 μ g of TAg. IL-2 and IL-4 were quantified at 24 h, IL-10 at 72 h and IFN- γ at 96 h.

^bResults are expressed as the levels of cytokines produced by TAg-stimulated cells minus the level of cytokine spontaneously produced by unstimulated cells, expressed in pg.ml⁻¹ (mean values using cells from three mice).

of syngeneic CBA/J mice. The induction of efficient mucosal immune responses against *T. gondii* has been shown to inhibit parasite replication and to reduce the severity of the infection. Moreover, studies reported that specific antibodies play an important role in resistance to *T. gondii* infection *in vivo*, by blocking infection of host cells by tachyzoites [19,20].

A Th1-type T cell response was elicited *in vivo* by exosomes from TAg-pulsed SRDC in CBA/J and C57BL/6 mice. This mechanism could account for the production of IFN- γ which is offset by significant expression of IL-10. In agreement with previous studies, this result shows that exosomes preferentially elicit a polarized Th1-type immune response and induce both systemic and local TAg-specific proliferative responses in syngeneic CBA/J mice. A protective immunity to *T. gondii* infection is generally associated to the generation of TAg-specific CD8 + T cells and the production of IFN- γ [21]. CD4 + T cells also contribute significantly to the protection against chronic *T. gondii* infections via their role as helper cells for the production of isotype switched antibodies and cytokines [22]. Moreover, several studies showed that a Th2-type mucosal immune response is also associated to the control of *T. gondii* infection [16,23]. Weak but significant amounts of IL-4 were also produced by MLN and spleen cells from Exo-TAg

syngeneic CBA/J mice. These results are similar to those obtained by Aline et al. [18], excepted a prominent Th1 profile. Injection of Exo-TAg also induced in allogeneic C57BL/6 mice both systemic and local specific proliferative responses belonging to the CD4 + Th1 subset, associated to mice survival after *T. gondii* infection.

Since the first observation that exosomes can induce antitumor immunity [11], exosomes have been extensively evaluated as vaccine vectors in different models. However, the way exosomes induce antigen-specific immune responses is not yet elucidated. Exosomes express MHC class I- and class II/peptide complexes, that can be used by recipient DC to activate T cells [24,25]. A proteomic analysis of D1-derived exosomes revealed the presence of 21 proteins involved in cell-cell interaction that could confer to exosomes the ability to be captured by APCs [9,26]. A recent study showed that, under defined conditions, T cells can be directly activated by exosomes expressing a high density of MHC I/peptide complexes, B7 molecules and ICAM-1 [26]. We can assume that the protection observed in allogeneic C57BL/6 mice after Exo-TAg injection could be induced by parasite antigen presentation after the capture of exosomes by APCs. In fact, Andre et al. have shown that Mart1 is efficiently presented to CTL by HLA-A2

exosomes pulsed onto HLA-A2-mature DC [24]. So, TAG-pulsed SRDC-derived exosomes, transferred in allogeneic C57BL/6 mice, could also be recognized as foreign bodies, therefore being destroyed by the immune system cells and processed by the host. In syngeneic model, Exo-TAG can activate directly or indirectly T lymphocytes and elicit protection against *T. gondii* [25,26]. Whether exosomes directly activate T cells or are captured and processed by APCs remains unclear.

Protection obtained with Exo-TAG injection in syngeneic model suggests that *i.v.* injection of Exo-TAG alone is not sufficient to induce total protection against brain cyst development. This result suggest that Exo-TAG may be associated to adjuvant to induce an optimal protection immune response. In agreement with this hypothesis, a recent study reported that the injection of human exosomes pulsed with Mart1 peptide leads to the expansion of Mart1-specific CTL response *in vivo* in HLA-A2 transgenic mice when associated with CpG-oligonucleotides [27]. Moreover, other parameters such as the route of immunization, the amount of exosomes, and the number of injections, should be also considered.

To define the contribution of SRDC-derived exosomes in immunogenicity, we analyzed their migration in CBA/J and C57BL/6 mice. In our experiments, the *i.v.* route was chosen since previous studies have shown that antigen-pulsed DCs, injected *i.v.*, are more effective than those administered *s.c.* [28,29]. We observed that adoptively transferred exosomes in CBA/J and C57BL/6 mice were rapidly transferred to the spleen and also to the small intestine within 2 h after *i.v.* injection. Twenty-four hours after *i.v.* injection, radioactivity was mainly detected in the spleens of both CBA/J and C57BL/6 mice. These observations are in line with a strong activation of systemic and mucosal immune responses in both CBA/J and C57BL/6 mice, even though the mechanisms by which exosomes home to appropriate organs are not yet known.

In conclusion, this study shows that exosomes used in prophylactic vaccination can elicit systemic and mucosal protective responses against a pathogen that is thought to be strictly invasive. The protection is effective in both syngeneic and allogeneic animal models. Exosomes thus appear as good candidates in prophylactic anti-parasite vaccines.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Y. Delneste for critical reading of the manuscript, to Pr. J.-F. Dubremetz for providing 1E5 mAb, to Pr. Ph. Roingeard for help with electronic microscopy and to J. Pierre, D. Tabareau and T. Papin for technical and typing assistance.

References

- [1] E.Y. Denkers, B.A. Butcher, L. Del Rio, S. Bennouna, Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*, *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 411–421.
- [2] D. Buxton, E.A. Innes, A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis, *Parasitology* 110 (Suppl.) (1995) S11–S16.

- [3] C. Bonenfant, I. Dimier-Poisson, F. Velge-Roussel, D. Buzoni-Gatel, G. Del Giudice, R. Rappuoli, D. Bout, Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1605–1612.
- [4] J. Bancheau, K. Palucka, Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 296–306.
- [5] C. Conrad, F.O. Nestle, Dendritic cell-based cancer therapy, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5 (2003) 405–412.
- [6] I. Bourguin, M. Moser, D. Buzoni-Gatel, F. Tielemans, D. Bout, J. Urbain, O. Leo, Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity *in vivo*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4867–4874.
- [7] A. Iwasaki, B.L. Kelsall, Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 229–239.
- [8] C. Thery, L. Zitvogel, S. Amigorena, Exosomes: composition, biogenesis and function, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 569–579.
- [9] J. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, L. Zitvogel, Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming, *Nat. Med.* 7 (2001) 297–303.
- [10] G. van Niel, G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, M. Heyman, Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles, *Gastroenterology* 121 (2001) 337–349.
- [11] L. Zitvogel, A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, S. Amigorena, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nat. Med.* 4 (1998) 594–600.
- [12] N. Chaput, J. Taieb, N. Scharzt, C. Flament, S. Novault, F. Andre, L. Zitvogel, The potential of exosomes in immunotherapy of cancer, *Blood Cells Mol. Dis.* 35 (2005) 111–115.
- [13] S. Ruiz, C. Beauvillain, M.-N. Mevelec, P. Roingeard, P. Breton, D. Bout, I. Dimier-Poisson, A novel CD4 = CD8alpha + CD205 + CD11b-murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis, *Cell. Microbiol.* 7 (2005) 1659–1671.
- [14] T. Charde, I. Bourguin, M.-N. Mevelec, J.-F. Dubremetz, D. Bout, Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens, *Infect. Immun.* 58 (1990) 1240–1246.
- [15] D. Bout, M. Moretto, I. Dimier-Poisson, D. Buzoni-Gatel, Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte, *Immunobiology* 201 (1999) 225–228.
- [16] I. Dimier-Poisson, F. Aline, M.-N. Mevelec, C. Beauvillain, D. Buzoni-Gatel, D. Bout, Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5254–5265.
- [17] B. Fevrier, G. Raposo, Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 415–421.
- [18] F. Aline, D. Bout, S. Amigorena, P. Roingeard, I. Dimier-Poisson, *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4127–4137.
- [19] H. Kang, J.S. Remington, Y. Suzuki, Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase, *J. Immunol.* 164 (2000) 2629–2634.
- [20] P.C. Sayles, G.W. Gibson, L.L. Johnson, B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 1026–1033.
- [21] R.T. Gazzinelli, E.Y. Denkers, A. Sher, Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites, *Infect. Agents Dis.* 2 (1993) 139–149.
- [22] L.L. Johnson, P.C. Sayles, Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice, *Infect. Immun.* 70 (2002) 185–191.

- [23] O. Liesenfeld, J. Kosek, Remington, Y. Suzuki, 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 (1996) 597–607.
- [24] F. Andre, N. Chaput, N.E. Scharz, C. Flament, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, G. Raposo, B. Escudier, D.H. Hsu, T. Tursz, S. Amigorena, E. Angevin, L. Zitvogel, Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class II/peptide complexes to dendritic cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 2126–2136.
- [25] C. Thery, L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, S. Amigorena, Indirect activation of naive CD4 + T cells by dendritic cell-derived exosomes, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 1156–1162.
- [26] I. Hwang, X. Shen, J. Sprent, Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 6670–6675.
- [27] N. Chaput, N.E. Scharz, F. Andre, J. Taieb, S. Novault, P. Bonnaventure, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, M. Merad, G. Adema, M. Adams, M. Ferrantini, A.F. Carpentier, B. Escudier, T. Tursz, E. Angevin, L. Zitvogel, Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive T_H1 lymphocytes leading to tumor rejection, *J. Immunol.* 172 (2004) 2137–2146.
- [28] C.S. Hsieh, S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, K.M. Murphy, Development of TH1 CD4 + T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages, *Science* 260 (1993) 547–549.
- [29] J.M. Escola, M.J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J.M. Griffith, O. Yoshie, H.J. Geuze, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20121–20127.

MATERIELS ET METHODES

Obtention des parasites de *Toxoplasma gondii* in vitro

L'amplification des parasites de la souche RH est réalisée *in vitro* sur des cultures de cellules HFF (human foreskin fibroblast Hs27, ATCC CRL-1634). Deux à trois jours après infection d'une couche cellulaire à 80 % de confluence, les tachyzoïtes extracellulaires sont récoltés par prélèvement du surnageant de culture.

Préparation de l'extrait antigénique de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*

Après dénombrement sur cellules de Malassez, les tachyzoïtes sont lavés en tampon PBS 1X puis centrifugés à 1600 ×g pendant 15 min. Les culots sont alors repris en eau distillée à raison de 10⁹ tachyzoïtes par mL. Les suspensions parasitaires ainsi obtenues sont placées dans la glace puis soniquées 2 fois 10 min, avec 5 min de repos entre les deux sonications à 60 W/s. Les sonicats sont ensuite centrifugés à 2000 ×g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants récupérés sont dosés à l'aide du kit MicroBCA (Pierce, USA) puis conservés à -80°C.

Obtention de la lignée SRDC

Voir article fourni en annexe : Ruiz *et al*, 2005.

Chargement de la lignée SRDC avec l'extrait antigénique

Des cellules de la lignée SRDC (Ruiz *et al*, 2005) sont cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, dans un milieu IMDM additionné de 5 % de sérum de veau fœtal, de 50 U/mL de pénicilline, de 50 µg/mL de streptomycine, de 50 µM de β-mercaptoethanol et de 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont sensibilisées (TE-SRDC) ou non (NP-SRDC) par 50 µg/mL d'extrait parasitaire pendant 24 h. Suite à cette sensibilisation, les cellules sont récoltées par grattage puis remises en suspension dans du milieu RPMI, à raison de 2,5 × 10⁶ cellules par mL. Les souris CBA/J reçoivent ensuite 4 × 10⁵ TE-SRDC ou NP-SRDC par voie sous-cutanée.

A novel CD4⁻CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis

Sophie Ruiz,^{1,2†} Céline Beauvillain,^{1†}
Marie-Noëlle Mévellec,¹ Philippe Roingard,³
Pascal Breton,² Daniel Bout¹ and
Isabelle Dimier-Poisson^{1*}

¹Université François-Rabelais de Tours; INRA; UMR 0483
Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et
Vaccinologie, IFR Agents Transmissibles et Infectiologie,
UMR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge
37200 Tours, France.

²VIRSOL SNC, 46 rue Boissière 75116 Paris, France.

³Laboratoires de Biologie Cellulaire et Virologie, EA 2639,
Analyse Structurale des Antigènes, IFR Agents
Transmissibles et Infectiologie, Faculté de Médecine, 2 bl
boulevard Tonnelé, 37032 Tours Cedex, France.

Summary

Dendritic cells (DCs) play an essential role in the induction of immune responses to pathogen infections. Native DCs are difficult to obtain in large numbers and consequently the vast majority of DCs employed in all experiments are derived from bone marrow progenitors. In an attempt to solve this problem, we have established a novel CD8 α ⁺ DC line (H-2^b) from spleen, which we have named SRDC line, and which is easy to culture *in vitro*. These cells display similar morphology, phenotype and activity to CD4⁻CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ DCs purified *ex vivo*. *Toxoplasma gondii* antigen was shown to be taken up by these cells and to increase class I and class II major histocompatibility complex (MHC), CD40, CD80 and CD86 surface expression. We report that vaccination with *T. gondii* antigen-pulsed SRDCs, which synthesize large amounts of interleukin-12, induced protective immune responses against this intracellular pathogen in syngeneic CBA/J mice. This protection was associated with strong cellular and humoral immune responses at systemic and intestinal levels. Spleen and mesenteric lymph node cell proliferations were correlated with a Th1/Th2-type response and a

specific SRDC homing to spleen and intestine was observed. The SRDC or CD4⁻CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ DC line can be expected to be a very useful tool for immunobiology studies of DC.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the most potent of all antigen-presenting cells (APCs) and are unique in their ability to stimulate naive T cells (Banchereau, 1998). In their immature state, DCs are found in almost all tissues where they very efficiently take up antigens from their environment and become specialized in antigen presentation (Banchereau, 1998). DCs present processed antigens to competent T cells, in association with class I and class II major histocompatibility complex (MHC-I and MHC-II) and CD1 molecules, to generate specific cellular immunity. These features of the DCs indicate that they play a crucial role in the host's immune response to pathogens.

The coccidian protozoan *Toxoplasma gondii*, which is responsible for toxoplasmosis, is an obligate intracellular parasite of humans and other warm-blooded animals. After a primary infection, the immune response induced in an immunocompetent individual usually limits the replication of the invasive form of *T. gondii*, resulting in the formation of the dormant stage of the parasite. Because of this effective immune reaction, the chronic infection of an immunocompetent individual results in protective immunity, which is thought to mainly involve a systemic Th1 response (Denkers, 1998; Yap, 1999). The oral route is the natural port of entry of *T. gondii*. Ingested organisms are released within the gastrointestinal tract and initially invade the intestinal epithelium before spreading throughout the body.

In our laboratory, we had previously investigated the use of DCs as potential vaccination agents against infection with *T. gondii*. We showed that an adoptive transfer to mice of DCs purified from mouse spleen or from mesenteric lymph nodes (MLNs) and pulsed with *T. gondii* antigens (TAg) induced good protection against a virulent oral challenge (Bourguin *et al.*, 1998; Dimier-Poisson *et al.*, 2003).

Dendritic cells are present in spleen and lymph nodes in relatively low abundance. Consequently, it is difficult to

Received 21 January, 2005; revised 9 May, 2005; accepted 11 May, 2005. *For correspondence. E-mail dimier@univ-tours.fr; Tel. (+33) 2 47 36 71 84; Fax (+33) 2 47 36 72 52. †These authors contributed equally to this work.

obtain large numbers of these cells. For this reason most DC-mediated experiments have been performed using DCs differentiated and expanded *in vitro* according to protocols involving different DC precursor populations and cytokine combinations (Banchereau, 1998). In the present study, we isolated a line of cloned spleen DCs, called SRDCs, from CBA/J mice to provide large numbers of DCs for reproducible studies. These cells were phenotypically characterized for several surface markers and secreted cytokines. We investigated the ability of SRDCs, pulsed *in vitro* with TAG, to initiate an efficient immune response against *T. gondii* infection. Immunization with TAG-pulsed SRDCs highly protected CBA/J mice against a virulent oral challenge in association with strong specific systemic and mucosal immune responses. This immune response was correlated to specific SRDC homing to spleen and intestine. These data show that the SRDC cell line can be used as an effective tool to study the immune functions and biology of DCs.

Results

Immortalization of spleen dendritic cells

It is well established that bone marrow- or tissue-derived primary DC can be cultured for short periods *in vitro*. We developed long-term cell lines by transforming spleen DC with SV40 large T oncogene. These immortalized spleen cells expressed high levels of surface antigens as MHC-II, co-stimulatory molecules CD80 and CD86, activation marker CD40, CD11c and Mac-1 (data not shown).

Phenotype and morphology of SRDCs cloned from the immortalized spleen DC

Fifteen clones were obtained from immortalized spleen 'DC-like' cells in 2 months by specific selection with anti-CD11c monoclonal antibodies (mAbs) and by limiting dilutions. These cells attached to plastic and detached over time so that culture contained both adherent and floating cells. These DC clones have been in culture for more than 9 months and can be frozen with cryopreservatives [10% DMSO (v/v)] and thawed with good viability. The clones were analysed by flow cytometry for their surface antigen expression as described previously. After analysis, a cell line called SRDC was selected, that expressed MHC-I and MHC-II molecules, the accessory molecule CD8, the co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40, the integrin alpha chain CD11c, the Fas molecule CD95 and the mannose receptor CD205. SRDCs do not express CD4, CD11b or Mac-3 antigens (Fig. 1A). This cell line displays a DC phenotype compatible with antigen presentation and T cell sensitization *in vivo*.

In the presence of TAG or lipopolysaccharide (LPS) there was overexpression of MHC-I and MHC-II, CD40, CD95, CD11c, CD80 and CD86 (Fig. 1B and C).

The morphology of unpulsed SRDCs, LPS or TAG-pulsed SRDCs were observed by light and electron microscopy. SRDCs observed microscopically after LPS and TAG stimulation displayed major modifications, forming long dendrites that characterize the morphology of mature DCs (Fig. 1B and C). These data are representative of three experiments yielding similar results. SRDC cells stored frozen with cryopreservatives after 1 year can be thawed and kept in culture for additional 9 months with good viability.

DC-LAMP and MHC-II protein expression by SRDCs

In order to analyse the level of maturation of SRDCs, unpulsed SRDCs and LPS or TAG-pulsed SRDCs were examined for DC-LAMP and MHC-II expression using immunofluorescence microscopy (Fig. 2). In all the analysed unpulsed SRDC, DC-LAMP was observed and overlapped with MHC-II expression. Cytosolic MHC-II associated to DC-LAMP co-staining indicated that SRDCs expressed an intermediate stage of maturation (Fig. 2A). These results showed that unpulsed SRDCs were at a semi-mature stage. After LPS or TAG activation, while all MHC-II molecules were translocated to the cell surface, DC-LAMP was only concentrated in cytosol (Fig. 2B and C). These results indicated that LPS or TAG-pulsed SRDCs were at the final stage of maturation.

Cytokine production by SRDCs

The presence of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70) and gamma interferon (IFN- γ) was assayed by ELISA in culture supernatants from unpulsed SRDCs and from SRDCs pulsed with TAG (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or activated with IFN- γ (20 ng ml^{-1}) or LPS (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Fig. 3). No significant secretion of IL-2, IL-5 or IL-10 by the SRDCs was detected. After culture with TAG, SRDC cells secreted high levels of the p70 bioactive IL-12, which was detected in the 24 h and 48 h culture supernatants, at levels of 210 pg ml^{-1} and 1300 pg ml^{-1} respectively. No release of IL-12 was observed in culture supernatants at various times, from either SRDCs or SRDCs activated with LPS or IFN- γ . IL-4 was only produced by SRDCs activated with LPS, where it reached levels of 350 pg ml^{-1} and was detected after 8–24 h of culture. No significant production of IL-4 was detected in the culture supernatant from SRDCs or from SRDCs pulsed with TAG or activated with IFN- γ .

High levels of IL-6 were secreted by SRDCs activated with LPS, after culturing for 8 h (1300 pg ml^{-1}), and these concentrations decreased significantly after culturing for

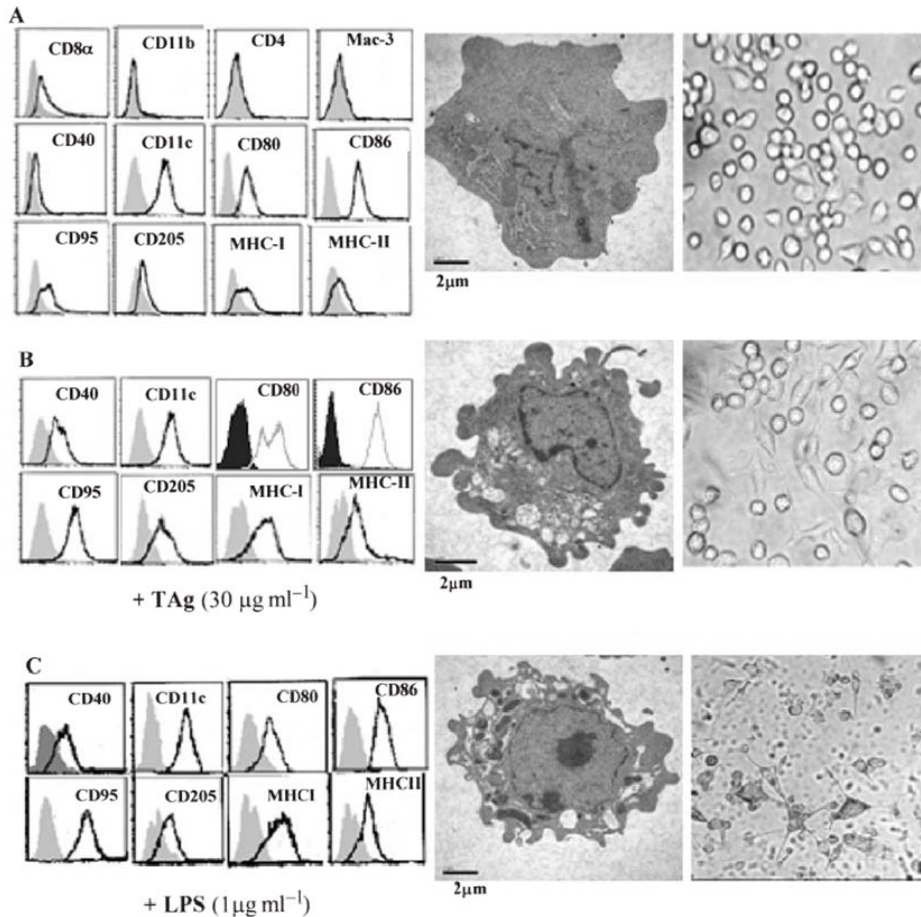


Fig. 1. Phenotype and morphology of SRDCs (A) and SRDCs pulsed *in vitro* by *T. gondii* antigens (TAg) (B) or LPS (C). SRDCs were cultured for 18 h with $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAg or with $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ LPS. The phenotype was analysed by flow cytometry. The black histograms show the expression of the indicated markers by SRDCs. The grey histograms represent cell staining with corresponding isotype control. Before all labelling experiments, FcR blocking was performed with 2.4G2 mAb (rat anti-mouse Fc receptor). SRDCs expressed CD8 α , CD11c, MHC-I, MHC-II, CD40, CD80, CD86, CD205 and CD95 and did not express CD4, CD11b or Mac-3 (A). After TAg or LPS stimulation, SRDCs overexpressed CD11c, MHC-I, MHC-II, CD40, CD80, CD86 molecules (B), characteristic of DC maturation. The morphology of SRDCs and TAg-pulsed SRDCs were observed by light ($\times 200$) and electron microscopy. TAg or LPS stimulation induces the dendrite formation, typical of DC maturation. These data are representative of three experiments yielding similar results.

72 h (240 pg ml^{-1}). IL-6 was detected in the supernatant of IFN- γ -activated SRDCs, reaching its peak (525 pg ml^{-1}) after culturing for 48 h. TAg-pulsed SRDCs weakly secreted IL-6, with a significant level of production being found after culturing for 72 h (250 pg ml^{-1}). No significant IL-6 production was detected in the supernatant from unpulsed SRDCs.

Detection of SV40 large T antigen in SRDCs

To check whether the DC transformation had been successful, we compared the expression of the SV40 large T antigen in SRDCs with that in Cos-7-positive control cells and in BHK-21-negative control cells (Fig. 4A). Western blot analysis showed that, like BHK-21 cells, SRDC cells

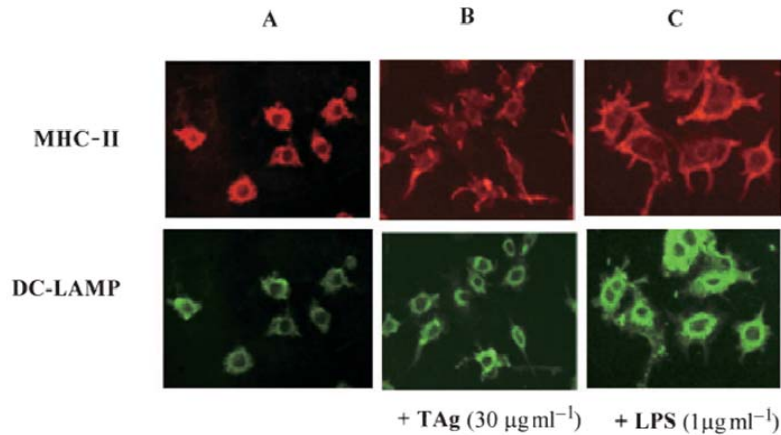


Fig. 2. Analysis of the localization of DC-LAMP (green) and MHC-II (red) during maturation of SRDCs by immunofluorescence microscopy. Microscopy analysis was performed on unpulsed (A), TAG-pulsed (B) or LPS-pulsed (C) SRDC. The colocalization of class II molecules and DC-LAMP is indicative of an intermediate stage of maturation for unpulsed SRDC (A). The presence of MHC-II molecules to the cell surface and the condensation of DC-LAMP in cytosolic vesicles revealed the final stage of maturation of TAG-pulsed (B) and LPS-pulsed (C) SRDC.

did not express the SV40 large T antigen. The Cos-7 cells expressed a protein, with the predicted size (97 kDa), detected by PAB 108 mAb (anti-SV40 large and small T antigen protein). To prove that the SV40 large T oncogene is not integrated into SRDC cellular DNA, polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed using specific primers for this gene (Fig. 4B). Gel electrophoresis analysis of PCR products revealed an amplification band with an appropriate 340 pb size from genomic DNA purified from Cos-7 cells and from the plasmid pSV3neo. No amplification was detected for the SRDCs or BHK-21 cells.

In Southern blots using SRDC, Cos-7 and BHK-21 genomic DNA digested with restriction enzymes, the labelled pSV3neo plasmid was found to hybridize only with Cos-7 genomic DNA. A single band of about 1 kb for HindIII Cos-7 genomic DNA, 20 kb for BamHI and 15 kb for EcoRI was visible (Fig. 4C). These results suggested that PSVneo3 plasmid is not integrated into SRDC genomic DNA.

Uptake of Toxoplasma antigens by SRDCs

The majority of SRDCs pulsed with TAG and successively incubated with antitoxoplasma serum from infected mice and FITC anti-mouse immunoglobulin G (IgG) exhibited intense fluorescent staining (Fig. 5A and B), indicating that *Toxoplasma* antigen was taken up. Unpulsed control SRDCs were negative (data not shown). After TAG uptake, SRDCs showed characteristic large processes or vells

extending in many directions as seen by phase microscopy (Fig. 5C).

Protection of mice immunized by TAG-pulsed SRDCs

The ability of SRDCs to protect against chronic *T. gondii* infection was determined in CBA/J mice by measuring the brain cyst load 1 month after oral challenge (Fig. 6). The mice developed a substantial number of intracerebral cysts following infection. Control mice were either untreated or received unpulsed SRDCs or TAG alone ($10 \mu\text{g mouse}^{-1}$), as previously described (Bourguin *et al.*, 1998). Mice intravenously immunized twice with TAG-pulsed SRDCs exhibited greater resistance to brain cyst formation (1100 ± 105 cysts) than control mice (3600 ± 510 cysts for untreated mice, 4100 ± 230 cysts for unpulsed SRDC-immunized mice and 3000 ± 560 for TAG-immunized mice). The parasite burden in the brains of the pulsed SRDC-immunized mice was markedly lower (75%) than that observed in the brains of the untreated mice ($P < 0.01$).

Lymphocyte proliferative response in mice immunized with TAG-pulsed SRDCs

Toxoplasma gondii antigen-induced proliferation was assessed, using spleen and MLN cells from mice after immunization and before the oral challenge. Cells from control mice showed no cellular expansion when cultured with TAG. Spleen and MLN cells from mice immunized with

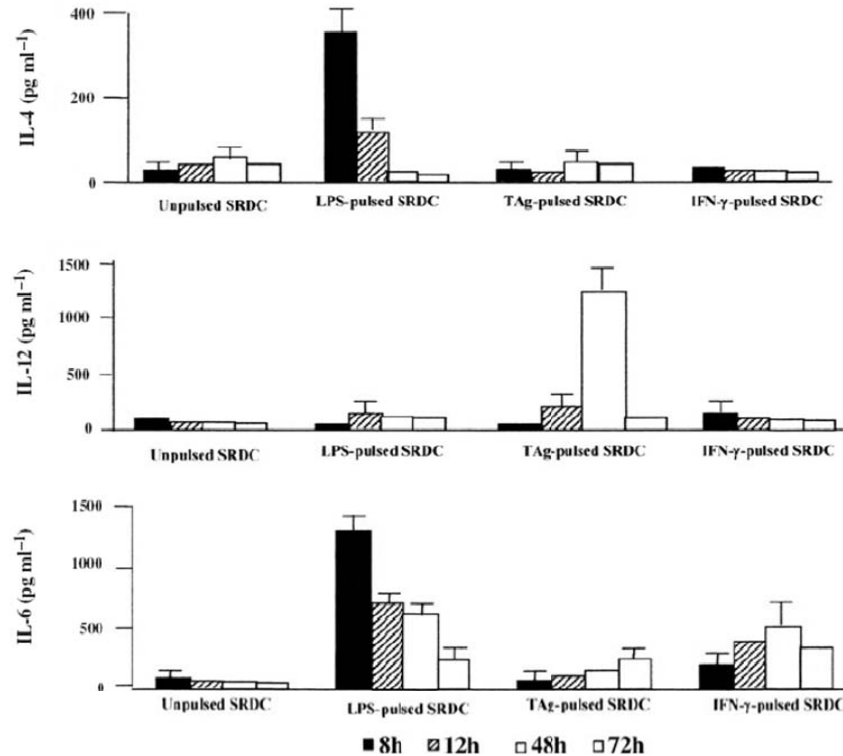


Fig. 3. Cytokine production by SRDCs in the presence of LPS ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), TAG ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) or IFN- γ (20 ng ml^{-1}) after 8, 24, 48 and 72 h of culture. The culture supernatants (2 ml) were concentrated to $500 \mu\text{l}$ through dialysis tubing, and were then tested for the presence of IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70) and IFN- γ using an ELISA kit as described in *Experimental procedures*. Only IL-4, IL-6 and IL-12 were detected.

pulsed SRDCs showed a marked, dose-dependent proliferative response to TAG stimulation, with ΔCPM (counts per minute) = 11000 ± 115 for spleen cells and $\Delta\text{CPM} = 8500 \pm 225$ for MLN cells after re-stimulation with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAG (Fig. 7).

Cytokine production by spleen and MLN cells in mice immunized with TAG-pulsed SRDCs

Culture supernatants of spleen and MLN cells from untreated mice or from mice immunized with unpulsed or TAG-pulsed SRDCs were analysed with regard to cytokine production in response to TAG (Table 1).

Spleen cells from mice immunized with TAG-pulsed SRDCs responded to *in vitro* TAG stimulation by increased IFN- γ and IL-10 secretion (6000 pg ml^{-1} and

1350 pg ml^{-1} respectively), compared with values for spleen cells from untreated mice (340 pg ml^{-1} and 30 pg ml^{-1}), or for mice treated with unpulsed SRDCs (400 pg ml^{-1} and 100 pg ml^{-1}) (Table 1). A high level of IFN- γ (4000 pg ml^{-1}) was also produced by MLN cells from TAG-pulsed SRDC-injected mice compared with the level observed for MLN cells from untreated (95 pg ml^{-1}) mice or mice injected with unpulsed SRDCs (320 pg ml^{-1}). The concentration of IL-10 produced by MLN cells was significantly higher in mice immunized with TAG-pulsed SRDCs (200 pg ml^{-1}) than that produced by MLN cells from untreated mice (35 pg ml^{-1}) or mice injected with unpulsed SRDCs (50 pg ml^{-1}).

Spleen cells from mice immunized with TAG-pulsed SRDCs responded to TAG stimulation by producing more IL-2 and IL-4 (160 pg ml^{-1} and 43 pg ml^{-1}) than spleen

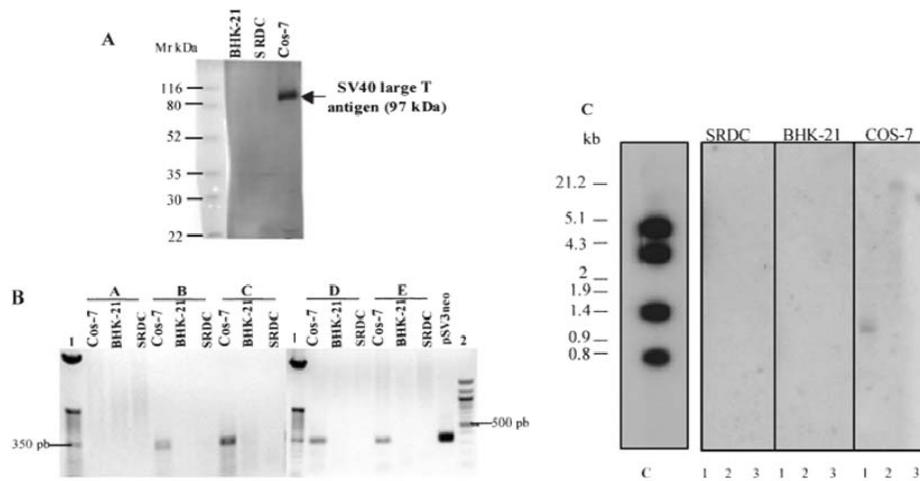


Fig. 4. Detection of the SV40 large T antigen.

A. Total protein contains of 5×10^5 cells from BHK-21, Cos-7 and SRDC cells were separated using SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and incubated with PAB 108 mAb. BHK-21 and Cos-7 were used as negative and positive controls respectively. B. Genomic detection by PCR. Lane 1, 50 pb DNA size marker. Lane 2, 100 pb DNA size marker. The plasmid pSV3neo and Cos-7 cells were used as positive controls. The amplification from 1 µg of genomic DNA for each cellular type without primers was used as negative control (lane A). Lanes B–E: amplification from 10 ng, 50 ng, 500 ng and 1 µg, respectively, of genomic DNA with specific primers as described in *Experimental procedures*. SRDCs do not carry the gene that encodes the SV40 large T antigen. C. pSV3neo3 detection by Southern blot. About 10 µg of SRDC, BHK-21 or Cos-7 genomic DNA was digested with HindIII (lane 1), BamHI (lane 2), EcoRI (lane 3), electrophoresed on a 1% agarose gel, transferred to a nylon membrane and probed with 32 P-labelled pSV3neo plasmid. HindIII-digested pSV3neo plasmid was used as a control (lane c). The numbers on the left correspond to DNA markers in kb (λ DNA HindIII/EcoRI fragments).

cells from untreated mice (44 pg ml^{-1} and 19 pg ml^{-1}) or from mice treated with unpulsed SRDCs (69 pg ml^{-1} and 13 pg ml^{-1}) respectively. No specific release of IL-2 and IL-4 from MLN cells was detected.

Production of serum IgG and intestinal immunoglobulin A (IgA) antibodies in mice immunized with TAG-pulsed SRDCs

Serum IgG (Fig. 8A) and intestinal immunoglobulin A (IgA) (Fig. 8B) anti-*T. gondii* antibodies were detected by

Western blotting in mice injected 15 days earlier with TAG-pulsed SRDCs. Both the antibody responses were mainly directed against an antigen with an apparent molecular mass of 30 kDa corresponding to the major *Toxoplasma* surface antigen, SAG1.

Traffic of SRDCs to the intestine and to the spleen following adoptive transfer

The localization of ^{51}Cr -labelled SRDCs was observed 2, 6, 12 and 24 h after injection (1×10^6 cells per injection)

Table 1. Cytokine production following intravenous immunization of CBA/J mice with unpulsed (NP) or TAG-pulsed SRDCs.

Immunization regimen	IFN- γ concentration (pg ml $^{-1}$)		IL-2 concentration (pg ml $^{-1}$)		IL-10 concentration (pg ml $^{-1}$)		IL-4 concentration (pg ml $^{-1}$)	
	Spleen	MLN	Spleen	MLN	Spleen	MLN	Spleen	MLN
Untreated	340	95	44	38	30	35	19	22
SRDC-NP	400	320	69	29	100	50	13	17
SRDC-TAg	6000	4000	160	43	1350	200	43	19

A group of control mice was untreated. Spleen and MLN cells were isolated 15 days after the second injection, and stimulated *in vitro* with 10 µg of TAG. Values for IL-2 were measured at 24 h, IL-4 at 48 h, IFN- γ at 72 h and IL-10 at 96 h of culture. Results are mean cytokine concentrations on spleen and MLN cells from three mice per experimental group. Results from one of three similar experiments are shown and are expressed as the mean \pm SEM. $P < 0.001$.

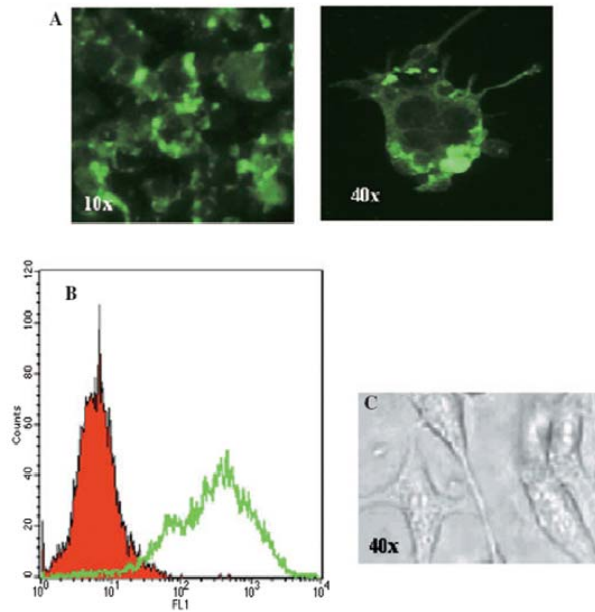


Fig. 5. Uptake of *Toxoplasma* antigens by SRDCs. The majority of SRDCs pulsed with TAG and successively incubated with antitoxoplasma serum from infected mice and FITC anti-mouse IgG exhibited intense fluorescent staining (A and B), indicating that *Toxoplasma* antigen was taken up. After TAG uptake, SRDCs showed characteristic large processes or veils extending in many directions as seen by phase microscopy (C).

into mice. Two hours after injection a high level of radioactivity was detected in the lungs (47% of total radioactivity), spleen (27%) and the small intestine (18%). After 6 h, the radioactivity level remained constant in the lungs (38%) and spleen (34%), but had markedly decreased in the small intestine (1%). Radioactivity was also detected

in organs of excretion, such as the liver (16%) and kidneys (7%). Twelve and 24 h after injection, some of the SRDC cells had left the lungs (12% and 3% respectively) and most of them homed to the spleen (49% and 56% respectively) (Fig. 9). Similar results were obtained with TAG-pulsed SRDCs (data not shown). Adoptively transferred SRDCs homed to the spleen and to the small intestine.

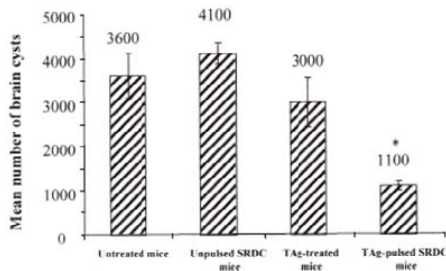


Fig. 6. Protection of mice against infection with *T. gondii* after injection of TAG-pulsed SRDCs. Groups of 12 mice were injected twice intravenously with unpulsed or TAG-pulsed SRDCs or with TAG. A group of mice were untreated. Mice were orally infected 28 days later the brain cyst burden was evaluated 30 days after challenge. The results reported are the mean numbers of brain cysts in each mouse \pm standard deviation. They are representative of three similar experiments. * $P < 0.001$.

Discussion

Dendritic cells have become a very attractive area of research due to their involvement in antitumour immunotherapies and vaccination strategies (Banchereau, 1998). Because DCs are present at relatively low levels in the tissues (Steinman, 1973), their studies and uses have mostly been performed using DCs differentiated and expanded *in vitro*. Shen *et al.* (1997) have established a DC line, called DC2.4, from bone marrow precursors, first transduced with the GM-CSF gene and then supertransfected with the *myc* and *raf* oncogenes. Other similar approaches to immortalizing DCs using oncogenes without cytokines have been reported (Paglia *et al.*, 1993), although it is not entirely clear whether the cells isolated were *bona fide* DCs. Several groups have succeeded in generating large numbers of functional DC/Langerhans cells in both murine and human systems by treating DC

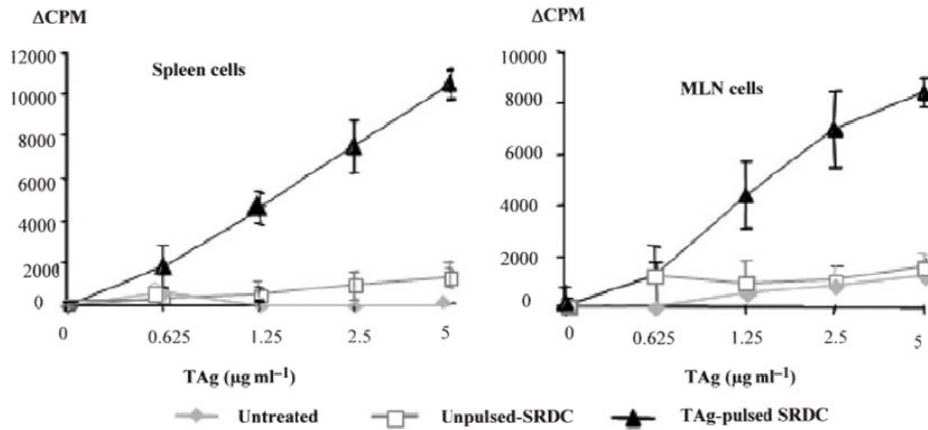


Fig. 7. Lymphocyte proliferative response following intravenous immunization of mice with 2.5×10^5 unpulsed or TAg-pulsed SRDCs. A group of control mice were untreated. Spleen and MLN cells were isolated 15 days after the second injection and stimulated *in vitro* with different concentrations of TAg. Proliferation was assessed after 4 days of stimulation. Results are mean CPM from three mice per experimental group. The results from one of three similar experiments are shown, and expressed as the mean \pm standard error of the mean.

precursors with GM-CSF, either alone or combined with other growth factors (Banchereau, 1998). However, these DCs could only be propagated for a limited time. More recently, growth factor-dependent long-term DC lines have been derived from the skin of fetal or newborn mice (Sallusto, 1994; Xu *et al.*, 1995). These cell lines possess

the properties of DC precursors and cannot be induced to mature *in vitro*. In order to study the process of DC differentiation and maturation *in vitro*, Winzler *et al.* (1997)

established an immature DC population from mouse spleen, which have been successfully driven to long-term proliferation and are known as D1 cells. However, this proliferation and survival are strictly dependent on the presence of fibroblast-derived growth factors and exogenous GM-CSF in the culture medium.

By using the SV40 T oncogene, we established a spleen DC line from CBA/J (H-2^b) mice, which we have called SRDC, which is well differentiated, easy to culture

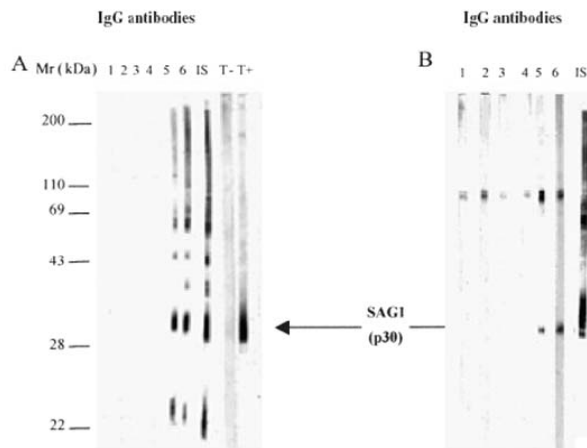


Fig. 8. Western blot analysis of *T. gondii* antigens recognized by serum IgG antibodies (A) and by intestinal IgA antibodies (B). Serum samples (A) and intestinal secretions (B) were recovered 15 days after immunizing mice with unpulsed or TAg-pulsed SRDCs. Lanes 1 and 2 correspond to serum from untreated mice, lanes 3 and 4 to serum from mice injected with unpulsed SRDCs, and lanes 5 and 6 to serum from mice immunized with TAg-pulsed SRDCs. *T. gondii* antigens recognized by serum IgG antibodies or by intestinal antibodies from infected mice (positive control) are shown lane IS. 1E5 [anti-p30 (SAG1)] mAb was also used as positive control (lane T+). Samples incubated with the secondary antibody (goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate) are shown lane T- (negative control). The molecular masses (kilodaltons) of the standard proteins are given on the left.

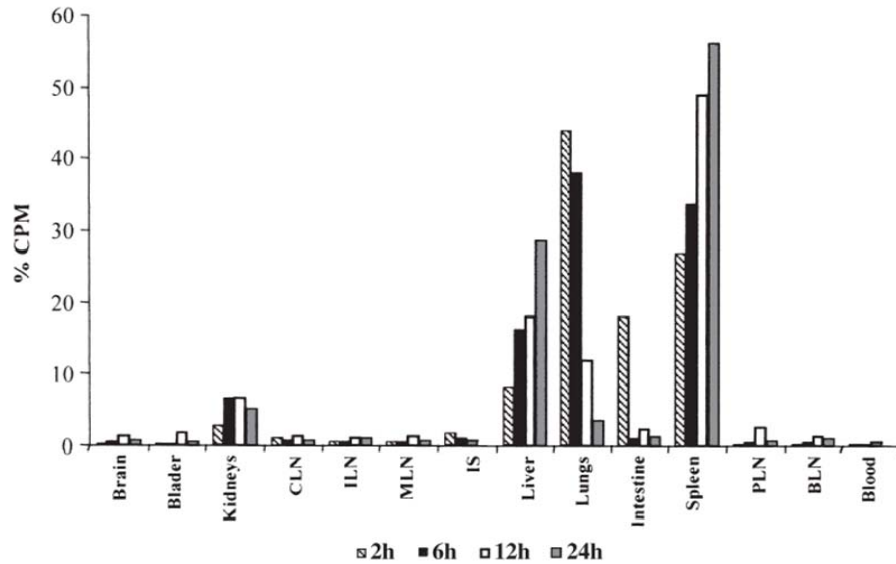


Fig. 9. Homing of SRDCs after intravenous injection to mice. Mice were injected with 1×10^6 ^{51}Cr -SRDCs. Two, 6, 12 and 24 h after the adoptive transfer, each organ was recovered and the radioactivity was measured. Results are expressed as the percentage of the radioactivity found in each specific organ compared with the total radioactivity in the mouse. Results are expressed as the mean of radioactivity measured and are representative of at least two experiments. CLN, cervical lymph node; ILN, inguinal lymph node; PLN, popliteal lymph node; MLN, mesenteric lymph node; BLN, brachial lymph node.

in large numbers and able to process antigens. SRDCs can be cultured for prolonged periods without cytokines or growth factors in the culture medium. Interestingly, SRDCs do not express the SV40 T antigen and do not carry the SV40 T oncogene and the pSN3neo plasmid. SRDC cells may have temporarily retained the plasmid carrying the SV40 T oncogene during antibiotic-driven selection, and subsequently rejected it after several culture passages. A second hypothesis is that the SRDCs were spontaneously immortalized in culture. The SRDC line expressed MHC-I and MHC-II molecules, the accessory molecule CD8, the co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40, the integrin alpha chain CD11c, the Fas molecule CD95 and the mannose receptor CD205. MHC-I, MHC-II, CD40, CD95, CD80, CD86 and CD205 surface expression increased on SRDCs pulsed with TAG or activated by LPS. No expression of CD4, CD11b and Mac-3 molecules was detected. Conventional murine splenic DC subsets are broadly defined by the expression of CD11c and MHC-II. These DCs can be further distinguished into three major subpopulations based on the basis of differential expression of CD4 and CD8 α homodimers: CD4 $^+$ CD8 $^-$ CD205 $^+$ CD11b $^+$, CD4 $^-$ CD8 α^+ CD205 $^+$ CD11b $^-$ and CD4 $^-$ CD8 α^+ CD205 $^-$ CD11b $^+$ (referred to as CD4 $^+$,

CD8 $^+$, and double negative) (Vremec *et al.*, 2000). These conventional CD11c $^{\text{high}}$ murine spleen DC subsets efficiently present antigen to and stimulate the proliferation of T cells, and it has been shown that both CD8 $^+$ and CD8 $^-$ spleen DCs are capable of inducing the priming of CD4 $^+$ (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999) and CD8 $^+$ (Ruedl, 1999) T cell responses *in vivo*. However, only the CD8 $^+$ DC subset is able to mediate cross-priming of CD8 $^+$ T cell responses to exogenous antigens (Den Haan and Lehar, 2000). CD8 $^+$ and CD8 $^-$ spleen DC populations also differ in the cytokines they produce. Notably, CD8 $^+$ DCs produce much higher levels of IL-12p70 than CD8 $^-$ DCs under many experimental conditions, and hence have a greater tendency to induce a Th1-biased cytokine profile in responding CD4 $^+$ T cells (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999; Pulendran *et al.*, 1999). CD8 α^+ cells occupy the T cell areas of the spleen (Leenen *et al.*, 1998). They have also been identified as the DC subset responsible for generating cross-tolerance. In this role, they may maintain T cell tolerance in lymphoid organs in the absence of infection (Belz 2002). A fourth subpopulation of murine spleen DCs, the plasmacytoid DC (pDC) subset, has also been identified (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Nakano and Yanagita 2001), phenotypically characterized as being

CD11c^{low}, MHC-II^{low} and B220⁺. Although pDCs can stimulate T cell proliferation when suitably activated (O'Keefe *et al.*, 2002), they are relatively poor APCs.

Several studies have shown that CD8 α ⁺ DCs can induce Th1-type immune responses *in vivo*, which is consistent with activated CD8 α ⁺ DCs being the major producers of IL-12 (Hochrein *et al.*, 2001). LPS from *Escherichia coli* stimulates CD8 α ⁺ DCs to produce IL-12 and to induce Th1 responses. In contrast, LPS from *Porphyromonas gingivalis* does not stimulate IL-12 production, but preferentially induces Th2 responses by IL-4 and IL-10 synthesis (Pulendran *et al.*, 2001). The level of IL-12 produced by DCs also determines the Th1/Th2 balance *in vivo*. High levels favour a polarized Th1-type response, whereas intermediate levels favour a mixed Th1/Th2 response and low levels induce a polarized Th2-type response (Maldonado-Lopez *et al.*, 2001). These findings indicate that DCs can display functional plasticity and can lead to a Th1 or a Th2 immune response that depends partly on the nature of the pathogen or environmental signals involved. *In vitro*, the CD4⁺CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ SRDCs synthesize IL-12 in the presence of TAG. They produce IL-4 and IL-6 in the presence of LPS. The transfer of TAG-pulsed SRDCs leads to Th1/Th2 differentiation. Bourguin *et al.* (1998) have shown that spleen DCs, pulsed *in vitro* with TAG and transferred to naive mice, were able to provide effective protection of mice orally challenged with *T. gondii* cysts. This protection was correlated to both humoral and Th1-like cellular systemic immune responses. More recently, we have demonstrated that DCs from MLN, sensitized *in vitro* with TAG, induced strong protection against an oral infection in mice. This protection was associated with Th1/Th2 and Th2-like cellular responses at systemic and mucosal levels respectively (Dimier-Poisson *et al.*, 2003). These findings suggest that DCs from different lymphoid organs can indeed elicit distinct T cell responses, as has already been shown by Kelsall *et al.* (2002).

In this study, we showed that SRDCs were able to take up *Toxoplasma* antigens and that TAG-pulsed SRDCs injected to mice evoked a good protection against an oral challenge with *T. gondii*. We measured the specific proliferative responses of spleen and MLN cells from mice injected with TAG-pulsed SRDCs. The proliferative response was associated with an increased production of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 in spleen and with an increased production of IFN- γ and IL-10 in MLN. These results indicated that the cellular immune response elicited *in vivo* by TAG-pulsed SRDCs were correlated with a Th1/Th2 response. A serum IgG-specific antibody response, especially against the major *Toxoplasma* surface antigen SAG1, was shown. TAG-specific IgA antibodies were also detected in the intestinal secretions. The migration pathway of SRDCs in naive mice was checked. We observed

that adoptively transferred SRDCs rapidly homed to the lung, spleen and also to the small intestine within 2 h after intravenous injection. These observations were consistent with the marked activation of the systemic and mucosal immune responses. This particular SRDC homing could involve so far unidentified specific receptor/ligand interactions.

Overall, our data show that the CD4⁺CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ SRDC line can be considered to be a very useful tool for vaccination and DC biology studies.

Experimental procedures

Materials

All reagents for cell culture were obtained from Life Technologies and Sigma-Aldrich; ELISA reagents and recombinant cytokines were from Pharmingen; antibody-alkaline phosphatase conjugates and chemicals were from Sigma-Aldrich, unless stated otherwise.

Mice

CBA/J (H-2^k) mice aged 8–10 weeks (Janvier, France) were maintained in a pathogen-free environment. CBA/J mice are sensitive to the chronic phase of infection by *T. gondii*, which is manifest as the formation of numerous brain cysts.

Parasites and TAG

Tachyzoites of the RH strain of *T. gondii* were harvested from the peritoneal fluid of swiss OF1 mice that had undergone intraperitoneal infection 4 days earlier with 1×10^6 tachyzoites, and were used as the source of TAG (Dimier-Poisson *et al.*, 2003). Cysts of the 76K strain of *T. gondii* were obtained from brains of CBA/J mice orally infected 1 month before with 80 cysts.

Isolation of spleen dendritic cell clones

Dendritic cells were purified from the spleens of 15 naive CBA/J mice as previously described (Dimier-Poisson *et al.*, 2003). Spleen cells were cultured in IMDM supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin (100 U ml^{-1}), streptomycin ($100 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), 2- β -mercaptoethanol (50 μM), L-glutamine (2 mM) and plated (5×10^6 cells per 10 ml per dish) on culture dishes for 60 min at 37°C. Adherent cells (2.5×10^6 cells per 5 ml per dish) were cultured in Optimem medium and transfected for 4 h at 37°C by the pSV3neo plasmid (carrying the SV40 T oncogene and the gene encoding for neomycin resistance) and DOTAP [N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl] trimethylammonium methylsulphate]. Transfection complexes were obtained by mixing 50 μg of DOTAP with 5 μg of plasmid in 500 μl of HBS buffer (20 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7.2). On day 7, 10^6 transfected cells were maintained in culture in 24-well plates with supplemented IMDM medium with neomycin ($600 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) to achieve

selection. On day 11, 2×10^6 proliferating cells were cultured in six-well plates for 15 days as described above. CD11c-positive cells were isolated with MACS immunomagnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) with mAbs N418 according to the manufacturer's instructions, successively diluted twice (0.1 cell well $^{-1}$) in flat-bottomed, 96-well, culture plates and cultured for 15 days.

Flow cytometry analysis

Isolated cell clones and activated SRDCs were labelled using the following antibodies: Anti-I-E k (14.4.4 mouse IgG2a), anti-H-2 k (36-7-5, mouse IgG2a), anti-mouse CD80 (16-10A1, rat IgG2a), hamster anti-mouse CD86 (GL1), anti-mouse CD40 (3/23, rat IgG2a), anti-mouse CD4 (GK1.5, rat IgG2b), anti-mouse CD8 α (53-6.7, rat IgG2a), rat anti-mouse CD11b (M1/70), anti-mouse CD95 (Jo2, hamster IgG), anti-mouse Mac-3 (M3/84, rat IgG1), all of which were purchased from Pharmingen. Hamster anti-mouse CD11c (N418), FITC-conjugated goat anti-hamster IgG (STAR79F), anti-mouse CD205 (NLDC-145, rat IgG2a) and PE-conjugated F(ab') $_2$ rabbit anti-rat IgG (STAR20A) were all purchased from Serotec.

Cells were incubated for 10 min on ice with anti-mouse CD16/CD32 (Fcblock 2.4G2, Pharmingen) in PBS/1% FCS (v/v), washed and stained with the specific mAb or the corresponding isotype control ($1 \mu\text{g}/2 \times 10^5$ cells/100 μl) for 30 min on ice. Labelled cells were washed and analysed with FACSort $^{\text{TM}}$ flow cytometer (Becton Dickinson).

Cytokine analysis

SRDCs were cultured in six-well culture plates (5×10^6 cells per 2 ml per well) with supplemented IMDM medium containing $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ LPS (*E. coli* O26:B6; Sigma), 20 ng ml^{-1} IFN- γ and $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAG. Culture supernatants were recovered after incubating for 0–72 h, concentrated to 500 μl using Centricon $^{\text{TM}}$ tubes and assayed for IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70) and IFN- γ production.

Spleen and MLN cells from untreated or treated mice were cultured in 24-well plates (5×10^6 cells well $^{-1}$) in 1 ml of RPMI medium supplemented with 5% heat-inactivated FCS, Hepes (25 mM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), 2- β -mercaptoethanol (50 μM), penicillin (100 U ml $^{-1}$) and streptomycin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), either alone or with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAG. Culture supernatants were harvested from 24 h to 96 h and assayed for IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ secretion. Cytokine concentrations were evaluated using an ELISA kit according to BD Pharmingen's instructions.

SV40 large T antigen detection

Cos-7 and BHK-21 cells, used as the positive and negative controls, respectively, for SV40 large T antigen expression (Fiers *et al.*, 1978; Miller and Bullock, 1984) were cultured in six-well culture plates for 24 h at 37°C, with 5% CO $_2$ (5×10^5 cells per 2 ml per well) in their culture media according to ATCC instructions. SRDCs were cultured in supplemented IMDM medium.

Cells were sonicated in 100 μl of PBS containing 1 μl of protease inhibitor cocktail (P8340). Cytosolic protein concentration was determined using an assay reagent kit (Micro-BCA), analy-

sed on 10% polyacrylamide SDS-PAGE gel (Dual Gel caster, Hoefer) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Protran $^{\text{®}}$, Schleicher and Schuell). SV40 T antigen expression was detected by PAB 108 (mouse IgG2a anti-SV40 large T antigen) and by anti-mouse IgG-phosphatase alkaline conjugate. Blots were developed using the BCIP/NBT liquid substrate system.

Specific primers located in the coding sequence of SV40 T antigen (GenBank Accession No. J02400; Miller and Bullock, 1984) were used for PCR reactions: 5'-gctgggtctctcatc-3' and 5'-gatgaatgagtacagtggtcc-3'. Genomic DNA (10 ng, 50 ng, 500 ng and 1 μg) from SRDCs, and Cos-7 and BHK-21 cells was isolated with Dneasy $^{\text{TM}}$ tissue kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). PCR conditions: 95°C for 10 min, followed by 35 amplification cycles consisting of 1 min at 95°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C followed by 10 min at 72°C. The PCR products were analysed on a 1% agarose gel (Life Technologies).

Genomic DNA from SRDC, Cos-7 and BHK-21 cells was isolated by SDS/proteinase K lysis and genomic Southern blots were carried out using standard procedures. Hybridizations were performed for 18 h at 65°C with ^{32}P -labelled pSV3neo plasmid. DNA was radiolabelled using [α - ^{32}P]-dCTP with the Rediprime II Random Prime Labelling System according to the manufacturer's instructions (Amersham, Biosciences). HindIII-digested pSV3neo plasmid was used as a control, and λ DNA HindIII/EcoRI fragments were used as a molecular weight marker (Sigma).

Electron microscopy. SRDCs were fixed in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 48 h, washed in PBS and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h. They were dehydrated in a graded acetone series and cell pellets were embedded in Epon resin that was allowed to polymerize for 24 h at 60°C. Ultrathin sections were then performed with a Reichert ultramicrotome (Heidelberg, Germany), collected into copper grids and stained with 1% uranyl acetate and 1% lead citrate in distilled water. These ultrathin sections were observed with a Jeol 1010 XC electron microscope (Tokyo, Japan).

Immunophenotyping observation for MHC-II and DC-LAMP localization in SRDC. Intracellular immunofluorescence was conducted as previously described (De Saint-Vis *et al.*, 1998). On polylysine-coated coverslips, SRDCs fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde in PBS were washed twice in 10 mM glycine in PBS and twice in PBS and permeabilized with 0.5% saponin-1% BSA-PBS for 30 min. Coverslips were incubated for 30 min at room temperature with $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-DC-LAMP (Becton Dickinson) and anti-I-E k (Pharmingen). After three washes, cells were post-fixed with 2% paraformaldehyde. Coverslips were mounted onto glass slides with Fluoromount (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) and were visualized with an immunofluorescence microscope.

Toxoplasma antigen uptake

SRDCs alone or pulsed with TAG in supplemented IMDM medium for 18 h at 37°C were washed, resuspended and fixed in Cytofix/Cytoperm $^{\text{TM}}$ solution (BD Pharmingen) for 20 min at 4°C and permeabilized in PBS-saponin 0.05% for 15 min at 4°C. Cells were incubated for 10 min at 4°C with anti-mouse CD16/CD32 (Fcblock 2.4G2, Pharmingen) in PBS/1% FCS (v/v), washed and incubated with serum from *T. gondii*-infected mice ($5 \mu\text{l}/2 \times 10^5$ cells/100 μl of PBS/1% FCS) for 30 min at 4°C. Cells were

washed and incubated in the presence of FITC-labelled goat anti-mouse IgG ($1 \mu\text{g}/2 \times 10^5$ cells/ $100 \mu\text{l}$ of PBS/1% FCS) for 30 min at 4°C . After staining, the cells were washed and analysed by FACScan (Becton Dickinson) and fluorescence microscopy.

Adoptive immunization and Toxoplasma challenge

Groups of 12 mice were immunized with SRDCs cultured for 18 h at 37°C with or without $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ TAG in supplemented IMDM medium. Mice were given intravenously 2.5×10^5 unpulsed or TAG-pulsed SRDCs twice with an interval of 15 days. A group of control mice were untreated. Another group of control mice received TAG ($10 \mu\text{g mouse}^{-1}$). All the mice were orally infected 28 days after the last injection with 80 cysts of *T. gondii* 76K strain. Brains from mice were recovered 30 days after the oral challenge and homogenized in 5 ml of PBS. The cysts were counted under the microscope in eight samples ($10 \mu\text{l}$ each) of each homogenate. Results are expressed as mean \pm standard deviation for each group. The Mann-Whitney test (InStat 2.01 software, Macintosh) was used to detect any significant differences in protection against *T. gondii* infection. $P < 0.05$ was accepted as the level of significance.

Lymphocyte proliferation assay

Spleen and MLN cells from 2 sacrificed mice in each group were seeded in triplicate in flat-bottomed 96-well culture plates (5×10^5 cells per well per $200 \mu\text{l}$) in supplemented RPMI medium with or without various concentrations of TAG and cultured for 3 days. Concanavalin A ($10 \mu\text{g well}^{-1}$) was used as positive control for cell proliferation. Cells were pulsed with $1 \mu\text{Ci}$ [^3H]thymidine well^{-1} for 18 h and collected on fibreglass filters. The radioactivity incorporated (CPM) was measured by liquid scintillation counting. Results are expressed as the ΔCPM , calculated by subtracting the mean CPM of unstimulated cells from the mean CPM of TAG-stimulated cells.

Humoral response analysis

Sera were recovered according to standard protocols and stored at -20°C . Intestinal secretions were collected by using the procedure previously described (Chardes *et al.*, 1990) and stored at -20°C .

Immunoblotting was performed as previously described, using TAG (Chardes *et al.*, 1990). Tag-specific serum IgG and intestinal IgA antibodies were detected by using goat anti-mouse IgG or an anti-mouse IgA; alkaline phosphatase conjugate respectively. Serum and intestinal secretions from infected mice and 1E5 mAb (anti-SAG1 TAG; J.F. Dubremetz, Montpellier, France) were used as positive controls.

Short-term homing

SRDCs were labelled for 2 h at 37°C ($50 \mu\text{Ci}$ $^{51}\text{Cr}/5 \times 10^6$ cells) and washed by successive centrifugations. SRDCs or TAG-pulsed SRDCs (1×10^6) were injected into the tail vein of mice. Two mice were sacrificed 2, 6, 12 and 24 h after the passive transfer. The bladder, liver, lungs, intestine, spleen, kidneys, brain, blood, MLN, peripheral lymph nodes, superficial inguinal

and cervical nodes, brachial and popliteal nodes were collected. Intestinal secretions were recovered as described before. All organs were homogenized in 3 ml of distilled water containing 1% Triton X-100 and the radioactivity was measured using a gamma counter. Values were expressed as the percentage of radioactivity recovered in the organ and the remaining body. Each experiment was carried out in triplicate.

Statistical analysis

Parametric statistical analysis was performed using the *c2* test for analysing the observed differences in the survival of the mice and Student's *t*-test was used for the other analyses.

Acknowledgements

We would like to thank A. Sher and J. Aliberti for revising the manuscript. We acknowledge J. Pierre for help with immunofluorescence microscopy. We are grateful to D. Tabareau for typing assistance. We are indebted to J.M. Rieth and T. Papin for their excellent technical assistance. This work was partly supported by VIRSOL SNC.

References

- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., *et al.* (2001) Mouse type 1 IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**: 1144–1150.
- Banchereau, J., and Steinman, R. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245–252.
- Belz, G., Behrens, G., Smith, C., Miller, J., Jones, C., Lejon, K., *et al.* (2002) The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* **196**: 1099–1104.
- Bourguin, I., Moser, M., Buzoni-Gatel, D., Tielemans, F., Bout, D., Urbain, J., and Leo, O. (1998) Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity *in vivo*. *Infect Immun* **66**: 4867–4874.
- Chardes, T., Bourguin, I., Mevelec, M.N., Dubremetz, J.F., and Bout, D. (1990) Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun* **58**: 1240–1246.
- Den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000) CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J Exp Med* **192**: 1685–1696.
- Denkers, E., and Gazzinelli, R. (1993) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* **11**: 569–588.
- De Saint-Vis, B., Vincent, J., Vanderabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J.-J., Art-Yahia, S., *et al.* (1998) A novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC Class II compartment. *Immunity* **9**: 325–336.
- Dimier-Poisson, I., Aline, F., Mevelec, M.N., Beauvillain, C., Buzoni-Gatel, D., and Bout, D. (2003) Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect Immun* **71**: 5254–5265.

- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., *et al.* (1978) Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**: 113–120.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keeffe, M. (2001) Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* **166**: 5448–5455.
- Kelsall, B., Biron, C., Sharma, O., and Kaye, P. (2002) Dendritic cells at the host–pathogen interface. *Nat Immunol* **3**: 699–702.
- Leenen, P., Radosevic, K., Voerman, J.S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. (1998) Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: *in vivo* phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* **160**: 2166–2173.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., *et al.* (1999) CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J Exp Med* **189**: 587–592.
- Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2001) Cytokines regulate the capacity of CD8 α^+ and CD8 α^- dendritic cells to prime Th1/Th2 cells *in vivo*. *J Immunol* **167**: 4345–4350.
- Miller, J., Bullock, P., and Botchan, M. (1994) Simian virus 40 T antigen is required for viral excision from chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7534–7538.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M.D. (2001) CD11c $^+$ B220 $^+$ Gr-1 $^+$ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **194**: 1171–1178.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J.L., Anders, E.M., *et al.* (2002) Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8 $^+$ dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* **196**: 1307–1319.
- Paglia, P., Girolomoni, G., Robbiati, F., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1993) Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses *in vivo*. *J Exp Med* **178**: 1893–1901.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C.R. (1999) Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1036–1041.
- Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T., and Banchereau, J. (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. *J Immunol* **167**: 5067–5076.
- Ruedl, C., and Bachmann, M.F. (1999) CTL priming by CD8 $^+$ and CD8 $^-$ dendritic cells *in vivo*. *Eur J Immunol* **29**: 3762–3767.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* **179**: 1109–1118.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K. (1997) Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **158**: 2723–2730.
- Steinman, R., and Cohn, Z. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**: 1142–1162.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000) CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* **164**: 2978–2986.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., *et al.* (1997) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* **185**: 317–328.
- Xu, S., Ariizumi, K., Caceres-Dittmar, G., Edelbaum, D., Hashimoto, K., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (1995) Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J Immunol* **154**: 2697–2703.
- Yap, G., and Sher, A. (1999) Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* **201**: 240–247.



Rachel GUITON

Toxoplasma gondii et réponse immunitaire protectrice :

- Effecteurs de protection lors d'une vaccination par des cellules dendritiques

- Voies de signalisation activées par *T. gondii*



Résumé

Toxoplasma gondii, protozoaire à l'origine de la toxoplasmose, cause de nombreux avortements ou malformations fœtales, chez l'homme et l'animal. Aucun vaccin n'étant disponible, le développement d'approches vaccinales efficaces est d'actualité.

L'immunisation de souris CBA/J avec des cellules dendritiques pulsées avec de l'extrait de *T. gondii* induit une réponse immunitaire Th1 spécifique du parasite et une protection significative. La déplétion *in vivo* des LTCD₄⁺ ou CD₈⁺, suite à un challenge par des kystes de *T. gondii*, nous a permis de décrire les rôles décisif des LTCD₈⁺ et accessoire des LTCD₄⁺ dans la protection des souris chroniquement infectées.

Nous avons également étudié deux voies de signalisation intracellulaires induites par la reconnaissance du toxoplasme. Nous avons décrit le rôle délétère de l'IL-17R dans la réponse inflammatoire chez la souris C57BL/6 ainsi que le caractère essentiel de MyD88 dans la survie et la protection de souris BALB/c infectées chroniquement.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii* ; vaccination ; cellules dendritiques ; récepteur à l'IL-17 ; MyD88

Résumé en anglais

Toxoplasma gondii, an obligate intracellular protozoan, is the etiologic agent of toxoplasmosis, responsible for numerous abortions or fetal malformations, both in humans and animals. No vaccine is available so the design of efficient vaccine strategies is a topical question.

Immunization of CBA/J mice with *T. gondii* extract-pulsed dendritic cells induces a parasite-specific Th1 immune response and a significant protection. *In vivo* depletion of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes following a challenge with *T. gondii* cysts, allowed us to establish the main effector role of CD8⁺ T cells and the secondary role of CD4⁺ T cells in the protection of mice chronically infected.

We next studied two intracellular signaling pathways induced following the parasite recognition. We described a deleterious role of IL-17R in the inflammatory response in C57BL/6 mice and the crucial role of MyD88 in the survival and the protection of BALB/c mice chronically infected with *T. gondii*.

Key words: *Toxoplasma gondii*; vaccination; dendritic cells; IL-17 receptor; MyD88