

**ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES, TECHNIQUES**  
**UMR0483 Université-INRA Laboratoire d'Immunologie Parasitaire,  
Vaccinologie et Biothérapies Anti-infectieuses**

**THÈSE** présentée par :

**Haroon AKBAR**

soutenue le : **16 décembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé/ Immunologie parasitaire

**Rôle des cellules T régulatrices dans un  
modèle murin de toxoplasmose aiguë**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme MOIRÉ Nathalie**

Chargée de Recherche (HDR), INRA, Tours

**RAPPORTEURS :**

**M. ALIOUAT EI Moukhtar**

Professeur, Université de Lille 2, Lille

**Mme MAJLESSI Laleh**

Chargée de Recherche (HDR), Institut Pasteur, Paris

---

**JURY :**

**M. ALIOUAT EI Moukhtar**

Professeur, Université de Lille 2, Lille

**Mme DIMIER-POISSON Isabelle**

Professeur, Université François Rabelais de Tours

**Mme MAJLESSI Laleh**

Chargée de Recherche (HDR), Institut Pasteur, Paris

**Mme MOIRÉ Nathalie**

Chargée de Recherche (HDR), INRA, Tours

**M. PRINA Eric**

Chargé de Recherche (HDR), Institut Pasteur, Paris

**M. THIBAUT Gilles**

Professeur, Université François Rabelais de Tours

Au Pakistan qui m'a financé et à qui j'appartiens

A la France qui m'a laissée une opportunité pour faire cette aventure de thèse

A toutes les personnes du monde qui ont souffert, qui souffrent et qui vont  
souffrir de l'injustice

## Remerciements

Je remercie l'Higher Education Commission à Islamabad au Pakistan, qui a financé pendant cinq ans mon séjour en France pour faire cette thèse. Je remercie toute l'équipe EA3609 de Lille, qui m'a appris la langue française pendant mon stage de Master 2. Je remercie également le Professeur Daniel BOUT et le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON pour avoir m'accueilli au sein de leur laboratoire et pour avoir rendu possible cette aventure la thèse pendant ces quatre années.

Je remercie énormément le Professeur ALIOUAT El-Moukhtar et le Dr MAJLESSI Laleh pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que d'être membre du jury. Je tiens également à remercier le Professeur THIBAUT Gilles et le Dr PRINA Eric pour avoir accepté de prendre part au jury.

Je présente mes grands remerciements à mon encadrante, Docteur Nathalie MOIRÉ, pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils et discussions fructueuses sur les manip et les rédactions que j'ai effectuées pendant ces quatre années. Je n'oublierai jamais ses aides dans les expériences et ses encouragements pendant les moments difficiles de la thèse. Je remercie également au Docteur Marie-Noëlle MÉVÉLEC pour m'intégrer dans ses projets pendant ma thèse.

Je tiens également à remercier Docteur Stéphanie GERMON pour être co-directrice de ma thèse et ses aides et ses conseils pendant ces quatre années de mes études.

Une grande merci à l'ensemble de toutes les personnes du laboratoire y compris Docteur Nicolas Aubrey, Docteur Matthieu Juste, Josette Pierre, Céline Ducournau, Dany Leclerc, Dany Tabarau, Sylvie Bigot, Docteur Sarah Dion, Docteur Dorsaf Hedhli, Docteur Rachel Guiton, M. Imran Rashid, Marbel Torres, Audrey Gnahoui, Mathieu Mas et toutes les personnes qui m'ont aidées et dont j'ai oublié leurs noms. Je remercie également les personnes de l'équipe de Vitamfero pour partager des bons moments pendant cette période. Je remercie beaucoup M. Thierry Papin et les autres personnes de l'animalerie.

Je remercie également le Docteur Patricia Berthon et Christelle Rossignol pour m'avoir aidé à faire l'histopathologie et l'immunopathologie dans leur laboratoire.

Ça ne serait pas juste si je ne remercie pas Larbi Bedrani, un ami qui m'a réparé mon ordinateur plusieurs fois pendant la phase critique d'écriture de thèse. Je remercie toutes mes amies en France avec qui j'ai passé très bon moments en France y compris Maamer, Khalid et Shoukat. Un grande merci à Asad, un ami chez qui j'ai passé plusieurs weekend pour partager des très bons moments.

Un immense merci aux mes parents Akbar et Parveen, toute les membres de ma famille, mes enfants, mes amis et mes professeurs particulièrement Syed Anwar Hussain Shah Bukhari et Arif Hassan qui sont au Pakistan, très loins de moi mais toujours là pour me supporter.

## Résumé

Une immunité concomitante à long terme est mise en place lors de certaines infections persistantes avec des parasites protozoaires intracellulaires responsables, par exemple, de la leishmaniose et du paludisme. Dans un modèle murin de leishmaniose, il a ainsi été démontré que les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont impliquées dans la persistance des leishmanies aux sites d'infection cutanés et protègent l'hôte contre une ré-infection.

Le protozoaire *Toxoplasma gondii* est également à l'origine d'une infection chronique liée à l'installation du parasite dans le cerveau et les muscles de l'hôte dans des formes kystiques. Il était donc pertinent de s'intéresser à l'implication des cellules T régulatrices dans l'installation et la persistance du toxoplasme.

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-CD25 dans des expériences de déplétion pendant la phase aiguë de la toxoplasmose après infection de souris non consanguines avec une souche de toxoplasmes de type II. Aucune différence significative que ce soit en terme de mortalité ou de charge parasitaire cérébrale n'a été observée entre les souris infectées et déplétées et les souris infectées non déplétées. En complément de ces expériences, nous avons pu montrer que les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) sont une cible potentielle de l'anticorps anti-CD25 ainsi que les cellules T effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (Teff) ; cellules qui expriment le marqueur CD25 en phase aiguë de l'infection.

Ainsi, les résultats observés dans ces expériences ne permettent pas de conclure sur l'implication des cellules Treg dans le contrôle de l'infection toxoplasmique en modèle murin dans la mesure où une déplétion simultanée des cellules Treg CD25<sup>+</sup> et des cellules Teff CD25<sup>+</sup> est observée avec l'anticorps anti-CD25.

Parallèlement, nous avons étudié le rôle des cellules Treg dans la protection des souris vaccinées par voie intrapéritonéale avec une souche vaccinale atténuée de type I de *T. gondii* (Mic1-3KO). Nous avons observé une forte expansion des cellules Treg au site d'infection 4 jours après vaccination suivie par l'expansion des cellules Teff entre 7 et 11 jours après vaccination. Les souris vaccinées avec la souche Mic1-3KO arrivent à contrôler la parasitémie et survivent à l'infection tandis que les souris infectées avec la souche sauvage RH de type I meurent d'une forte parasitémie et d'une réponse immunitaire incontrôlée. Les cellules Treg auraient donc, dans ce modèle de vaccination, une importance primordiale en contrôlant la réponse immunitaire cellulaire excessive observée chez la souris infectées avec la souche sauvage RH.

Mot-clés : Cellules Treg Foxp3<sup>+</sup>, *Toxoplasma gondii* de Type I et Type II, Vaccination, Parasitémie

## Résumé en anglais

Long term concomitant immunity is developed in case of persistent infections with certain intracellular protozoan parasites as for example in leishmaniosis and malaria. In a murine model of leishmaniosis, it has thus been demonstrated that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells are involved in the persistence of leishmania parasites at cutaneous sites of infection and protect the host against re-infection.

The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is also responsible for a chronic infection associated with the settlement of parasite in the brain and the muscles of the host in the form of cysts. It was therefore pertinent to know about the implication of Treg cells in the development and the persistence of toxoplasma. To attain this objective, we have used a monoclonal antibody anti-CD25 in depletion experiments during the acute phase of toxoplasmosis after infection of outbred mice with a type II toxoplasma strain. No significant difference was found neither in terms of mortality nor in brain cyst load between infected and depleted mice and infected and non-depleted mice. In addition to these experiments, we have been able to show that not only the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells but also the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T effector (Teff) cells are a potential target of anti-CD25 antibody-depletion. These cells are induced to express CD25 during acute phase of the infection.

Thereby the results observed in these experiments do not allow to conclude the implication of Treg cells in the control of toxoplasmic infection in a murine model in a condition where a simultaneous depletion of CD25<sup>+</sup> Treg and CD25<sup>+</sup> Teff cells is observed with anti-CD25 antibody.

At the same time, we have studied the role of Treg cells in the protection of mice vaccinated intraperitoneally with a type I attenuated strain of *Toxoplasma gondii* (Mic1-3KO). We have observed a high expansion of Treg cells at the site of infection 4 days after vaccination followed by expansion of Teff cells between 7 to 11 days post-vaccination. The mice vaccinated with the strain Mic1-3KO manage to control the parasitemia and survive the infection whereas the mice infected with the wild type strain RH parasites, die of a high parasitemia and of uncontrolled immune response. The regulatory T cells would thus have, in this model of vaccination, a vital importance in the control of excessive cellular immune response observed in mice infected with wild type strain RH.

Key-words : Foxp3<sup>+</sup> Treg cells, Type I and Type II *Toxoplasma gondii*, Vaccination, Parasitemia

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Résumé en anglais .....	6
Table des matières .....	7
Liste des tableaux .....	10
Liste des figures .....	11
Liste des annexes.....	12
Abréviations .....	13
Introduction .....	16
Revue de la littérature .....	21
A. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	22
I. Rappels historiques.....	22
II. Description du parasite .....	22
1. Tachyzoïtes.....	24
2. Kystes infectieux contenant les bradyzoïtes.....	24
3. Oocystes sporulés contenant les sporozoïtes.....	26
III. Cycle de vie .....	27
1. Phase sexuée.....	27
2. Phase asexuée .....	30
IV. Différentes souches de <i>T. gondii</i> .....	31
1. Souches classiques du <i>T. gondii</i> .....	31
2. Souches recombinantes et atypiques .....	33
3. Haplogroupes de <i>T. gondii</i> .....	34
4. Les loci impliqués dans la virulence des souches .....	34
B. La toxoplasmose.....	35
I. Toxoplasmose humaine .....	35
1. La toxoplasmose chez le sujet immunocompétent.....	35
2. Toxoplasmose chez les immunodéprimés.....	36
II. Toxoplasmose animale .....	37
1. Toxoplasmose ovine et caprine .....	37
2. Toxoplasmose chez les autres mammifères .....	38
III. Transmission.....	38

IV. La transmission verticale .....	39
V. Diagnostic .....	39
1. Bio-essai .....	39
2. Sérologie.....	39
3. Diagnostic anténatal et postnatal.....	40
VI. Traitements .....	41
VII. Prévention.....	41
VIII. Vaccination.....	42
1. Les vaccins vivants de <i>T. gondii</i> .....	42
2. Les vaccins vivants comme modèle d'étude de la réponse immune protectrice.....	45
C. Réponse immunitaire.....	48
I. Réponse humorale .....	48
II. Réponse cellulaire .....	49
1. Réponse immune innée .....	49
2. Réponse immune adaptative.....	53
D. Cellules T régulatrices.....	64
I. Fonctions des Treg .....	64
II. Historique .....	64
III. Différentes populations de Treg .....	65
1. Treg CD4 <sup>+</sup> .....	65
2. Treg CD8 <sup>+</sup> .....	68
IV. Marqueurs des cellules Treg CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> .....	69
1. Les marqueurs "classiques" .....	69
2. Marqueurs membranaires .....	74
3. Marqueurs spécifiques de sous-phénotypes de Treg.....	77
V. Mécanisme de l'activité suppressive des Treg .....	82
1. Activité contact-dépendante .....	82
2. Activité induite via les cytokines .....	86
VI. Différenciation, homéostasie, plasticité des Treg.....	90
1. Différenciation des Treg.....	90
2. Marqueurs spécifiques de nTreg et iTreg.....	95
3. Spécificité Ag-dépendante de la suppression.....	96
4. Plasticité .....	97

5. Homing et migration .....	99
VII. Outils pour étudier les cellules Treg.....	101
1. Les souris.....	102
2. Les anticorps ou agonistes dirigés contre les marqueurs membranaires anti CTLA-4, GITR, CD25, cytokines qui activent ou inhibent les Treg .....	102
3. Les produits induisant la multiplication et l'expansion des Treg.....	104
4. Les produits diminuant la multiplication des cellules Treg .....	106
E. Cellules Treg dans les infections.....	108
I. Mise en évidence de l'expansion des Treg au cours des infections .....	109
1. Rôles bénéfiques des Treg dans les infections. ....	110
2. Rôle délétère des Treg dans les infections .....	112
II. Cellules Treg et les vaccins contre les infections .....	112
III. Cellules Treg et infections par les protozoaires .....	113
1. Rôle des Treg dans la leishmaniose .....	113
2. Rôle protecteur et pathologique des Treg dans la malaria .....	114
3. Rôle des Treg et autres infections protozoaires .....	119
4. Cellules Treg et toxoplasmose .....	119
Résultats .....	121
A. Article-I.....	122
B. Article-II.....	160
C. Article-III .....	190
Conclusions et perspectives .....	226
Bibliographie.....	238
Résumé :.....	282
Résumé en anglais:.....	282

## Liste des tableaux

Tableau 1: Les essais de vaccinations avec des parasites vivants d'après Jongert <i>et al.</i> 2009.	47
Tableau 2: Molécules importantes impliquées dans l'identification et l'activité des cellules Treg (modifié d'après Trzonkowski et al. 2009).....	70
Tableau 3: Marqueurs associés à la migration des cellules Treg d'après Campbell et Koch 2011.....	80
Tableau 4 : Mécanismes de suppression de cellules Treg d'après Sakaguchi <i>et al.</i> 2010.....	89
Tableau 5: Facteurs de transcriptions associés aux différentes lignées cellulaires.....	90
Tableau 6 : Les produits modulant l'activité des cellules Treg.....	107
Tableau 7: Les infections induisant les cellules nTreg d'après Belkaid 2007.....	116

## Liste des figures

Figure 1: Structure d'un bradyzoïte en microscopie électronique d'après Dubey <i>et al.</i> 1998..	23
Figure 2: Différents stades du parasite .....	25
Figure 3 : Cycle du toxoplasme modifié d'après Aliberti 2005 .....	29
Figure 4: Différenciation des cellules CD4 <sup>+</sup> en différentes populations cellulaires .....	59
Figure 5: Les effets de l'absence des Treg chez la souris et chez l'Homme d'après Sakaguchi <i>et al.</i> 2008.....	73
Figure 6 : Mécanismes des fonctions des cellules Treg d'après Shevach 2009.....	83

## Liste des annexes

- Annexe-I : Présentation orale dans le Forum de l'Ecole Doctorale Santé, Sciences, Techniques, Université François Rabelais de Tours, France le 17 juin, 2009 277
- Annexe-II : Présentation orale dans un congrès en Hollande "10th International Congress on Toxoplasmosis" le 20 juin 2009 279

## Abréviations

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADNc	Acide DéoxyriboNucléique complémentaire
AHR	Airway Hypersensitivity Reaction
AMP	Adénosine MonoPhosphate
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine TriPhosphate
aTreg	Acquired Regulatory T cells
B7	Ligand du CTLA-4
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR	“CC-chemokine receptor”
CXCR	“CXC-chemokine receptor”
CD	Cellules dendritiques
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA	Cellules Présentatrices d’ Antigènes
CPS-1	Carbamoyl Phosphate Synthetase I
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4 (CD152)
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
DEREG	DEpletion of REGulatory T cells
DHFR	DéHydroFolate Réductase
DL	Dose Léthale
DSS	Dextran Sulfate Sodium
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
Egr2 <sup>+</sup>	Early Growth Response Gene 2
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
FITC	Fluorescein Iso-Thio-Cyanate
FOXP3	Forkhead box P3
GFP	Green Fluorescent Protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein
GRA	Protéine de granules denses

GVHD	Graft versus host like disease
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HFF	Human Foreskin Fibroblasts
ICOS	Inducible costimulator
IFI	Immuno-Fluorescence Indirecte
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IPEX	Immudysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrome
ip	intra-péritonéal
ISAGA	Immunosorbant Agglutination Assay
iTreg	Cellules T régulatrices induites
iv	intra-veineux
JAK	Janus Kinase
KLRG1	Killer-like lectin receptor G1
KO	Knock-out
LAG3	Lymphocytes Activation Gene 3
LAP	Latency Associated Peptide
LIE	Lymphocytes Intra-Epithéiliaux
LP	Lamina Propria
LPS	Lipo-PolySaccharide
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
Mic1-3 KO	<i>Mic 1 Mic 3</i> Knock Out
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MW	Molecular Weight
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxyde
NKT	Natural Killer T
NOD	Non-Obese Diabetic
Nrp1	Neurophiline-1
nTreg	Cellules T régulatrices naturelles
OD405	Optical Density at a wavelength of 405

OMPDC	Orotidine-5-MonoPhosphate DeCarboxylase
OVA	Ovalbumine
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrine
PMN	PolyMorphoNuclear
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RA	Retinoïc Acid
RAG	Recombination Activating Gene
ROP	Protéine de rhoptrie
ROR	Retinoïd related Orphan Receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Syndrôme d'Immuno-Déficience Acquise
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCM	Central memory T cells
TCR	T cell receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor-beta
TH	Cellules T "Helper"
TH1	Cellules T "Helper" type-1
TH2	Cellules T "Helper" type-2
TH3	Cellules T "Helper" type-3
TH17	Cellules T "Helper" type-17
TLR	Toll-Like-Receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
Tr1	Cellules T régulatrices de type-1
Treg	Cellules T régulatrices
UP	Uridine Phosphorylase
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humain
WT	Wild type

# Introduction

La toxoplasmose est une zoonose mondiale. *Toxoplasma gondii*, un parasite protozoaire, provoque la toxoplasmose chez une grande variété d'hôtes, l'homme y compris. Presque un tiers de la population mondiale est infecté avec ce parasite. Chez un sujet immunocompétent, la toxoplasmose est asymptomatique dans 80% des cas. Parmi les 20% restants, la pathologie la plus fréquente est une inflammation ganglionnaire dont la guérison est spontanée après quelques mois. Les atteintes les plus graves concernent d'abord les sujets immunodéprimés et résultent de la réactivation d'une infection acquise antérieurement. Quelques cas de contamination ont aussi été décrits après transplantations d'organes contaminés. Enfin, la forme majeure de la maladie aigüe est la toxoplasmose congénitale. Lorsqu'une femme se contamine pour la première fois lors d'une grossesse, les tachyzoïtes franchissent la barrière trans-placentaire et infectent le fœtus. La transmission congénitale du parasite a aussi des effets graves chez les animaux. L'avortement chez la brebis et la chèvre due à la toxoplasmose cause des pertes des millions d'agneaux par an en Europe. A ce jour, il n'y a aucun traitement pour éliminer le parasite d'un hôte infecté. De plus, il n'y a aucun vaccin pour prévenir l'infection chez l'homme et les vaccins utilisés chez des animaux ne donnent pas une protection efficace à 100% ou une immunité stérile. Face à l'impact important de la toxoplasmose, le développement de traitements efficaces est un enjeu important en médecine vétérinaire et humaine. Le développement d'un vaccin est une stratégie envisageable puisqu'une immunité protectrice à long terme est induite après une primo-infection naturelle par *T. gondii*. De nombreux essais de vaccination ont été effectués dans des modèles animaux avec des extraits parasitaires, des parasites vivants atténués, des protéines purifiées ou recombinantes du parasite, ou des vaccins ADN. Dans ce cadre, l'étude des mécanismes immunitaires impliqués dans la protection est primordiale pour la mise au point d'un vaccin efficace. La réponse immunitaire induite dans la toxoplasmose est principalement de type Th1, marquée par une production importante d'IL12 par les cellules présentatrices d'antigènes et la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK, lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

La modulation de la réponse immunitaire de l'hôte est un phénomène exploité par certains parasites protozoaires pour contrôler la réponse de l'hôte et empêcher la destruction totale du parasite. Il y aurait plusieurs facteurs provenant de l'hôte et/ou du parasite impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire. Les cellules T régulatrices (Treg) CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> régulent les réponses immunitaires et maintiennent la tolérance dans le

corps. Elles inhibent l'auto-immunité. Elles sont caractérisées par l'expression constitutive des marqueurs CD25 et Foxp3. La mutation (naturelle ou expérimentale) du gène Foxp3 abroge la fonction régulatrice des cellules Treg et provoque une maladie auto-immune inflammatoire chez l'homme et chez la souris. Dans les maladies infectieuses, les cellules Treg maintiennent l'homéostasie dans le corps en diminuant l'intensité des réponses immunitaires fortes contre les pathogènes mais en même temps elles sont responsables en particulier dans les infections chroniques de la persistance du parasite. Cette capacité régulatrice des cellules Treg est parfois bénéfique pour l'hôte, par exemple dans la leishmaniose et parfois délétère pour l'hôte comme dans le paludisme et le cancer. La toxoplasmose est une infection parasitaire chronique. Jusqu'alors on ne connaissait pas précisément le rôle exact des cellules Treg dans la protection induite après infection à *T. gondii* ni dans la persistance du toxoplasme. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des cellules Treg qui pourraient être responsables de la persistance de *T. gondii* dans ses hôtes. La connaissance des mécanismes exacts impliqués dans cette persistance nous permettrait d'envisager d'intervenir sur les populations responsables de ce maintien pour pouvoir augmenter la réponse pour développer un vaccin efficace.

Le rôle des cellules Treg chez la souris infectée par *T. gondii* n'était pas étudié aux débuts de ces travaux et c'est ce rôle dans la réponse protectrice induite qui a fait l'objet de ces travaux de thèse.

Les travaux de cette thèse sont complémentaires des études effectuées au sein de l'unité UMR 483. L'objectif prioritaire des travaux de l'Unité est la conception et la réalisation de vaccins contre les Apicomplexa. La compréhension des systèmes inducteurs et effecteurs de l'immunité de protection s'intègre dans une approche rationnelle de la vaccination. La caractérisation des réponses protectrices après différentes stratégies de vaccination avec des protéines majoritaires du parasite ainsi que le rôle des cellules dendritiques dans l'induction de la réponse immunitaire protectrice sont les sujets de recherche principaux en cours dans l'UMR.

Le modèle d'étude privilégié de l'unité est une infection qui mime la voie naturelle à savoir l'infection orale par une souche de toxoplasme de type II. Un autre modèle est l'utilisation d'une souche vivante atténuée "candidat-vaccin" pour étudier la réponse protectrice induite.

Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi d'étudier le rôle des Treg dans un modèle murin de toxoplasmose chez la lignée non consanguine de souris OF1. Ces souris ont une

grande variabilité génétique individuelle ce qui est plus représentatif des populations ovines ou humaines qui sont les cibles de la toxoplasmose. Nous avons étudié le rôle des Treg dans deux modèles dans lesquels l'infection est contrôlée.

D'une part, nous avons utilisé la souche sauvage 76K de type II dans un modèle d'infection orale qui mime une infection naturelle. Dans ce cas, le parasite est rapidement contrôlé après infection et établit une infection chronique chez son hôte. Dans le deuxième modèle, les réponses immunitaires contre une souche vaccinale protectrice et la souche sauvage dont elle dérive (létale) ont été comparées. La souche sauvage est la souche RH de type I. La souche vaccinale atténuée (Mic1-3KO) a été obtenue au sein de l'Unité en délétant deux gènes de micronèmes *Mic1* et *Mic3* à partir de la souche RH.

La première stratégie retenue a été de regarder l'effet de la déplétion des Treg au cours d'une infection mimant l'infection naturelle avec la souche de type II. Nous avons choisi une technique de déplétion des cellules Treg en injectant un anticorps monoclonal anti-CD25. Après avoir mis en évidence l'efficacité de la déplétion des cellules  $CD4^+CD25^+$  chez les souris naïves, nous avons utilisé l'anti-CD25 pour dépléter les cellules Treg chez les souris infectées. De forts taux de mortalité ont dans ce cas été observés. Les examens post mortem des souris infectées et déplétées ont montré que les souris avaient une iléite, comme ce qui est observé chez les souris C57BL/6 (naturellement sensibles) infectées avec une dose létale de la souche 76K. Les injections d'un anticorps contrôle aux souris infectées ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative de survie chez les souris infectées recevant soit l'anti-CD25 soit son contrôle isotypique. Ces résultats ont montré que la mortalité n'était pas due à la déplétion des cellules Treg puisque l'on observe des résultats similaires sur la survie en utilisant l'isotype contrôle. Nous avons utilisé dans ces premières expériences des anticorps obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la mortalité des souris est la présence d'un contaminant qui entrainerait une inflammation qui en présence des parasites aggraverait l'inflammation déjà induite par le parasite. Nous avons présenté les résultats des travaux dans l'article-I de cette thèse.

Par la suite, nous avons purifié les anticorps, par chromatographie d'affinité. Les expériences faites avec les anticorps purifiés ont montré une absence de mortalité chez les souris témoin injectées avec l'isotype et une mortalité non significative chez les souris déplétées avec l'anti-CD25. Les résultats présentés dans l'article II sont les résultats des expériences faites avec les anticorps purifiés. On observe une surproduction de l'IL-12p70 systémique après les injections de l'anti-CD25 mais on ne trouve pas de différence de charge parasitaire entre les

souris déplétées ou non déplétées. De plus, il est à noter que l'anti-CD25 déplete les cellules T effectrices (Teff) CD25<sup>+</sup> même si la cible privilégiée de la déplétion reste les cellules Treg CD25<sup>+</sup>.

Globalement, la déplétion des Treg dans ce modèle d'infection naturelle n'a pas eu de conséquences sur le développement de la maladie. De plus, nous avons montré que la déplétion n'est pas un outil adapté dans ce modèle d'infection puisque le nombre de cellules CD25<sup>+</sup> effectrices augmente après l'infection.

Dans le dernier volet de notre travail, nous avons étudié le rôle des cellules Treg dans la protection après une vaccination avec une souche vivante atténuée Mic1.3KO. Nous avons adopté une autre stratégie et nous avons quantifié les cellules Treg au niveau local (péritoine) et systémique (rate) après marquage avec l'anticorps anti-Foxp3 spécifique des Treg. Nous avons comparé les réponses entre la souche vaccinale et la souche sauvage. Nous avons pu mettre en évidence une expansion au niveau local du nombre de cellules Treg 4 jours post infection préférentiellement chez les souris infectées avec la souche vaccinale. Cette expansion est suivie au niveau local par une expansion de cellules T effectrices entre j4 et j11 post infection. Cette expansion des Teff au niveau local est corrélée à un contrôle de la parasitémie chez les souris vaccinées contrairement aux souris infectées avec la souche sauvage dont le nombre de parasites augmente exponentiellement à partir du jour 4 post infection jusqu'à la mort de la souris entre j8 et j10. Chez ces souris, on observe également des signes d'une réponse immunitaire (RI) non contrôlée à partir de j7 avec des taux importants d'IFN $\gamma$  au niveau systémique (rate et sérum) et un taux fort d'expression de CD69 par les splénocytes. Les souris infectées par la souche sauvage seraient donc incapables de contrôler la RI induite par l'infection mais aussi incapables de contrôler la parasitémie. L'expansion des Treg observée chez les souris vaccinées pourrait jouer un rôle important dans la protection.

## Revue de la littérature

## A. *Toxoplasma gondii*

### I. Rappels historiques

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire (Sabin et Olitsky 1937). *T. gondii* a été découvert en 1908 par Nicolle et Manceaux chez un rongeur "*Ctenodactylus gundi*" à l'Institut Pasteur de Tunisie (Nicolle et Manceaux 1908, Nicolle et Manceaux 1909) et chez le lapin par Splendor au Brésil (Splendor 1908). *T. gondii* provoque une infection appelée toxoplasmose. C'est entre 1920 et 1930 que sont décrits les premiers cas de toxoplasmose humaine (toxoplasmose congénitale avec manifestations oculaires en 1923, un cas d'encéphalite chez un enfant en 1939). Le diagnostic de la toxoplasmose chez l'Homme a été effectué pour la première fois en 1939 (Wolf *et al.* 1939). La mise au point d'un diagnostic le "Dye Test" (réaction de Sabin et Feldman) a permis de calculer les séroprévalences très importantes de ce parasite chez l'Homme dans les années 1940.

Le rôle de la consommation de viande insuffisamment cuite dans l'infection humaine n'a été clairement identifié que dans les années 1960 (Desmonts et Couvreur 1965). Et ce n'est qu'en 1969 que l'identification du chat comme hôte définitif abritant les oocystes a permis de reconstituer le cycle du parasite pour comprendre ainsi le cycle d'infection des herbivores (Hutchison 1965, Frenkel *et al.* 1969).

### II. Description du parasite

*T. gondii* est un protozoaire appartenant à l'ordre des coccidies, phylum des apicomplexes, responsable d'une infection très répandue dans le règne animal chez tous les animaux homéothermes, y compris l'Homme. C'est un parasite intracellulaire obligatoire. Outre les organites cellulaires communs aux autres cellules eucaryotes (noyau, mitochondrie, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique), *T. gondii* possède des organites impliqués dans le processus d'invasion cellulaire et deux organites originaux, l'apicoplaste et l'acidocalcisome. L'apicoplaste ressemble à un plaste ayant perdu ses fonctions de photosynthèse. Cet organite aurait été acquis par un ancêtre du phylum des apicomplexes par double endosymbiose d'une algue verte. Son rôle exact est encore mal connu. (Fig. 1).

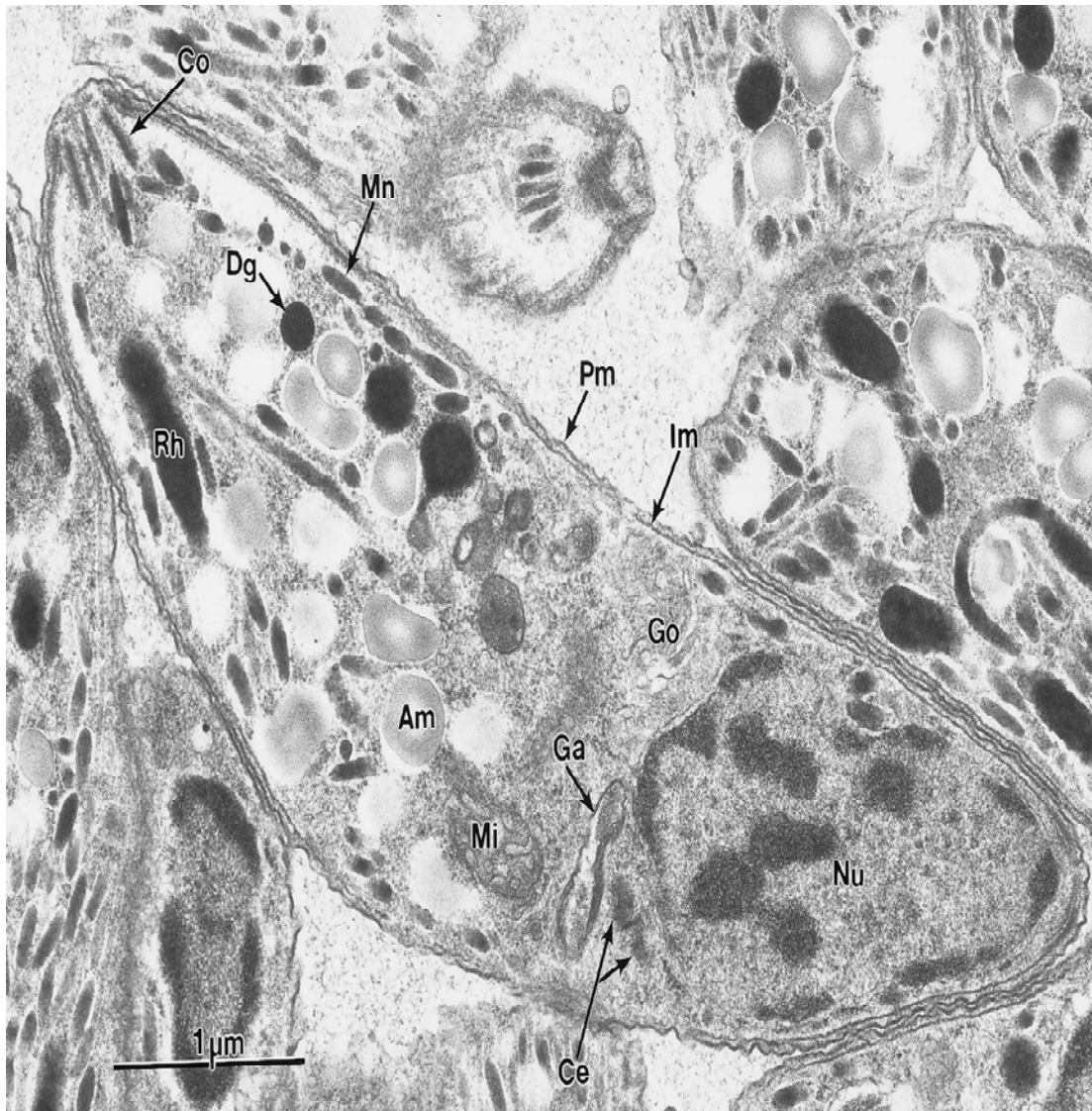


Figure 1: Structure d'un bradyzoïte en microscopie électronique d'après Dubey *et al.* 1998

Am = granules amylopectine; Ce = centrioles; Co = Conoïdes; Dg = granules électron dense; Ga = apicoplaste; Go = complexe de Golgi; Im = complexe de la membrane interne; Mi = mitochondrie; Mn = Micronèmes; Nu = noyau; Pm = membrane plasmique; Rh = rhoptries.

L'acidocalcisome est un organelle acide, dense aux électrons et riche en pyrophosphate, polyphosphate, calcium, magnésium, sodium, et zinc. Sa membrane contient de nombreux systèmes de transport.

Le toxoplasme présente au cours de son cycle trois stades infectieux : les tachyzoïtes, les bradyzoïtes et les sporozoïtes (Dubey *et al.* 1998) (Fig. 2)

## 1. Tachyzoïtes

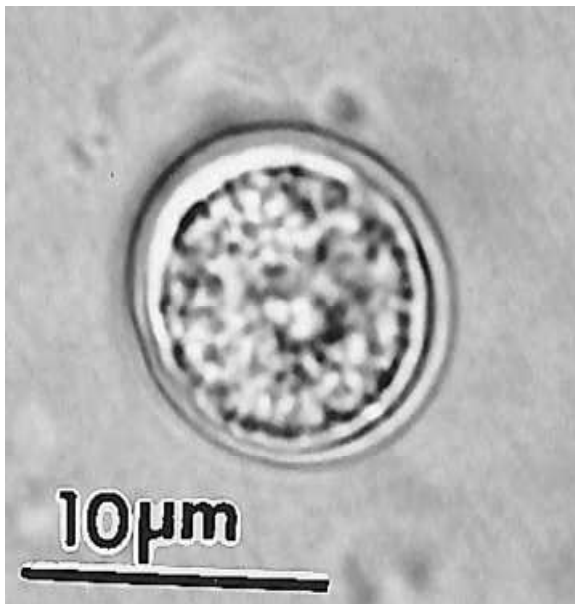
Les tachyzoïtes sont trouvés chez les hôtes intermédiaires ainsi que chez les hôtes définitifs. Le tachyzoïte (Frenkel 1973) aussi appelé trophozoïte est la forme découverte en 1908 dans le *Ctenodactylus gundi*. Les tachyzoïtes sont la forme de multiplication rapide du parasite, c'est pour cela qu'il porte le nom de tachyzoïte du grec « tacho » qui signifie rapide (Frenkel 1973, Meissner *et al.* 2002).

Le tachyzoïte a une forme de croissant, d'une taille approximative de 2 x 6 µm. Le tachyzoïte est luniforme. Son extrémité antérieure est effilée et son extrémité postérieure arrondie. La partie antérieure présente une structure caractéristique du phylum des apicomplexes : le complexe apical qui comporte le conoïde et les organelles sécrétoires (micronèmes, rhoptries, granules denses) (Fig. 1 et Fig. 2C). L'enveloppe du tachyzoïte est composée de 3 membranes, une membrane plasmique et 2 membranes juxtaposées formant un complexe membranaire interne constitué de vésicules aplaties. Cette membrane interne est discontinue au pôle antérieur et au pôle postérieur. Le tachyzoïte est le stade de multiplication rapide du toxoplasme, lors des phases actives de l'infection. Il se divise en deux par un processus spécialisé appelé endodyogenie. Chaque division s'effectue en 6 à 9 heures.

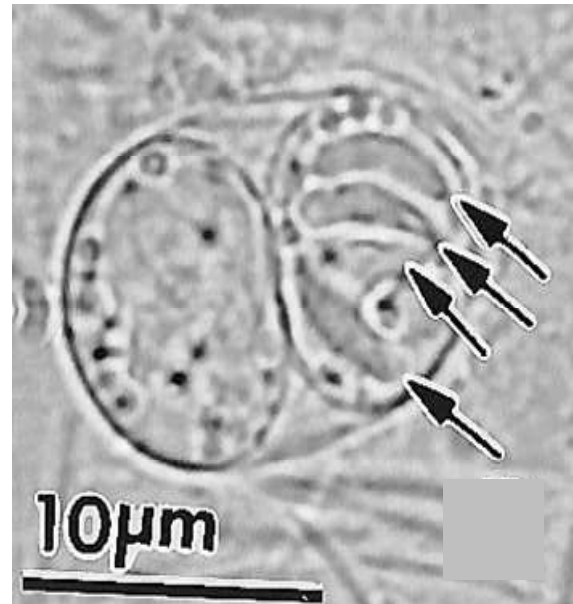
## 2. Kystes infectieux contenant les bradyzoïtes

Le bradyzoïte appelé aussi cystozoïte est la forme latente de *T. gondii* trouvée dans les kystes tissulaires (Frenkel 1973). Leur multiplication est lente. Les kystes siègent préférentiellement dans le système nerveux central et les muscles (striés et myocarde). Les kystes peuvent aussi se développer au sein de l'oeil ou des viscères. Ils persistent tout au long de la vie de l'hôte. Un kyste peut contenir de deux bradyzoïtes jusqu'à trois mille bradyzoïtes avec un diamètre de 5 à 100µm. Le paroi kystique est détruite par la pepsine ou la trypsine mais les bradyzoïtes libérés dans l'intestin sont résistants aux digestions enzymatiques. C'est pour cela que la transmission par la consommation de viande crue ou mal cuite est la voie de contamination la

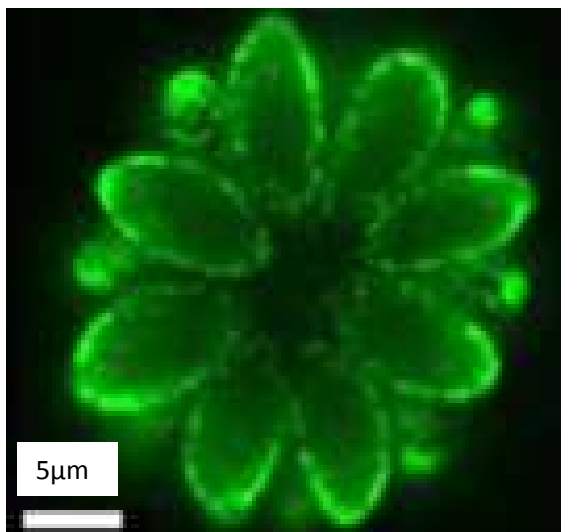
A



B



C



D

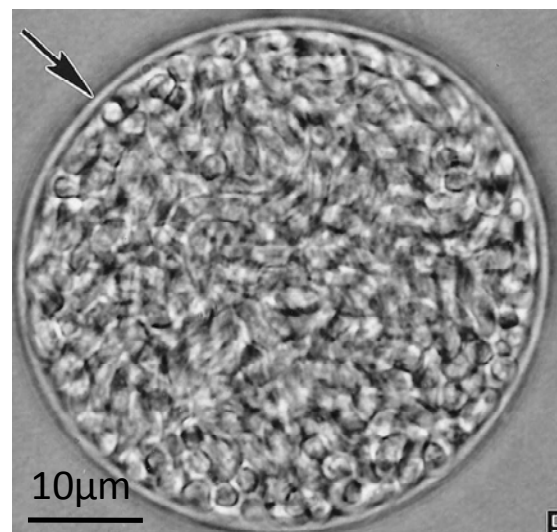


Figure 2: Différents stades du parasite

Oocyste non sporulé (A), oocyste sporulé (les flèches indiquent les sporozoïtes) (B), tachyzoïtes (C) et bradyzoïtes (D) dans un kyste (la flèche indique la double paroi du kyste) d'après Dubey *et al.* 1998 et Brossier *et al.* 2008

plus probable chez l'Homme. La forme du bradyzoïte ressemble à un croissant d'une taille de 7 x 1.5µm mais il diffère un peu des tachyzoïtes. Le noyau a une situation plus postérieure dans les bradyzoïtes par rapport aux tachyzoïtes. Les bradyzoïtes contiennent beaucoup de granules d'amylopectine que l'on trouve rarement chez les tachyzoïtes. La paroi du kyste tissulaire est fine (0,5µm d'épaisseur) (Fig. 2D).

### 3. Oocystes sporulés contenant les sporozoïtes

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

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 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). 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).

Ce sont les sporozoïtes qui pénètrent la paroi intestinale des hôtes après l'ingestion des oocystes sporulés. (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).

### III. Cycle de vie

*T. gondii* a deux types d'hôtes ; des hôtes définitifs et des hôtes intermédiaires.

Le cycle du parasite comprend une multiplication sexuée chez l'hôte définitif et asexuée, chez les hôtes définitifs et intermédiaires. Tous les félidés sont les hôtes définitifs (chat, jaguar, puma). La phase sexuée a lieu seulement chez les hôtes définitifs tandis que la phase asexuée peut avoir lieu chez le chat aussi bien que chez les hôtes intermédiaires. Tous les animaux à sang chaud y compris les oiseaux et les mammifères terrestres et marins (Lehmann *et al.* 2006, Stieve *et al.* 2010, Dubey *et al.* 2010, de Godoi *et al.* 2010) sont des hôtes intermédiaires (Fig. 3).

#### 1. Phase sexuée

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 rejetés quotidiennement dans les fèces 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 félinés excrètent des oocystes dans les fèces trois à dix jours après ingestion de bradyzoïtes, dix-huit jours après ingestion d'oocystes sporulés et treize jours après ingestion de tachyzoïtes (Dubey *et al.* 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).

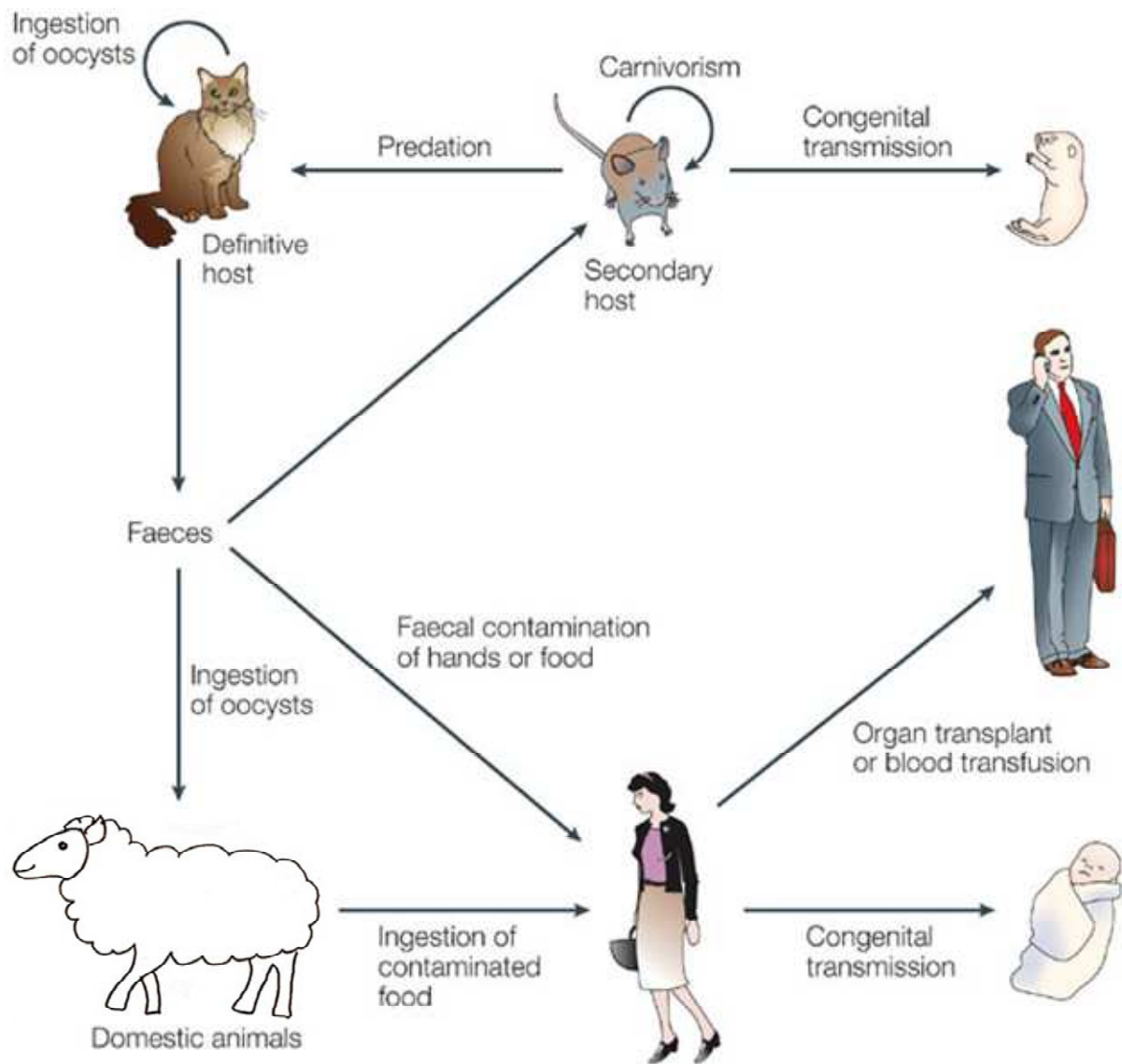


Figure 3 : Cycle du toxoplasme modifié d'après Aliberti 2005

Cycle : <http://www.nature.com/scitable/content/toxoplasma-gondii-life-cycle-14465566>

(site Web visité le 04-11-2011)

## 2. Phase asexuée

La reproduction asexuée du parasite *T. gondii* commence quand un hôte intermédiaire ingère des kystes tissulaires ou des oocystes sporulés. Juste 2 heures après l'ingestion d'oocystes sporulés, on retrouve les sporozoïtes dans leurs vacuoles parasitophores dans les entérocytes, et 4 heures après, les parasites sont retrouvés dans la lamina propria (LP). On ne retrouve pas les parasites à ce moment dans les lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) (Dubey *et al.* 1997). Les bradyzoïtes libérés après l'ingestion des kystes tissulaires, envahissent les cellules épithéliales intestinales avant de se multiplier et d'être convertis en tachyzoïtes. Dans 12 heures après l'infection, une grande majorité des sporozoïtes est transformée en tachyzoïtes suivie par leur multiplication rapide par endodyogénie dans les entérocytes en particulier. L'endodyogénie se prolonge 24-48 heures après l'infection. Ensuite, une énorme quantité de tachyzoïtes extracellulaires sont libérés après la lyse des cellules parasitées et sont détectables dans la LP (Dubey *et al.* 1997, Speer et Dubey 1998). Ces tachyzoïtes envahissent ensuite les cellules adjacentes, les cellules intraépithéliales (LIE) et les cellules du système réticulohistiocytaire, permettant la dissémination rapide des parasites dans le corps de l'hôte. Cette dissémination marque la phase aiguë de l'infection. Le système immunitaire de l'hôte immunocompétent élimine la grande majorité des tachyzoïtes. Le reste des tachyzoïtes migrent vers les autres tissus pour se convertir en bradyzoïtes conduisant à la formation des kystes intracellulaires au sein de ces mêmes tissus. Les bradyzoïtes continuent à se multiplier par endodyogénie dans les kystes mais beaucoup plus lentement (Dubey *et al.* 1997). Les principaux tissus contenant les kystes sont le cerveau, le système nerveux central, l'œil, les muscles cardiaques et squelettiques. Les organes viscéraux comme le foie, les poumons, les reins, peuvent aussi contenir des kystes mais en plus faible quantité (Dubey et Thulliez 1993, Dubey *et al.* 1997). Ces kystes marquent l'étape terminale du cycle de reproduction chez l'hôte intermédiaire et sont directement infectieux au contraire des oocystes qui ont besoin d'une sporulation. Ces kystes persistent toute la vie des hôtes sans pour autant créer des réactions inflammatoires. Cependant l'hypothèse admise est que les kystes tissulaires doivent se rompre assez régulièrement, libérant des bradyzoïtes qui vont rapidement se convertir en tachyzoïtes pour une nouvelle dissémination dans l'hôte pour être à nouveau transformés en bradyzoïtes qui vont donner naissance à de nouveaux kystes tissulaires (Dubey *et al.* 1997 et 1998, Frenkel et Dubey 2000, Black et Boothroyd 2000).

## IV. Différentes souches de *T. gondii*

Les analyses faites avec les techniques de biologie moléculaire ont montré que la plupart des isolats de *T. gondii* chez l'Homme et chez les animaux en Amérique du Nord et en Europe sont classés principalement en trois lignées clonales, appelées souches de Type I, Type II et Type III (Ajzenberg *et al.* 2004, Howe et Sibley 1995, Sibley et Boothroyd 1992). En outre, il y a des souches atypiques et recombinantes produites par recombinaisons entre les populations clonales des trois types (Sibley *et al.* 1992, Howe et Sibley 1995). Ces types sont basés sur le génotype des isolats et les caractères associés de virulence, pathogénicité, capacité de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques (Barragan et Sibley 2002), la vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité de transformation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes aboutissant à la formation des kystes (Soete *et al.* 1993). Il n'y a pas d'énormes différences géographiques entre les souches isolées d'Amérique du Nord et d'Europe. De même, les isolats trouvés soit chez l'Homme soit chez l'animal en Amérique du Nord et en Europe, sont similaires. Malgré la propagation clonale des trois lignées, il y a une haute similarité entre eux. Il n'y a qu'une différence de 1% en ADN entre ces 3 souches (Howe et Sibley 1995).

### I. Souches classiques du *T. gondii*

#### a. Type I

Le premier isolat de la souche RH à partir d'un patient humain était très virulent chez les souris (Sabin 1941). Aujourd'hui une vingtaine de souches ont été isolées à partir d'infections d'animaux et d'humains, toutes similaires en terme de virulence chez la souris (comme GT1, VEL) (Howe et Sibley 1995). Ces souches très virulentes chez la souris sont classées comme les souches de type I. L'infection chez la souris par les souches de type I est mortelle dans la phase aiguë de l'infection. La dose létale (DL)100 des souches de type I est de 1 tachyzoïte viable qui provoque la mort des souris en moins de 10 jours avec une haute parasitémie. Ces souches sont non virulentes chez le rat et parfois sont complètement éliminées par leur système immunitaire (Zenner *et al.* 1999). Les souches de type I ont une capacité de migration et de transmigration à travers des barrières biologiques *ex vivo* supérieure à celles des types II et III. Leur multiplication *in vitro* est trois fois plus rapide que celle des souches de type II et III. La transformation en bradyzoïtes et la formation des kystes est faible. Chez la souris, ces souches induisent énormément de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  et donc sont

responsables de manifestations cliniques sévères (Gavrilescu et Denkers 2001, Mordue *et al.* 2001). Les souches de type I sont trouvées, en générale chez l'Homme et rarement chez les animaux. Ces souches provoquent une toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés comme par exemple chez les malades du SIDA (Khan *et al.* 2005) et sont aussi à l'origine de certains cas de toxoplasmose congénitale (Fuentes *et al.* 2001). Les souches de type I sont aussi associées aux infections oculaires acquises (Boothroyd et Grigg 2002).

#### b. Type II

Les souches de virulence moyenne sont incluent dans la catégorie des souches de type II comme les souches 76K, ME49, DEG, PIH et sont responsables de la toxoplasmose chronique chez la souris. Elles ne sont pas mortelles dans la phase aiguë de la toxoplasmose sauf chez les souris naturellement sensibles comme les souris C57BL/6 ou dans le cas d'une infection avec une forte dose. La DL100 des souches de type II est  $10^3$ . Les souches de type II sont à l'origine de la plupart des infections chez l'Homme et chez les animaux domestiques (Howe et Sibley 1995, Gross *et al.* 1997). La formation des bradyzoïtes et des kystes *in vitro* est supérieure par rapport aux souches de type I mais la capacité de migration et de transmigration à travers des barrières biologiques *ex vivo* est inférieure à celles de type I. Les souches de type II sont capables de produire des kystes dans les modèles d'infection animale et sont souvent liées aux infections des animaux de rentes (Mondragon *et al.* 1998, Owen et Trees 1999). C'est pour cela que les souches de type II sont à l'origine de la plupart des infections chez l'Homme (Sibley et Ajioka 2008). Des études faites en Amérique du Nord et en Europe, montrent que dans la plupart des cas de toxoplasmose chez l'Homme (soit congénitale, soit chez les sujets immunodéprimées), la souche de type II est responsable de l'infection (Ajzenberg *et al.* 2002, Dardé *et al.* 1992, Howe *et al.* 1997, Howe et Sibley 1995, Richomme *et al.* 2009). Les souches de type II seraient responsables de la majorité des cas de toxoplasmose oculaire en France (Fekkar *et al.* 2011).

#### c. Type III

Les souches de *T. gondii* qui sont avirulentes chez le souris, sont incluses dans la catégorie de souches de type III (comme VEG, CTG, STRL). On les trouve rarement dans les populations étudiées. Les souches de type III sont fréquentes chez les animaux mais elles ne sont pas associées à la maladie (Howe et Sibley 1995). Une étude récente montre que la plupart des souches isolées des animaux infectés en Afrique, appartenaient au génotype de type III

(Mercier *et al.* 2010). Chez l'Homme, les infections dues aux souches de type III sont rares et sont liées à la présence d'une immunosuppression.

## 2. Souches recombinantes et atypiques

Bien que la plupart des souches de *T. gondii* trouvées en Amérique du Nord et en Europe appartiennent à l'un des trois génotypes principaux, de rares isolats qui ne correspondaient pas à ces génotypes ont été isolés. Ils sont classés dans les souches exotiques ou atypiques et contiennent un mélange d'allèles ou des nouveaux allèles entiers sur certains loci (Ajzenberg *et al.* 2002, Howe et Sibley 1995, Sibley et Boothroyd 1992). Globalement, les souches recombinantes (contenant les mélanges des génotypes de 3 populations clonales) représentent moins de 5% des souches totales (Howe et Sibley 1995). Bien que *T. gondii* ait un mode de reproduction sexué, il profite rarement de ce mode de reproduction en terme d'échanges génétiques. D'après le nombre d'allèles trouvés sur les loci multiples (Howe et Sibley 1995), on pourrait avoir plus de 1500 génotypes distincts mais au contraire, il n'y a qu'environ 20 génotypes distincts observés (Sibley et Ajioka 2008). Plusieurs facteurs pourraient jouer un rôle dans ce phénomène. La forte réponse immunitaire de l'hôte ne permet pas l'infection de plusieurs souches de *T. gondii* en même temps (Reikwam et Lorentzen-Styr 1976). Prenant en compte la courte durée de gamétogonie (Dubey *et al.* 1970), il y aurait très peu de chats infectés simultanément avec plusieurs souches de *T. gondii*, diminuant la possibilité d'échanges génétiques. La transmission directe entre les hôtes intermédiaires limite la possibilité d'échange génétique. Ces facteurs permettent à certaines souches de *T. gondii* de se multiplier énormément (Sibley et Ajioka 2008).

En Afrique, on a surtout identifié, chez les quelques cas humains étudiés, des souches issues de recombinaisons entre les génotypes de types I et III (type I/III). Les toxoplasmoses oculaires acquises sont pour la plupart dues à des souches de type I ou de type I/III. Par ailleurs, en Amérique du Sud, les souches atypiques semblent être les plus représentées. Elles ont été isolées à partir de différents animaux de rente (poulet, chat, cheval), de porc au Brésil (Belfort-Neto *et al.* 2007). Récemment, elles ont également été identifiées chez environ 40% des moutons testés aux USA (Dubey *et al.* 2008). Les souches atypiques ont été isolées à partir d'animaux sauvages ; singes-écureuils (Carme *et al.* 2009), loutres en Californie centrale (Miller *et al.* 2004, Conrad *et al.* 2005), jaguar en Guyane française (Demar *et al.* 2008). Chez l'Homme, ces souches ont été isolées lors de cas de toxoplasmose humaine

sévère chez des patients immunocompétents en Guyane (Carme *et al.* 2002) et pendant une épidémie de toxoplasmose au Surinam (Demar *et al.* 2007).

De plus, un cas exceptionnel de réinfection survenue chez une mère séropositive pour la toxoplasmose avant sa grossesse a été décrit récemment en France (Elbez-Rubinstein *et al.* 2009). Elle s'était réinfectée vraisemblablement après la consommation de viande de cheval importée d'Amérique du Sud. La souche isolée à partir du sang du nouveau-né présentait un génotype atypique, peu commun en Europe, qui avait décrit en Amérique du Sud. Cette étude suggère que l'immunité acquise contre des souches européennes de toxoplasme peut ne pas protéger contre la réinfection par des souches atypiques transmises lors de voyages hors de l'Europe ou par la consommation de viande importée. Bien qu'il n'y ait pour l'instant aucun lien bien établi entre les différents génotypes et leur virulence chez l'Homme, ces cas de toxoplasmose sévère chez des patients immunocompétents doivent être considérés avec attention.

### 3. Haplogroupes de *T. gondii*

Les analyses phylogénétiques sur l'ensemble des souches d'Amérique du nord, d'Amérique du sud et d'Europe montrent qu'il y a 11 haplogroupes distincts de *T. gondii* selon le polymorphisme dans les introns (Khan *et al.* 2007, Falush *et al.* 2003). Ces haplogroupes montrent aussi une population clonale de certaines souches de *T. gondii* en Amérique du sud (Sibley et Ajioka 2008). Des analyses sur les génotypes des isolats de *T. gondii* ont montré la présence de deux haplogroupes (Africa 1 et 3) en Afrique dans lesquelles Africa 1 est le plus virulent (Mercier *et al.* 2010).

### 4. Les loci impliqués dans la virulence des souches

La virulence des souches de *T. gondii*, chez la souris, pourrait être associée en partie aux gènes situés sur le chromosome VIIa (Sibley *et al.* 2002, Su *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2006, Hajj *et al.* 2007), VIIb (Saeij *et al.* 2007) et Chr1a (Taylor *et al.* 2006, Khan *et al.* 2006, Khan *et al.* 2007). Certains gènes impliqués dans la virulence de *T. gondii*, ont récemment été identifiés comme par exemple un gène située sur le chromosome VIIa et codant pour la protéine de rhoptrie, ROP18 (Taylor *et al.* 2006, Saeij *et al.* 2006) et un autre gène situé sur la chromosome VIIb et codant la protéine de rhoptrie, ROP16 (Saeij *et al.* 2006, Yamamoto *et al.* 2009, Ong *et al.* 2010). Ces deux protéines ont des activités kinases. Les souches de type I expriment 100 fois plus de ROP18 que les souches de type II et III (Taylor *et al.* 2006, Steinfeldt *et al.* 2010, Fentress *et al.* 2010).

## B. La toxoplasmose

### I. Toxoplasmose humaine

La maladie provoquée par *T. gondii* est appelé toxoplasmose. La pathologie de cette maladie est variable, asymptomatique chez les hôtes immunocompétents et ou très grave chez les hôtes immunodéprimés.

La prévalence de la toxoplasmose est très variable chez l'Homme avec des taux de prévalence variables entre 0 et 90% selon la région géographique du monde, l'âge et l'habitude des hôtes, la méthode de diagnostic et le niveau d'hygiène de l'environnement (Tassi 2007). Par exemple, en Amérique Latine et en Europe Centrale, sa prévalence est plus élevée (entre 50 et 80%) qu'au Royaume-Uni et aux Etats-Unis (entre 16 et 40%) (Tenter *et al.* 2000, Hill et Dubey 2002).

#### 1. La toxoplasmose chez le sujet immunocompétent

La survenue d'une toxoplasmose est cliniquement inapparente dans environ 80% des cas y compris chez la femme enceinte non immunisée vis-à-vis de *T.gondii*. Elle peut se présenter sous différentes formes dont certaines peuvent être sévères.

##### a. La toxoplasmose ganglionnaire

C'est la forme clinique la plus fréquente (15 à 20% des cas) caractérisée par la présence d'adénopathies, le plus souvent localisées dans la région cervicale ou occipitale. Ces symptômes peuvent persister plusieurs mois avant de régresser spontanément sans traitement.

##### b. La toxoplasmose oculaire

Les infections oculaires ont longtemps été considérées comme exceptionnelles chez les sujets immunocompétents. Avant 1950, on pensait que tous les cas de toxoplasmose oculaire étaient dus à la transmission congénitale de *T. gondii*. Les études faites au Brésil ont montré une haute incidence de toxoplasmose oculaire associée à une toxoplasmose acquise (Silveira *et al.*

1988, Glasner *et al.* 1992, Innes 2010). Les atteintes oculaires peuvent être contemporaines ou correspondre à une réactivation locale de kystes résiduels de la primo-infection (Couvreur et Thulliez 1996).

Le fort taux de toxoplasmose oculaire observé au Brésil serait dû à des souches atypiques ou recombinantes (Khan *et al.* 2006)

### c. Toxoplasmose congénitale

La contamination du fœtus a lieu par passage transplacentaire du tachyzoïte lors de la contamination de la mère lors d'une primo-infection. Les risques de transmission du parasite augmentent avec l'avancée de la grossesse, par contre la gravité des atteintes évolue de façon inverse. Les conséquences de l'infection sont variables, allant de la perte fœtale à une atteinte cérébrale sévère ou au contraire à une forme infra clinique. Au cours du premier trimestre de grossesse, l'infection fœtale se produit dans moins de 6% des cas mais conduit dans la majorité des cas à une forme sévère ou à une perte fœtale. A l'inverse au troisième trimestre de grossesse, le passage transplacentaire survient dans 80% des cas et donne généralement une infection infra clinique (Desmonts 1986, Wallon *et al.* 1999)

La prévalence de la toxoplasmose congénitale est de 1 à 10 pour 10 000 naissances aux Etats-Unis (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).

## 2. Toxoplasmose chez les immunodéprimés

La toxoplasmose de l'immunodéprimé concerne deux types de populations : les patients atteints du SIDA et les patients transplantés. Dans la grande majorité des cas, les formes graves de toxoplasmose sont dues à la réactivation d'une infection acquise. Les symptômes sont les mêmes quel que soit l'origine de l'immunodépression.

Des études ont montré 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 traitements efficaces anti-rétroviraux (HAART). 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- $\gamma$  favorise la réversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes qui prolifèrent rapidement dans les astrocytes et la microglie. Cette prolifération aboutit à l'apparition de régions de tissus nécrosés qui peuvent atteindre jusqu'à 4 cm de diamètre (Carruthers 2002). La plupart des personnes ayant une atteinte du cerveau souffre de maux de tête bilatéraux sévères. 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).

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). 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.

## II. Toxoplasmose animale

### 1. Toxoplasmose ovine et caprine

La toxoplasmose est une des causes principales de mortalité foetale et d'avortements chez les ovins. Les travaux de Hartley *et al.* publié en 1954 ont montré pour la première fois l'incidence d'avortement chez la brebis due à la toxoplasmose. Ils ont observé le parasite dans les placentas de brebis ayant avortées et ensuite ont isolé le parasite d'un foetus mort (pour revue Dubey 2008, Innes 2010). Chez le mouton et la chèvre, *T. gondii* est responsable d'avortements et de mortalité néo-natale causant des pertes estimées à 1,25 millions d'agneaux/an en Europe. Chez la brebis, l'ingestion d'au moins 200 sporocystes de *T. gondii* pendant la gestation peut causer une primo-infection (McColgan *et al.* 1988). Dans la phase aiguë, les brebis développent une fièvre qui peut persister jusqu'à j10 post-infection (Mévélec *et al.* 2010). Pendant cette période on peut détecter les tachyzoïtes dans le sang (Dubey and Sharma 1980, Wastling *et al.* 1993). La primo-infection des brebis au cours des 2 premiers mois de la gestation conduit à la mort foetale suivie par une résorption ou à l'avortement. Une mort foetale suivie par la momification des fœtus peut être observée après une infection pendant le troisième mois de la gestation. On peut aussi observer la survie du foetus mais suivie par la mort de l'agneau à proximité du terme, à la naissance ou dans les quelques heures après la naissance. Si la primo-infection de la brebis a lieu pendant le cinquième mois

de la gestation, les agneaux naissent sains et sont immunisés. On observe des manifestations cliniques tout à fait comparables chez les caprins.

## 2. Toxoplasmose chez les autres mammifères

Il existe des rapports contradictoires à propos de la toxoplasmose chez les bovins et les chevaux. Selon certaines études, chez les bovins, on ne peut observer qu'une fièvre modérée et une anorexie dans une infection expérimentale. Les bovins ne manifestent pas de signes cliniques lors d'une infection naturelle (Stalheim *et al.* 1980). Les signes sont plus intenses chez le veau avec une fièvre et une détresse respiratoire (Costa *et al.* 1977). La transmission fœtale chez les bovins n'est pas très importante dans les conditions naturelles car l'isolement de *T. gondii* n'a été obtenu que deux fois, aux Etats Unis et au Portugal (Canada *et al.* 2002). Par ailleurs, aucun kyste n'a pu être détecté chez les bovins. Récemment il a été décrit que les bovins sont résistants à la toxoplasmose et que c'est *Neospora caninum* qui serait majoritairement responsable des avortements chez les bovins (Dubey 2003). Plusieurs études montrent la séroprévalence de l'infection naturelle chez les chevaux mais ils sont assez résistants à la toxoplasmose. Dans les infections expérimentales des chevaux, les signes cliniques sont soit absents soit très discrets (Al- Khalidi 1980, Dubey 1985). C'est *Sarcocystis neurona* qui serait l'agent responsable de l'encéphalomyélite fatale chez les chevaux aux Etats-Unis et non pas *T. gondii* (Dubey *et al.* 2001). Il n'existe aucun cas de toxoplasmose clinique confirmé chez les bovins ou chez les chevaux (Dubey *et al.* 2007). Chez le porc, la toxoplasmose est assez répandue.

## III. Transmission

La voie de prédilection pour la transmission de la toxoplasmose est la voie orale. La toxoplasmose peut être transmise de l'hôte définitif à l'hôte intermédiaire ou inversement. La transmission de la toxoplasmose est aussi possible entre les hôtes définitifs ou entre les hôtes intermédiaires. La toxoplasmose est une zoonose très importante. Un tiers de la population mondiale est infectée par *T. gondii* mais les symptômes de cette maladie ne se développent que chez un petit pourcentage de la population (Henriquez *et al.* 2009). La voie privilégiée de transmission de l'infection à l'Homme passe par la consommation de viandes crues ou peu cuites contenant des kystes (Dubey 2008). Dans une expérience chez l'Homme dans un hôpital à Paris, il a été observé que la viande crue de mouton peut transmettre l'infection à 100% des consommateurs (Desmonts et Couvreur 1965). En plus, la transmission verticale

(transmission transplacentaire) de toxoplasmose est aussi possible (Desmonts et Couvreur 1974). La toxoplasmose par l'ingestion des oocystes sporulés est considérée comme plus grave que celle par l'ingestion des kystes tissulaires. Une autre voie commune d'infection est via l'eau des réserves naturelles contaminée avec les oocystes sporulés (Benenson *et al.* 1982, Bowie *et al.* 1997).

#### IV. La transmission verticale

La transmission verticale a principalement lieu lors d'une primo-infection pendant la grossesse. Elle est aussi possible mais dans de très rares cas pendant la grossesse chez des femmes ayant déjà été en contact avec le parasite.

#### V. Diagnostic

Le diagnostic de la toxoplasmose se base sur les trois objectifs suivants : l'isolement du parasite, l'isolement de l'ADN parasitaire et la mise en évidence des anticorps spécifiques de *T. gondii*. Différentes techniques comme par exemple l'examen microscopique, le bio-essai, la culture cellulaire, les techniques de biologie moléculaire et la sérologie, peuvent être employées pour faire le diagnostic de la toxoplasmose.

##### 1. Bio-essai

Pour isoler les parasites, des inoculations de sang ou de broyat d'organes à tester sont effectuées chez la souris ou le chat (de Godoi *et al.* 2010). C'est une technique de référence pour isoler les toxoplasmes viables. L'infection (témoin de la présence de parasite dans l'échantillon inoculé) ne peut le plus souvent être détecté qu'après 3 à 4 semaines par la mise en évidence des anticorps anti-*T. gondii* et est confirmé par l'observation microscopique des kystes dans les cerveaux. Cette technique donne des résultats tardifs mais elle a une bonne sensibilité et une spécificité de 100%. Elle confirme les résultats obtenus par la biologie moléculaire, donc est complémentaire des résultats de la PCR (Dupuy-Camet *et al.* 1992, Fricker-Hidalgo *et al.* 1998). Un autre avantage du bio-essai est qu'il permet l'isolement des souches pour une caractérisation ultérieure de la souche.

##### 2. Sérologie

La sérologie comprend soit la détection de l'antigène du toxoplasme utilisant l'anticorps spécifique soit la détection de l'anticorps (IgM, IgA, IgG, IgE) en utilisant l'antigène

spécifique. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients. Différentes techniques quantitative et qualitative sont utilisées pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose.

Les techniques quantitatives comme par exemple les réactions immunoenzymatiques (ELISA) ou d'immunochemiluminescence sont employées pour la quantifications des taux d'anticorps IgM, IgA ou IgG. L'immunofluorescence indirecte (IFI) et le test de lyse (dye test) peuvent détecter des IgG avec une grande spécificité et une détection plus précoce qu'en ELISA après une séroconversion. L'IFI ne détecte les IgM que pendant les 2 à 3 premiers mois après l'infection. L'Immunsorbant Agglutination Assay (ISAGA), une technique d'immunocapture, peut aussi détecter des IgM un an après l'infection.

Les méthodes d'immunocapture sont capables de détecter les anticorps IgA et IgE. Leurs cinétiques sont différentes de celles des IgM. Leur apparition est plus précoce (cas des IgE) et d'une durée de détection plus courte de l'ordre de quatre à six mois environ (Decoster *et al.* 1995, Villena *et al.* 1999).

Différentes techniques qualitatives peuvent être utilisées, ce qui permet de dater une infection et de mieux caractériser une réponse immunitaire dans des milieux biologiques différents. Pour distinguer une toxoplasmose récente d'une toxoplasmose chronique, on peut mesurer l'avidité des IgG par une méthode immunoenzymatique. Au cours d'une infection, l'avidité des IgG pour les antigènes augmente. Cette technique est utilisée dans le cas où les techniques quantitatives ne permettent pas de distinguer par exemple la présence d'IgM ou quand les IgG sont présentes à un titre élevé  $> 150$  UI/ml.

### 3. Diagnostic anténatal et postnatal

C'est la détection des anticorps IgM, IgA et IgG qui est utilisée pour le diagnostic anténatal et postnatal. La détection des IgM chez les nouveau nés permet de détecter entre 70% et 80% des cas de toxoplasmose congénitale chez l'Homme (Lebech *et al.* 1999). Les anticorps de classe IgM ou IgA ne traversent pas la barrière placentaire, mais les anticorps de classe IgG peuvent traverser la barrière placentaire. Donc la présence des anticorps IgM ou IgA est le meilleur témoin de l'infection congénitale chez les nouveau-nés. Ces anticorps, doivent être détectés par des techniques ayant une haute sensibilité et basée sur le principe de l'immunocapture. La sensibilité de détection de ces anticorps dépend de la chronicité de l'infection maternelle (Wallon *et al.* 1999a). La sensibilité de détection de l'IgA est supérieure à celle de l'IgM (Robert-Gangneux *et al.* 1999, Bessières *et al.* 2001, Pinon *et al.* 2001).

## VI. Traitements

Plusieurs médicaments sont en cours d'utilisation contre la toxoplasmose. Ils comprennent les inhibiteurs de la déhydrofolate réductase (DHFR) (inhibiteur de la synthèse de l'acide folique comme par exemple la pyriméthamine), les sulfamides (comme par exemple la sulfadiazine, la sulfadoxine). La combinaison des inhibiteurs de l'acide folique et des sulfamides a des effets synergiques et donc est un des meilleurs traitements contre la toxoplasmose. Les effets thérapeutiques des sulfamides ont été décrits pour la première fois en 1941 par Sabin et Warren (Dubey 2008). Quelques années plus tard, le traitement de la toxoplasmose avec la combinaison des sulfamides et de la pyriméthamine commençait (Eyles et Coleman 1953).

Les macrolides (dont la spiramycine, roxithromycine, azithromycine, clarithromycine) qui ont une activité parasitostatique forment un autre groupe de médicaments utilisé contre ce parasite. Seule la spiramycine est utilisée pendant la grossesse dans le cas de toxoplasmose acquise. Une combinaison de médicaments utilisés contre la toxoplasmose cérébrale et oculaire comprend la clindamycine et la pyriméthamine. Tous ces médicaments bloquent la croissance parasitaire de la forme tachyzoïte. Ils ont une meilleure efficacité pendant la phase aiguë de la toxoplasmose et ne traitent pas un individu déjà infecté car ils ont des effets très limités contre la forme kystique du parasite.

La seule molécule active contre les tachyzoïtes et les kystes est l'atovaquone. Les infections oculaires peuvent aussi être traitées avec l'atovaquone et avec des corticostéroïdes pour diminuer l'inflammation oculaire et les dommages tissulaires (Koo et Young 2006, Innes 2010).

## VII. Prévention

Des conditions d'hygiène drastique peuvent être appliquées pour diminuer les risques d'infection chez l'Homme plus particulièrement chez les sujets immunodéprimés et les femmes enceintes séronégatives. Pour cela, il faut bien cuire la viande et laver abondamment les légumes avant de les manger. La consommation de viande après la congélation est une des meilleures méthodes pour détruire les kystes dans la viande (Kijlstra et Jongert 2008). De plus, il faut être extrêmement vigilant lors des changements des litières des chats où sont excrétés les oocystes.

Les mesures pour prévenir la toxoplasmose chez l'animal comprennent la gestion des chats à la ferme, la gestion de la nourriture et de l'eau. La vaccination des brebis et parfois l'utilisation de décoquinate dans la nourriture des animaux, peut aider à réduire le taux d'infection (Buxton 1998, Buxton *et al.* 2007, Buxton *et al.* 2007a). La vaccination des animaux de rente pourrait diminuer l'incidence des avortements chez les animaux. La prévalence diminuée de toxoplasmose chez les animaux pourrait diminuer, ensuite, la transmission de cette maladie à l'Homme.

## VIII. Vaccination

La stratégie vaccinale repose sur le fait qu'une primo-infection induit une immunité protectrice à long terme, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. La vaccination des animaux destinés à la consommation pourrait être une des solutions pour diminuer le risque d'infection humaine.

La plupart des essais de vaccination a été effectué chez la souris, soit avec des extraits parasitaires, des parasites vivants atténués, différentes protéines du parasite, soit par injection des protéines purifiées, ou recombinantes ou de l'ADNc correspondant (pour revue Jongert *et al.* 2009). Les ovins, les porcs et les félins ont été utilisés pour certains essais de vaccination. Les protections obtenues lors des différents essais sont très variables. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations comme par exemple la souche de parasite utilisée dans la vaccination, la voie d'administration du vaccin, la souche et le type de parasite utilisés pour l'épreuve après la vaccination et la voie d'administration. Cependant à ce jour, les vaccins vivants restent les plus efficaces. A l'origine, les premiers vaccins vivants atténués provenaient de souches atténuées naturellement par passage successif en culture (Tableau 1). L'obtention de souches atténuées en supprimant des gènes ciblés, permet actuellement d'obtenir des souches de virulence atténuée, qui ne sont pas susceptibles de retrouver leur virulence d'origine. De nombreuses souches ont ainsi été créées, mais seules quelques unes d'entre elles sont utilisées dans des essais de vaccination.

### 1. Les vaccins vivants de *T. gondii*

Les premiers essais de vaccination effectués chez les moutons avec des parasites tués, ne montraient pas de protection chez les brebis gestantes (Buxton 1993). Par contre, l'injection de parasites vivants comme la souche RH ou la souche vivante incomplète S48, a montré son efficacité aussi bien sur la réduction de la charge parasitaire chez les porcs que sur la

protection contre les avortements chez les brebis (Dubey *et al.* 1991; Buxton 1993). Chez le porc, des adjuvants ont été utilisés pour diminuer la dose de tachyzoïtes vivants injectés. Des vaccinations avec des doses de 1000 tachyzoïtes, injectés en intramusculaire en présence d'oligonucléotides comme adjuvant, ont induit une protection d'environ 50% de l'effectif traité chez les porcs après une épreuve avec les oocystes d'une souche de type-III (VEG) par voie orale (Kringel *et al.* 2004).

#### A S-48

Chez le mouton et la chèvre, le vaccin composé de la souche S48 induit une protection et réduit de 70 à 80% les avortements dans les troupeaux de brebis par rapport à des troupeaux témoins. Ce vaccin est commercialisé (Ovilis, Toxovax, Intervet), il est utilisé dans les pays dans lesquels les risques d'avortement liés au toxoplasme sont grands (Innes & Vermeulen 2006).

Cette souche a été isolée en 1958 à partir des membranes foetales d'un avorton d'agneau et a été atténuée par de multiples passages sous forme de tachyzoïtes sur souris. Cette souche est incomplète car elle n'a pas le pouvoir de former des kystes tissulaires (Buxton 1993). Elle est aussi incapable de produire des oocystes chez le chat (Buxton 1993). Les brebis sont vaccinées à l'âge de 5 mois et doivent être vaccinées au moins 3 semaines avant la reproduction. Aucun parasite viable n'a pu être détecté dans les tissus des brebis vaccinées après 10 jours post-vaccination et jusqu'à 6 mois post-vaccination (Buxton et Innes 1995). Ce vaccin utilisé chez les ovins et les caprins possède cependant plusieurs inconvénients. Il n'empêche pas la transmission verticale du parasite aux agneaux. Il est peu stable, sa durée de vie ne dépassant pas deux à trois semaines. Les animaux récemment vaccinés ne peuvent être consommés à cause d'une possible transmission des tachyzoïtes. De plus, la virulence de cette souche n'est pas bien contrôlée puisque c'est une souche naturelle et le risque de réversion vers une forme plus virulente existe.

#### B T-263

La vaccination des chats pour éliminer ou diminuer l'émission des oocystes dans les fécès des chats est une mesure qui ne protège pas l'animal mais diminue la biomasse parasitaire dans l'environnement. Mais pour avoir une efficacité, ce type de vaccination devrait être fait à une grande échelle chez tous les chats avant que ne surviennent la contamination naturelle. Tous les chats vaccinés avec des kystes ou des bradyzoïtes de la souche T-263 par voie orale, sont séroconvertis (Freyre *et al.* 1993). On n'observe aucune forme parasitaire dans les fécès

après la contamination de ces chats vaccinés. Même les chats vaccinés avec les tachyzoïtes de la souche T-263 administré par voie intra-duodénale, sont séroconvertis mais la suppression de la sécrétion d’oocystes n’est pas totale après une infection d’épreuve. Même si la vaccination des chats avec ce vaccin est efficace, la vaccination de toute la population de félinés (chats sauvages compris) est nécessaire si l’on veut enrayer la dissémination du parasite dans l’environnement.

#### C Mic1-3KO:

La souche Mic1-3KO a été obtenue par délétion des gènes *Mic1* et *Mic3* codant les protéines micronèmes1 et 3, à partir de la souche virulente RH (Cérède *et al.* 2005). Ces protéines sont responsable de l’attachement des parasites aux cellules hôtes pendant l’invasion (Fourmaux *et al.* 1996, Fourmaux *et al.* 1996a, Garcia-Réguet *et al.* 2000). *In vitro*, il a été montré que la capacité d’invasion cellulaire de cette souche délétée était diminuée par rapport à la souche sauvage, ce qui a été corrélé par l’observation d’une diminution de la virulence chez la souris (Cérède *et al.* 2005). De plus, il a été mis en évidence que la vaccination par la souche Mic1-3KO confère une protection contre la toxoplasmose congénitale et chronique après une épreuve par ingestion orale de kystes, et ce chez la souris (Ismael *et al.* 2006) et chez le mouton (Mévélec *et al.* 2010). Elle protège également dans un modèle murin contre une infection par *Neospora caninum*, un parasite protozoaire intracellulaire proche de *T. gondii* (Penarete-Vargas *et al.* 2010).

La réponse protectrice chez les souris vaccinées par Mic1-3KO est principalement de type Th1. Cette réponse est néanmoins contrôlée contrairement à la souche sauvage dont elle dérive puisque la production des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont réduites vis-à-vis de la souche sauvage RH (Moiré *et al.* 2009). Chez la souris, la dissémination parasitaire de la souche Mic1-3KO est retardée par rapport à celle de la souche sauvage, et si la souche vaccinale persiste au niveau du cerveau, c’est en très faible quantité. De plus, les kystes ne seraient pas infectieux après ingestion dans ces conditions expérimentales (Moiré *et al.* 2009).

## 2. Les vaccins vivants comme modèle d'étude de la réponse immune protectrice

### a. Ts4

Ts4 a été obtenue par mutation chimique à partir de la souche RH (Pfefferkorn et Pfefferkorn 1976). Elle a pour caractéristique de se multiplier seulement à faible température (33°C). Les essais de vaccination avec cette souche ont montré une protection contre la formation de kystes et une protection partielle contre la toxoplasmose congénitale en modèle murin (McLeod *et al.* 1988).

L'utilisation de cette souche a permis de jeter les bases des mécanismes de protection induits par la vaccination et en particulier le rôle protecteur des lymphocytes CD4 et CD8 et de la production de l'IFN $\gamma$  (Gazinelli *et al.* 1991).

### b. Cps-1:

La voie de synthèse de novo des pyrimidines et en particulier l'enzyme carbamoyl phosphate synthetase I est indispensable pour la virulence de *T. gondii*. Les tachyzoïtes d'une souche mutée pour la carbamoyl phosphate synthetase I (souche cps-1, auxotrophe pour l'uracile), sont complètement avirulents chez les souris IFN $\gamma$  KO aussi bien que chez les souris Balb/c immunocompétentes. Une seule injection des parasites cps-1 induit une immunité protectrice à long terme chez les souris Balb/c (Fox et Bzik 2002). Les souris C57BL/6 sont génétiquement plus sensibles à la toxoplasmose mais après la vaccination avec cps-1, ces souris ne meurent pas après une infection d'épreuve avec des parasites de type I (Gigley *et al.* 2009a) ou de type-II (Gigley *et al.* 2009), quelque soit la voie d'infection de l'épreuve (Gigley *et al.* 2009). Cette souche a été et est abondamment utilisée pour étudier les mécanismes de protection induits par la vaccination (Tait *et al.* 2010, Gigley *et al.* 2009 et 2009a, Jordan *et al.* 2009). Les études effectuées avec cette souche modèle vivante mais non répliquative ont permis des avancées dans la compréhension des mécanismes de défense inné et acquis et en particulier le rôle des lymphocytes CD8 effecteurs au niveau local et périphérique.

Cette souche a cependant montré un taux de reversion non négligeable vers la forme sauvage et une nouvelle souche a été créée récemment (Fox et Bzik 2010). Cette nouvelle souche est déletée d'un gène codant pour l'uridine phosphorylase (UP), faisant partie de la voie de sauvetage de la pyrimidine, et d'un gène codant une enzyme de la voie de synthèse des pyrimidines (l'orotidine-5-monophosphate décarboxylase ou OMPDC). Cette souche présente

les mêmes caractéristiques en terme de virulence que cps-1 et protège d'une épreuve avec une souche de type I RH.

Tableau 1: Les essais de vaccinations avec des parasites vivants d'après Jongert *et al.* 2009

<b>Vaccins vivants</b>	<b>Voie d'injection</b>	<b>Point final de la protection/négatif control groupe (en %)</b>	<b>Hôte</b>	<b>souche d'épreuve <i>T. gondii</i></b>
Tachyzoïtes vivants de S48 (une souche ne formant pas de bradyzoïtes)	Intra-musculaire (im)	72-80/17 agneaux viables, Environ 66 % d'agneaux étaient infectés	Brebis	Oocystes, par voie orale
tachyzoïtes ts4 souche vivante atténuée thermosensible	Sous-cutanée	19++/0 survie 1/25 fœtus étaient infectés avec TS-4 pendant la gestation	Singes ( <i>Aotus</i> sps.)	T265, T163
Bradyzoïtes vivants de T263 (une souche ne formant pas d'oocystes)	Orale	84 chats étaient protégées de l'excrétion d'oocystes	Chat	T265, orale
Tachyzoïtes de RH	IFA + CpG, im	52/0 <i>Toxoplasma</i> free	Porc	VEG (III) oocystes, orale
Tachyzoïtes de RH	PLG microsphères, intranasale	Pas de protection	Brebis	M3 oocystes, orale

## C. Réponse immunitaire

La toxoplasmose stimule la réponse immunitaire de ses hôtes au niveau local ainsi qu'au niveau systémique. La réponse immunitaire de l'hôte comprend la réponse cellulaire et la réponse humorale. Les deux réponses jouent chacune leur rôle pour protéger les hôtes contre la toxoplasmose (Suzuki *et al.* 1988, Hakim *et al.* 1991, Dubey 2008). Des travaux de transfert de sérums immuns ou de cellules ont montré que la réponse cellulaire jouait un rôle primordial dans les mécanismes effecteurs de la résistance à *T. gondii* même si au niveau local les IgA ont un rôle important dans la limitation de l'invasion des cellules épithéliales par les parasites (pour revue, Denkers et Gazzinelli 1998).

### I. Réponse humorale

Les souris C57BL/6 déficientes en cellules B ( $\mu$ MT) meurent à 3-4 semaines après infection par voie orale d'une surcharge parasitaire cérébrale, par rapport aux souris témoins et de lésions cérébrales importantes contenant des tachyzoïtes. Les souris  $\mu$ MT n'ont pas d'IgG anti-*T. gondii* dans leurs sérums mais présentent un taux comparable d'ARNm pour l'IFN $\gamma$ , l'IL10 et l'iNOs que les souris témoin. Un sérum polyclonal de lapin anti-*T. gondii* empêche la mort prématurée de ces souris et la formation de lésions suggérant que les anticorps sont capables de limiter l'infection par les tachyzoïtes (Kang *et al.* 2000). Ces mêmes souris  $\mu$ MT vaccinées avec la souche atténuée ts4 meurent après une épreuve avec des tachyzoïtes virulents RH de type I. Cependant l'injection d'un sérum d'une souris immune à ces souris, prolonge leur survie. Dans ces conditions les anticorps spécifiques sont nécessaires pour la protection des souris vaccinées (Sayles *et al.* 2000).

Les différents types d'anticorps produits après infection (IgM, IgA) ont aussi un rôle important dans la protection.

L'IgM est produit dans la phase aiguë de la toxoplasmose. Les IgM spécifiques de *T. gondii* inhibent l'invasion cellulaire par les tachyzoïtes et diminuent la dissémination parasitaire dans la phase aiguë de la toxoplasmose. Les parasites disséminent rapidement dans les souris IgM<sup>-/-</sup>

(Couper *et al.* 2005). Les anticorps IgA protègent au niveau muqueux. Les IgA purifiés à partir de sérums de femmes ayant une toxoplasmose aiguë diminuent de 50 à 75% l'invasion des entérocytes par les tachyzoïtes (Mack et McLeod 1992) *in vitro*.

Les anticorps de type IgA sécrétoires sont trouvés au niveau intestinal chez des souris infectées par voie orale par une souche de type II (Chardès et Bout 1993).

## II. Réponse cellulaire

Il y a deux types de réponses cellulaires : la réponse innée et adaptative.

### 1. Réponse immune innée

Les cellules qui répondent immédiatement contre les parasites produisent une réponse innée. Dans une infection par voie orale, la première barrière à traverser est celle des cellules épithéliales intestinales. Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes libérés dans la lumière intestinale entrent en contact avec les entérocytes les envahissent par un processus d'invasion active. Pendant la pénétration, les cellules épithéliales sont activées et produisent des cytokines pro-inflammatoires et d'autres molécules comme les défensines. Une fois à l'intérieur d'une cellule hôte, le parasite commence sa multiplication. Ensuite les parasites arrivent dans la lamina propria (LP). Les neutrophiles, monocytes et cellules NK (Natural Killer) sont les premières à arriver au site d'entrée en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes intra épithéliaux (LIE) présents dans la LP jouent également un rôle dans la réponse au parasite. Chez la souris, les PRR (Pathogen Recognition Receptors) comme le TLR11 et le CCR5 identifient les antigènes parasitaires respectivement la profiline (Yarovinsky *et al.* 2005) et la cyclophiline (Aliberti 2005). L'interaction des PRR avec ces protéines parasitaires induit la production d'IL12 par les CD. Ces cellules sont les producteurs principaux de l'IL-12 dans l'infection à *T.gondii* (Liu *et al.* 2006). Cependant, plusieurs populations cellulaires sont impliquées dans la production d'IL-12 comme les neutrophiles (Bliss *et al.* 1999, Bliss *et al.* 1999a) et les macrophages (eSousa *et al.* 1997, eSousa *et al.* 1999). L'IL-12 induit ensuite la production de l'IFN $\gamma$  par les cellules NK, NKT et les cellules de la réponse immune adaptative (lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) (Kim *et al.* 2006).

a. Monocytes :

Les monocytes inflammatoires sont rapidement recrutés dans la cavité péritonéale des souris infectées avec soit la souche de type II soit la souche de type I (Mordue et Sibley 2003). Ces monocytes recrutés expriment les marqueurs CD11b, F4/80, CD68, CD115 et Gr1 (Ly-6C) (Dunay et Sibley 2010). Ils n'expriment pas CD11c (Mordue et Sibley 2003). Ces monocytes inflammatoires jouent un rôle important dans le contrôle de la multiplication parasitaire au niveau local. Ils produisent de l'IL-12, du TNF $\alpha$ , (Mordue et Sibley 2003). Ces cellules sont capables de réduire la multiplication des tachyzoïtes *in vitro* par la production d'oxyde nitrique (NO) (Mordue et Sibley 2003). Le recrutement des monocytes dépend de l'induction de la chimiokine MCP-1 (CCL2) et de son récepteur CCR2. Chez les souris MCP-1<sup>-/-</sup> ou CCR2<sup>-/-</sup> qui sont déficientes pour le recrutement des monocytes Gr1<sup>+</sup> (Robben *et al.* 2005) la multiplication parasitaire n'est pas contrôlée. Les souris meurent en absence de recrutement des monocytes au site d'infection en dépit de l'induction d'une réponse forte de type Th1 et de la production de fortes quantités d'IL-12, de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  (Robben *et al.* 2005). De même, l'infection par voie orale de souris CCR2<sup>-/-</sup> et MCP1<sup>-/-</sup> résulte en une multiplication incontrôlée des parasites, une nécrose des tissus et la mort rapide des souris (Dunay *et al.* 2010).

b. Neutrophiles :

Les neutrophiles font partie des premières populations cellulaires recrutées après infection par voie intra péritonéale des souris. Ces cellules sont IL12<sup>+</sup> et leur recrutement dépend des récepteurs aux chimiokines CXCR2 (Del Rio *et al.* 2001) et CCR1 (Khan *et al.* 2001). Chez les souris CXCR2<sup>-/-</sup>, le recrutement des neutrophiles au site d'infection n'a pas lieu et en absence de recrutement la production des cytokines de type Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) est énormément diminuée pendant la toxoplasmose aiguë. De plus, la charge parasitaire cérébrale augmente également (Del Rio *et al.* 2001). Le recrutement des neutrophiles est aussi déficient chez les souris CCR1<sup>-/-</sup>. Ces souris sont plus sensibles à l'infection à *T. gondii* et montrent une mortalité augmentée après une infection par voie orale avec des kystes (Khan *et al.* 2001).

La déplétion des neutrophiles avec un anticorps monoclonal anti-Gr-1<sup>+</sup> avait montré une augmentation de la susceptibilité des souris à la toxoplasmose aiguë mais pas chronique (Bliss *et al.* 2001). Dans ces expériences l'anticorps anti-GR1 utilisé reconnaissait également les monocytes inflammatoires GR1<sup>+</sup>. Dans des études très récentes, utilisant des anticorps

spécifiques de chaque population, il a été montré que le rôle le plus important dans la toxoplasmose aiguë, après une infection par voie intra péritonéale, pour le contrôle de la multiplication des parasites est effectivement celui des monocytes inflammatoires et non pas des neutrophiles (Dunay et Sibley 2010, Dunay *et al.* 2010).

La signalisation entre l'IL-17 et son récepteur IL-17R est importante pour le recrutement des cellules polynucléaires au site d'infection pendant la phase aiguë. Les souris IL-17R<sup>-/-</sup> infectées par voie orale avec des kystes développent une immunité adaptative normale pendant la phase aiguë mais meurent rapidement en fin de phase aiguë. Chez les souris IL17R<sup>-/-</sup>, l'influx des PMN est inhibé au niveau du foie et des intestins après infection par voie orale. De même l'injection en ip de fortes doses de tachyzoïtes RH induit un recrutement plus faible de neutrophiles que chez les souris de souche sauvage (Kelly *et al.* 2005).

c. Cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques (CD) sont les principales productrices de l'IL-12 pendant la toxoplasmose (Scott et Hunter 2002). Les souris produisent moins d'IL-12 et deviennent sensibles à la toxoplasmose aiguë après la déplétion des cellules dendritiques (Liu *et al.* 2006). Le transfert de CD de souris sauvages aux souris déplétées en CD, restaurent la production d'IL-12 et l'IFN $\gamma$  et augmente la résistance contre l'infection dans ces dernières. *In vitro*, les souches de type II de *T. gondii* induisent une production plus importante d'IL-12 après infection de macrophages de souris que les souches de type I (Robben *et al.* 2004). Cependant, les différences de virulence entre type I et II ne peuvent s'expliquer par cette seule différence de production d'IL12 puisqu'en dépit d'une production plus faible d'IL12, le taux d'IFN $\gamma$  chez des souris infectées par des souches de type I est élevé et serait impliqué dans la mortalité des souris (Mordue *et al.* 2001). Les travaux de Tait *et al.* (2010) montrent que la différence de virulence entre les souches de type I et II serait due à un défaut de recrutement des CD au site d'infection et dans les ganglions drainants ce qui a pour conséquence une diminution du nombre de CD8<sup>+</sup> spécifique d'antigène. L'infection de souris avec des souches de type I et II exprimant l'ovalbumine (OVA) induit un fort recrutement de CD au site d'infection et dans le ganglion drainant pour les type II contrairement aux souris infectées par les souches de type I (Tait *et al.* 2010). Ces CD activent les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène OVA. Dans ce modèle, la déplétion des CD avant l'infection avec la souche de type II a pour effet de ne pas induire de T CD8<sup>+</sup> activées résultant en une charge parasitaire plus importante. Au contraire, l'injection d'IL12 chez les souris infectées avec la souche de type I

provoque une faible augmentation de CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène. Les CD ont également un rôle important dans la dissémination du parasite dans les tissus de l'hôte. Les cellules dendritiques sont préférentiellement infectées par *T. gondii* par rapport aux autres types de cellules sanguines (Channon *et al.* 2000) et transportent les parasites jusqu'au cerveau de la souris infectée. *T. gondii* induit également une hypermotilité des CD. La migration des CD induite par les souches de type II et type III de *T. gondii* est plus forte que celle induite par une souche de type I (Lambert *et al.* 2009). Le transfert de CD infectées dans des souris consanguines induit une dissémination rapide du parasite et augmente la gravité de l'infection (Lambert *et al.* 2006). *T. gondii* peut détourner les leucocytes migratoires, moduler les propriétés migratoires des cellules infectées et peut se diffuser entre les populations leucocytaires via la lyse des leucocytes infectés. Ces mécanismes utilisés par le parasite assurent sa survie dans son hôte et en même temps limitent la pathologie induite par la destruction des tissus de l'hôte (Lambert et Barragan 2010).

d. Les cellules T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) :

Les cellules T gamma-delta ( $\gamma\delta$  T) sont une des premières populations cellulaires à participer à la réponse immune contre l'invasion parasitaire par la voie intestinale. Elles sont trouvées en grand nombre dans les sites épithéliaux et font un lien entre la réponse immune innée et la réponse immune adaptative. Le nombre des cellules T $\gamma\delta$  augmente beaucoup chez les souris infectées avec *T. gondii*. Leur mode d'action exact n'est pas connu, mais une diminution de la production de NO a été rapportée après la déplétion des cellules T  $\gamma\delta$  (Hisaeda *et al.* 1996). Le NO ne tue pas *T. gondii* directement mais induit une augmentation de la conversion de tachyzoïte en bradyzoïte en inhibant la respiration mitochondriale (Bohne *et al.* 1994).

e. Cellules NK :

Les cellules NK tuent les cellules infectées et produisent de l'IFN $\gamma$  très précocement après l'infection (pour revue, Denkers *et al.* 2004). L'IL12 joue un rôle majeur dans la régulation de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK. Les cellules NK migrent dans les tissus lymphoïdes locaux où ils produisent de l'IFN $\gamma$  qui stimule les macrophages et provoque l'augmentation de l'expression des molécules du MHC de classe-II (Khan *et al.* 2006a). Les récepteurs CCR5 sont impliqués dans la migration et le recrutement des cellules NK au site d'infection. Les souris CCR5KO ont moins de cellules NK recrutées aux sites d'infection (Khan *et al.* 2006a) et ont une charge parasitaire augmentée avec une réponse inflammatoire moins forte que les souris sauvages témoin. Les souris CCR5KO produisent moins d'IFN $\gamma$  et deviennent plus

sensibles à *T. gondii* mais moins sensibles à l'immunopathologie de l'infection. Le transfert de cellules NK CCR5<sup>+/+</sup> dans les souris CCR5KO protège les souris CCR5KO contre une épreuve létale de *T. gondii* (Khan *et al.* 2006a).

L'interaction entre les cellules NK et les CD augmente la production de l'IFN $\gamma$  par les cellules NK et celui de l'IL-12 par les CD (Guan *et al.* 2007). Les récepteurs NKG2D des cellules NK jouent un rôle important dans l'interaction entre les cellules NK et les CD. L'expression des récepteurs NKG2D est augmentée après l'infection des cellules NK et des anticorps bloquant les récepteurs NKG2D diminuent la production d'IFN $\gamma$  (Guan *et al.* 2007). Les cellules NK sont impliquées dans le développement et l'éducation des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. L'anticorps anti-NKG2D diminue le développement des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et donc diminue la réponse cellulaire adaptative contre *T. gondii* (Guan *et al.* 2007). Chez les souris CD4KO, ce sont les cellules NK qui aident au développement de la réponse cytotoxique en induisant les cellules T CD8<sup>+</sup> (Combe *et al.* 2005).

## 2. Réponse immune adaptative

Les lymphocytes produisent une réponse cellulaire adaptative. Ces cellules ont besoin d'un temps de «priming» pour réagir contre les pathogènes. Une fois stimulées, ces cellules gardent la mémoire contre le pathogène. Lors d'une infection ultérieure avec le même pathogène, elles répondent rapidement pour éliminer le pathogène le plus tôt possible. L'infection par *T. gondii* induit une forte réponse cellulaire caractérisée par une activation des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et une réponse de type Th1. Le contrôle de la toxoplasmose aussi bien en phase aiguë que chronique dépend principalement de la production d'IFN $\gamma$ . Le rôle des cellules CD8<sup>+</sup> est primordial dans la résistance à l'infection.

### a. Lymphocytes

Les deux types de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont nécessaires pour le développement et le maintien d'une réponse protectrice contre la toxoplasmose (Gazzinelli *et al.* 1991). Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> jouent un rôle important dans la régulation de la réponse alors que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont les effecteurs majeurs contre le parasite.

#### a. Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> :

Les cellules CD8<sup>+</sup> produisent l'IFN $\gamma$  et sont les effecteurs majeurs de la protection contre la toxoplasmose (Gazzinelli *et al.* 1991). La protection dans la phase aiguë et la phase chronique

de la toxoplasmose est due à la production de l'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (Suzuki *et al.* 1988, Suzuki et Remington 1988, Suzuki et Remington 1990). Le rôle des cellules T CD8<sup>+</sup> est aussi primordial dans la survie à long terme et la réponse mémoire (Denkers *et al.* 1993a et 1993b, Khan *et al.* 1996, Khan *et al.* 1999). La production de l'IFN $\gamma$  et la cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> limitent la réactivation des kystes tissulaires (Suzuki *et al.* 1990, Suzuki et Remington 1990) dans la phase chronique de la toxoplasmose (Brown et McLeod 1990). Le transfert passif des cellules T CD8<sup>+</sup> de souris immunisées à des souris immunodéprimées prévient la réactivation de *T. gondii* dans les souris chroniquement infectées (Khan *et al.* 1999, Khan *et al.* 1994).

La première étape importante de l'activation des CD8<sup>+</sup> est l'interaction de ces cellules avec les CPA et la reconnaissance d'un peptide présenté par les molécules de classe I du CMH. Récemment, plusieurs antigènes spécifiques de *T. gondii* ont été identifiés comme contenant des épitopes dominants reconnus après infection. Parmi eux des peptides provenant des protéines de granules denses GRA4 et GRA6, de roptrie ROP7 et d'une protéine sécrétée Tgd057 ont été caractérisés (pour revue Jordan et Hunter 2010).

Des travaux récents effectués avec la souche avirulente *cps1* ont permis d'étudier le mécanisme de protection mis en place après vaccination et de mieux caractériser les populations et sous populations CD8<sup>+</sup> impliquées dans la réponse protectrice. Ces travaux montrent que la vaccination avec cette souche non virulente, non répliquative et non persistante induit une réponse protectrice CD8<sup>+</sup> à long terme après une infection d'épreuve avec des souches de type I (Bzik and Fox 2002) et II (Gigley *et al.* 2009). La réponse protectrice est dépendante de l'IL12 et de l'IFN $\gamma$  bien que la production systémique d'IFN $\gamma$  ne soit pas nécessaire à la mise en place de la réponse et que seule la production au niveau local (péritonéal) soit suffisante. L'IL-12 dans ce système est nécessaire au développement des populations CD8 effectrices cytotoxiques (CTL) (Wilson *et al.* 2008) et des CD8<sup>+</sup> mémoire (Wilson *et al.* 2009). La vaccination avec *cps1* induit l'expansion de 3 sous populations de CD8<sup>+</sup> effectrices au niveau local (péritoine) et au niveau systémique (rate) (Wilson *et al.* 2008, Jordan *et al.* 2009). Ces sous populations sont différenciées par l'expression de marqueurs spécifiques en particulier l'expression plus ou moins forte de CD62L, de KLRG1 (killer-like lectin receptor G1) et de CD127. Ces marqueurs ont été utilisés dans différents modèles d'infection et permettent de discriminer les sous populations naïves, effectrices et mémoires. Classiquement, lors d'une infection après activation les CD8 naïves prolifèrent et

se différencient en une population hétérogène composée de cellules effectrices différenciées appelées SLEC (short-lived effector cells) et de cellules précurseurs des cellules « mémoire » appelées MPEC (memory precursor cells). Après cette expansion initiale et cette différenciation, le «pool» de cellules activées se réduit par apoptose ne laissant subsister qu'une sous population de MPEC. CD62L est un marqueur lié à l'activation des T et KLRG1 à la différenciation terminale en CTL. Les 3 populations induites après vaccination sont CD62L<sup>lo</sup>KPRG1<sup>-</sup>, CD62L<sup>lo</sup>KPRG1<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup>KPRG1<sup>+</sup>. Ces 3 populations expriment toutes le CD44 (marqueur d'activation spécifique d'antigène) et des niveaux variés de granzyme B (lié à l'activité cytotoxique) et d'IFN $\gamma$ . Classiquement, les cellules CD62L<sup>lo</sup> KLRG1<sup>+</sup> sont des SLEC, les CD62L<sup>hi</sup> sont des précurseurs des cellules T mémoire central (TCM).

#### b. Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Plusieurs populations des cellules T CD4<sup>+</sup> existent dont les cellules Th (Helper T Cells) et Treg. Entre les cellules Th, plusieurs sous populations ont été identifiées qui sont les Th1, Th2, Th17 (Zenewicz *et al.* 2009) (Fig. 4). Globalement, la réponse induite par *T. gondii* est du type Th1.

#### Cellules de type Th1

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> résidents de la lamina propria :

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> résidents de la lamina propria sont les premiers à participer à la réponse adaptative dans l'infection orale à *T. gondii*. Ils sont stimulés par l'IL-12 produite par les CPA. Selon la souche de souris infectée, on peut observer des différences dans la réponse de type Th1 induite (McLeod *et al.* 1984). Les souris C57BL/6 (naturellement sensibles à la toxoplasmose) meurent d'une iléite après une infection orale avec une dose supérieure à 10 kystes. La mortalité chez les souris C57BL/6 due à la surproduction des cytokines de type Th1 a lieu une dizaine de jours post infection. Les souris développent une nécrose massive des villosités intestinales et des cellules des muqueuses intestinales. Les souris qui sont naturellement résistantes à la toxoplasmose (CBA/J, Balb/c), ne développent pas l'iléite en dépit de la multiplication parasitaire dans les intestins (Liesenfeld *et al.* 1996). En utilisant des souris déficientes en cellules T CD4, T CD8, T $\alpha\beta$  ou T $\gamma\delta$ , Liesenfeld *et al.* (1996 et 1997) ont identifié les cellules T CD4<sup>+</sup> $\alpha\beta$ <sup>+</sup> comme responsables de la nécrose. Cette pathologie est accompagnée d'une augmentation du pourcentage de CD4<sup>+</sup> dans la lamina propria mais pas

dans l'épithélium à J7 post infection (Liesenfeld *et al.* 1999, Mennechet *et al.* 2002). Dans les souris C57BL/6, les cellules CD4<sup>+</sup> de la lamina propria produisent des cytokines inflammatoires très importantes (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), et l'enzyme inductible (NO synthase) (Liesenfeld *et al.* 1996, Khan *et al.* 1997). La surproduction de toutes ces molécules est impliquée dans la nécrose intestinale. Les souris ne développent pas de nécrose si elles sont traitées avec des anticorps neutralisants l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , ou avec l'aminoguanidine (un inhibiteur d'iNOS) (Liesenfeld *et al.* 1996). De même les souris IFN $\gamma$  KO ne développent pas d'iléite mais succombent suite à une parasitémie trop importante (Liesenfeld *et al.* 1999). Les souris déficientes en iNOs ne développent pas non plus de nécrose intestinale, indiquant le rôle critique du NO dans la pathologie intestinale des souris infectées (Khan *et al.* 1997). La co-culture des CD4<sup>+</sup> isolées de la LP de souris infectées avec des cellules épithéliales (primaires ou provenant de lignées) augmente la production de plusieurs chimiokines inflammatoires (Mennechet *et al.* 2002). Ces cytokines et chimiokines inflammatoires provoquent le développement d'une iléite aiguë et létale (Mennechet *et al.* 2002). Le développement de l'iléite est accompagné d'une diminution de cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> régulatrices dans de nombreux compartiments dont la LP (Oldenhove *et al.* 2009).

#### Cellules CD4<sup>+</sup> Th1

Chez la souris les deux populations CD4 et CD8 ont un rôle protecteur dans la toxoplasmose aiguë et chronique. La déplétion avec des anti-CD4 ou CD8 pendant la phase chronique avec la souche ME49 résulte dans la réactivation partielle de la toxoplasmose (Gazinelli *et al.* 1992). Cependant, des études de transfert de cellules dans des souris "nude" montrent le rôle primordial des cellules CD8<sup>+</sup> dans le contrôle du parasite et la survie des souris. Les CD4<sup>+</sup> auraient plus un rôle helper et dans certaines circonstances ils sont impliqués dans l'immunopathologie induite comme par exemple dans la toxoplasmose oculaire ou encore l'iléite induite chez les C57BL/6.

Les cellules CD4<sup>+</sup> ne jouent pas de rôle dans la réponse secondaire après la vaccination. En effet, chez des souris vaccinées avec les souches atténuées ts4 (Gazzinelli *et al.* 2001) ou cps1 (Gigley *et al.* 2009, Jordan *et al.* 2009) la déplétion avec un anti-CD4 avant l'infection d'épreuve n'a pas d'effet sur la protection. Par contre, si la déplétion a lieu pendant la vaccination, elle inhibe la mise en place de la réponse protectrice (Gazzinelli *et al.* 2001, Jordan *et al.* 2009). Des résultats similaires étaient obtenus par Denkers *et al.* (1996) qui montrent que la réponse T CD8<sup>+</sup> reste partielle en absence des cellules T CD4<sup>+</sup>. Donc pour

une réponse complète, les cellules CD4<sup>+</sup> sont nécessaires (Denkers *et al.* 1996). Après vaccination avec la souche cps1 exprimant OVA, la déplétion des CD4<sup>+</sup> induit la diminution du nombre de CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène en particulier les cellules KLRG1<sup>+</sup> qui représentent les cellules CD8<sup>+</sup> effectrices. Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont également nécessaires pour l'activité cytotoxique et l'activité fonctionnelle optimale des cellules T CD8<sup>+</sup> cérébraux spécifiques d'antigène, et ceci dans la phase aiguë aussi bien que dans la phase chronique (Lütjen *et al.* 2006).

Le rôle des CD4 serait également important pour le maintien de la réponse cytotoxique des CD8<sup>+</sup>. Bien que les souris déficientes en cellules CD4<sup>+</sup> aient un taux normal de cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxique, et d'IFN $\gamma$ , la fréquence des CTL CD8<sup>+</sup> de ces souris CD4<sup>-/-</sup>, diminue significativement après 180 jours d'infection (Casciotti *et al.* 2002). De plus ces souris recevant une infection d'épreuve 180 jours après la primo-infection meurent alors que quand l'épreuve a lieu 90 jours après la primo-infection, elles survivent.

Le rôle des CD4<sup>+</sup> semble donc important dans la mise en place de la réponse effectrice CD8<sup>+</sup> et aussi dans le maintien de cette réponse. La production d'IL2 par les CD4 a été montrée comme l'un des facteurs essentiels pour l'induction de la réponse CD8 effectrice. La cytokine IL-2 a un rôle très important dans la protection des souris dans la toxoplasmose aiguë. Les souris C57BL/6 IL2KO sont hautement sensibles et meurent après une infection sublétales avec une souche de type II de *T. gondii*. La mortalité de ces souris IL-2KO est accompagnée d'une diminution de l'IFN $\gamma$  sérique et une parasitémie plus forte que dans les souris témoins. Bien que la production d'IL-12 soit normale chez ces souris IL-2KO, l'ajout d'IL-2 seul ou combiné avec IL-12 ne restaure pas la synthèse de l'IFN $\gamma$  par les splénocytes. C'est l'incapacité de ces souris à produire de l'IFN $\gamma$  due à l'absence de l'IL-2 qui est derrière cette haute sensibilité (Villegas *et al.* 2002). *In vitro*, il a été montré que seules les CD4<sup>+</sup> et pas les CD8<sup>+</sup> de souris vaccinées par ts4 produisaient de l'IL2. La production d'IL-2 par ces cellules CD4<sup>+</sup> serait nécessaire pour l'induction de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD8<sup>+</sup>, ce qui a été établi dans des essais de déplétion et la vaccination par Gazzinelli *et al.* (1991). Un autre rôle majeur de l'IL2 a été montré récemment, par Oldenhove *et al.* (2009) qui ont montré qu'une diminution de la production d'IL-2 entraînait une diminution significative du nombre des cellules Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) chez les souris C57BL/6 souffrant d'iléite. La conséquence de cette chute du nombre de Treg étant la mort quelques jours plus tard des souris.

Les cellules CD4<sup>+</sup> seraient également les principales cellules productrices de cytokines régulatrices comme l'IL10.

La déplétion de cellules T CD4<sup>+</sup> utilisant l'Ac anti-CD4 ou la délétion de CMH-II dans les souris C57BL/6 n'induit pas de nécrose après infection (Liesenfeld *et al.* 1996). De plus, des souris IL-10KO meurent d'une iléite après une infection orale avec une dose subléthale de la souche ME49 de type-II de *T. gondii*. Les souris IL-10KO souffrent également d'une inflammation sévère cérébrale létale avec le développement de nombreux foyers de nécrose ainsi que des infiltrats péri vasculaires (Wilson *et al.* 2005). Les injections des anticorps anti-CD4, anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-12 prolongent la survie de ces souris IL-10KO, montrant le rôle régulateur important de l'IL-10 dans la toxoplasmose (Gazzinelli *et al.* 1996, Suzuki *et al.* 2000a). Diverses études ont montré que les cellules CD4<sup>+</sup> pourraient être les sources majeures de l'IL10 dans la toxoplasmose. Une délétion spécifique du gène codant pour l'IL10 dans les cellules CD4 est suffisante pour entraîner une susceptibilité à la toxoplasmose induite par voie orale. Les travaux de Jankovic *et al.* (2007) montrent que ce sont les cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> qui produisent l'IL10. De plus, ces mêmes cellules produisent également l'IFN $\gamma$  ce qui implique que ces deux cytokines antagonistes sont produites par la même cellule.

Les cellules CD4<sup>+</sup> ont aussi un rôle dans la réponse humorale contre la toxoplasmose. Les souris CD4KO sont moins résistantes contre la toxoplasmose par rapport aux souris sauvages. Les souris déficientes des cellules CD4<sup>+</sup> ont une charge parasitaire cérébrale plus élevée et vivent moins longtemps que les souris témoins sauvages après une infection par voie orale avec des kystes de la souche ME49. Après vaccination avec la souche ts-4 de *T. gondii*, ces souris montrent une réponse immunitaire détériorée face à une épreuve avec les tachyzoïtes de RH. De plus, la production d'IgG2a est diminuée dans les souris déficientes de CD4<sup>+</sup>. Bien que les souris déficientes en CD4<sup>+</sup> aient un taux normal de cellules CD8<sup>+</sup>, mais elles ont besoin des cellules CD4<sup>+</sup> pour développer une réponse humorale plus efficace contre le parasite et aussi pour diminuer la charge parasitaire cérébrale (Johnson et Sayles 2002).

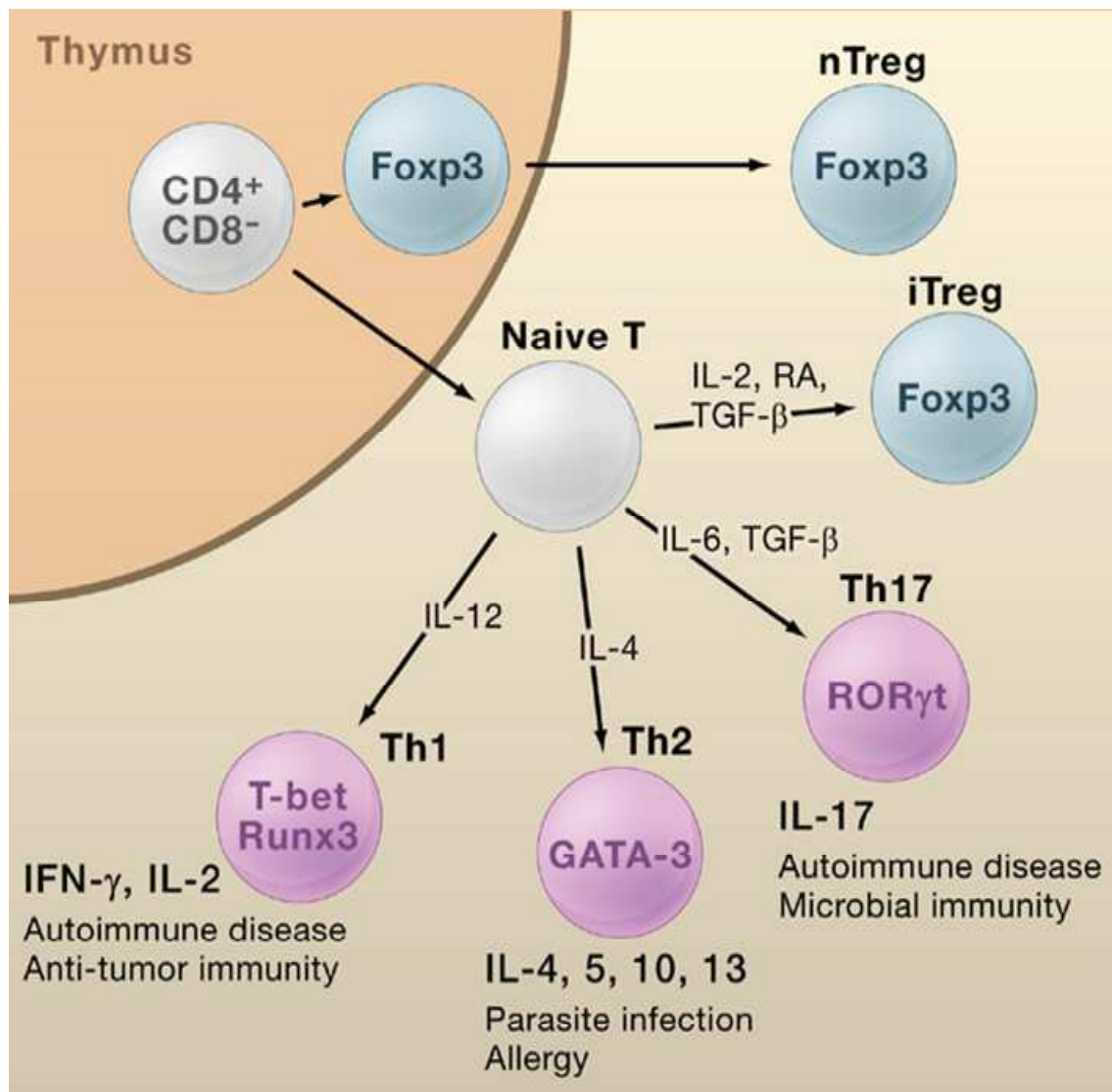


Figure 4: Différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> en différentes populations cellulaires

d'après Sakaguchi *et al.* 2008. Différenciation des cellules T naïves en cellules Treg ou cellules TH1, TH2 ou TH17. Les cytokines nécessaires à la différenciation des cellules T naïves sont indiquées par les flèches. Les facteurs de transcription Tbet, Runx3, GATA3, ou RORγt sont nécessaires pour la différenciation des cellules T naïves en cellules TH1, TH2 ou TH17, respectivement.

nTreg, iTreg et RA signifient cellules Treg naturelles, cellules Treg induites et acide rétinoïque.

## Cellules de type Th17

Les lymphocytes qui sécrètent les cytokines IL17A, IL17F, IL21, TNF $\alpha$ , sont classés dans la catégorie de cellules de type Th17 (Liang *et al.* 2006, Nurieva *et al.* 2007). Le TGF $\beta$  augmente l'expression du récepteur de l'IL-23 (IL-23R) et favorise la différenciation des cellules de type Th17. Elles sont capables d'induire l'infiltration des neutrophiles et de réagir contre les bactéries pathogènes extracellulaires (Ye *et al.* 2001, Kolls et Lindén 2004). L'impact des cellules de type Th17 est assez complexe et dépend du type de cytokine produite par ces cellules dans une condition donnée (Volpe *et al.* 2008). Il y a des résultats contradictoires concernant le rôle des cellules Th17 dans la toxoplasmose. Une étude montre l'importance de la signalisation via IL17/IL17R après infection par voie orale de souris C57BL/6 IL17R $^{-/-}$  dans la protection (Kelly *et al.* 2005) mais l'autre étude montre un effet délétère dans le même modèle d'infection (Guiton *et al.* 2010). Kelly *et al.* (2005) montrent que des souris IL17R $^{-/-}$  sont plus sensibles à l'infection par voie orale que les souris sauvages. Guiton *et al.* (2010) montrent que la neutralisation de l'IL-17 protège partiellement les souris pendant la toxoplasmose aiguë en particulier contre la réponse inflammatoire sévère observée chez les souris C57BL/6. Le point commun entre les deux études est le recrutement défectueux des neutrophiles au site d'infection des souris IL17R $^{-/-}$  ; dans un modèle, il est mortel (Kelly *et al.* 2005) et dans l'autre il est protecteur (Guiton *et al.* 2010).

### b. Cytokines et chimiokines

Ainsi la résistance à la toxoplasmose (soit aiguë soit chronique) dépend fortement de l'immunité cellulaire, et en particulier de la production d'IL-12 et d'IFN $\gamma$ . Les autres cytokines comme le TNF $\alpha$ , le TGF $\beta$ , l'IL-10 et les chimiokines comme le MCP-1 jouent aussi des rôles importants dans la réponse immune contre la toxoplasmose.

#### a. IL-12

L'IL-12 est une des premières cytokines produite dans la phase aiguë de la toxoplasmose. Les tachyzoïtes de *T. gondii* activent des cellules dendritiques (CD) qui, après activation, migrent vers les organes secondaires lymphoïdes (Banchereau et Steinman 1998). L'activation des CD par les tachyzoïtes de *T. gondii* se fait par l'interaction entre le récepteur cellulaire CCR5 des CD et son ligand parasitaire la cyclophiline du parasite (Denkers *et al.* 2003, Aliberti *et al.* 2000). Après l'interaction du CCR5 avec la cyclophiline, les CD activées produisent l'IL-12 (Denkers *et al.* 2003, Aliberti *et al.* 2000). La stimulation des TLR par *T. gondii* peut aussi induire la production d'IL-12 via la voie de signalisation de MyD88 car la production d'IL-12

est diminuée chez les souris MyD88KO (Scanga *et al.* 2002) de la même façon que chez les souris CCR5KO (Aliberti *et al.* 2000).

L'IL12 contrôle la production de l'IFN $\gamma$  bien qu'un mécanisme IL12-indépendant existe également (Scharton-Kersten *et al.* 1996). L'IL12 est également essentielle pour la différenciation des CD8<sup>+</sup> effecteurs KLRG1<sup>+</sup> en CTL et la production d'IFN $\gamma$  par ces CTL (Wilson *et al.* 2008).

#### b. IFN $\gamma$

La cytokine l'IFN $\gamma$  joue un rôle majeur dans la protection des souris contre *T. gondii*. En effet, l'injection de l'anticorps anti-IFN $\gamma$  provoque la mort des souris dans la phase aiguë de la toxoplasmose (Suzuki *et al.* 1988) ainsi qu'en phase chronique après réactivation. De plus, l'injection d'IFN $\gamma$  empêche les encéphalites dues à la réactivation des kystes dans les lignées de souris sensibles comme les CBA/Ca. L'IFN $\gamma$  est produit par différents types des cellules du système immunitaire. Les cellules "Natural Killer" (Gazzinelli *et al.* 1993) produisent l'IFN $\gamma$  dans la phase précoce de l'infection puis ce sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui sont les principales sources d'IFN $\gamma$  (Gazzinelli *et al.* 1991, Suzuki *et al.* 1988, Scharton-Kersten *et al.* 1997 et 1997a).

Différentes études décrivent les mécanismes de protection induits par l'IFN $\gamma$ . La neutralisation de l'IFN $\gamma$  bloque l'activation des macrophages (Suzuki *et al.* 1988). L'IFN $\gamma$  provoque la dégradation du tryptophane dans les cellules infectées soit hématopoïétiques ou non hématopoïétiques et donc contrôle la croissance du parasite (Silva *et al.* 2002). Les cellules épithéliales intestinales de l'Homme activées par l'IFN $\gamma$  peuvent inhiber *in vitro* la réplication de *T. gondii* (Dimier et Bout 1998). L'IFN $\gamma$  active la production d'oxyde nitrique par les macrophages et en combinaison avec le TNF $\alpha$  limite la réplication du parasite (Adams *et al.* 1990, Langermanns *et al.* 1992).

La délétion du gène de l'IFN $\gamma$  chez les souris C57BL/6 provoque une énorme augmentation d'infectivité de *T. gondii* dans le rectum et le sang (Kobayashi *et al.* 1999). Les souris Balb/c déficientes en IFN $\gamma$  développent une encéphalite toxoplasmique en dépit de taux normaux d'ARNm de TNF $\alpha$  et iNOS (Suzuki *et al.* 2000). Par contre, la surproduction de l'IFN $\gamma$  a été montrée comme responsable des dommages tissulaires entraînés lors d'une iléite induite après l'infection par voie orale avec une souche de type II des souris C57BL/6. L'IFN $\gamma$  produite dans les intestins peut induire l'apoptose des cellules T (Liesenfeld *et al.* 1997)

La surproduction d'IFN $\gamma$  est également impliquée dans la mortalité des souris après infection par une souche de type I (Mordue *et al.* 2001). Donc d'un côté l'IFN $\gamma$  a un rôle très important

dans l'inhibition de la croissance du parasite chez une souche de souris résistante à la toxoplasmose mais d'autre côté, l'énorme production de la même cytokine inflammatoire peut devenir mortelle pour la souris C57BL/6, une souche de souris sensible à l'infection avec *T. gondii* de type-II (Liesenfeld *et al.* 1996) ou lors d'infection avec les souches virulentes de type I.

### c. IL-10

L'IL-10 est produite par divers types cellulaires (cellules T et B, macrophages, cellules épithéliales). Cette cytokine joue un rôle essentiel pour la survie des souris dans la phase aiguë de la toxoplasmose dans un modèle létale d'iléite après une infection avec une souche de type II. Les souris IL10KO infectées avec une dose sub létale de kystes ne contrôlent plus les réponses inflammatoires et meurent d'une nécrose du foie et des intestins due à une surproduction d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  et corrélée à une augmentation du nombre des cellules T CD4<sup>+</sup> (Gazzinelli *et al.* 1996). Les souris IL-10KO développent aussi une encéphalite létale caractérisée par une infiltration de CD4<sup>+</sup> et de macrophages et une production très élevée des cytokines inflammatoires. La déplétion partielle des cellules T CD4<sup>+</sup> réduit la sévérité de l'inflammation et diminue aussi l'encéphalite létale chez ces souris (Wilson *et al.* 2005). Les études *in vivo* ont identifié une population des cellules T régulatrices Foxp3<sup>+</sup>RORt<sup>+</sup> comme productrice principale de l'IL-10 (Lochner *et al.* 2008). Les macrophages et les cellules T CD4<sup>+</sup> infiltrées dans le cerveau pendant la toxoplasmose sont aussi des producteurs importants d'IL-10 dans le cerveau. La production d'IL-10 régule la production de l'IL-12, l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-6 par les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques du cerveau.

Etant donné son rôle inhibiteur, l'IL10 a été proposé comme un des facteurs impliqué dans la virulence du parasite. Cependant l'infection de souris Balb/c IL10<sup>-/-</sup> ou sauvages par une souche virulente RH ne montre aucune différence entre ces souris. Les deux groupes de souris produisent des quantités comparables d'IFN $\gamma$  et d'IL12 et montrent des charges parasitaires comparables et des courbes de mortalité similaires (Wille *et al.* 2001). De même, l'IL10 ne serait pas impliquée dans la réponse mémoire. Les souris IL10KO vaccinées avec une souche de type I ou II survivent à une infection d'épreuve (Wille *et al.* 2004) et produisent une réponse Th1 comparable à celle des souris sauvages.

#### d. TNF $\alpha$

La production de TNF $\alpha$  dans la toxoplasmose est induite par la stimulation des macrophages. Les macrophages stimulés *in vitro* avec les glycosylphosphatidylinositols (GPIs) de *T. gondii* (Debierre-Grockiego *et al.* 2003) via le TLR2 et le TLR4 (Debierre-Grockiego *et al.* 2007) produisent du TNF $\alpha$ . Le TNF $\alpha$  a un rôle protecteur ou immunopathologique dans la toxoplasmose. Le rôle protecteur du TNF $\alpha$  a été montré dans une étude qui décrit une mortalité importante des souris B6 après l'injection de l'anticorps anti-TNF $\alpha$  pendant la toxoplasmose (Johnson 1992a). D'autre part, l'injection de l'anticorps anti-TNF $\alpha$  pendant la toxoplasmose inhibe la nécrose des intestins après une infection orale chez ces mêmes souris C57BL/6 (Liesenfeld *et al.* 1999).

## D. Cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices (Treg) sont les cellules qui régulent les réponses immunitaires indésirables. A ce jour, plusieurs fonctions des cellules Treg ont été proposées comme le maintien de la tolérance pour empêcher les maladies auto-immunes, pour diminuer l'allergie, et l'immunopathologie induite par un pathogène, pour maintenir la tolérance fœto-maternelle et la tolérance orale.

### I. Fonctions des Treg

Le premier rôle décrit des cellules Treg était la tolérance contre le soi. Ces cellules maintiennent la tolérance dans le corps et empêchent le développement des maladies auto-immunes. Elles induisent la tolérance contre les antigènes alimentaires (tolérance orale) et ont également un rôle dans le développement de la tolérance fœto-maternelle. L'immunopathologie induite par les pathogènes est contrôlée également par les cellules Treg. Ces sont les cellules Treg qui empêchent l'élimination des bactéries commensales par le système immunitaire (Sakaguchi *et al.* 2009, Corthay 2009, Ohkura et Sakaguchi 2010).

### II. Historique

Bien que l'idée de tolérance soit apparue en 1911, ce n'est qu'en 1972 quand Gershon *et al.* (1972) ont pu transférer la tolérance infectieuse via le transfert des cellules à des souris receveuses naïves que des cellules T ayant une activité suppressive ont été mises en évidence. Gershon *et al.* (1972) les ont appelées les cellules T suppresseur « Suppressor T Cells » (Ts) pour les distinguer des cellules T helper. Peu après, CD8 (Lyt-2, 3<sup>+</sup>) était identifié comme un marqueur de ces cellules Ts. La notion de cellules Ts a cependant été abandonnée à la fin des années 1980 par manque de marqueurs phénotypiques caractéristiques des cellules possédant l'activité suppressive ne permettant pas une caractérisation de cette sous population.

Dans les années 1970 et la première moitié de la décennie de 1980, beaucoup d'études ont été faites pour caractériser les cellules Ts CD8<sup>+</sup> mais dans la dernière moitié de la décennie de 1980, ces études ont été freinées à cause de publications contenant des résultats contradictoires (Kapp et Bucy 2008).

Il est connu maintenant qu'il y a des cellules possédant des activités régulatrices dans les deux grandes populations de cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (Sakaguchi *et al.* 1995). Le pourcentage de

cellules Treg est variable dans ces deux populations cellulaires. Mais depuis une quinzaine d'années, les études sur les cellules ayant une activité suppressive ont augmenté exponentiellement avec la mise en évidence d'un marqueur intracellulaire spécifique d'une population majoritaire de T régulatrice la protéine Foxp3. De nombreuses autres cellules exprimant ou n'exprimant pas Foxp3, des cellules CD8<sup>+</sup>, NK  $\gamma\delta$  ont aussi montré des activités suppressives.

Mais la population la mieux caractérisée actuellement reste la population CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> et nous nous intéresserons principalement à ces cellules.

### III. Différentes populations de Treg

#### 1. Treg CD4<sup>+</sup>

Les cellules Treg CD4<sup>+</sup> peuvent être divisées en deux catégories selon les marqueurs de surface et ou selon le profil des cytokines qu'elles produisent, ou selon leur origine : les cellules Treg naturelles (nTreg) et les cellules Treg acquises ou adaptatives (aTreg) (Wan et Flavell 2008).

##### a. Cellules Treg naturelles (nTreg)

Les cellules T régulatrices naturelles (nTreg) sont produites dans le thymus comme une population distincte des cellules T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Feuerer *et al.* (2009) les nomment les cellules Treg thymiques ou tTreg (Feuerer *et al.* 2009).

Elles sont caractérisées phénotypiquement par l'expression de CD25 et de Foxp3 et représentent environ 10-15% de la population CD4<sup>+</sup> chez la souris naïve.

##### b. Cellules Treg acquises ou adaptatives (aTreg)

Les cellules T conventionnelles quand elles acquièrent une fonction régulatrice, sont appelées les cellules Treg acquises ou adaptatives (aTreg). Feuerer *et al.* (2009) les appellent également les cellules Treg converties (convTreg). Il y en a deux types : Tr1 et Th3. Les cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> induites en périphérie sont aussi appelées aTreg ou Treg induite (iTreg) (Curotto de Lafaille et Lafaille 2009).

#### a. Tr1

Les cellules Treg de type Tr1 sont caractérisées par la production de fortes quantités d'IL-10 et de TGFβ. Ces cellules possèdent une activité suppressive inhibant les cellules T effectrices dans une manière spécifique de l'antigène.

Historiquement, Groux *et al.* (1997 et 1997a) ont réussi à cloner des cellules CD4<sup>+</sup> ayant un profil de sécrétion de cytokines différents des clones classiques TH : TH1 ou TH2. Ces clones ont été induits à partir de cellules naïves de souris exprimant un récepteur T (TCR) spécifique de l'ovalbumine (OVA) après stimulation *in vitro* avec l'antigène spécifique (OVA) et de l'IL10. Ces clones produisent de fortes quantités d'IL10, de TGFβ, de l'IL5 et des faibles quantités d'IL2. *In vitro* elles avaient toutes les caractéristiques de Treg. Des transferts *in vivo* dans un modèle murin de colite ont montré leur rôle protecteur *in vivo*. De tels clones ont également été dérivés de cellules humaines *ex vivo* en présence d'IL10.

Leur activité suppressive est liée à la forte production d'IL10 et de TGFβ et un mécanisme dépendant de contact cellulaire a également été évoqué (Weiner 2001).

La différenciation de ces cellules est dépendante de l'IL10. L'induction des cellules Tr1 est spécifique de l'antigène mais une fois induites par un antigène spécifique, elles peuvent exercer leur activité suppressive contre des cellules ayant une spécificité antigénique autre (ou effet « bystander »).

Ces cellules Tr1 sont impliquées dans la tolérance aux antigènes du soi, aux allergènes (venin, chat, nickel) mais également à la tolérance orale induite par des faibles doses d'antigènes. Elles ont un rôle important dans la tolérance aux allogreffes et greffes d'organes solides. Elles ont également été retrouvées dans des infections par les helminthes et dans des tumeurs.

Aucun marqueur phénotypique particulier n'a été jusqu'à présent associé à ces cellules. Elles n'expriment pas CD25 ni Foxp3 ce qui laisse supposer qu'elles ne sont pas liées aux nTreg.

Une étude récente décrit un type des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> comme des cellules T régulatrices. Ces cellules sont LAG3<sup>+</sup> (lymphocyte activation gene 3), IL-10<sup>+</sup> et Egr2<sup>+</sup> (Early Growth Response Gene 2) mais elles n'expriment pas les marqueurs CD25 et Foxp3. Egr2 est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans l'induction de l'anergie (Okamura *et al.* 2009). Le lien entre ces cellules et les cellules Tr1 est actuellement à l'étude puisque ces cellules produisent des quantités importantes d'IL10 sous la dépendance d'Egr2 et bien que ne produisant pas de quantités détectables d'IL5 et de TGFβ elles pourraient produire ces cytokines dans des conditions d'activation maximale.

### b. Th3

Les cellules Treg de type Th3 sont induites à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves après l'ingestion d'un antigène par voie orale, induisant la tolérance orale.

Historiquement, des cellules ayant une activité suppressive ont été isolées lors de recherche concernant l'induction de la tolérance orale dans un modèle d'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) (Chen *et al.* 1994, Stock *et al.* 2004) chez la souris. Ces cellules comme les Tr1 ont été clonées et il a été montré qu'elles produisaient de fortes quantités de TGFβ. Elles ont été dénommées TH3 (Chen *et al.* 1994). Il apparaît maintenant que l'une des caractéristiques de ces cellules TH3 est l'expression d'un peptide appelé « LAP » (latency associated peptide). Chez l'Homme, une population régulatrice de cellules T CD4<sup>+</sup>, a été identifiée exprimant le LAP (latency associated peptide), CD69 et le TGFβ membranaire. Ces cellules CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> TGFβ<sup>+</sup> sécrètent de l'IL8, de l'IL9, de l'IL10, de l'IFNγ et du TGFβ après activation. Leurs activités suppressive dépendent le TGFβ et l'IL10 *in vitro*. L'activation *in vitro* des cellules CD4<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> génère les cellules Treg CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Gandhi *et al.* 2010).

De même chez la souris, des cellules ayant une activité régulatrice et exprimant CD69 et un TGFβ membranaire ont été décrites Han *et al.* (2009). Alors que le CD69 est généralement considéré comme un marqueur d'activation, dans cette nouvelle population des cellules Treg, ce marqueur est lié aux activités régulatrices. Han *et al.* (2009) ont trouvé que presque 40% des cellules T CD4<sup>+</sup> expriment CD69 chez les souris ayant des tumeurs progressives. Ces cellules expriment la chaîne β du R-IL2 (CD122) mais elles n'expriment pas le Foxp3, elles ne sécrètent aucunes des cytokines comme l'IL10, le TGFβ, l'IL2 et l'IFNγ. Elles expriment le TGFβ lié à leur surface. Ces cellules ont une activité suppressive contact dépendante. De façon intéressante, les cellules CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> gardent leur activité suppressive même après la fixation chimique. De même, l'anticorps neutralisant le TGFβ bloque leur activité suppressive (Han *et al.* 2009).

L'hypothèse actuelle concernant ces cellules TH3 est que ce sont des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> qui existent dans un compartiment périphérique et qui sont induites dans l'intestin après stimulation via le TCR par des antigènes ingérés par voie orale. Ainsi activées elles sont capables de réguler au niveau intestinal les cellules TH1 et TH2 et d'interagir avec les Treg Foxp3 (Weiner *et al.* 2011).

L'induction des cellules Th3 est spécifique d'antigène mais une fois induites elles ont également comme les Tr1 une activité « bystander ».

## 2. Treg CD8<sup>+</sup>

Les cellules Treg CD8<sup>+</sup> jouent un rôle important dans le contrôle de l'immunité intestinale, l'immunopathologie et l'auto-immunité. Elles sont aussi importantes dans le contrôle de l'immunopathologie dans l'œil, la production de la tolérance orale et dans la prévention de maladie GVHD et la prévention de rejet de greffe (Pomié *et al.* 2008). Les cellules Treg CD8<sup>+</sup> naturelles sont produites dans le thymus et ensuite migrent dans la périphérie et les cellules Treg CD8<sup>+</sup> induites (iTreg CD8<sup>+</sup>) sont converties dans la périphérie dans les différentes conditions inflammatoires et dans les différents organes (Pomié *et al.* 2008).

Les cellules nTreg CD8<sup>+</sup> de souris peuvent exprimer plusieurs marqueurs comme les cellules nTreg CD4<sup>+</sup> par exemple CD25, CD122, Foxp3, CTLA4, GITR (Pomié *et al.* 2008). Les cellules iTreg CD8<sup>+</sup> peuvent exprimer le Foxp3, CD25, CD75, CD11c (Pomié *et al.* 2008). Les cellules Treg CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (naturelles et induites) expriment le marqueur CD103 et sont déficients pour la production de cytokine IFN $\gamma$  par rapport aux cellules CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>. Mais les cellules iTreg CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ont une faible activité suppressive sur la prolifération des cellules T et sur la production de l'IFN $\gamma$ . Donc les cellules Treg CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, en dépit d'avoir certains caractères développementaux et phénotypiques similaires aux cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, ne possèdent pas une forte activité suppressive (Mayer *et al.* 2011).

Les cellules Treg CD8<sup>+</sup> de souris peuvent produire IL10, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  selon les différentes conditions inflammatoires (Pomié *et al.* 2008). Les cellules nTreg CD8<sup>+</sup> de souris exprimant le marqueur CD122 produisent l'IL10 et l'IFN $\gamma$ . Les cellules Treg CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> produisent du TGF $\beta$  *in vivo* pour prévenir la colite (Pomié *et al.* 2008).

Des cellules Tr1 CD8<sup>+</sup> qui produisent de l'IL10 ont été décrites. Ces cellules sont anergiques, suppriment les réponses prolifératives via l'IL10, et peuvent être générées *in vitro* par la stimulation des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves avec des cellules dendritiques plasmacytoïdes activées ou des cellules dendritiques myéloïdes produisant de l'IL10 (Roncarolo *et al.* 2006).

La bibliographie suivante s'intéressera uniquement aux cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

## IV. Marqueurs des cellules Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>

Les molécules impliquées dans l'identification et l'activité des cellules Treg sont décrites dans le tableau 2.

### 1. Les marqueurs "classiques"

#### a. Marqueur intracellulaire FoxP3

En 1995, la définition phénotypique des Treg murines était basée sur l'expression du marqueur CD25 (Sakaguchi *et al.* 1995), les cellules ayant une activité régulatrice exprimant de façon constitutive ce récepteur. Ce n'est qu'à partir de 2003 chez la souris puis chez l'Homme que Foxp3 est considéré comme le régulateur majeur du développement et de la fonction des cellules nTreg (Hori *et al.* 2003, Fontenot *et al.* 2003, Khattri *et al.* 2003, Lahl *et al.* 2007, Kim *et al.* 2007, Ono *et al.* 2007).

Foxp3 (Fork head box p3) est un facteur de transcription intracellulaire qui appartient à une famille de facteurs de transcription « fork-head/winged helix family of transcription factors » (Hori *et al.* 2003, Fontenot *et al.* 2003, Khattri *et al.* 2003).

Le rôle majeur du gène FOXP3 dans le maintien de la tolérance au soi a d'abord été montré chez la souris mutante « scurfy » (Brunkow *et al.* 2001) puis ensuite chez des patients atteints du syndrome « IPEX » (Bennett *et al.* 2001). IPEX est une maladie génétique mortelle entraînant de nombreux désordres auto-immuns (diabète de type1, thyroïdite, colite, anémie hémolytique). De même, les souris « scurfy » présentent des syndromes lymphoprolifératifs touchant de nombreux organes. Dans les 2 cas, des mutations dans le gène *FOXP3* entraînent la perte de fonction de la protéine (scurfin) qu'il code. Les 4 différentes mutations non polymorphiques observé dans le gène FOXP3 humain changent un domaine de la protéine scurfin et perturbent des interactions avec l'ADN (Wildin *et al.* 2001) (Fig. 5).

Des études de transfert de cellules, de surexpression ou d'extinction du gène Foxp3 ont ensuite confirmées ce rôle dans la différenciation et la fonction des Treg.

Tableau 2: Molécules importantes impliquées dans l'identification et l'activité des cellules Treg (modifié d'après Trzonkowski et al. 2009)

<b>Molécules</b>	<b>Fonctions</b>
CD4	marqueur commun chez l'Homme et la souris pour identifier les cellules Treg.
CD25 (IL2R $\alpha$ )	Chaîne $\alpha$ du récepteur pour l'IL2. Chez l'Homme seules les cellules CD4 ayant une haute expression de CD25 possèdent l'activité régulatrice
CTLA-4 (CD152)	CTLA-4 est un récepteur de surface le plus important pour l'activité suppressive contact-dépendante des cellules Treg
Foxp3	ou scurfin facteur de transcription marqueur intracellulaire le plus fiable à ce jour
CD122 (IL-2R $\beta$ )	Chaîne $\beta$ du récepteur pour l'IL2 Nécessaire pour l'induction de l'expression intracellulaire de Foxp3 pendant leur développement thymique et dans la périphérie.
GITR	régulateur négatif des fonctions des cellules Treg. L'anticorps agoniste anti-GITR abroge la fonction suppressive de cellules Treg humain.
CD28	Nécessaire pour le développement et l'homéostasie de cellules Treg
IL-10	cytokine ayant une activité suppressive forte. Sécrétée principalement par les cellules Tr1 mais aussi par les autres cellules Treg
TGF $\beta$	cytokine ayant une activité suppressive forte. Sécrétée principalement par les cellules Th3 mais aussi par les autres Treg. Sa forme membranaire sur les cellules Treg est impliquée dans la suppression des cellules NK.
CD62L	Selectine qui permet aux lymphocytes de passer via les organes lymphoïdes ; les cellules Treg exprimant CD62L sont naïves et ont une activité suppressive plus forte que les cellules Treg CD62L-
CCR7	les cellules Treg exprimant CCR7 sont une sous population naïve avec une activité suppressive très forte
CD45RA	marqueur des lymphocytes naïfs ; son expression sur la population de cellules Treg est liée à une haute capacité suppressive

<b>Molécules</b>	<b>Fonctions</b>
CD39	ectonucléotidase exprimée par les Treg dégrade l'ATP extracellulaire en AMP qui ensuite peut être catabolisé en adénosine avec une activité suppressive
CD73	ectonucléotidase exprimé par les Treg l'adénosine résultant de son activité enzymatique a une activité suppressive
Molécules d'adhésions et les intégrines	ICAM-1 (CD54), Intégrines LFA-1 (CD11a/CD18), $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1), $\alpha E\beta 7$ (CD103) et $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD49) : forte expression des molécules d'adhésion et intégrines, augmentent la capacité de contact des cellules Treg aux autres cellules et leur localisation aux sites inflammatoires
CD95 (Fas)	Les cellules Treg expriment Fas juste après isolement et sont plus sensibles à la mort cellulaire médiée par Fas ; les cellules Treg aussi expriment FasL et sont capables d'induire l'apoptose des monocytes et les cellules B via la voie de Fas/FasL
CD223 (LAG3)	Importante pour la suppression d'activité de cellules NK par les cellules Treg agissant via leur TGF $\beta$ membranaire ; n'est pas exprimée sur les cellules Treg en état de repos
PDL1	L'expression de PDL1 sur les cellules Treg est associée avec l'induction de tolérance fœto-maternelle
Toll-like récepteurs	TLR4, TLR5, TLR8 chez l'Homme ; les signaux via ces récepteurs diminuent l'activité suppressive des cellules Treg mais stimulent leur prolifération
CCR4 (et aussi CCR8 au niveau faible)	Ligands pour CCL22, CCL17, CCL1 et vMIP-1, exprimées préférentiellement sur les cellules Treg, les ligands sont importants pour la mouvement des cellules Treg au sein des organes lymphoïdes et les tissus inflammés e.g. sites tumoraux

Les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> périphériques et les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> chez les souris normales expriment Foxp3. Les souris déficientes en Foxp3 et les souris Scurfy ont peu de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, et l'inoculation des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> à partir des souris normales, empêche l'inflammation systémique grave chez les souris Scurfy (Fontenot *et al.* 2003). Réciproquement, chez les souris transgéniques avec une surexpression de Foxp3, le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> est augmenté et les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et les cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant Foxp3 montrent une activité suppressive *in vitro* (Khattari *et al.* 2003). Les études montrent que les cellules T Foxp3<sup>+</sup> apparaissent peu de temps après la naissance et prouvent que le développement de maladie auto-immune/inflammatoire suit leur épuisement/déplétion (Lahl *et al.* 2007, Kim *et al.* 2007).

La transduction rétrovirale du gène Foxp3 dans les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> peut convertir ces dernières en cellules TregCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> qui acquièrent une activité suppressive *in vitro* et empêchent le développement de maladie auto-immune comme l'"IBD (Inflammatory Bowel Disease)" *in vivo* (Hori *et al.* 2003). Dans les cellules T naïves, elle stimule l'expression de CD25 et d'autres molécules sur la surface de cellules Treg, telles que CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) et GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) et réprime la production d'IL-2, d'IFN $\gamma$ , et d'IL-4 (Ohkura et Sakaguchi 2010).

L'utilisation des souris DEREK transgéniques permettant la déplétion temporaire des cellules exprimant Foxp3 après injection de toxine diphtérique a permis de montrer le rôle des cellules Foxp3 dans de nombreuses pathologies. L'utilisation de souris exprimant une protéine de fusion GFP-Foxp3 a permis d'identifier les populations cellulaires exprimant Foxp3 (Fontenot *et al.* 2005a). L'expression de Foxp3 est restreinte aux cellules T  $\alpha/\beta$  et est presque indétectable dans les cellules B, les macrophages et les CD. L'expression est également restreinte aux tissus lymphoïdes. Dans les ganglions mésentériques, l'expression est à plus de 97% restreinte aux cellules CD4<sup>+</sup>.

Cependant l'expression de Foxp3 n'est absolument ni nécessaire ni suffisante pour définir les cellules Treg (Feuerer *et al.* 2009). En effet certaines cellules avec des fonctions régulatrices sont Foxp3<sup>-</sup> (Tr1 par exemple). De plus, les cellules humaines après activation peuvent exprimer Foxp3.

D'autres marqueurs supplémentaires sont donc utilisés pour caractériser et/ou purifier les cellules Treg.

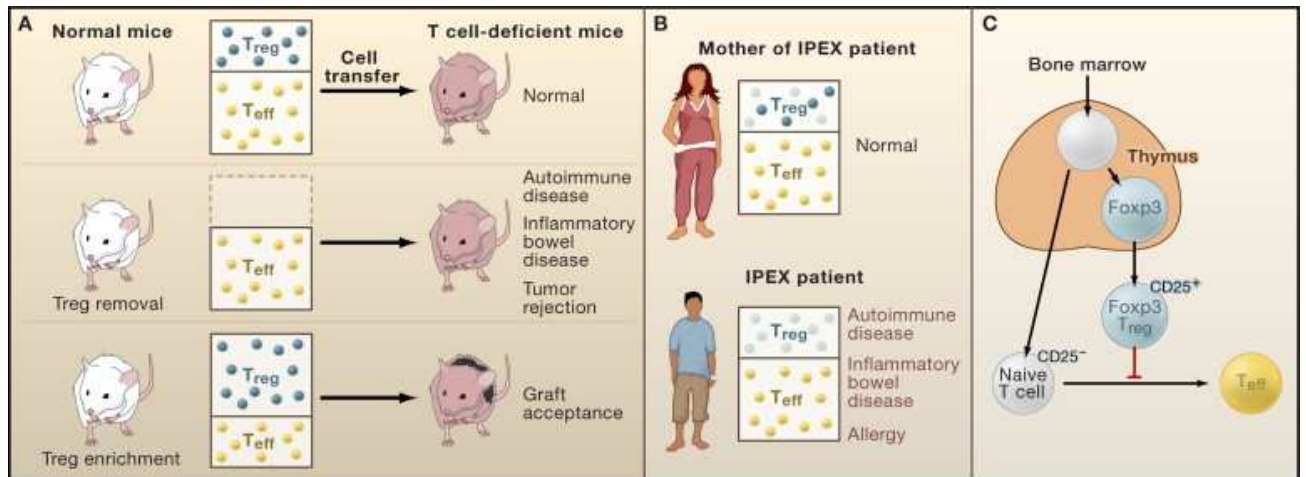


Figure 5: Les effets de l'absence des Treg chez la souris et chez l'Homme d'après Sakaguchi *et al.* 2008

(A)<sup>o</sup>: Le rôle des Treg est montré par transfert de cellules contenant différentes proportions de cellules Treg. Les suspensions de cellules T provenant d'une souris normale sont transférées à des souris consanguines déficientes en cellules T (les souris « nude » athymiques) ne développent pas de maladie. Par contre, quand les cellules du donneur sont débarrassées des cellules Treg, les souris receveuses développent des maladies autoimmunes et IBD (Inflammatory Bowel Disease) et rejettent les cellules tumorales. Au contraire, quand les cellules des donneurs sont enrichies en Treg puis transférées aux souris « nude » athymiques, les souris receveuses acceptent les greffes de peau allogène. (B) : Les enfants mâles souffrent d'un syndrome IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome). Les mères portent des défauts sur le gène FOXP3 porté par le chromosome X et ont soit un nombre réduit de cellules Treg soit une mosaïque des cellules Treg normales et de cellules Treg défectueuses à cause d'une inactivation aléatoire sur le chromosome X. Les cercles bleus et jaunes indiquent les cellules Treg et Teff intacts, respectivement. Les cercles bleu clair indiquent les cellules Treg non fonctionnels. (C) : Les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> naturelles sont produites dans le thymus et inhibent le développement des cellules Teff à partir des cellules T naïves.

## 2. Marqueurs membranaires

Les marqueurs le plus utilisés pour distinguer les cellules Treg sont CD25, CTLA4, GITR, LAG-3, CD127 dont tous sont membranaires sauf Foxp3 qui est intracellulaire (Fig. 4) (Sakaguchi *et al.* 2008). Corthay (2009) décrit que tous ces marqueurs ne sont pas strictement spécifiques des cellules Treg car la plupart d'entre eux sont aussi exprimés par les cellules T activées.

### a. CD25

L'identification d'une population lymphocytaire CD4<sup>+</sup> exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'interleukine-2-récepteur ou CD25 ayant un rôle très important dans le développement et la protection des maladies auto-immunes chez la souris (Sakaguchi *et al.* 1995) a ouvert la voie aux recherches sur les cellules Treg. Quand les souris Balb/c athymiques « nude » reçoivent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> à l'origine des souris Balb/c nu<sup>+</sup>, elles développent immédiatement des maladies auto-immunes comme par exemple une gastrite, thyroïdite, sialoadénite, adrénalite, oophorite, glomérulonéphrite, polyarthrite et GVHD (Graft versus host like disease). Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inhibent le développement de ces maladies auto-immunes. Les souris recevant des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ont montré des réponses immunes très fortes aux greffes de peaux et aux vaccins protéiques mais le transfert des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en même temps que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ont bloqué le développement des maladies auto-immunes. Ces résultats ont montré que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont un rôle important dans le développement de la tolérance chez la souris (Sakaguchi *et al.* 1995).

Le récepteur de la cytokine IL2 (IL2R) contient trois chaînes : la chaîne alpha (CD25), la chaîne beta (CD122) et la chaîne gamma (CD132) qui est commune à d'autres récepteurs de cytokine comme l'IL15. L'IL2R est exprimé constitutivement par les cellules nTreg et par les cellules T activées par l'antigène (Malek et Castro 2010). Après fixation de l'IL2 sur la chaîne  $\alpha$ , il y a formation d'un complexe binaire, IL2R $\alpha$ -IL2. Ce complexe conduit à un changement de conformation de l'IL2, ce qui augmente son association avec la chaîne  $\beta$  formant un complexe tertiaire contenant IL2R $\alpha$ -IL2R $\beta$ -IL2. Ce nouveau complexe forme ensuite une faible association avec la chaîne  $\gamma$  produisant une structure quaternaire formant le récepteur de haute affinité (Malek et Castro 2010).

Chez la souris, les cellules T CD4<sup>+</sup> périphériques qui expriment CD25<sup>+</sup>, sont à plus de 90% des cellules Treg. CD25 est exprimée sur la surface des cellules nTreg constitutivement (Sakaguchi 2004). Dans les cellules de rate de souris naïves, cette population de cellules

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> représente 10% des cellules CD4<sup>+</sup>. Cependant, dans cette population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> seulement 60% coexpriment le Foxp3 (Fontenot *et al.* 2005) et donc 40% sont CD25<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Il a été montré que les deux populations CD25<sup>+</sup> et CD25<sup>low</sup> avaient une activité suppressive. Cette population CD25<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> pourrait représenter une population de Treg effectrice ou tissulaire puisqu'elle est fortement représentée dans les poumons.

Chez l'humain, cette population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> représente seulement 1 à 2% des cellules CD4<sup>+</sup> et le nombre peut fluctuer énormément jusqu'à 30% des CD4<sup>+</sup> ; de plus, ce n'est pas comme pour la souris une population homogène quand elle est visualisée par cytométrie en flux. De nombreux autres marqueurs ont donc été cherchés pour les Treg humains.

De plus, si CD25 est un bon marqueur pour les cellules Treg de souris, le fait qu'il soit aussi exprimé par toutes les cellules T en état d'activation rend difficile la différenciation entre les cellules Treg et cellules T activées dans des modèles infectieux ou lors de pathologie auto-immunes ou d'autres cellules (NK, lymphocytes B et T) peuvent être activées et exprimer CD25.

#### b. CTLA4 (CD152)

CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte Associated Antigen 4) est un récepteur qui présente 28% d'homologie au niveau protéique avec le CD28 et qui se fixe sur les mêmes ligands B7-1 et B7-2 des CPA (Bour-Jordan et Bluestone 2009).

Au niveau des cellules T «conventionnelles», il n'est pas exprimé à l'état naïf mais son expression est augmentée sur les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après leur activation. Dans ce cas c'est un régulateur négatif de l'activation. CTLA-4 est constitutivement exprimé à la surface des cellules Treg. Son expression chez les Treg est régulée par Foxp3 qui en association avec d'autres facteurs de transcription, s'attache au promoteur de CTLA-4 et augmente son expression, maintenant une expression forte de CTLA-4 à la membrane des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> (Marson *et al.* 2007, Zheng *et al.* 2007, Wu *et al.* 2006, Ono *et al.* 2007). Chez l'Homme, les cellules effectrices Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>low</sup> sont les seules cellules à exprimer constitutivement CTLA-4 (Wing *et al.* 2011).

Le rôle de CTLA-4 dans la biologie des Treg a été longtemps controversé à cause de résultats contradictoires utilisant les mêmes anticorps bloquant CTLA-4. Cependant la production de souris CTLA4-CKO qui présentent un déficit d'expression de cette molécule uniquement au niveau des cellules Foxp3<sup>+</sup> a permis de clarifier le rôle de cette molécule dans la production, le développement et l'activité des Treg. L'obtention de ces souris a permis de confirmer que

l'expression de CTLA-4 n'était nécessaire ni pour le développement ni pour la survie des cellules Treg. La déplétion spécifique des cellules CTLA-4<sup>+</sup> dans ces souris n'a d'effet ni sur la production thymique de cellules Treg puisque la fréquence de thymocytes Foxp3<sup>+</sup> n'est pas différente entre les souris WT et CTLA-4 CKO, ni sur leur survie *in vivo* ou sur leur état d'activation (Wing *et al.* 2008). Il joue cependant un rôle primordial dans l'activité suppressive des cellules Treg *in vivo* et *in vitro* (Wing *et al.* 2011). En absence de CTLA4, les cellules T périphériques sont activées et prolifèrent de façon non contrôlée et induisent des lésions tissulaires létales (Tivol *et al.* 1995, Waterhouse *et al.* 1995).

Le rôle de CTLA-4 sur les cellules T effectrices activées et sur les cellules Treg reste un sujet de recherche actuel puisque les cellules T effectrices activées présentent les mêmes caractéristiques que les cellules Treg à savoir faible production d'IL2, anergie et forte expression de CD25 et CTLA-4 (Wing *et al.* 2011).

### c. GITR

GITR (Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor related protein) est un récepteur de surface qui est exprimé par plusieurs types de cellules comme les cellules Treg, les cellules NK et aussi par les cellules Teff activées. GITR est activé par ses ligands GITRL qui sont exprimés par les CPA et les cellules endothéliales et stimule l'immunité innée et l'immunité adaptative (Nocentini et Riccardi 2009). Le GITR participe au développement des réponses auto-immunes et inflammatoires et augmente les réponses aux infections et aux tumeurs. Ces effets sont dus à plusieurs mécanismes d'une part l'inhibition des Treg et d'autre part la co-activation des Teff.

Comme CTLA-4, GITR est exprimé fortement sur les cellules Treg mais également sur les cellules Teff activées chez l'Homme et chez la souris. Son ligand appartient à la superfamille du TNF et est exprimé par les CPA professionnelles ou non (CD, lymphocytes B, monocytes). Plusieurs études utilisant les souris GITR<sup>-/-</sup> ou des souris traitées avec des anticorps anti-GITR, montrent que le GITR est nécessaire pour l'activation de la réponse immune. La stimulation physiologique ou pharmacologique de GITR exacerbe les maladies auto-immunes, la réaction du greffon contre son hôte (GVHR) et augmente l'immunité contre les tumeurs et les virus. De plus, l'inhibition du signal via GITR avec une protéine de fusion (GITR-Fc) améliore les maladies auto-immunes et inflammatoires (Nocentini et Riccardi 2009).

GITR module aussi l'activation des cellules T effectrices. Son activation augmente l'activation et la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activées via le TCR. Son expression est augmentée sur ces cellules.

Sur les cellules Treg, il a été montré que les anticorps anti-GITR avaient la capacité de contrer l'effet suppresseur des Treg. Cet effet est cependant transitoire. Le rôle de GITR dans l'expansion des Treg a aussi été suggéré par le fait que les souris GITR<sup>-/-</sup> ont un nombre réduit de Treg.

Son rôle a bien été étudié chez les souris infectées avec le paludisme. Dans ce modèle on observe que les cellules Treg sont incapables de neutraliser la réponse des cellules T effecteurs pendant le paludisme, si on bloque leur action en injectant l'anticorps monoclonal anti-GITR de souris (Hisaeda *et al.* 2005).

### 3. Marqueurs spécifiques de sous-phénotypes de Treg

De nombreux autres marqueurs préférentiellement exprimés chez l'Homme ou signant une activité précise ou une localisation préférentielle ont été décrits pour les Treg humaines ou murines.

#### a. Marqueurs spécifiques humains

L'expression de CD25 peut difficilement être utilisée pour purifier les Treg humaines. Différents marqueurs ou combinaisons de marqueurs sont donc utilisés pour purifier ou caractériser ces cellules.

CD127 (IL7R) est utilisé pour purifier les Treg humaines sur la base de leur faible expression chez ces cellules puisque plusieurs équipes ont montré que l'activité suppressive ainsi que l'expression de Foxp3 étaient augmentées dans les CD4<sup>+</sup> exprimant faiblement CD127. Cependant, les cellules CD4<sup>+</sup> effectrices montrent également une diminution de cette expression juste après activation. Il est donc nécessaire d'associer l'expression du CD62L pour différencier les cellules Treg des cellules Teff récemment activées. Les cellules Treg sont CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup> contrairement aux cellules Teff activées qui sont CD62L<sup>low</sup>. L'expression de CD62L est aussi utilisable chez la souris où il a été montré dans différents modèles (GVH, diabète de type I, greffe) par transfert de cellules, que les cellules Treg CD62L<sup>+</sup> avaient une activité plus importante que les cellules CD62L<sup>low</sup> (Ermann *et al.* 2005, Szanya *et al.* 2002, Fu *et al.* 2004).

## b. Marqueurs d'activation/mémoire

CD103 (Integrine  $\alpha_E\beta_7$ ) est un marqueur des cellules Treg effecteur/mémoire murin et humain et est exprimé sur ces cellules aux sites de recrutement local des Treg. Vingt à trente % de la population des cellules Treg murines dans les organes lymphoïdes secondaires exprime CD103. Les cellules Treg CD103<sup>+</sup> montrent un phénotype activé et possèdent une forte activité suppressive (Huehn *et al.* 2004). Leur présence est liée à la rétention des cellules Treg aux sites d'infection (Suffia *et al.* 2005, McSorley *et al.* 2008).

La plupart des cellules iTreg induites *in vitro* et des Treg trouvées lors d'inflammation dans le cerveau, exprime CD103. Cependant, le fait que CD103 soit un marqueur pour les cellules iTreg *in vivo*, n'est pas clair (Zhu & Paul 2010). Mais CD103 est associé à une forte activité suppressive et les cellules Treg exprimant CD103 expriment aussi les récepteurs pour les chimiokines inflammatoires et migrent préférentiellement vers les sites enflammés (Huehn *et al.* 2004, Lehmann *et al.* 2002).

L'expression du marqueur CD69 sur les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> reste peu documenté et contradictoire entre les données sur les cellules murines ou humaines. Chez des patients atteints de sclérodémie, l'expression diminuée de CD69 est liée à une activité suppressive diminuée (Radstake *et al.* 2009). Les auteurs donnant l'hypothèse que l'expression de CD69 aurait un rôle dans la régulation de la production de TGF $\beta$ . Chez la souris dans un modèle expérimental de lupus, cette expression est augmentée et liée à une activité suppressive diminuée (Divekar *et al.* 2011). Dans une revue récente, de Araújo *et al.* (2011) montrent que les cellules Treg de patients atteints de la maladie de Chagas ont une expression de CD69 augmentée après activation par l'antigène spécifique comme c'est le cas pour les cellules Teff. Ceci suggère que les cellules Treg sont capables de monter une réponse mémoire.

De nombreux autres marqueurs liés à l'activation ou la mémoire, en particulier pour la population de Treg humaine qui semble plus hétérogène que la population murine, ont été décrits. Parmi ces marqueurs CD45R0. L'expression de cet isoforme de CD45 est corrélée avec la mémoire puisque c'est un marqueur de cellules ayant rencontré un antigène. La plupart des Treg murines est CD45R0<sup>+</sup> alors que cette expression est plus hétérogène chez l'Homme. Une population CD45RA<sup>+</sup>CD45R0-Foxp3<sup>low</sup> chez l'Homme a été montrée comme ayant une activité suppressive. Cette population pourrait être l'homologue de la population dérivée du thymus chez la souris les nTreg et la population CD45R0 plutôt correspondre aux Treg induits en périphérie.

### c. Marqueurs de migration et de localisation

Les Treg ont été initialement trouvés dans les tissus lymphoïdes primaires et secondaires mais ils se trouvent également dans les organes inflammés, les tumeurs ou les sites d'infection. Des études récentes (pour revue Huehn et Hamann 2005) ont montré que les Treg pouvaient recirculer entre les différents organes lymphoïdes et entrer dans les sites inflammés.

L'expression de CD62L et de CCR7 définit une sous population de Treg dite naïve et est corrélée à la circulation vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques. L'activité suppressive *in vitro* des cellules Treg CCR7KO est identique aux cellules Treg des souris sauvages. Au contraire, leur activité suppressive *in vivo* est défectueuse. La cause principale de cette incapacité est due à leur incapacité à migrer dans les ganglions lymphatiques et plus précisément dans les zones des cellules T (Schneider *et al.* 2007, Manning *et al.* 2007, Kocks *et al.* 2007).

Les cellules Treg ont été divisées en deux sous populations selon leur expression de CD103. Les cellules qui expriment CD103 sont dites « effector-like Treg » et les cellules qui n'expriment pas CD103 sont classées comme « naïve-like Treg » (Huehn *et al.* 2004). Les cellules Treg CD103<sup>+</sup> (effector-like) migrent à la périphérie où elles exercent leur activité suppressive contre les cellules Teff présentes. CD103 est exprimé sur 20 à 30% des cellules Foxp3<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires mais ce taux est plus élevé dans les tissus comme les poumons, la peau et la LP (Feuerer *et al.* 2009).

### d. Récepteurs de chimiokines

D'autres récepteurs de chimiokines comme CCR2, 4, 5, 6, 8 et 10 ont été décrits sur différentes populations de Treg (Campbell et Koch 2011). L'expression de ces différents récepteurs correspond comme cela est le cas pour les cellules T conventionnelles à des sites de migration spécifiques vers des sites lymphoïdes ou non. (Tableau 3).

Tableau 3: Marqueurs associés à la migration des cellules Treg d'après Campbell et Koch 2011

Site de migration de cellules Treg	Récepteurs	Fonctions
Tissus lymphoïdes	CD62L	Migration aux ganglions lymphatiques
	CCR7	Migration aux ganglions lymphatiques et la rate
Tissus non lymphoïdes	Ligands d'E-selectine et P-selectine	Migration à la peau et aux tissus inflammés
	$\alpha E\beta 7$ intégrine	Localisation épithéliale
	$\alpha 4\beta 7$ intégrine	Migration aux tissus lymphoïdes associés aux intestins
	CCR2	Migration aux sites inflammés
	CCR4	Migration à la peau et les autres tissus inflammés
	CCR5	Migration aux tissus inflammés
	CCR6	Migration aux sites d'inflammation médiés par les cellules Th17
	CCR8	Migration à la peau et les sites d'inflammation médiés par les cellules Th2
	CCR9	Migration aux petits intestins
	CCR10	Migration aux muqueuses et à la peau
	CXCR3	Migration aux sites d'inflammation médiés par les

Site de migration de cellules Treg	Récepteurs	Fonctions
		cellules TH1
	CXCR5	Migration aux follicules de cellules B et centres germinaux
	CXCR6	Migration au foie
Vers les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes	CXCR4	Migration à la moelle osseuse, aux plaques de Peyer et aux sites tumoraux

CCR4 n'est pas exprimé chez les Treg thymiques mais chez les Treg retrouvées dans les tissus inflammés ou la peau (Feuerer *et al.* 2009). Les cellules Treg dans la LP expriment à haut niveau le CCR4 et le CCR9 mais moins de CCR7 par rapport aux cellules Treg de la rate (Guo *et al.* 2008). Les cellules Treg utilisent CCR4 pour leur localisation tissulaire dans les greffes cardiaques (Lee *et al.* 2005) et les tumeurs ovariennes (Curiel *et al.* 2004).

De même, les cellules Treg impliquées et migrant au niveau des organes impliqués dans la GVHD expriment CCR5. On peut citer également CCR4, 6 et 10 qui sont exprimés sur les Treg au niveau de la peau (Matsushima et Takashima 2010). La migration par exemple des Treg sur les sites de lésion cutanée liée à l'infection à *Leishmania major* nécessite la présence de CCR4 et de CCR5.

#### e. ICOS

ICOS (Inducible costimulator) est une molécule de costimulation associée à l'expression de l'IL10 dans les cellules T. ICOS est exprimé par les cellules aTreg de type Th1 et réagit avec son ligand situé sur les cellules dendritiques CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Stock *et al.* 2004).

#### f. Garp et Nrp1:

Garp est un antigène de membrane essentiel pour l'activité suppressive après activation via le TCR pour les Treg humaines et chez la souris avec son orthologue la Neuropiline 1 (Nrp-1) (Wang *et al.* 2008). Nrp-1 est un récepteur de classe-III des semaphorines et un co-récepteur

pour un facteur «vascular endothelial growth factor». Nrp-1 est préférentiellement exprimé par les cellules Treg et peut être exprimé par les cellules T Foxp3<sup>-</sup> après transfection du gène Foxp3 (Sarris *et al.* 2008, Mizui et Kikutani 2008, Shevach 2009).

## V. Mécanisme de l'activité suppressive des Treg

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'activité suppressive montrée par les cellules Treg, certains sont contact-dépendants et d'autres dépendent de la production de cytokines régulatrices produites par les cellules Treg (Fig. 6) (Shevach 2009) (Tableau 4). Les cellules ciblées par les cellules Treg peuvent être les CPA professionnelles ou non ou les cellules T effectrices mais aussi les cellules NK et NKT.

Les mécanismes de la suppression ont bien sûr été étudiés dans des modèles *in vitro*. Un test faisant référence et utilisé dans de nombreux laboratoires sur des cellules Treg humaines et murines a été mis au point rapidement après la découverte des Treg (Takahashi *et al.* 1998, Thornton et Shevach 1998.) Dans ces expériences *in vitro* où les CPA et l'anticorps anti-CD3 soluble sont utilisés pour l'activation des cellules Treg, les cibles de la suppression comprennent les cellules T effectrices et les CPA. Mais quand les anticorps anti-CD28 et anti-CD3 sont donnés sous forme insoluble (couplés à des billes ou sur plastique) les cellules T effectrices sont les seules ciblées par les cellules Treg (Shevach 2009). Ces différentes expériences ont donc permis de mettre en évidence les mécanismes respectifs de suppression au niveau des CPA ou des T effectrices.

### 1. Activité contact-dépendante

Le rôle de CTLA-4 dans le mécanisme de suppression a été bien documenté. Tout d'abord, il a été montré que l'injection d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 bloque la fonction des cellules Treg en se fixant sur CTLA-4 et induit diverses maladies auto-immunes dans les souris normales (colite) (Read *et al.* 2000, Takahashi *et al.* 2000) ou exacerbe le diabète dans un modèle murin de diabète de type I (Lühder *et al.* 1998).

Des expériences utilisant les Treg de souris CTLA-4<sup>+/+</sup> et des cellules T répondeuses de souris CTLA-4<sup>-/-</sup>, en co-culture ou leur transfert aux souris SCID a montré que le blocage de CTLA-4 de cellules Treg abroge la suppression mais pas le blocage de CTLA-4 de cellules T répondeuses (Takahashi *et al.* 2000, Tang *et al.* 2004, Read *et al.* 2006).

L'argument le plus convaincant de l'implication de CTLA-4 dans le mécanisme de suppression repose sur l'observation que les souris déficientes en CTLA-4 spécifiquement au

niveau des Treg, développent des symptômes similaires aux souris Foxp3-KO (Wing *et al.* 2008).

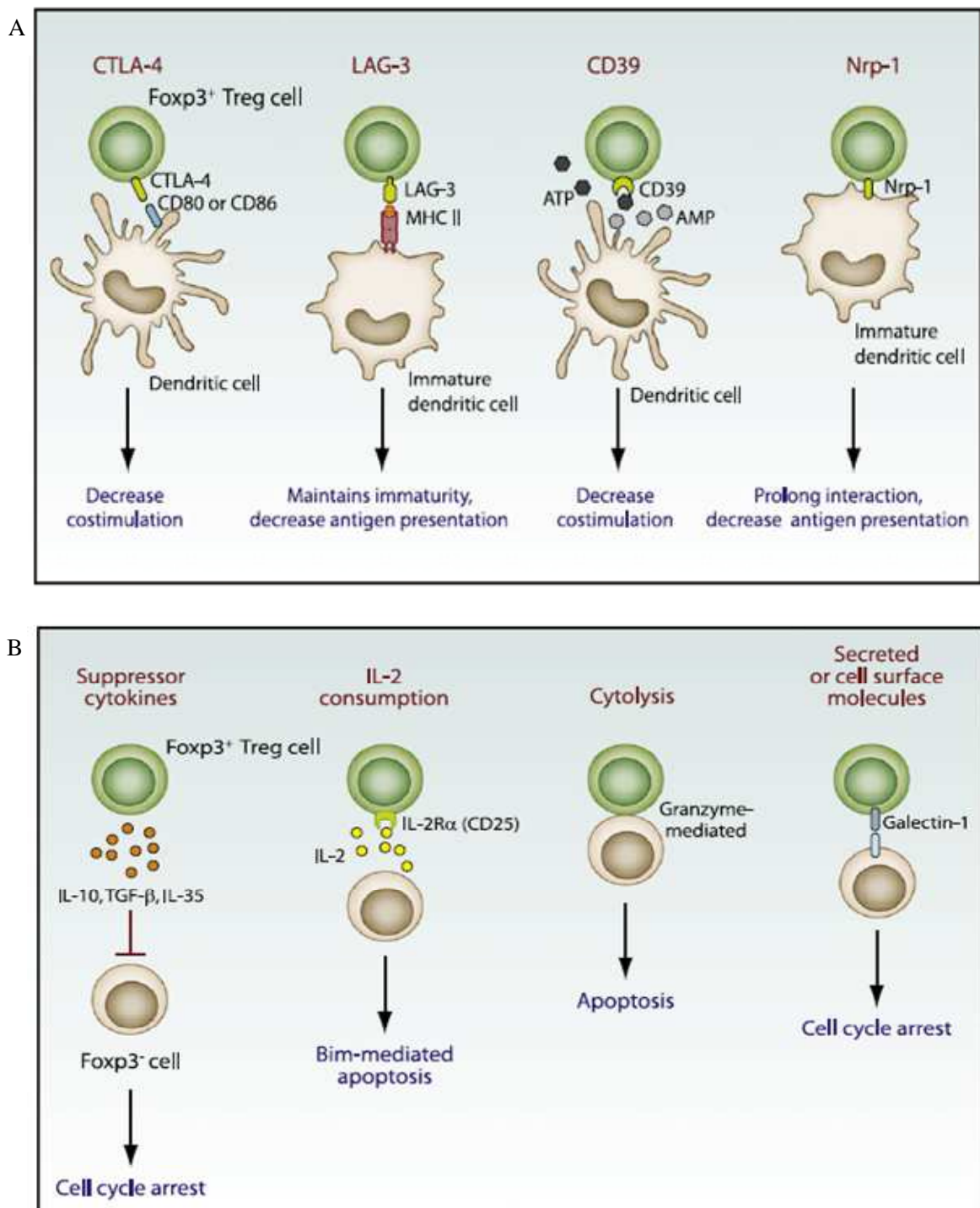


Figure 6 : Mécanismes des fonctions des cellules Treg d'après Shevach 2009

(A) Mécanismes de suppression indirecte des Treg sur les fonctions des cellules CPA,

(B) Mécanismes de suppression directe des cellules Treg sur les Teff Foxp3-

a. L'adhésion aux cellules CPA

Onishi (2008) a visualisé dans une étude *in vitro* de co-cultures de cellules Treg et T répondeuses naïves en présence de CD et d'antigène un phénomène de compétition entre les cellules Treg et T répondeuses par formation d'agrégats autour des CD empêchant les cellules répondeuses d'avoir accès aux CD. Cette agrégation ne se fait qu'en présence d'antigène et est dépendante de l'expression de LFA-1 (Lymphocyte Function associated Antigen-1) puisque des Treg déficientes en LFA-1 ne sont pas capables d'entrer en compétition contrairement aux Treg CTLA-4 déficientes. La formation d'agrégats autour des CD inhibe l'augmentation d'expression CD80 et CD86 sur ces CD immatures et diminuent l'expression de telles molécules sur les CD matures, sans modifier l'expression de CD40 et de CMH de classe-II (Wing *et al.* 2008, Onishi *et al.* 2008). Ces effets inhibiteurs de la maturation des CD sont très puissants puisqu'ils peuvent être observés en présence de stimuli de maturation forts comme par exemple le LPS, le zymosan et l'IFN de type-I (Onishi *et al.* 2008). Ces effets sont médiés par CTLA-4 comme cela a été démontré chez les souris CTLA-4-KO ou CTLA-4 CKO dont les cellules sont incapables de moduler l'expression de CD80 et CD86. Un autre mécanisme pourrait également intervenir pour moduler l'expression de CD80 et CD86 : la trogocytose. C'est un processus dans lequel les lymphocytes extraient les molécules de surfaces (CD80 et CD86) des CPA auxquels ils sont conjugués via les synapses immunologiques (Joly et Hudriser 2003, Shevach 2009). Il est également possible que CTLA-4 exprimé par les Treg interagisse avec les molécules CD80 et CD86 des cellules T activées Foxp3<sup>-</sup> (Paust et Cantor 2005).

Les cellules Treg activées peuvent stimuler l'expression de l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) par les cellules dendritiques (Oderup *et al.* 2006, Grohmann *et al.* 2002). IDO catabolise la conversion du tryptophane en kynurénine qui est toxique pour les cellules voisines. Cette activité des cellules Treg dépend aussi de l'expression de CTLA-4 et de son interaction avec CD80 et CD86 (Grohmann *et al.* 2002). Cependant, il n'y a pas d'évidence claire du rôle d'IDO dans la fonction des Treg *in vivo* ou *in vitro* (Shevach 2009).

D'autres mécanismes impliquant des contacts cellulaires ne dépendant pas de CTLA-4 ont été mis en évidence.

LAG3 (Lymphocyte Activation Gene-3, CD223) est une molécule de surface hautement exprimée par les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> activées. C'est un homologue de CD4 qui se fixe avec

une très haute affinité sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Après fixation sur le CMH des CD, LAG3 induit des signaux inhibiteurs qui empêchent la maturation de CD (Liang *et al.* 2008). La fixation de LAG3 pourrait également s'effectuer sur les cellules T activées qui expriment le CMH de classe II.

Des expériences de microscopie « intravitale » ont montré *in vivo* que les cellules Treg sont apparemment plus souvent en contact avec les CD que les T effectrices suggérant que la cible principale des Treg serait les CD. (Tang *et al.* 2006, Tadokoro *et al.* 2006).

Nrp-1 a aussi été proposé comme jouant un rôle dans l'interaction de CD et des Treg. Cette molécule, préférentiellement exprimée par les Treg, facilite les longues interactions entre les cellules Treg et les CD immatures. Le blocage de Nrp-1 diminue les fréquences de ces interactions. De plus, l'expression par transfert de gène de Nrp-1 dans les cellules T Foxp3<sup>-</sup>, augmente le nombre de ces longues interactions. L'expression préférentielle de Nrp1 donnerait l'avantage aux Treg sur les cellules T répondeuses d'interagir avec les CD. Des anticorps anti-Nrp-1 abrogent complètement l'activité suppressive de cellules Treg sur la prolifération de cellules T répondeuses stimulées avec de faibles concentrations d'antigène (Sarris *et al.* 2008, Shevach 2009)

b. Lyse des cellules T effectrices par le granzyme A et le granzyme B :

Un mécanisme potentiel de la suppression est la lyse des cellules T effectrices ou des CPA par les cellules Treg.

Les cellules CD4<sup>+</sup> humaines ont un potentiel cytolytique contrairement aux cellules CD4<sup>+</sup> murines. De plus, les Treg humaines activées expriment le granzyme A. Chez l'Homme, l'anti-CD3 et l'anti-CD46 peuvent activer les cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> qui, après l'activation, expriment le granzyme A et tuent les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activées et d'autres types de cellules par un mécanisme dépendant de la perforine mais indépendant de Fas-FasL (Grossman *et al.* 2004).

Les cellules Treg de souris, après l'activation, sur-expriment le granzyme B et une équipe a montré qu'elles étaient capables de tuer les cellules T effectrices par un mécanisme dépendant du granzyme B mais indépendant de la perforine (Gondek *et al.* 2005). Cette même équipe a montré que les cellules Treg déficientes en granzyme-B avaient une activité suppressive diminuée *in vitro*. Zhao *et al.* (2006) n'ont pas observé la lyse des cellules T<sub>eff</sub> par les cellules Treg activées chez la souris mais ils ont pu montrer la lyse des cellules B présentatrices

d'antigènes, mais pas des autres cellules B, par les cellules Treg activées. De plus, Cao *et al.* (2007) ont démontré que 5% à 30% des cellules Treg expriment le granzyme B dans une tumeur. Ces cellules Treg lysent les cellules NK et les CTLs par un mécanisme dépendant du granzyme B et de la perforine. La lyse des CPA reste un mécanisme potentiel par lequel les cellules Treg peuvent contrôler les réponses immunes primaires et secondaires mais pour l'instant il n'y a aucune étude *in vivo* qui montre la lyse des CD ou des cellules B par les cellules Treg (Shevach 2009).

### c. CD73 et CD39

CD73 (ecto-5'-nucléotidase) et CD39 (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1) sont exprimés par les cellules Treg. CD39 est un ecto-enzyme qui hydrolyse l'ATP ou l'ADP en AMP (adénosine-mono-phosphate-cyclique). Il est exprimé par les cellules B, les CD, toutes les cellules Treg murines et environ 50% des cellules Treg humaines (Borsellino *et al.* 2007).

Le complexe CD73-CD39 exprimé par les cellules Treg hydrolyse l'ATP extracellulaire en libérant l'adénosine qui donne un signal négatif aux cellules répondeuses (Deaglio *et al.* 2007, Dwyer *et al.* 2007). Les souris déficientes en CD39 développent une auto-immunité (Deaglio *et al.* 2007, Dwyer *et al.* 2007). L'activité suppressive des cellules Treg en augmentant l'AMP intracellulaire qui inhibe la prolifération de cellules T et diminue la production d'IL-2 (Bopp *et al.* 2007).

## 2. Activité induite via les cytokines

### a. «Déprivation» d'IL2

L'IL-2 est essentiel pour le développement des cellules nTreg dans le thymus et pour leur maintien en périphérie (pour revue Cheng *et al.* 2011). Cependant le rôle de l'IL2 dans le mécanisme de suppression lui-même reste sujet à débat.

De nombreuses études ont montré que les cellules Treg induisent une suppression en inhibant l'induction des ARNm spécifiques de l'IL2 des Teff (Takahashi *et al.* 1998, Thornton et Shevach 1998).

Quand les cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont cultivées *in vitro* avec les cellules T eff CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et stimulées avec l'antigène en présence des CPA, on observe une diminution de la prolifération des cellules Teff CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> aussi bien que de leur production d'IL2. L'ajout

d'IL2 et de l'anti-CD28 à cette culture empêche l'activité suppressive des cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Takahashi *et al.* 1998, Thornton et Shevach 1998). Les cellules Treg consomment l'IL2 produite par les cellules effectrices mais ne produisent pas d'IL2.

L'utilisation préférentielle de l'IL2 par les cellules Treg pourrait intervenir dans le mécanisme de suppression. Cet effet des Treg à savoir l'épuisement de l'IL2 reste un sujet de controverse. Des études effectuées chez la souris ont montré que l'IL2 serait consommée par les Treg et ne serait plus disponible pour les Teff ce qui entrainerait la mort de ces Teff par apoptose. Ce phénomène d'apoptose a également été décrit par ces mêmes auteurs *in vivo*. (Pandiyan *et al.* 2007).

Un tel phénomène d'apoptose ne semble pas impliqué dans le mécanisme de suppression chez l'Homme comme cela a été montré *in vitro* et *ex vivo* (Vercoulen *et al.* 2009).

Un autre mode d'action de l'IL2 dans le mécanisme de suppression a été décrit. Les Treg limitent la différenciation des CD8<sup>+</sup> en inhibant la phase initiale d'expansion par compétition pour l'IL2. Cela a été montré dans un modèle murin *in vivo* (McNally *et al.* 2011, Kastenmuller *et al.* 2011).

#### b. IL10 et TGFβ

L'IL10 et le TGFβ sont des cytokines bien connues pour leur activité suppressive et elles ont fait partie des premiers candidats capables d'être responsables de l'activité des Treg. Cependant la neutralisation de ces cytokines *in vitro* n'abroge pas la suppression induite par les Treg (Takahashi *et al.* 1998, Thornton et Shevach 1998). Cependant, l'IL10 et le TGFβ sont responsables de la suppression *in vivo* dans le modèle murin d'IBD après déplétion des Treg. De même, la neutralisation de l'IL10R du TGFβ abolit la tolérance pendant cette maladie (Read *et al.* 2000). Au contraire, les cellules Treg IL10<sup>-/-</sup> sont capables de diminuer la gastrite auto-immune due à la déplétion des Treg (Suri-Payer et Cantor 2001). Le rôle primordial de l'IL10 est observé dans de nombreux modèles infectieux (comme la leishmaniose, la toxoplasmose, la trichinellose) mais les nTreg ne sont pas les cellules impliquées dans cette production (Jankovic *et al.* 2007).

Le rôle du TGFβ reste également très controversé. Des études *in vitro* et *in vivo* de neutralisation par des anticorps ou d'utilisation de Treg n'exprimant pas le TGFβ ont montré que celui-ci n'était pas nécessaire à l'activité des Treg. Par contre le TGFβ membranaire exprimé par les Treg serait primordial dans l'activité suppressive (pour revue Vignali 2008).

c. IL35 :

Une nouvelle cytokine suppressive IL35, membre de famille de l'IL12 (Collison *et al.* 2009, Collison *et al.* 2010, Bettini et Vignali 2009) a été décrite comme étant préférentiellement exprimée par les cellules nTreg Foxp3<sup>+</sup>. C'est une molécule hétérodimérique formée par le produit du gène Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene) et la chaîne p35 de l'IL12. Ces 2 chaînes sont exprimées constitutivement et préférentiellement par les cellules Treg mais pas par les cellules naïves ou activées murines. Les cellules Treg des souris IL35<sup>-/-</sup> ont une activité suppressive réduite *in vitro* et *in vivo* dans le contrôle de l'IBD (Collison *et al.* 2007). Cette cytokine n'a pas été détectée dans les cellules Treg humaines ni au niveau ARNm ni au niveau protéique, cependant une étude récente montre que les CD4<sup>+</sup> de patients infectés par l'hépatite B expriment au niveau ARNm et protéine l'IL35.

d. Galectine-1 et galectine-10

La galectine-1 est une molécule sécrétée par les cellules Treg quant elles sont activées par le TCR. La galectine est un membre de la famille des protéines se liant à beta-galactoside (Garin *et al.* 2007) et est sécrétée sous forme d'un homodimère. Elle se lie avec plusieurs glycoprotéines comme par exemple CD45, CD43 et CD7. Les effets de la galectine-1 sont corrélés avec l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'inhibition de la production des cytokines pro inflammatoires. La galectine-1 agit sous forme soluble ou par contact cellulaire. Le blocage de la galectine-1 réduit l'activité suppressive des cellules Treg humaine et murine. Les cellules Treg des souris déficientes en galectine-1 ont aussi une activité suppressive réduite (Shevach 2009).

Des études protéomiques ont identifié un autre membre de famille des galectines, la galectine-10, exprimée par les cellules Treg humaines (Kubach *et al.* 2007). Cette protéine est intracellulaire et ses ligands sont inconnus. Le traitement *in vitro* des cellules Treg avec un « siRNA » ciblant la galectine-10, abolit l'état anergique des cellules Treg, permettant leur activation, prolifération et une diminution partielle de leur activité suppressive.

De nombreux mécanismes de suppression sont mis en évidence et cette multiplicité de mécanismes pourrait être corrélée soit à des sous populations de Treg différentes soit à des environnements différents ou des cibles spécifiques des Treg. Il est à noter également que certains mécanismes sont spécifiques pour l'instant à la souris et n'ont pas leur équivalent chez l'humain.

Tableau 4 : Mécanismes de suppression de cellules Treg d'après Sakaguchi *et al.* 2010

Molécules clés	Fonctions (étudiées chez la souris et ou chez l'Homme)
<b>Mécanisme de la suppression contact-dépendante</b>	
CTLA4	<p>Sous régulation de fonction co-stimulatrice des CPA (souris)</p> <p>Interactions avec CD80 et CD86 des cellules T conventionnelles (souris)</p>
CD73-CD39	Hydrolyse les ATP extracellulaire de l'inflammation (souris)
LAG3	Induction des signaux d'inhibition via CMH de classe-II (souris)
Granzyme B (souris) et granzyme A (Homme)	Lyse des cellules T conventionnelles (souris et Homme)
CD95-CD95Ligand	Induction de l'apoptose dans les cellules T conventionnelles (Homme)
<b>Mécanisme de la suppression cytokine-dépendante</b>	
TGFβ et LAP	Induction de FOXP3 dans les cellules T conventionnelles
IL-10	<p>Atténuation des fonctions des cellules dendritiques (Homme)</p> <p>Conversion des cellules T conventionnelles en cellules Tr1 (souris et Homme)</p>
Galectine-1	Arrêt du cycle cellulaire et apoptose de cellules T conventionnelles (souris)
CD25	Adsorption de l'IL2 (souris)
IL-35	l'expression de l'IL-35 augmente la capacité suppressive (IL-35 n'est pas exprimé par les cellules Treg humain)

## VI. Différenciation, homéostasie, plasticité des Treg

Les facteurs de transcriptions sont primordiaux pour la différenciation et le profil de production des cytokines des cellules Th. Les facteurs de transcription essentiels pour la différenciation des différentes lignées des cellules Th sont T-bet/STAT4 (pour Th1), GATA-3/STAT5 (pour Th2), ROR $\gamma$ -t/STAT3 (pour Th17) et Foxp3/STAT5 (pour Treg) (Zhu et Paul 2010) (Tableau 5).

Tableau 5: Facteurs de transcriptions associés aux différentes lignées cellulaires

<b>Facteur de transcription</b>	<b>Différenciation de la lignée cellulaire</b>
T-bet / STAT4	Th1
GATA-3 / STAT5	Th2
ROR $\gamma$ -t / STAT3	Th17
Foxp3 / STAT5	Treg

### 1. Différenciation des Treg

#### a. Treg naturelles et Treg induites

Les cellules nTreg sont générées dans le thymus et migrent à la périphérie. Les nTreg sont générées dans le thymus à partir de précurseurs ayant un TCR de haute affinité pour les peptides du soi.

Les cellules iTreg ou convTreg sont induites dans la périphérie à partir de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> comme cela a été montré dans des expériences de transfert chez la souris de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (Curotto de Lafaille *et al.* 2004, Furtado *et al.* 2002). Les cellules iTreg sont induites après activation via le TCR par des antigènes exogènes. La présence d'IL2 est nécessaire pour cette différenciation qui s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans les tissus. La population périphérique contient donc les cellules nTreg et les cellules iTreg.

## b. Différenciation des nTreg

### a. Rôle du TCR dans la différenciation thymique

La signalisation via le TCR est nécessaire pour le développement des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus et la périphérie (Ohkura et Sakaguchi 2010). Les cellules Treg ne se développent pas dans les souris RAG<sup>-/-</sup> (recombination activating gene) incapables de réarranger le TCR. Une mutation dans un gène codant pour une protéine LAT (linker activated T cell) impliquée dans la transduction du signal via le TCR entraîne une abolition complète de la génération de cellules Foxp3<sup>+</sup> dans la périphérie mais pas des cellules T classiques (Koonpaev *et al.* 2006). Ceci suggère que les cellules Treg ont besoin d'un signal fort via le TCR pour se développer dans le thymus. Les cellules Foxp3<sup>+</sup>Treg se différencient pendant le développement dans le thymus à partir de thymocytes CD4<sup>+</sup> simple positif (SP) qui ont un TCR reconnaissant les auto-antigènes. La différenciation thymique des Treg est un processus en plusieurs étapes ; tout d'abord l'activation via le TCR induit l'expression du CD25 sur les thymocytes CD4<sup>+</sup>SP. Ces précurseurs Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> sont ensuite capables d'induire l'expression de Foxp3 et de se différencier en CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg fonctionnels.

Un co-signal via le CD28 est également primordial pour la différenciation des nTreg comme cela a été montré chez les souris CD28<sup>-/-</sup> ou CD80/86<sup>-/-</sup> chez lesquelles la fréquence des nTreg est très diminuée. Les souris déficientes en CD28 développent un nombre réduit de cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> (Tai *et al.* 2005). La stimulation du CD28 sur des thymocytes préactivés via le TCR induit l'expression de Foxp3 et le programme de différenciation (Tai *et al.* 2005). Les souris NOD déficientes en CD28 ou B7-1/B7-2 développent une forme fulminante de diabète (Salomon *et al.* 2000, Lenschow *et al.* 1996). Le transfert de cellules Treg de type sauvage diminue le développement du diabète chez ces souris déficientes en CD28 (Tang *et al.* 2004). Ces études montrent l'importance du rôle de CD28 dans la génération thymique et le maintien en périphérie des cellules Treg (Ohkura et Sakaguchi 2009).

### b. Rôle des cytokines dans la différenciation thymique

L'implication des cytokines a également été montrée dans la différenciation des nTreg et en particulier dans l'induction de l'expression de Foxp3.

Les souris déficientes pour la chaîne commune  $\gamma$  du récepteur de cytokine ont un nombre de cellules Foxp3<sup>+</sup> réduit aussi bien dans le thymus que dans la périphérie (Fontenot *et al.* 2005).

Cette chaîne est un récepteur partagé par plusieurs cytokines comme l'IL2, l'IL7 et l'IL15. Les souris déficientes en IL2 et IL2R $\alpha$  (CD25) montrent une réduction de 50% des thymocytes Foxp3<sup>+</sup> alors que des souris déficientes en IL7 ou IL15 ont un nombre normal de cellules Treg.

Le rôle de l'IL2/IL2R dans la différenciation des nTreg a été bien étudié. Les premiers travaux montrant l'importance de l'IL2R dans le développement des nTreg sont les suivants. L'expression d'un transgène de l'IL2R $\beta$  spécifiquement dans le thymus rétablit le nombre de cellules nTreg dans le thymus et à la périphérie des souris déficientes en IL2R $\beta$  et empêche le développement de l'auto-immunité observée chez ces souris IL2R $\beta$ <sup>-/-</sup> (Malek *et al.* 2000, Malek *et al.* 2002). De même, les souris déficientes en IL2R $\alpha$  ou IL2R $\beta$ , développent une auto-immunité fatale (Papiernik *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 1995, Willerford *et al.* 1995).

Les études utilisant les souris déficientes en IL2 et IL2R $\alpha$  (CD25) ont conclu que l'IL2 n'est pas indispensable pour la génération de cellules nTreg dans le thymus (D'Cruz et Klein 2005, Fontenot *et al.* 2005, Curotto de Lafaille et Lafaille 2009). Les jeunes souris déficientes en IL2 ont des quantités normales d'ARNm de Foxp3 dans les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> montrant que l'IL2 n'est pas nécessaire pour le développement des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus (Curotto de Lafaille *et al.* 2004). Dans ce cas l'absence d'IL2 serait compensée par la présence d'IL15. En effet, des souris double KO pour l'IL2 et l'IL15 montrent une réduction très importante de cellules Treg. La neutralisation de l'IL2 avec des anticorps induit une forte réduction de l'expression de Foxp3 dans la rate mais pas dans le thymus (Setoguchi *et al.* 2005).

La signalisation via IL2/IL2R implique l'activation du facteur de transcription STAT5 et la kinase JAK3. STAT5 se lie au gène Foxp3 et peut coopérer avec STAT3 pour induire l'expression de Foxp3 (Burchill *et al.* 2007, Li et Flavell 2008). STAT5 et Jak3 sont importants dans le développement des nTreg car les souris STAT5<sup>-/-</sup> et Jak3<sup>-/-</sup> ont une expression respectivement très réduite et inexistante de Foxp3.

Le rôle du TGF $\beta$  dans la différenciation des cellules nTreg est moins clair. Les jeunes souris TGF $\beta$ 1-KO ont un nombre normal de cellules nTreg. Une autre étude montre que les souris avec une délétion conditionnelle du TGF $\beta$ RI dans les thymocytes ont une diminution

transitoire des cellules nTreg dans la première semaine de vie mais la double délétion de TGFβRI et IL2 empêche la génération des cellules nTreg (Liu *et al.* 2008).

c. Mécanisme de différenciation des iTreg

La notion de conversion en périphérie des cellules CD4 naïves résulte d'expériences de transfert dans lesquelles des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïves ont été injectées à des souris lymphopéniques ou ne possédant pas de nTreg. Dans ces conditions, une partie de ces cellules acquière l'expression de Foxp3 et une activité suppressive (de la Faille *et al.* 2004).

La différenciation des cellules iTreg peut être obtenue sous différentes conditions mais elle nécessite au minimum une stimulation via le TCR et la présence des cytokines TGFβ et IL2 *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. Cependant le manque de marqueurs spécifiques permettant de différencier dans la périphérie les nTreg des iTreg rend les études *in vivo* très compliquées.

a. Rôle du TGFβ, de l'IL2 et d'une costimulation

L'addition de TGFβ induit l'expression de Foxp3 dans des cultures de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves stimulées via leurs TCR. Elle induit également l'anergie et l'acquisition de l'activité suppressive *in vitro* par ces cellules. Elles deviennent capables de réduire l'inflammation dans un modèle d'asthme expérimental (Chen *et al.* 2003). De même, le TGFβ induit l'expression de Foxp3 *in vitro* dans les cellules T naïve stimulées avec les anticorps immobilisés anti-CD3 et CD28 (Chen *et al.* 2003) donc sans nécessité de la présence de CPA. La neutralisation du TGFβ *in vivo* empêche la tolérance orale (Faria et Weiner 2005, Kohm *et al.* 2005) et inhibe la différenciation des cellules iTreg spécifiques d'antigène (Mucida *et al.* 2005).

Le mécanisme qui induit l'expression de Foxp3 par le TGFβ implique la coopération des facteurs de transcription STAT3 et NFAT régulant le gène Foxp3 (Fantini *et al.* 2004, Josfowicz et Rudensky 2009, Curotto de Lafaille et Lafaille 2009). L'acquisition de l'activité suppressive et de Foxp3 dans ces conditions d'activation *in vitro* par le TGFβ nécessite une costimulation via le CTLA-4 contrairement au développement des nTreg thymiques (Zheng *et al.* 2006). De même, l'expression de B7 (ligand du CTLA-4) par les cellules hôtes est nécessaire pour la conversion des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en cellules Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, après leur transfert adoptif (Liang *et al.* 2005).

Au contraire, l'activation via le CD28 inhibe la différenciation *in vitro* des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en iTreg après stimulation avec le TGFβ (Benson *et al.* 2007).

b. L'IL2 est essentielle pour la génération et la plasticité des iTreg.

Le rôle primordial de l'IL2 dans l'induction *in vitro* des iTreg a été bien établi.

Dans les cultures *in vitro* des cellules T CD4 naïves stimulées avec l'anti-CD3 et le TGFβ, l'IL2 est nécessaire pour induire leur activité suppressive (Chen *et al.* 2003). Les expériences utilisant des anticorps neutralisants l'IL2 ou des souris déficientes en IL2 ont montré que l'IL2 était nécessaire pour l'induction de Foxp3 et de l'activité suppressive en présence de TGFβ (Zheng *et al.* 2007).

L'IL2 peut aussi remplacer la costimulation par le CD28 pour induire l'expression de Foxp3 après activation par l'anti-CD3 et le TGFβ (Davidson *et al.* 2007). Cependant, les cellules iTreg différenciées *in vitro* n'ont pas besoin d'IL2 pour maintenir leur expression de Foxp3 après leur transfert dans les souris RAG<sup>-/-</sup> (Davidson *et al.* 2007). Le rôle de l'IL2 dans le développement *in vivo* des iTreg est moins clair et moins bien documenté. Une étude a montré que quand on fournit de l'IL2 chez des souris déficientes en IL2 dans les lymphocytes T périphériques il y a production de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> avec une activité suppressive (Furtado *et al.* 2002)

La différenciation en Th17 et Treg est liée (Littman et Rudensky, 2010), et la signalisation via l'IL2R est impliquée dans ce choix entre les deux lignées. Tout d'abord, l'IL2 induit le développement des iTreg (Laurence *et al.* 2007). Les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> sont plus « plastiques » que les cellules Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> à se différencier en Th17 (Komatsu *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009).

d. Rôle de l'IL2 pour la prolifération et l'homéostasie des Treg en périphérie

L'IL2R et l'IL2 sont tous deux nécessaires pour le bon fonctionnement des cellules Treg.

Le rôle de la voie passant par l'IL2R dans l'homéostasie des Treg périphériques a été montré dans des expériences de neutralisation de l'IL2 par des anticorps qui réduit le nombre de Treg périphériques aussi bien chez les adultes que chez les nouveau-nés (Bayer *et al.* 2005, Yu *et al.* 2009). De même, la déficience en IL2 produit une maladie auto-immune/inflammatoire fatale, due à la survie diminuée de cellules Treg (Malek et Bayer 2004).

L'IL2 dans la période néo-natale permet l'amplification dans les ganglions périphériques des Treg provenant du thymus. De même chez les jeunes ou les adultes la multiplication des Treg dépend aussi de l'IL2. Dans des modèles infectieux, il a été montré que l'IL2 était

indispensable au maintien du nombre de Treg et que la mortalité induite par exemple dans l'iléite provoquée par *T. gondii* chez la souris C57BL/6 pouvait être empêchée par l'injection d'IL2 (Oldenhove *et al.* 2009). De même, la compétition pour l'IL2 entre les Treg et les Teff pourrait être à l'origine de l'homéostasie des Treg. En effet, les Treg grâce à leur expression importante de l'IL2R $\alpha$  des récepteurs de haute affinité aurait un avantage vis à vis des Teff pour la consommation de l'IL2. Ces Treg activées supprimeraient les Teff en particulier les T auto réactives.

#### e. Rôle des CD et de l'acide rétinoïque

L'Acide Rétinoïque (RA), un métabolite de la vitamine A, a aussi un rôle important dans l'induction des cellules T régulatrices. Le RA et le TGF $\beta$  sont produits par les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> situées dans la membrane muqueuse de l'intestin et dans les ganglions mésentériques. Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> sont aussi présentes dans la lamina propria mais sont plus rares dans la rate. La production de RA et de TGF $\beta$  par ces CD CD103<sup>+</sup> aident à la différenciation des cellules T naïves en cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> (Coombes *et al.* 2007, Sun *et al.* 2007). Ce mécanisme est bien décrit au niveau de l'intestin où ces cellules sont nombreuses. Au niveau de la rate, les cellules dendritiques CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> produisent du TGF $\beta$  et donc sont capables d'induire la transformation des cellules T naïves en cellules Treg Foxp3<sup>+</sup>. Au contraire, les cellules dendritiques CD8-CD205- DCIR2<sup>+</sup> (DC inhibitory receptor-2) de la rate n'induisent l'expression de Foxp3 qu'en présence de TGF $\beta$  exogène (Yamazaki *et al.* 2008).

## 2. Marqueurs spécifiques de nTreg et iTreg

Bien que des différences existent entre les cellules nTreg et les iTreg en ce qui concerne leur spécificité antigénique, les tissus dans lesquels elles sont générées, il n'existe pas de marqueur phénotypique exprimé préférentiellement par l'une ou l'autre des populations (Feuerer *et al.* 2009). De nombreuses études de transcriptomique ont donc été entreprises pour avoir une signature qui distinguerait les nTreg des iTreg. Ces études ont confirmé la complexité des Treg (en fonction de l'origine, du microenvironnement) mais n'ont pas permis réellement d'avoir un marqueur spécifique des nTreg ou/et des iTreg.

Cependant Hélios, un membre de la famille des facteurs de transcription Ikaros a été proposé comme étant spécifique des nTreg (Thornton *et al.* 2010). Hélios est préférentiellement exprimé au niveau de l'ARNm par les Treg. La disponibilité d'un anticorps spécifique de la

protéine Hélios a permis de montrer que la protéine était exprimée par tous les thymocytes double négatifs et également 100% des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8-Foxp3<sup>+</sup>.

Au contraire son expression dans les tissus lymphoïdes périphériques est restreinte à une sous population (~70%) de cellules T Foxp3<sup>+</sup> chez l'Homme et la souris. De plus, les cellules T naïves murines ou humaines induites *in vitro* via le TCR en présence de TGF-β expriment Hélios. Par contre, les cellules T Foxp3<sup>+</sup> induites *in vivo* par voie orale n'expriment pas Hélios. L'expression d'Hélios avait donc été liée aux nTreg.

Cependant des travaux récents (Akimova *et al.* 2011) ont montré qu'Hélios n'était pas un bon candidat puisque son expression serait plutôt liée à l'activation et la multiplication des cellules T mais pas spécifiquement des CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Hélios est fortement exprimé et de façon transitoire après activation des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> classiques ainsi que des CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

### 3. Spécificité Ag-dépendante de la suppression

#### a. Signalisation via le TCR

La signalisation via le TCR est nécessaire pour le développement de cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus et la périphérie (Ohkura et Sakaguchi 2010).

#### b. TCR et spécificité antigénique des iTreg

Les cellules Treg comme toutes les cellules CD4<sup>+</sup> possèdent un TCR qui a subi des réarrangements somatiques ce qui permet la reconnaissance spécifique de peptides antigéniques dans le contexte des molécules de classe II du CMH. L'activation des cellules T naïves conventionnelles nécessite une reconnaissance spécifique de l'antigène et on peut penser que cela est la même chose pour les Treg.

Les premières études sur l'activité suppressive des Treg, en particulier dans le contrôle de l'auto-immunité, suggéraient que la suppression était indépendante de la spécificité antigénique. De nombreuses études en modèle murin avaient montré que des Treg polyclonaux avaient la capacité de protéger contre de multiples formes d'auto-immunité (Masteller *et al.* 2006). De plus, des études *in vitro* montraient qu'une fois activées via le TCR, les cellules Treg montraient également une activité suppressive sur les autres cellules T avec une spécificité antigénique autre ou «effet bystander» (Takahashi *et al.* 1998, Ohkura et Sakaguchi 2010).

Il apparaît maintenant que la suppression serait bien antigène dépendante. De nombreux Treg avec une spécificité antigénique particulière ont été décrits. Par exemple, dans le modèle

d'EAE, des Treg spécifiques de la protéine de myéline (MBP) ont été détectées (Hori *et al.* 2002).

Il a également été montré que ces iTreg spécifiques d'antigène ont une activité suppressive plus importante que les nTreg ou les Treg polyclonaux. Par exemple, les Treg spécifiques d'un auto antigène pancréatique sont plus efficaces dans la prévention du diabète en modèle murin que des cellules Treg polyclonales (Tang *et al.* 2004). De plus chez des patients souffrant de mélanomes à un stade avancé, il a été montré que les cellules Treg et Th étaient activées par les mêmes épitopes de l'antigène tumoral (Fourcade *et al.* 2010).

#### 4. Plasticité

Les cellules Treg sont très hétérogènes mais seraient également très « plastiques » et pourraient selon l'environnement (inflammation ou lymphopénie) être converties en Foxp3<sup>-</sup>. Cette plasticité des Treg reste un sujet très controversé et très discuté (Bailey-Bucktrout et Bluestone 2011).

Quatre grandes lignées de CD4 Th sont actuellement reconnues. Th1, Th2, Th17 et Treg dont la différenciation dépend de l'environnement (cytokines) et de l'activation de facteurs de transcription spécifiques de chaque lignée, T-bet pour TH1, GATA3 (TH2), RORγt (TH17) et Foxp3 (Treg). Les autres lignées (Th3, Th9, Tr1) seraient dérivées de ces 4 grands groupes.

De plus en plus d'études ont montré que plusieurs facteurs de transcription trouvés chez les cellules Th sont exprimés chez les cellules Treg. Les cellules exprimant les facteurs de transcription Foxp3 et RORγ-t ont été trouvées *in vivo* chez la souris et chez l'Homme (Zhu & Paul 2010). Il a été suggéré que ces cellules sont les précurseurs des cellules Th17 et les cellules Treg induites (iTreg) (Fig. 4) (Wan et Flavell 2009, Hory 2010, Zhu et Paul 2010).

##### a. Interconversion Treg/Th17, Th1 Th2

Les cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> peuvent se différencier pour contrôler les réponses immunes de type Th1 ou Th2, et acquérir des facteurs de transcription spécifiques des populations Th1 ou Th2 (Sakaguchi *et al.* 2009).

##### a. Relation Treg/Th1

Les cellules nTreg peuvent exprimer T-bet dont l'expression augmente dans ces cellules quand elles sont dans un environnement cytokinique de type Th1 (Koch *et al.* 2009). Dans ces conditions, il y a également augmentation de l'expression du récepteur pour les chimiokines

CXCR3 (qui est sous le contrôle de T-bet), ce qui guide les Treg vers les sites inflammatoires de type Th1 (Koch *et al.* 2009). De plus, les Treg n'exprimant pas T-bet prolifèrent moins bien dans un environnement de type Th1 et ne régulent plus efficacement les réponses Th1 indésirables. Un niveau bas de T-bet dans les cellules Treg peut induire l'expression CXCR3 mais pas de l'IFN $\gamma$ .

L'expression concomitante de T-bet et Treg a aussi été décrite dans le cas de toxoplasmose létale chez la souris C57BL/6 (Oldenhove *et al.* 2009). Dans ce cas, il y a également augmentation de l'expression de CXCR3 mais les Treg ne sont pas dirigées vers le site de l'infection. Elles conservent également leur activité suppressive dans ces conditions et acquièrent la capacité de produire de l'IFN $\gamma$ .

Une population cellulaire exprimant T-bet et Foxp3 peut produire de l'IFN $\gamma$ , et en même temps garder son activité régulatrice (Stock *et al.* 2004, Zhu et Paul 2010).

Il est probable que le rapport d'expression du Foxp3 vis-à-vis des autres facteurs de transcription soit crucial pour maintenir la fonction des cellules Treg. Foxp3 peut former des complexes avec les autres facteurs de transcription comme T-bet, GATA3 ou ROR $\gamma$ -t pour réduire la production des cytokines effectrices par ces derniers (Zhu et Paul 2010).

#### b. Relation Treg/Th2

Des liens entre Th2 et Treg ont également été établis. Tout d'abord, la différenciation des Th2 et des Treg fait appel à l'activation de STAT5 via l'IL2. De même, la relation entre Th2 et Treg est aussi illustrée par le fait que les souris «scurfy» aient une réponse de type Th2. Ce biais vers une réponse Th2 n'est pas dû à l'absence de Treg mais plutôt à l'absence de la fonction régulatrice des Treg chez ces souris. Foxp3 contrôle également l'expression de facteur de transcription de type Th2, IRF-4 (Interferon Regulatory Factor 4) (Zheng *et al.* 2009). La délétion d'IRF-4 spécifiquement dans les Treg, abroge l'activité suppressive des Treg vis-à-vis des réponses de type Th2 mais pas de type Th1, produisant spontanément le développement d'une réponse incontrôlée de type Th2 (Zheng *et al.* 2009, Sakaguchi *et al.* 2009).

#### c. Relation Treg/Th17

La relation étroite entre les cellules Th17 et les iTreg a été décrite. Il a été montré que les cellules CD4<sup>+</sup> Th murines se différencient de manière mutuellement exclusive en Th17 ou

Treg (pour revue Weaver et Hatton 2009). Les deux lignées ont besoin de TGF $\beta$  pour se différencier. Quand des CD4 naïves sont activées via le TCR en présence de TGF  $\beta$  et d'IL6, elles se différencient en Th17. Le TGF $\beta$  est capable d'induire dans ces cellules l'expression de Foxp3 et de ROR $\gamma$ t. Dans ces conditions, Foxp3 et ROR $\gamma$ t s'associent ce qui inhibe l'activité de ROR $\gamma$ t qui n'agit plus comme un activateur de transcription. En présence d'IL6 l'inhibition est levée et la différenciation en Th17 est initiée. Ce lien entre les deux populations a aussi été observé *in vivo* en utilisant des souris génétiquement modifiées dans lesquelles on peut marquer avec la GFP les cellules exprimant au cours de leur vie Foxp3. Dans ces conditions, il a été montré que 25% des cellules produisant de l'IL17 exprimaient ou avaient exprimé Foxp3 au cours de leur vie (pour revue Ziegler et Buckner 2009). Ces données supportent l'hypothèse d'un précurseur commun entre ces deux populations Th17 et Treg. Elles supposent aussi que les Treg comme les Th17 ne sont pas complètement différenciées et qu'elles restent très « plastiques » et instables.

#### b. Cellules « exFoxp3 » et instabilité des Treg

La controverse existe entre les différentes études sur la stabilité des Treg.

Plusieurs publications ont décrit la perte d'expression de Foxp3 et l'activité suppressive dans certaines conditions expérimentales comme dans un environnement lymphopénique ou inflammatoire (pour revue, Bailey-Buckner 2011, Hori 2011). D'autres expériences utilisant des souris transgéniques, dont on peut suivre la population Foxp3 du début de son développement et tout le long de la vie de la souris, montrent que l'expression de Foxp3 serait relativement stable.

## 5. Homing et migration

#### a. Chimiokine et développement thymique

Les chimiokines sont des molécules clés régulant le trafic des leucocytes. Bien que la plupart des chimiokines soient sécrétées dans des conditions inflammatoires, deux d'entre elles CCL21 et CCL19 sont constitutivement exprimées et contrôlent les mouvements cellulaires à l'homéostasie. Le récepteur de ces chimiokines est le CCR7.

Les nTreg se développant dans le thymus sont une population homogène exprimant CCR7. Ces cellules ressemblent à des lymphocytes T conventionnels naïfs et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules nTreg peuvent se développer dans le thymus en absence

de CCR7. Le nombre total des cellules T Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus de souris CCR7KO est comparable à celui des souris sauvages (Schneider *et al.* 2007) cependant, leur activité suppressive *in vivo* est défectueuse. La cause principale de cette incapacité est due à leur incapacité à migrer dans les zones T des ganglions (Schneider *et al.* 2007, Menning *et al.* 2007, Kocks *et al.* 2007).

Les cellules nTreg sont divisées en deux sous populations selon leur expression de CD103. Les cellules nTreg qui expriment CD103, sont des Treg effectrices et les cellules nTreg qui n'expriment pas CD103 sont les Treg naïves (Huehn *et al.* 2004). Les cellules nTreg naïves assurent leur fonction suppressive dans les ganglions. Les cellules nTreg effectrices migrent dans les tissus périphériques où elles exercent leur activité suppressive. Il a été suggéré que ces 2 phénotypes représentaient 2 stades de développement de la même lignée. Les cellules Treg à la sortie du thymus seraient CCR7<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> et migreraient vers la périphérie où elles acquerraient leur phénotype effecteur. Cependant cette hypothèse est invalidée par le fait que dans les souris CCR7KO les cellules CD103<sup>+</sup> prédominent. De plus, ces cellules, en l'absence de CCR7, sont bien capables de migrer en périphérie mais n'ont plus d'activité suppressive.

#### b. Migration dans les sites lymphoïdes et non lymphoïdes

Les Treg sont présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires mais également dans la plupart des tissus non lymphoïdes même en absence d'inflammation (pour revue Campbell et Koch 2011) (Tableau 3).

Les Treg peuvent migrer et s'accumuler aux sites d'inflammation et d'infection comme la peau, le pancréas, les muqueuses, le cerveau, les tumeurs, les poumons, (Huehn *et al.* 2005, Siegmund *et al.* 2005, Huehn & Hamann 2005). Cependant dans la plupart des circonstances, comme par exemple lors de colite expérimentale, les Treg migrent à la fois vers les ganglions drainants et les sites inflammés (Mottet *et al.* 2003). La question se pose de savoir si les Treg jouent leur rôle tout d'abord dans les tissus puis dans les ganglions drainants ou l'inverse.

Le comportement migratoire des cellules Treg a un effet crucial sur leur activité suppressive *in vivo* (Huehn *et al.* 2005, Siegmund *et al.* 2005, Huehn et Hamann 2005).

#### c. Recrutement aux sites inflammatoires

Le recrutement des Treg vers les tissus est fortement augmenté en conditions inflammatoires. Cependant, la contribution des différents récepteurs de chimiokines (CCR) dans cette

migration varie considérablement en fonction du tissu impliqué et du type de réponse inflammatoire.

Les cellules Treg et les Teff recrutées dans un même site d'inflammation expriment des CCRs similaires (Sakaguchi *et al.* 2009). L'expression de certains CCRs sur les Treg guiderait ces cellules vers les CPA produisant la chimiokine correspondante et les autres types de cellules Teff exprimant les mêmes CCR, facilitant le contact cellulaire nécessaire à une suppression efficace (D'Ambrosio *et al.* 2003, Iellem *et al.* 2003).

Par exemple, les cellules Treg migrant dans les sites d'inflammation de type Th17 expriment le CCR6 qui est aussi exprimé par les cellules Th17 sous contrôle du facteur de transcription, ROR $\gamma$ t (Hirota *et al.* 2007). La présence des cellules Treg dans les organes lymphoïdes et dans les tissus inflammés assurent la suppression dans la phase primaire, dans les organes lymphoïdes et le contrôle des réponses tardives directement dans les tissus inflammés (Huehn et Hamann 2005). Des travaux anciens suggéraient qu'il existait une division du travail entre les différentes sous populations des cellules Treg, c'est-à-dire que deux populations différentes de Treg migraient soit vers les organes lymphoïdes soit vers les tissus (pour revue, Huehn et Hamann 2005). Des études plus récentes, en particulier une étude d'allogreffe, montre que les Treg migreraient de façon séquentielle d'abord du sang vers le greffon puis vers le ganglion drainant (Zhang *et al.* 2009). Ce trafic serait essentiel pour une fonction suppressive optimale dans ce modèle en particulier « l'éducation » des Treg au site de l'inflammation serait primordiale. L'utilisation de cellules Treg provenant de souris KO pour différents CCR a permis de montrer que la migration du sang au greffon dépendait de CCR2, 4 et 5 et que la migration vers le ganglion drainant dépendait de CCR2, 5 et 7. Ces études qui doivent être complétées par d'autres montrent bien la complexité de la migration des Treg pendant une inflammation.

## VII. Outils pour étudier les cellules Treg

Plusieurs types d'approche ont permis l'étude des cellules Treg *in vivo*. Tout d'abord l'utilisation de souris transgéniques, mais aussi l'utilisation d'anticorps agonistes ou antagonistes permettant d'inhiber ou d'activer les cellules Treg *in vivo* (Tableau 6). D'autres techniques, comme les transferts de cellules Treg avec ou sans amplification *in vitro* ou encore l'utilisation de différentes molécules permettant l'expansion *in vivo* des cellules Treg, ont été utilisées dans les différents modèles expérimentaux pour étudier le rôle des Treg *in vivo*.

## 1. Les souris

La découverte de l'importance primordiale de Foxp3 dans l'activité suppressive des Treg a permis de développer des souris soit déficientes en Foxp3 soit sur exprimant ce gène.

Les souris appelées «DEREG» (DEpletion of REGulatory T cells) sont des souris chez lesquelles le récepteur de la toxine diphtérique (DT) a été transfecté sous le contrôle du promoteur de Foxp3. Une seule injection de DT est suffisante pour éliminer de façon sélective et efficace les cellules Treg chez ces souris DEREG (Lahl *et al.* 2007). Cela permet la déplétion pendant des temps plus ou moins longs des cellules Treg. Ces souris constituent donc un très bon modèle de souris transgéniques pour étudier le rôle des cellules Treg (Lahl *et al.* 2007, Kim *et al.* 2007).

La déplétion des cellules Treg chez les souris DEREG conduit au développement de symptômes ressemblant à ceux des souris «scurfy» avec une splénomégalie, une lymphadénopathie, une insulite et une inflammation de la peau (Lahl *et al.* 2007). De nombreuses variantes de ces souris ont été fabriquées avec l'adjonction en fusion de molécules fluorescentes comme la GFP et/ou la luciférase ce qui permet de suivre les cellules Foxp3<sup>+</sup> par fluorescence et bioluminescence (Suffner *et al.* 2010).

La limite de l'utilisation des souris DEREG est que la déplétion n'est pas complète mais de l'ordre de 95-98%. De plus, après 2 semaines de traitement à la DT, il y a ré expansion de cellules Foxp3<sup>+</sup>Treg n'exprimant pas la GFP (donc n'exprimant pas le transgène).

Des lignées de souris sur exprimant Foxp3 (Foxp3Tg) ont aussi été générées. Des croisements avec les mutants naturels «scurfy» ont également été produits et utilisés pour comprendre l'implication de différentes sous populations ou cytokines dans les phénomènes d'auto-immunité (Sharma et Ju 2010).

La plupart de ces souris ont un fond génétique C57BL/6 ce qui est un facteur limitant pour un certain nombre d'études.

## 2. Les anticorps ou agonistes dirigés contre les marqueurs membranaires anti CTLA-4, GITR, CD25, cytokines qui activent ou inhibent les Treg.

### a. Anti-CD25

Avant la caractérisation de Foxp3 le principal outil disponible pour supprimer les cellules Treg *in vivo* était l'anti-CD25. La déplétion avec cet anticorps a été et est toujours largement utilisée pour étudier l'implication des Treg dans différentes pathologies comme les maladies

auto-immunes (Sakaguchi *et al.* 1995), le cancer (Onizuka *et al.* 1999), les infections parasitaires, virales, bactériennes (Long *et al.* 2003, Hisaeda *et al.* 2004, Vigário *et al.* 2007, Couper *et al.* 2007, Couper *et al.* 2008, Mendez *et al.* 2004, Okwor *et al.* 2009, Kotner et Tarleton 2007).

Les anticorps monoclonaux PC61 (IgG1 de rat) et 7D4 (IgM de rat) qui bloquent la fixation de l'IL2 sur son récepteur sont les plus utilisés (Sakaguchi *et al.* 1995, Couper *et al.* 2007).

Les mécanismes de déplétion après injections de ces anticorps sont mal connus. Cependant il a été montré pour l'anticorps 7D4 que celui-ci induisait soit une régulation négative du récepteur CD25 soit un relargage de CD25 de la surface des cellules et non pas une disparition de la population cellulaire ciblée puisque le pourcentage de cellules Foxp3<sup>+</sup> n'était pas diminué après injection de cet anticorps (Kohm *et al.* 2006, Couper *et al.* 2007).

De même, l'injection aux souris de l'anticorps PC61 induit une forte réduction de la population TregFoxp3<sup>+</sup> mais pas une déplétion totale puisque les cellules CD25<sup>low</sup> et CD25-Foxp3 ne sont pas éliminées. Cette réduction est de l'ordre de 45 à 60% des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sur les cellules de rate de souris (Couper *et al.* 2007, Zelanay et Demengeot 2006). L'efficacité de déplétion n'est pas dépendante de la dose d'anticorps injectée puisque dès 200 µg d'anticorps purifiés on obtient ce taux de déplétion et l'augmentation de la dose a seulement pour effet d'augmenter la durée de déplétion. L'effet de la déplétion avec le clone PC61 se maintient pendant au moins 13 jours après l'injection de 750 µg d'anticorps (Couper *et al.* 2007).

Si la déplétion des cellules CD25<sup>+</sup> avec ces anticorps s'est montrée efficace dans de nombreuses études, dans des conditions inflammatoires il apparait que la déplétion peut également toucher des cellules activées effectrices comme cela a été montré en phase aiguë de la toxoplasmose (Couper *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2011).

#### b. Anticorps déplétants ou neutralisants

Divers anticorps spécifiques d'antigènes de membrane comme GITR ou CTLA-4 ont été utilisés pour intervenir sur les cellules Treg aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

La fixation des anticorps anti-GITR sur les Treg inhibe leur fonction suppressive. Quand des anticorps anti-GITR sont ajoutés *in vitro*, ils inhibent l'activité suppressive des Treg (Shimizu *et al.* 2002).

L'injection *in vivo* d'anticorps anti-GITR induit soit une expansion de Treg ou alors une déplétion de ces cellules selon l'anticorps injecté (Coe *et al.* 2010) ou une diminution de la stabilité des Treg qui perdent l'expression de Foxp3 (Cohen *et al.* 2010). Le rôle des anticorps anti-CTLA-4 est également controversé d'une expérience à l'autre selon l'anticorps et le modèle infectieux.

### c. Anticorps anti-cytokines

L'IL2 est indispensable pour le maintien des cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans la périphérie. La source principale de l'IL2 provient des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup> activées incluant les cellules T réactifs au soi (Setoguchi *et al.* 2005).

L'injection d'anticorps anti-IL2 provoque une diminution importante des Treg. L'anti-IL2 bloque l'attachement de l'IL2 sur son récepteur IL2R et donc diminue le nombre de cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pour une durée limitée et initie des maladies auto-immunes de la même façon que celles produites après la déplétion des Treg. Le traitement des souris NOD avec un anti-IL2 induit le diabète de façon précoce vis-à-vis des souris non traitées. De plus ces souris souffrent également de nombreuses maladies auto-immunes comme la gastrite, la thyroïdite, la sialoadénite, et une neuropathie sévère. De même l'utilisation de protéines recombinantes de fusion composées de fragments de la toxine diphtérique et de l'IL2 induit une déplétion des Treg en ciblant et détruisant les cellules exprimant le CD25 (Matsushita *et al.* 2008)

Les anticorps anti-IL10R et anti TGF pourraient également être utilisés pour manipuler les cellules Treg (Taher *et al.* 2008). Ils ont été utilisés dans un modèle murin d'allergie respiratoire (AHR : Airway Hypersensitivity Reaction) et ont conduit à une amélioration de la pathologie (Taher *et al.* 2008).

## 3. Les produits induisant la multiplication et l'expansion des Treg

De par leur faible nombre et leur importance dans de nombreuses pathologies, plusieurs stratégies de multiplication *ex vivo* de Treg, en particulier pour les cellules humaines ont été développées.

Plusieurs produits peuvent être utilisés pour induire la multiplication et l'expansion des cellules Treg *in vitro*, à des fins thérapeutiques ou expérimentales ou *in vivo*.

#### a. La rapamycine

La rapamycine est connue depuis des années comme une molécule immunosuppressive. Elle agit sur un facteur de transcription le mTOR (mammalian Target of Rapamycin) en inhibant la signalisation de réponses aux cytokines et facteurs de croissance. Elle supprime la synthèse des protéines et la progression dans le cycle cellulaire. L'adjonction de rapamycine dans des cultures de cellules murines *in vitro* augmente le nombre et la fonction suppressive des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> après plusieurs semaines de culture. Elle induit également l'expansion de Treg transférés *in vivo* (pour revue Wekerle 2008). Un effet semblable a été décrit pour les cellules Treg humaines pour lesquelles la rapamycine induit *in vitro* l'expansion des Treg et l'inhibition de la prolifération des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effecteurs. La rapamycine bloque la prolifération des cellules effectrices conventionnelles mais facilite la prolifération des cellules nTreg et iTreg *in vitro* (Battaglia *et al.* 2006, Kang *et al.* 2008, Long et Buckner 2008). Les cellules Treg sont résistantes à l'inhibition de la rapamycine parce que seule la voie STAT5 est activée dans les cellules Treg mais pas le mTOR, qui est la cible de la rapamycine (Bayer et Malek 2008, Malek et Castro 2010). La rapamycine augmente l'activité suppressive des cellules iTreg *in vitro* (Bocian *et al.* 2010).

#### b. La vitamine D3

La vitamine D3 (Vit D3) est également une molécule immunosuppressive et de nombreuses études chez l'Homme et l'animal ont montré qu'elle avait un effet inhibiteur sur la maturation et la différenciation des CD *in vitro*. De plus des études épidémiologiques montrent de plus en plus d'association entre le taux de Vit D3 et des infections ou maladies auto-immunes. Chez la souris l'apport de Vit D3 dans l'alimentation a montré par exemple une expansion de Treg et la prévention du développement du diabète chez la souris NOD. Les cellules Treg peuvent être induites chez les souris en utilisant une forme active de vitamine D3 soit dans la forme injectable (Taher *et al.* 2008) soit par l'application topicale de son analogue (Ghoreishi *et al.* 2009).

#### c. Anti-CD3, CD28, IL2

La combinaison des anticorps Anti-CD28 et anti-CD3 en présence d'IL2, pour stimuler *in vitro* les cellules Treg isolées, permet la multiplication de ces cellules jusqu'à 200 fois le nombre original. Ces cellules Treg multipliées *in vitro* gardent leurs fonctions régulatrices et peuvent être congelées dans l'azote liquide (Ring *et al.* 2007). Cependant c'est une expansion polyclonale et les nouvelles techniques d'expansion ont pour but la multiplication de Treg

spécifiques d'un antigène particulier. Cette multiplication a été obtenue pour plusieurs antigènes. En particulier, dans le modèle de souris diabétiques NOD, l'expansion de Treg spécifiques d'un peptide a été obtenue *in vitro* en remplaçant l'anti-CD3 par une molécule de classe II recombinante chargée avec ce peptide (Jang *et al.* 2003). De même, des CD chargées avec des peptides sont capables d'induire l'expansion de Treg spécifiques (pour revue, Masteller *et al.* 2006).

#### d. Complexes IL2-anti-IL2

L'injection à la souris de complexes composés d'IL2 couplés à certains anticorps anti-IL2 induit spécifiquement une expansion de Treg (Boyman *et al.* 2006). L'anticorps JES6-1 couplé à l'IL2 induit cette expansion préférentielle et a montré son efficacité à traiter l'asthme, ainsi que l'encéphalite expérimentale (EAE) chez la souris. Ces complexes sont maintenant largement utilisés pour induire *in vivo* les Treg chez la souris.

### 4. Les produits diminuant la multiplication des cellules Treg

#### a. La toxine pertussique

La toxine pertussique diminue le nombre et le pourcentage des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> spléniques après injection chez la souris C57BL/6. L'utilisation de cette toxine associée à l'anti-CD25 conduit à l'aggravation de l'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris (Cassan *et al.* 2006).

L'utilisation de ces outils permettant l'expansion *in vitro* ou *in vivo* ou la déplétion des Treg a permis de déterminer le rôle de ces cellules dans les maladies auto-immunes, la tolérance materno-fœtale, mais également dans les maladies infectieuses.

Tableau 6 : Les produits modulant l'activité des cellules Treg (modifié d'après Trzonkowski *et al.* 2009)

<b>Produits</b>	<b>Fonctions</b>
Vitamine D3 (calcitriol)	Augmente la capacité suppressive des cellules Treg Induit la tolérance orale en induisant les cellules Th3
Rapamycine	Un médicament immunosuppresseur induisant préférentiellement les cellules Treg <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
Inhibiteurs de Calcineurine	Un groupe des médicaments immunosuppresseurs qui diminuent fortement le nombre de cellules Treg <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> et inhibent leur fonction via l'inhibition de l'IL2
Glucocorticoïdes	Le traitement avec les glucocorticoïdes augmente le nombre des cellules Treg en périphérie
Alemtuzumab (anti-CD52 anticorps)	Certaines études montrent une augmentation des effets sur les cellules Treg et d'autres aucun effet
IL2	Abroge la fonction suppressive de cellules Treg Nécessaire dans le développement et la prolifération de cellules Treg
Cyclophosphamide	Un médicament anticancéreux qui diminue le nombre de cellules Treg dans le corps
Fludarabine	Un médicament anti cancéreux qui diminue le nombre de cellules Treg dans le corps
Estrogènes	Estrogènes augmentent les cellules Treg Foxp3 <sup>+</sup> , un phénomène lié à l'immunosuppression pendant la gestation et la phase lutéale du cycle menstruelle. Estrogènes causent une augmentation de l'expression de PD-1
Acide Rétinoïque	Induit la multiplication et le « homing » des cellules Treg vers l'intestin

## E. Cellules Treg dans les infections

La survie à une infection nécessite la génération d'une réponse immunitaire contrôlée de l'hôte qui reconnaît le pathogène et l'élimine tout en limitant les dommages collatéraux dus à la destruction des tissus environnants. De façon concomitante, le pathogène lui-même doit réguler la réponse de l'hôte pour assurer sa survie et sa transmission. Beaucoup de pathogènes se sont adaptés en développant des mécanismes divers d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Le rôle des Treg aussi bien des nTreg que des iTreg spécifiques du pathogène est étudié de façon importante depuis les 10 dernières années dans diverses infections. Différentes études ont été faites pour révéler le rôle des cellules Treg dans la protection ou la sensibilité des hôtes aux différents pathogènes. La plupart de ces études ont été faites chez la souris utilisant différents modèles d'infections bactériennes, virales et parasitaires pour la plupart dans des modèles d'infections chroniques (pour revues Majlessi *et al.* 2008, Belkaid *et al.* 2006, Belkaid 2007, Demengeot *et al.* 2006, Wilson et Maizels 2004 et 2006). Ces modèles d'infections montrent que le rôle de cellules Treg est variable d'un pathogène à l'autre, d'une souche à l'autre du même pathogène selon la virulence de la souche utilisée et aussi selon la génétique de la souche de souris utilisée. Chez l'Homme la plupart des études analyse les Treg dans le sang ce qui peut apporter un biais puisque dans les infections chroniques par exemple, les Treg s'accumulent de façon préférentielle dans les tissus et rarement dans le sang. De plus la caractérisation phénotypique des Treg chez l'Homme est variable d'une étude à l'autre et est basée soit sur les marqueurs CD25 et Foxp3 seuls ou associés à d'autres marqueurs comme CD127.

Le rôle précis de chacune des populations nTreg et iTreg dans un contexte infectieux est difficile à déterminer puisque ces deux populations sont présentes en périphérie et ne peuvent pas être différenciées du point de vue phénotypique. De plus, l'utilisation de l'anti-CD25 dans un contexte infectieux a montré ses limites puisque par définition, il y a activation après infection et la déplétion avec cet anticorps peut toucher aussi bien les Treg que les T<sub>H</sub>17 activés. C'est sans doute pour cette raison que différentes expériences avec les mêmes pathogènes et les mêmes lignées de souris donnent des résultats différents selon la cinétique d'injection de l'anticorps.

## I. Mise en évidence de l'expansion des Treg au cours des infections

Dans de nombreux modèles infectieux une augmentation de la population Foxp3<sup>+</sup> est observée aussi bien dans des modèles animaux expérimentaux que chez les patients (Tableau 7). L'accumulation de Treg lors d'infection peut provenir soit de l'expansion de nTreg ou iTreg spécifiques du pathogène ou alors localement du recrutement dans les sites infectés des Treg. Les infections chroniques virales sont liées à une réponse immune faible, une fonction détériorée des CD (Li *et al.* 2008) et une augmentation des cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> (Ebinuma *et al.* 2008, Ward *et al.* 2007). Par exemple, chez les patients qui sont infectés en phase chronique par le VIH, le nombre de Treg circulant est faible par contre dans certains tissus infectés ce nombre est beaucoup plus important que chez des individus non infectés. L'accumulation des Treg dans les différents tissus infectés pourrait être la cause de cette diminution dans le sang. Les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC) sont responsables d'infections chroniques. Chez les patients infectés par le VHB en phase chronique, le nombre de Treg Foxp3<sup>+</sup> est fortement augmenté dans le sang et le foie. De même, chez les patients infectés par le VHC le nombre de Treg est plus important dans le sang.

Chez l'Homme, le nombre de cellules Treg augmente dans le sang et aux sites d'infection chez les patients infectés avec *Mycobacterium tuberculosis* et présentant une tuberculose active. Le nombre de cellules Foxp3<sup>+</sup> est corrélé inversement avec l'immunité locale spécifique contre les mycobactéries (Hougardy *et al.* 2007).

*Helicobacter pylori* provoque des infections chroniques chez l'Homme, qui peuvent être traités avec les antibiotiques, pourtant, les personnes guéries ne sont pas résistantes à la réinfection. Une augmentation des transcrits de Foxp3 et de TGFβ est trouvée dans la muqueuse gastrique des individus infectés avec *H. pylori* (Kandulski *et al.* 2008). Les cellules T mémoires périphériques du sang des individus infectés et non infectés, prolifèrent en réponse à l'antigène de *H. pylori* mais la déplétion de cellules Treg n'augmente la prolifération que des cellules des individus infectés suggérant la présence des cellules Treg spécifiques de *H. pylori* (Lundgren *et al.* 2003).

L'augmentation de cellules Treg Foxp3<sup>+</sup> spécifique d'antigène, a aussi été observée chez les souris infectées avec *Listeria monocytogenes* (Ertelt *et al.* 2009).

Les infections par les filaires et par les helminthes en général induisent une immunosuppression. Dans la plupart des modèles murins d'infection avec des filaires (comme *Brugia malayi* ou *Heligmosoides polygyrus* ou *Litosomoides sigmodontis*), ou lors de la schistosomiase, il y a une expansion des cellules Treg. *Brugia malayi* sécrète un homologue de TGFβ de mammifère (Gomez-Escobar *et al.* 2000) qui pourrait induire la conversion de cellules Treg chez son hôte.

### 1. Rôles bénéfiques des Treg dans les infections.

La présence des Treg au cours des infections peut se révéler bénéfique ou délétère pour l'hôte. Trois études indépendantes ont mis en évidence au même moment le rôle des Treg contre 3 pathogènes différents un champignon, (*Pneumocystis carinii*), une levure (*Candida albicans*) et un protozoaire (*Leishmania major*) (pour revue Demengeot 2006). Dans tous ces cas les Treg maintiennent l'infection mais limitent l'immunopathologie associée.

Le rôle « protecteur » des Treg contre l'immunopathologie associée à diverses infections bactériennes, virales et parasitaires a été décrit depuis ces premiers travaux. Les cellules Treg chez les souris infectées avec *Helicobacter hepaticus* contrôlent les réponses immunes innées, diminuent l'inflammation intestinale et augmente la survie des souris. Dans ce modèle expérimental, l'activité suppressive des Treg est dépendante de l'IL10 et du TGFβ (Kullberg *et al.* 2002, Maloy *et al.* 2003). De même, les Treg limitent les gastrites dues à une infection par *H. pylori*.

Il a été suggéré que les cellules Treg jouaient un rôle dans le contrôle de l'inflammation chronique et des lésions du foie chez les porteurs du VHC. En effet, il existe une corrélation inverse entre la production de TGFβ spécifique du VHC par les cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et les lésions du foie (Bolacchi *et al.* 2006). De plus, les personnes chroniquement infectées avec VHC et qui ont moins de cellules Treg, développent une auto-immunité (Boyer *et al.* 2004).

Les infections chroniques par *Schistosoma mansoni* chez les souris illustrent bien le rôle protecteur des cellules nTreg contre l'immunopathologie. L'élimination des cellules nTreg chez la souris entraîne des dommages au niveau du foie (Hesse *et al.* 2004).

Un autre rôle bénéfique des Treg est le maintien de la mémoire immunitaire. Les travaux de Belkaid ont montré que la persistance du parasite, en l'occurrence leishmania, était nécessaire

pour le maintien de la réponse à une infection ultérieure. Cette persistance était due à la présence de Treg aux sites primaires de l'infection (Belkaid *et al* 2002).

Un autre aspect bénéfique des Treg est la conséquence de l'effet « bystander » de la suppression. « L'hypothèse hygiéniste » est la conséquence du rôle des Treg « infectieux » dans le contrôle des allergies.

Une augmentation des cas d'allergies en Europe et dans les autres pays développés, serait une conséquence d'un stress infectieux diminué dans l'enfance (Will-Karp *et al.* 2001) dus aux meilleures conditions d'hygiène. Il est suggéré que le mécanisme pourrait être lié à une diminution de cellules Treg.

L'observation de l'incidence des allergies dans des populations infectées par les helminthes et les expériences de co-infection chez la souris supporte ce modèle.

Les relations inverses entre les infections parasitaires induisant une réponse de type Th2 et le développement d'allergie comme l'asthme sont bien décrites. De plus les différents modèles murins d'infections par des helminthes ont confirmé ce lien entre l'infection parasitaire et la protection contre le développement de l'allergie. Par exemple, l'induction des cellules Treg après des infections parasitaires intestinales, diminuent l'intensité des réponses effectrices et protègent contre l'inflammation des voies respiratoires (Wilson *et al.* 2005a). L'exposition de souris à l'antigène de *Schistosoma mansoni*, prévient le développement de diabète de type-1 dans les souris NOD (Zaccone *et al.* 2003) et la colite expérimentale (Elliott *et al.* 2003). L'infection de souris avec *Heligmosomoides polygyrus* diminue la réponse immunitaire aux allergènes (ovalbumine, l'antigène Der p1). Cette diminution de la réponse immunitaire dépend de l'activité des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mais est indépendante de l'IL10 (Wilson *et al.* 2005a). De plus, les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> des souris infectées avec *Heligmosomoides polygyrus* mais non allergiques, ont une activité régulatrice forte qui peut transférer la tolérance aux souris non infectées mais allergiques (Wilson *et al.* 2005a).

De même, les bactéries probiotiques sont bénéfiques dans les inflammations intestinales par l'induction des Treg. La présence de microorganismes symbiotiques et/ou pathogéniques dans les intestins ou les autres tissus, pourrait maintenir un réservoir des cellules Treg naturelles et/ou induites, qui ensuite, pourraient maintenir l'homéostasie du système immunitaire de l'hôte et augmenter le seuil nécessaire pour activer et induire une réponse immunitaire

(Wilson et Maizels 2004 et 2006, Maizels 2005). L'augmentation du seuil d'activation et d'induction de la réponse immunitaire, est bénéfique pour réduire les réponses immunes aberrantes comme l'allergie et les maladies auto-immunes (Wohlfert et Belkaid 2008).

## 2. Rôle délétère des Treg dans les infections

Les Treg ont aussi un rôle délétère en induisant la persistance du pathogène. Dans un modèle de filariose, on observe une accumulation de cellules nTreg dans la cavité thoracique. L'élimination de ces cellules entraîne l'élimination du parasite et protègent les animaux contre la maladie (Taylor *et al.* 2005, Belkaid 2007). Les cellules Treg contrôlent les réponses immunes effectrices chez les souris infectées avec *Litomosoides sigmodontis* et sont responsables de la persistance parasitaire (Taylor *et al.* 2005, Belkaid et Rouse 2005). La diminution de l'activité des cellules Treg en utilisant des anticorps monoclonaux, augmente la réponse immune contre le parasite et entraîne l'élimination des vers adultes de *Litosomosoides sigmodontis* (Taylor *et al.* 2005).

Le rôle de cellules T régulatrices a aussi été étudié dans certaines infections bactériennes intracellulaires comme par exemple dans le cas de *Salmonella*. Ici encore les cellules Treg jouent un rôle dans la persistance de l'infection en diminuant la réponse effectrice dans les trois à quatre premières semaines d'infection mais ensuite ces cellules Treg laissent la place aux cellules T effectrices pour réduire la charge bactérienne (Johanns *et al.* 2010).

La déplétion des cellules T  $CD4^+CD25^+$  dans les leucocytes périphériques des patients infectés par le VIH, le VHC ou le VHB, induit une augmentation de la réponse immune spécifique contre les virus, *in vitro* (Kinter *et al.* 2004, Pereira *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que les cellules Treg peuvent augmenter la réplication virale, en diminuant la réponse immune contre le virus et donc jouer un rôle dans les infections virales humaines (Wohlfert et Belkaid 2008). Dans le cas de l'infection par le VHC, presque un tiers des infections sont résolues, ce qui indique une possibilité d'augmenter l'immunité effectrice en modulant l'activité des Treg dans cette infection.

## II. Cellules Treg et les vaccins contre les infections

Les cellules Treg peuvent réduire les effets bénéfiques de vaccins contre les pathogènes. En limitant la fonction de cellules Treg, l'efficacité des vaccins contre les infections microbiennes, pourrait être augmentée. Dans une étude utilisant un vaccin anti-listeria, il a été montré que les nTreg

diminuaient l'intensité de la réponse secondaire CD8<sup>+</sup> (Kursar *et al.* 2002). De même, des souris traitées avec un anti-CD25 au moment de la vaccination par le BCG ont une charge bactérienne diminuée après une infection d'épreuve avec *Mycobacterium tuberculosis* (Jaron *et al.* 2008). Dans ce cas la réponse contre des épitopes immunodominant et sous-dominant est augmentée. De même la déplétion des Treg lors d'une vaccination contre la malaria en modèle murin induit une immunité durable et un contrôle de la parasitémie plus importants que la vaccination seule. La déplétion permet également l'augmentation de la réponse T à des épitopes sous-dominants (Moore *et al.* 2005). La manipulation des Treg dans la vaccination contre les pathogènes n'est pas encore très développée, mais cela pourrait être une voie de recherche intéressante surtout en ce qui concerne les infections parasitaires humaines pour lesquels aucun vaccin n'est pour l'instant disponible.

### III. Cellules Treg et infections par les protozoaires

#### 1. Rôle des Treg dans la leishmaniose

Les travaux de Belkaid *et al.* (2002) ont été précurseurs dans l'étude de l'impact des Treg dans les pathologies infectieuses et en particulier chez les protozoaires. Ces expériences faites chez la souris ont montré que les cellules T régulatrices sont responsables de la persistance des parasites *Leishmanie* chez la souris, persistance qui est nécessaire au maintien d'une immunité à long terme (Belkaid *et al.* 2002). Chez la souris résistante C57BL/6, Belkaid *et al.* (2002) ont montré qu'après l'inoculation de promastigotes de *Leishmania major* des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> s'accumulaient au site d'infection après guérison des lésions cutanées. Ces cellules étaient responsables, par un mécanisme IL10-dépendant et indépendant, de l'inhibition des réponses des Teff CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. L'inhibition par les Treg empêchait l'élimination complète du parasite au site primaire de l'infection. Par contre, l'élimination totale du parasite était obtenue chez des souris ne produisant pas d'IL10. L'élimination complète des parasites était suivie de la perte de l'immunité vis-à-vis d'une réinfection. Donc les cellules Treg pouvaient contrôler l'équilibre délicat établi entre le pathogène et son hôte.

Par contre, dans ce modèle Mendez *et al.* (2004) ont montré qu'après un challenge chez des souris chroniquement infectées par *L. major*, une réinfection dans un site distant de l'infection primaire entraînait une réactivation de l'infection à ce site. Les cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont aussi un rôle dans cette réactivation au site primaire de l'infection puisqu'elles sont isolées en majorité du site primaire d'infection après la réactivation. De plus, le transfert des cellules

Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> issues de souris récemment infectées aux souris avec une leishmaniose chronique, est suffisant pour la réactivation de l'infection antérieure. (Mendez *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent que le nombre de Treg présents au moment de la réponse « mémoire » est directement responsable de l'efficacité de la réponse effectrice.

Le rôle des Treg a aussi été largement étudié par la suite chez d'autres protozoaires aussi bien en modèle murin que chez l'humain.

## 2. Rôle protecteur et pathologique des Treg dans la malaria

Le rôle des Treg au cours de la malaria en particulier leur contribution dans l'évasion à la RI et l'immunopathologie a été bien documentée (pour revue Scholzen *et al.* 2010). Le nombre de cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> augmente chez l'Homme au cours de l'infection avec *Plasmodium falciparum* ou *P. vivax* mais également chez les souris infectées expérimentalement avec *P. yoelli*, *P. berghei* et *P. chabaudi*. L'augmentation du nombre de cellules Treg chez l'Homme, apparait liée directement à la charge parasitaire. Pendant une étude expérimentale avec *P. falciparum* sur des volontaires naïfs, la charge parasitaire de 1000 parasites par ml dans le sang est obtenue significativement plus tôt chez les individus ayant des quantités de cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD69<sup>-</sup> plus importantes à j10 post infection (Walther *et al.* 2005).

Chez les patients symptomatiques de *P. falciparum*, la proportion de cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> est également corrélée au nombre de parasites circulants (Minigo *et al.* 2009, Walther *et al.* 2009). De plus, l'induction *in vitro* de cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>hi</sup> dépend aussi de la quantité de parasites ajoutée dans les cultures (Scholzen *et al.* 2009). Un certain seuil de parasitémie pourrait être nécessaire pour induire les cellules Treg ou pour stimuler leur prolifération chez l'Homme (Scholzen *et al.* 2010).

Le nombre de cellules Treg augmente aussi chez les souris infectées avec le plasmodium. L'infection de souris avec *Plasmodium yoelii* montre une augmentation des cellules Treg au début de l'infection qui peut persister plus longtemps dans les infections létales (Hisaeda *et al.* 2005). Au contraire de ce que l'on observe chez l'Homme, le nombre de cellules Treg n'est pas directement lié à la charge parasitaire dans l'infection des souris avec *P. yoelii*. A l'inverse, le nombre de cellules Treg diminue avant le pic de parasitémie dans les infections létale et non létale avec *P. yoelii*. De même, le niveau de cellules Treg augmente avant la

détection de la parasitémie chez les souris infectées avec *P. berghei* ANKA mais diminuent une fois que la charge parasitaire est augmentée (Long *et al.* 2003).

Le ratio entre cellules Treg et cellules Teff pourrait être une mesure plus informative de l'homéostasie de la réponse immune. En effet, le ratio Teff/Treg est diminué chez les adultes infectées avec le paludisme par rapport aux témoins asymptomatiques (Minigo *et al.* 2009) suggérant un déséquilibre vers l'immunosuppression (Scholzen *et al.* 2009). Au contraire, les ratios Teff : Treg et T-bet : Foxp3 sont élevés pendant l'infection aiguë des enfants et les ratios sont encore plus élevés dans les formes sévères de la maladie contrairement aux formes moins sévères (Walther *et al.* 2009) suggérant une perte d'immunorégulation pendant l'infection (Scholzen *et al.* 2010).

Les modèles murins de malaria permettent d'examiner les dynamiques des ratios Teff/Treg à différents moments de l'infection (Scholzen *et al.* 2010). Les différentes études montrent une induction précoce des Treg après l'infection résultant en un ratio Teff/Treg diminué et une immunosuppression. Puis ceci est suivie par une expansion des Teff et une inversion du ratio Teff/Treg ce qui dans certains cas aura pour conséquence une réponse inflammatoire trop importante ou alors un retour à l'homéostasie après contrôle des parasites en rétablissant l'équilibre entre les deux populations Teff et Treg.

Des infections expérimentales de souris C57BL/6 et CBA avec *P. berghei* ANKA ont des caractéristiques proches de la pathologie de la malaria cérébrale de l'Homme. Cette pathologie serait due à la séquestration de parasites dans les érythrocytes et l'augmentation au niveau local du taux de cytokines pro-inflammatoires. Au contraire, les souris résistantes Balb/c ne présentent pas ces symptômes et ont aussi bien à l'état naïf qu'après infection avec *P. berghei* un taux de Treg plus élevé que les souris C57BL/6 ce qui suggère que les Treg ont un rôle important dans ces différences de sensibilité au parasite.

Par contre, la tolérance produite par les cellules Treg n'est pas toujours bénéfique comme par exemple dans le cas des souris infectées avec une souche létale de *Plasmodium*. Les souris infectées avec la souche létale de *Plasmodium*, meurent à cause d'une parasitémie élevée accompagnée d'un fort pourcentage de cellules Treg en périphérie (Hisaeda *et al.* 2004). La survie des souris après la déplétion des cellules Treg, montrent que la tolérance produite par ces cellules aide les parasites à échapper à la réponse immune des souris (Hisaeda *et al.* 2004).

Tableau 7: Les infections induisant les cellules nTreg d'après Belkaid 2007

Microorganismes	Hôtes	Effets des cellules Treg sur l'immunopathologie et sur la charge bactérienne, virale ou parasitaire
<b>Les infections bactériennes</b>		
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Souris	Contrôle des réponses immunes innées
<i>Helicobacter pylori</i>	Souris	Limitent les réponses cellulaires T et humorales
<i>Listeria monocytogenes</i>	Souris	Limitent les réponses cellulaires T CD8 <sup>+</sup> primaires et secondaires
<i>Pneumocystis carinii</i>	Souris	Limitent les cytokines pro-inflammatoires et la pathologie pulmonaire
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Souris	Limitent les réponses effectrices
	Homme	Augmentation du nombre de cellules Treg dans le sang et au site de l'infection chez les patients avec une tuberculose active  Corrélation inverse entre la fréquence des cellules Foxp3 <sup>+</sup> et l'immunité locale spécifique de <i>Mycobacterium</i> .  Diminution de la production l'IFN $\gamma$ et l'IL10 spécifiques de <i>Mycobacterium</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Homme	Accumulation des cellules Foxp3 <sup>+</sup> dans les conjonctives infectées Rôle potentiel dans le contrôle de l'immunopathologie
<b>Les infections virales</b>		
SIDA murin	Souris	Limitent les réponses effectrices  Favorisent la réplication virale

Microorganismes	Hôtes	Effets des cellules Treg sur l'immunopathologie et sur la charge bactérienne, virale ou parasitaire
HSV	Souris	Limitent la prolifération des cellules T CD8 <sup>+</sup> et les fonctions effectrices ; favorisent la réplication virale ; contrôle de l'immunopathologie oculaire
VIH	Homme	Augmentation du nombre des cellules Treg dans les organes lymphoïdes et les tissus muqueux; déplétion de cellules Treg augmente les réponses immunes <i>in vitro</i> spécifiques du virus
VHC	Homme	Suppression de la production de l'IFN $\gamma$ , l'expansion de cellules T VHC-spécifique post guérison et pendant l'infection persistante ; corrélation négative entre le % des cellules Treg et l'inflammation ; Peptide VHC peut stimuler <i>in vitro</i> les cellules Treg de patients de VHC
VHB	Homme	Accumulation de cellules Treg dans le foie pendant l'infection chronique sévère ; corrélation entre la fréquence de cellules Treg et la charge virale ; la déplétion de cellules Treg augmente la production de l'IFN $\gamma$ spécifique de l'antigène ; cellules Treg diminuent la prolifération des PBMCs autologues médiée par les antigènes de VHB
<b>Les infections helminthiques</b>		
<i>Schistosoma mansoni</i>	Souris	Contrôle de la pathologie dans le foie via l'IL10 ; favorise la survie de l'hôte
<i>Schistosoma japonicum</i>	Souris	Suppression de la prolifération <i>in vitro</i> des cellules T spécifiques d'antigène
<i>Brugia pahangi</i>	Souris	Limitent les réponses effectrices
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	Souris	contrôle des réponses effectrices via un mécanisme dépendant de l'IL10 ; augmentent la persistance parasitaire

<b>Microorganismes</b>	<b>Hôtes</b>	<b>Effets des cellules Treg sur l'immunopathologie et sur la charge bactérienne, virale ou parasitaire</b>
Nématodes intestinaux	Souris	Cellules Treg activées ou induites par l'infection, donnent une protection dans un modèle d'asthme
<b>Les infections protozoaires</b>		
<i>Leishmania major</i>	Souris	contrôle des réponses cellulaires TH1 via les mécanismes dépendants et indépendants de l'IL10 chez les souris résistantes  contrôle des réponses cellulaires TH2 chez les souris sensibles ; déplétion de cellules Treg aggrave temporairement la maladie
<i>Leishmania amazonensis</i>	Souris	Déplétion des cellules Treg augmente le nombre des parasites et l'immunopathologie
<i>Leishmania braziliensis</i>	Homme	Accumulation des cellules Treg au site cutané de l'infection
<i>Plasmodium yoelii</i>	Souris	contrôle des réponses immunes effectrices ; l'expansion incontrôlée de parasites cause la mortalité
<i>Plasmodium berghei</i>	Souris	Limitent les réponses effectrices causant l'expansion parasitaire
<i>Plasmodium falciparum</i>	Homme	Une production précoce de TGFβ avec l'expansion des cellules Treg du sang ; corrélation entre la charge parasitaire augmentée et l'augmentation des cellules Treg ; déplétion des cellules Treg augmentent les réponses immunes <i>in vitro</i>

De même, les études chez les humains montrent que chez les Fulani, qui est un groupe ethnique du Burkina-Faso qui a une faible sensibilité à la forme clinique de la malaria due à *P. falciparum*, il existe un déficit fonctionnel des Treg associé à un taux élevé d'anticorps

spécifique du parasite et d'IFN $\gamma$  et d'IL4 induits en comparaison avec des groupes ethniques plus sensibles à la maladie (les dogon et les Fossi).

### 3. Rôle des Treg et autres infections protozoaires

Dans la maladie de Chagas il a également été montré une augmentation du pourcentage des Treg sanguins dans des formes peu sévères de la maladie comparée au pourcentage plus faible chez des malades ayant des atteintes cardiaques suggérant un rôle protecteur de ces cellules en limitant par exemple les dommages tissulaires (de Araújo *et al.* 2011). Dans un modèle murin de maladie de Chagas, la déplétion des cellules Treg par un anti-CD25 s'est montrée sans effet aussi bien en phase aiguë que chronique avec une souche létale ou non létale suggérant que les Treg n'auraient pas de rôle dans le contrôle de la maladie dans ce modèle murin. Les études faites chez la souris sont donc parfois difficiles à corrélérer avec les observations chez l'humain.

### 4. Cellules Treg et toxoplasmose

Le rôle protecteur des cellules Treg dans la toxoplasmose aiguë chez la souris a été montré chez les souris C57BL/6 naturellement sensibles à l'infection (Ronet *et al.* 2005, Ge *et al.* 2008). Les souris C57BL/6 souffrent d'une iléite létale pendant la phase aiguë de la toxoplasmose qui est accompagnée d'une surproduction d'IFN $\gamma$  dans la LP. Ronet *et al.* (2005) ont montré que l'injection d' $\alpha$ -Galactoside céramide dans les souris C57BL/6 les protégeait de la mort en induisant un profil de sécrétion de cytokines TH2 par les cellules NKT corrélée à une production d'IL10. Ils ont trouvé une augmentation dans le nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans les intestins et les ganglions mésentériques à J6 et J9pi des souris C57BL/6 corrélée à une augmentation de l'ARNm de Foxp3. Ces cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exprimaient l'ARNm de l'IL10 (Ronet *et al.* 2005). Quand ils ont injectés l'anti-CD25, la protection était abrogée montrant le rôle important de ces cellules dans la protection (Ronet *et al.* 2005).

Ge *et al.* (2008) ont regardé l'importance du taux de Treg chez des souris gestantes après infection par *T. gondii*. Ils ont quantifié l'ARNm de Foxp3 dans les cellules de rate et dans le placenta de souris gestantes infectées par la souche RH. L'expression des ARNm de Foxp3 commence à diminuer à partir de J4 et jusqu'à J6 post infection chez les souris en phase aiguë de toxoplasmose par rapport aux souris saines. La réduction du pourcentage des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> a été aussi vérifiée par cytométrie en flux et est diminuée de la même façon. Les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont impliquées dans la tolérance maternelle

induite par les alloantigènes fœtaux. Ces données suggèrent que la perte fœtale provoquée par *T. gondii*, puisse être indépendante de la transmission verticale et que la diminution des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pendant l'infection pourrait représenter un mécanisme nouveau impliqué dans l'avortement provoquée par ce parasite (Ge *et al.* 2008).

Ces travaux étaient les tous premiers sur le rôle des Treg au cours de la toxoplasmose et ils montraient des résultats contradictoires puisque dans un cas il y avait une augmentation des Treg et dans l'autre une diminution.

Des études plus récentes et contemporaines au déroulement de cette thèse ont permis de déterminer le rôle des Treg au cours de la phase aigue de l'infection par voie orale avec des souches de type II dans des souris sensibles et résistantes.

# Résultats

## A. Article-I

### **Ammonium-sulfate-precipitated rat IgG hydridoma supernatant can cause hemorrhagic ileitis in OF1 mice infected by *Toxoplasma gondii***

#### **Objectif :**

Déterminer le rôle des cellules T régulatrices (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en utilisant la stratégie de déplétion avec un anticorps monoclonal anti-CD25.

#### **Méthodes :**

- Injections intrapéritonéales des anticorps anti-CD25 (ppt) ou contrôle isotypique (ppt) obtenus par précipitation du surnageant d'hybridome avec du sulfate d'ammonium pendant la toxoplasmose aiguë pour déterminer le rôle de cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>
- sur la sensibilité à l'infection
- sur la charge parasitaire en phase aiguë et chronique

#### **Résultats :**

Les deux anticorps provoquent une iléite chez les souris pendant la phase aiguë de la toxoplasmose et induisent une mortalité très variable dans les deux groupes. On ne trouve pas de différence significative dans la mortalité des souris entre les deux groupes infectés suggérant la présence d'un composé toxique dans les préparations d'anticorps. La mortalité est due à une iléite.

Il n'y a pas de mortalité des souris naïves injectées avec les anticorps ou des souris en phase chronique d'infection. La mortalité est donc due à l'action concomitante d'un contaminant contenu dans les anticorps et la dissémination du parasite dans les tissus. L'ELISA a confirmé la présence d'IgG anti-BSA chez les souris injectées avec les anticorps précipités confirmant que la BSA est un contaminant protéique majeur des préparations d'anticorps. Cependant des souris injectées avec de la BSA purifiée et infectées ne montrent pas de mortalité.

#### **Conclusions :**

Les surnageants d'hybridomes, précipités avec le sulfate d'ammonium contiennent un contaminant impliqué dans l'iléite provoquée après injection des anticorps pendant la phase aigue de dissémination du parasite. La présence d'anticorps anti-BSA supporte l'hypothèse que la BSA dans les surnageants précipités puisse participer au développement de l'iléite.

## **Ammonium-sulfate-precipitated rat IgG hydridoma supernatant can cause hemorrhagic ileitis in OF1 mice infected by *Toxoplasma gondii***

### **Introduction**

Toxoplasmosis is a protozoan parasite that infects humans and warm-blooded animals. Infections in humans are generally asymptomatic although immunosuppressed patients may exhibit severe symptoms. Similarly, primary infection during pregnancy can lead to miscarriage and neonatal malformations.

Th1 cellular response plays an important role in protecting the host against *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) infection (Dubey 2008, Suzuki *et al.* 1988). However, ileitis caused by oral infection of *T. gondii* has been reported to provoke death of mice because of severe Th1-type immunopathology observed in ileum (Gazzinelli *et al.* 1994 & 1996, Liesenfeld 2002, Mennechet *et al.* 2002). Acute toxoplasmosis becomes lethal in the absence of regulatory cytokines IL10 (Gazzinelli *et al.* 1996) and IL27 (Stumhofer *et al.* 2006, Villarino *et al.* 2006) and because of high production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL12. Reduced survival of Treg cells, higher production of inflammatory cytokines and subversion of regulatory networks were found to be the major effects of strong Th1 type immune response observed in C57Bl/6 susceptible mice suffering from acute toxoplasmosis (Oldenhove *et al.* 2009).

Treg cells are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells, and their main function is to maintain immune homeostasis and tolerance (Sakaguchi *et al.* 2009). They express constitutively interleukin-2 receptor chain alpha (IL2R $\alpha$ ), also known as CD25, a surface receptor, and the intracellular marker forkhead box-p3 transcription factor (Foxp-3) (Sakaguchi *et al.* 2009). In order to study the role of Treg during acute toxoplasmosis, we used *in vivo* antibody depletion

protocol with anti-CD25. This technique was extensively used since the pioneer work of Onizuka *et al.* (1999). In the different works using anti-CD25 in depletion experiments several forms of the antibody were used. The antibody was either injected directly without purification step from ascitic fluid or hybridoma culture supernatant or after different steps of purification.

The objective of our study was to evaluate the role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells during acute toxoplasmosis after peroral infection of resistant outbred OF1 mice. For this purpose, we employed antibody mediated depletion technique using PC61 hybridoma that produces a monoclonal antibody (mAb) directed against CD25 surface marker. We found that injections of ammonium-sulfate precipitated anti-CD25 (ppt) or control isotype (ppt) in mice suffering from acute phase toxoplasmosis causes variable percentage (about 15% to 85%) of mortality between day 7 and 10 post-infection in OF1 mice, although the same treatment does not induce mortality in Balb/c mice. No change in the course of infection was observed when mice were injected with anti-CD25 during chronic toxoplasmosis. The most significant macroscopic post-mortem change associated with antibody injections was the hemorrhagic ileitis which has also been observed in susceptible C57BL/6 infected mice after peroral infection. We conclude that the intestinal inflammation observed in OF1 mice suffering from acute toxoplasmosis, is not due to depletion-effects of anti-CD25 but might be due to strong immune response to an antigenic component of rat IgG hybridoma supernatant. This component might be BSA as BSA is a potential allergen and is present in large amount in the culture medium. Antibodies specific of BSA have been detected in mice injected with both non-purified antibodies (anti-CD25 and isotype control), however injection of purified BSA during acute phase of toxoplasma infection does not lead to ileitis and death of mice.

## **Materials and Methods**

### **Experimental animals**

Six to 8 weeks old OF1 female mice and 6 to 8 week old Balb/c female mice were purchased from Janvier (France). All the animals were kept according to the protocols of animal housing of the University of Tours. The mice were given food and water ad libitum. The infected animals were observed for the onset of clinical signs or symptoms daily (e.g. coat, response to external stimuli and physical activity in the cage) until euthanized. All experiments were performed according to the guidelines on animal experimentation of the “Université François Rabelais de Tours, France”.

### **Parasites and Infections**

*T. gondii* strain 76K was used to infect the mice. The 76K strain is being maintained in female CBA/J mice. Every month, the naïve CBA/J mice are infected orally with 50 cysts of this strain collected from the brain of a CBA/J mouse in chronic phase of the infection.

Brains containing the cysts were homogenised in RMPI-1640 medium (Dutscher, Brumath, France), and the cysts were counted under microscope. OF1 mice were orally infected with 50 cysts.

### **Antibodies and treatments**

The PC61 hybridoma secreting rat IgG1 against murine CD25 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The isotype control rat IgG1 was obtained from

the CRL1912 hybridoma (a kind gift of Dr Laleh Majlessi, Institut Pasteur, Paris, France). Hybridomas were grown in RPMI medium with 5% FCS and mAbs were obtained after ammonium sulfate (40% w/v) precipitation. After precipitation, the supernatant was extensively dialysed against a phosphate buffered saline solution (PBS) and sterile filtered. Antibodies were resuspended in PBS endotoxin free at 2.5mg/mL before injection.

In some experiments, the concentrated and dialysed supernatants of hybridomas were further purified using HiTrap Protein-G HP columns (GE Healthcare) following the manufacturer's recommendations. All antibody preparations (precipitated and purified) were assayed for protein concentration by the micro-BCA technique using a commercial kit (Sigma-Aldrich from Servilab, Le Mans, France) containing purified BSA as standard protein.

The mice were depleted of CD25<sup>+</sup> cells by the intra-peritoneal injection of anti-CD25 antibody (500µg per mouse per administration). Anti-CD25 antibody was injected under three different protocols: short depletion, long and very long. During short depletion protocol, the injections were performed on day -1, 0 and 3 of infection. During long depletion protocol, the injections were performed on day -1, 0, 3, 6 and 10 of infection whereas during very long depletion, the antibody was injected on days -1, 0, 3, 6, 10, 14, 17 and 20 of infection. Two experiments were done using very long protocol and the control group was injected with endotoxin free PBS 1x (Dulbecco's endotoxin free PBS). In other experiments, the isotype-control group was also injected at the same time and same dose as the anti-CD25 mAb treated group.

### **Western Blot Analyses**

Protein samples were diluted in denaturing loading buffer and boiled for 5 min. The samples were then loaded into a 10% SDS PAGE. Proteins from gel were transferred to nitrocellulose

membranes (Protran). The membranes were blocked by incubation overnight in PBS containing 10 mg/ml of milk (Régilait, France). The membranes were then washed twice 10 min in PBS Tween 0.1%. To detect anti-BSA antibodies after a 1h incubation with mice sera, the membranes were washed twice 10 min in PBS Tween 0.1% and, alkaline-phosphatase-conjugated-anti-mouse IgG ( $\gamma$ -chain specific) (Sigma) was then added. After 1h incubation, two washes of 10 min in TBS Tween 0.1% and one wash of 10 min in PBS were performed. The blot was washed twice with TNT, each for 10 minutes, followed by a wash of 10 minutes in Buffer-R pH 9.5. BCIP (BCIP<sup>®</sup> /NBT Liquid Substrate System, Sigma) was added. The reaction was stopped with distilled water.

The blots for rat IgG1 were developed using alkaline-phosphatase-conjugated-anti-Rat IgG.

### **Blood lymphocyte preparations**

Blood was collected from the medial canthus of the mouse eyes in anti-coagulant (EDTA or Heparin)-coated blood collection tubes, and mixed thoroughly. The red blood cells were lysed twice with 5ml of lysis buffer (0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0M KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.3) for two minutes at room temperature. The lysis reaction was stopped by adding 20ml of RPMI-1640 supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Dutscher, Brumath, France).

### **Histological examination**

Intestines were collected in 4% formaldehyde for histological examination. Samples were dehydrated with ascending concentrations of ethanol and then embedded in paraffin within 24 hours. Tissue sections (5-7 $\mu$ m thick) were collected onto adhesive-treated microscope slide (Superfrost Plus, CML) and incubated for 24 hours at 37°C. After fixation, paraffin was

removed from the samples. The samples were rehydrated before staining with Hemalun & Eosin.

### **Cell preparations and flow cytometric analyses**

Mice were sacrificed by cervical dislocation. Splenocytes were prepared as described previously (Ismael *et al.* 2003).  $5 \times 10^5$  cells/well were used to stain the cells with specific antibodies or for in-vitro culture assays.

The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were analysed by flow cytometry using FACScalibur (BD, Le Pont de Claix, France). Anti-mouse CD4-(H129-19) FITC, anti-mouse CD25-PE (PC61) and anti-mouse CD25-PE (7D4) monoclonal labelled antibodies and their corresponding isotype controls were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Cells were incubated for 15 minutes at 4°C for saturation in 200 µl of 4% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) prepared in PBS, and then stained in the same medium. For each sample, at least 10,000 events were acquired.

### **Parasite Load Quantitative Test**

Parasite load was estimated by subculturing of serial dilutions of the organs on HFF monolayers (Zenner *et al.* 1998). Organs were washed twice with PBS supplemented with 50U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin and then homogenized over 100 µm-cell strainers except intestines which were homogenized with an ultraturax. Serial five-fold dilutions of the whole tissue homogenates were prepared in DMEM 5% fetal calf serum (FCS), then 100 µl of crude homogenate or of each dilution were added to HFF monolayers in

24-well plates. Medium was replaced the next day. Plates were examined every day up to 10 days and the presence of parasite foci recorded in each well.

### **ELISA for detection of cytokines and anti-BSA IgG**

Cytokine and chemokine levels (IFN $\gamma$ , MCP1 and IL10) were quantified from mouse serum by ELISA using OptEIA<sup>TM</sup> kits (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) following the manufacturer's recommendations.

For the detection of anti-BSA antibodies, ELISA was performed as described earlier (Ismael *et al.* 2003) with few modifications of coating and saturation conditions. 96 well flat-bottom microtiter plates (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 $\mu$ l BSA (Sigma) diluted at 2 $\mu$ g/ml. After overnight incubation the plates were washed twice with PBS 0.01% tween and PBS containing 5% (w/v) milk without cream (PBS-milk) was used to saturate the plates for 1h30min at 37°C.

### **Statistical Analysis**

The Mann-Whitney test, Student's t-test and Kruskal Wallis test were used to compare the values.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### **Depletion efficacy of anti-CD25 (ppt) injection, on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in naïve mice**

Naive mice were injected twice with anti-CD25 (ppt). The efficacy of the depletion was observed 2 days after the last injection by the observation of the reduction in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells. The efficacy of the depletion was also observed in the blood, spleen and MLN of the animals. Anti-CD25 (ppt) significantly reduces about 60% the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in blood, spleen and MLN of non-infected mice (Fig. 1A ).

### **Acute toxoplasmosis causes increase in number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in OF1 mice**

Infection of OF1 mice resulted into a significant increase (about 44%) in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in OF1 mice from day 3 post-infection to day 6 post infection followed by a non-significant decrease (about 22%) from day 6 to day 10 post-infection during acute toxoplasmosis (Fig. 1B). Anti-CD25 (ppt) caused an 84%, 68% and 58% depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> splenocytes at day 3, 6 and 10 post-infection respectively and is statistically significant at all time points compared to the non-depleted infected mice (Fig. 1B).

### **Survival of mice during acute toxoplasmosis after anti-CD25 depletion**

In the first experiments intraperitoneal injections of anti-CD25 (ppt) were performed under very long depletion protocol. High mortality occurred between day 7 and 10 pi compared to 100% survival in control mice receiving PBS injections (Fig. 2A). In a second time the depletion time was reduced to only cover the acute phase of the infection (until day 10). Mice

were injected under short and long depletion protocols with anti-CD25 antibody. The control isotype was injected only under long depletion protocol. Mice injected with anti-CD25 (ppt) showed around 20% and 50% mortality under short and long depletion protocols respectively. The mortality rate of the control-isotype injected mice was around 20% (Fig. 2B). Mortality occurred between day 7 to 18 during the early and the late acute phase of toxoplasmosis. Subsequent experiments were all performed under long depletion protocols. Mortality rates between the different experiments varied from 15 to 85% for the control isotype group and from 20 to 75% for the anti-CD25 group suggesting that mortality is not dependant of anti-CD25 depletion but may be related to antibody injections.

On postmortem examination after intraperitoneal injections of either anti-CD25 (ppt) or control isotype (ppt), identical macroscopic signs of hemorrhagic enteritis (ileitis) filled with inflammatory and hemorrhagic exudates were observed (Fig. 3B & 3D). In addition, splenomegaly as well as hepatomegaly was also seen (data not shown).

To further evaluate the ileitis observed in mice dying during acute phase of infection, samples of intestine were collected at day 6 pi for histological examination. The microscopic examination of the intestines shows intestinal mucosa with disturbed mucosal architecture in mice injected with anti-CD25 (ppt) compared to intact integrity of the epithelial barrier in control mice receiving PBS injections (Fig. 3E & 3F).

### **Post-mortem examination of naïve mice after long depletion protocol**

Intraperitoneal injections of anti-CD25 (ppt) or control isotype (ppt) in non-infected OF1 mice did not cause mortality and mice did not show any clinical signs (Data not shown). The naïve mice injected under short depletion procedure were also euthanized at day 6 post-infection. Post-mortem examination of these mice revealed splenomegaly and enlargement of

MLN as shown by increase in total number of cells in both groups (Fig. 4A & 4B) compared to naïve mice suggesting that antibody injection by itself may induce an inflammatory response. However, no hemorrhagic ileitis was observed in mice from both injected groups (Data not shown). In addition, long depletion protocol was also performed in chronically infected mice and no mortality was observed (data not shown).

### **SDS-PAGE shows presence of a major contaminant protein in both antibodies**

Ileitis observed in acutely-infected-mice receiving antibodies might be due to combined effects of high molecular weight of rat IgG1 as well as other components of the culture medium. We therefore performed SDS-PAGE analysis to evaluate the purity of antibody preparations. Coomassie blue stained SDS-PAGE analysis showed similar patterns of bands in anti-CD25 (ppt) and control isotype (ppt) with 2 bands corresponding respectively to heavy and light chain of the IgG (Fig. 5A & 5B) as observed in western blot probed with an anti-rat IgG (Fig. 6B). In addition, a large band around 60-70kda was observed in larger amount in the anti-CD25 ppt than in control isotype ppt. To further characterize the contaminant protein, precipitated antibodies were further purified with a protein G affinity column. Comparison of the antibody before and after purification showed that the high molecular weight band was significantly reduced in contrary to the low molecular weight band (Fig. 5B & 6A) after purification suggesting that the major contaminant is a protein with a molecular weight close to the MW of the heavy chain of the IgG.

### **Anti-CD25 (ppt) and control isotype (ppt) injected intraperitoneally during acute toxoplasmosis, induce a strong anti-BSA humoral immune response**

Western blot analysis of antibody preparations showed presence of large amount of protein having a molecular weight similar to that of BSA (about 68 kDa) (Fig. 6B). The coloration of total proteins with red ponceau showed similarity of molecular weight between contaminant protein and pure BSA (Fig. 6B). Therefore, we performed an ELISA to detect anti-BSA antibodies in the sera of mice. Sera of naïve and infected mice do not show specific anti-BSA antibodies. However, both infected mice injected with either anti-CD25 ppt or control-isotype ppt showed significant level of anti-BSA antibodies. Moreover, the level of antibodies is correlated with the number of injections since the lower level of antibody is detected in the short depletion group and the higher in the very long depletion group. The group injected with the highly purified control isotype is devoid of anti-BSA antibody and the group injected with purified anti-CD25 showed the lowest level of antibody (Fig. 7).

### **Purified BSA (Sigma) injected intraperitoneally during acute toxoplasmosis, does not increase susceptibility of OF1 mice**

Purified BSA was injected to infected OF1 mice following long depletion procedure. Sera of mice injected with purified BSA was tested for the presence of anti-BSA IgG total antibodies by ELISA and a significant difference between the PBS control and BSA group was found (Fig. 8E).

BSA did not increase susceptibility of OF1 mice to acute toxoplasmosis and no mortality was observed. No significant difference was found in the production of serum IFN $\gamma$  as well as serum MCP-1 between PBS-Inf group and BSA-Inf group (Fig. 8A & 8B). Similarly no significant difference was observed in the body weight and the brain parasitic load between two groups i.e. PBS-Inf and BSA-Inf group (Fig. 8C & 8D).

### **Anti-CD25 (ppt) mediated cell depletion delays movement of parasites from primary site of infection i.e. intestine**

The effect of the specific depletion of CD25<sup>+</sup> cells was evaluated under long depletion procedure on the surviving mice. A lower parasitic load in the spleens but a higher parasitic load in the intestines of Dep-Inf mice was observed on day 6 pi compared to the Iso-Inf mice (Fig. 9A & 9B).

### **Serum cytokines**

IFN $\gamma$  levels were analyzed at the local and systemic level in both groups at day 6 pi. No significant difference was found between Iso-Inf group and Dep-Inf group in the seric level of IFN $\gamma$  (Fig. 9C). Antigen specific stimulation of spleen cells induces production of IFN $\gamma$  but no significant difference was found between the two groups (Fig. 9D). Similarly no significant difference was found in serum IL10 levels between Iso-Inf group and Dep-Inf group (Fig. 9E). No significant difference was found, between the two groups, in IFN $\gamma$  levels from intestinal secretions (Fig. 9F) or from supernatants of intestinal segments (Fig. 9G).

### **Intraperitoneal injections of anti-CD25 (ppt) during acute toxoplasmosis increases brain parasitic loads in OF1 mice**

No significant difference was found in the body weight of mice from two groups during infection (Fig. 10A). The cysts were counted in the brains of mice during chronic phase at 5 weeks post-infection after both short and long depletion protocols. The parasitic load is

significantly higher in both anti-CD25 treated groups compared to the control group (Fig. 10B).

## **Discussion**

In the present study, we carried out depletion experiment by injection of the PC61 mAb to analyze the role of Tregs in the resistant OF1 outbred mice during the infection with the type II strain 76K of *T. gondii*. In the literature many protocols are described for Tregs depletion using the PC61 mAb in different models, using a wide range of mAb concentrations, from 100µg to 1mg, or even several injections of the PC61 mAb before and during infection and also under different forms either non purified or ammonium-precipitated or highly purified antibody (Couper *et al.* 2009). We used ammonium-precipitated antibody as described by others (Tenorio *et al.* 2010). We first verify the depletion efficiency in naive mice and the results were consistent with the observation found in the literature with about 60% reduction of CD25<sup>+</sup> cells (Couper *et al.* 2009). In infected animals the depletion efficiency was also consistent with the results of the literature but in addition a high mortality rate was observed in the mice around 7 to 15 day pi. Mortality was not only due to the anti-CD25 depletion since high mortality rates were also observed in the control group injected with an isotype-matched rat IgG1. Moreover, mortality is induced only in infected mice since no mortality is observed in control non infected mice only treated with antibodies. The mortality only occurred in the acute phase of the infection since injection of antibodies in the chronic phase of infection does not lead to the death of mice (data not shown). The most striking lesion on post-mortem examination of mice from both groups was hemorrhagic ileitis. Similar lesions of ileitis have been observed in a naturally susceptible strain of mice (C57Bl/6) infected orally with *T. gondii* type II strain (Li *et al.* 2002). Within 8 days after peroral infection C57BL/6

mice develop severe ileal inflammation, resulting in necroses of mucosal villi and complete tissue destruction (Liesenfeld 2002). This pathology is also accompanied by a significant weight loss in the acute phase of the infection as also observed in our experiment. Ileitis is caused by a Th1-type immunopathology, characterized by a CD4 T cell-mediated increase in proinflammatory mediators including IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and NO. Infection with *T. gondii* causes a breakdown of intestinal physiology and barrier functions followed by accumulation of Gram-negative bacteria in the ileum, bacterial translocation, and bacteria-mediated aggravation of inflammation via Th1-type cytokine. There is evidence that specific bacterial Ags such as LPS contribute to ileal inflammation.

Different factors might be involved in the mortality observed in mice receiving intraperitoneal injections of antibodies. Host's immune response against any of the component in the antibody preparation, might be responsible for the aggravation of the inflammation after infection. The increase in total number of cells in both spleen and MLN of non-infected mice injected with both antibodies indicates an activation of the immune system after antibody injection. BSA being a protein of high molecular weight (about 65 to 68 kDa) and was found to be present in large amount in the antibody preparation as confirmed by the presence of anti-BSA IgG antibodies in the sera of all infected mice injected with the non purified antibodies. Use of a sperm-medium containing BSA for artificial insemination caused severe anaphylactic reaction (Wüthrich *et al.* 1995). BSA was identified to be the cause of anaphylactic reaction in another case where a medium containing BSA was used for artificial insemination (Orta *et al.* 2003). IgE specific of BSA was considered to be the probable cause of gastroenteritis in a patient suffering from eosinophilic gastroenteritis (Verdaguer *et al.* 1993).

The presence of anti-BSA antibody correlates with the mortality rate since in infected mice injected with purified antibodies, in which no antibody or a very low level of antibody was

detected, showed no mortality. Similarly, no mortality was observed when acutely infected mice were injected with purified BSA suggesting that another contaminant may be involved in the ileitis.

LPS and other bacteria components contaminating the antibody preparation may also induced aggravation of the inflammation produce by *T. gondii* infection. Heisemaat *et al.* (2007a) reported that lipid-A aggravated immunopathology in a murine model of *T. gondii*-induced ileitis and that genetic deletion of TLR4, or treatment with the LPS scavenger polymyxin-B, ameliorated disease symptoms in this model (Heisemaat *et al.* 2006). This hypothesis of a bacterial contaminant remained to be explored.

Another explanation may be the contamination by a toxic chemical (ammonium sulfate). Experimental colitis is induced by administering toxic chemicals, such as, formalin, indomethacin, trinitrobenzene sulfonic acid, or polysaccharides such as dextran sulfate sodium (DSS). DSS is a sulfated polymer. Depending on the time course of oral administration of DSS in the drinking water, it can induce both acute and chronic colitis in mice (Heisemaat *et al.* 2007, Yan *et al.* 2009). The exact mechanism of induction and pathogenesis of DSS-induced colitis is unknown. However, a direct toxic action on colonic epithelium, macrophage activation by DSS, and altered colonic microflora has all been implicated in the pathogenesis of DSS colitis. Lange *et al.* (1996) observed about 50% mortality in mice having hemorrhagic intestinal colitis induced by DSS (Lange *et al.* 1996).

Although the precipitated antibody preparations were extensively dialyzed, we may not exclude this hypothesis.

The mechanism behind this intestinal inflammation observed in OF1 mice injected with ammonium-sulfate-precipitated antibody remains unknown. However several factors may account for this increased sensibility of OF1 resistant mice to *T. gondii* infection in these

conditions. The same treatment (antibody injection and infection) was performed in Balb/c mice and no significant mortality was observed (supplementary data Fig. S1).

We further evaluated the depletion effect using anti-CD25 in this model of infection and depletion. Depletion treatment induced a higher brain cyst load in the anti-CD25 group compared to the control group suggesting that even with this non purified antibody, there is a specific effect of the anti-CD25. This increased parasitic load has been observed in both susceptible C57BL/6 mice (Couper *et al.* 2009) and resistant mice Balb/c (Morampudi *et al.* 2011) after anti-CD25 depletion.

### **Acknowledgements**

Haroon AKBAR has financement from Higher Education Commission, Islamabad, Pakistan. The authors would like to thank Dr. P. Berthon (for help in histology), M. T. Arias (for help in rtPCR), S. Bigot, T. Papin and C. Rossignol for their excellent technical assistance.

## References

- Couper, K. N.; Lanthier, P. A.; Perona-Wright, G.; Kummer, L. W.; Chen, W.; Smiley, S. T.; Mohrs, M. & Johnson, L. L. (2009), Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol***182**(7), 3985-3994.
- Dubey, J. P. (2008), The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* **55**(6), 467-475.
- Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hayashi, S.; Denkers, E. Y.; Hieny, S.; Caspar, P.; Trinchieri, G. & Sher, A. (1994), Parasite-induced IL12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol***153**(6), 2533-2543.
- Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, W.; Trinchieri, G. & Sher, A. (1996), In the absence of endogenous IL10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol***157**(2), 798-805.
- Heimesaat, M. M.; Bereswill, S.; Fischer, A.; Fuchs, D.; Struck, D.; Niebergall, J.; Jahn, H.-K.; Dunay, I. R.; Moter, A.; Gescher, D. M.; Schumann, R. R.; Göbel, U. B. & Liesenfeld, O. (2006), Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol***177**(12), 8785-8795.
- Heimesaat, M. M.; Fischer, A.; Jahn, H.-K.; Niebergall, J.; Freudenberg, M.; Blaut, M.; Liesenfeld, O.; Schumann, R. R.; Göbel, U. B. & Bereswill, S. (2007a), Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut***56**(7), 941-948.
- Heimesaat, M. M.; Fischer, A.; Siegmund, B.; Kupz, A.; Niebergall, J.; Fuchs, D.; Jahn, H.-K.; Freudenberg, M.; Lodenkemper, C.; Batra, A.; Lehr, H.-A.; Liesenfeld, O.; Blaut, M.; Göbel, U. B.; Schumann, R. R. & Bereswill, S. (2007), Shift towards pro-inflammatory

intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One* **2**(7), e662.

Ismael, A. B.; Sekkai, D.; Collin, C.; Bout, D. & Mévélec, M.-N. (2003), The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect Immun* **71**(11), 6222-6228.

Lange, S.; Delbro, D. S.; Jennische, E. & Mattsby-Baltzer, I. (1996), The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. *APMIS* **104**(11), 823-833.

Li, W.; Buzoni-Gatel, D.; Debbabi, H.; Hu, M. S.; Mennechet, F. J. D.; Durell, B. G.; Noelle, R. J. & Kasper, L. H. (2002), CD40/CD154 ligation is required for the development of acute ileitis following oral infection with an intracellular pathogen in mice. *Gastroenterology* **122**(3), 762-773.

Liesenfeld, O. (2002), Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease?, *J Infect Dis* **185 Suppl 1**, S96-101.

Mennechet, F. J. D.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Li, W.; Vandewalle, A. & Buzoni-Gatel, D. (2002), Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* **168**(6), 2988-2996.

Morampudi, V.; Craeye, S. D.; Moine, A. L.; Detienne, S.; Braun, M. Y. & DSouza, S. (2011), Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes Infect.*

Oldenhove, G.; Bouladoux, N.; Wohlfert, E. A.; Hall, J. A.; Chou, D.; Santos, L. D.; O'Brien, S.; Blank, R.; Lamb, E.; Natarajan, S.; Kastenmayer, R.; Hunter, C.; Grigg, M. E. & Belkaid, Y. (2009), Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* **31**(5), 772-786.

Onizuka, S.; Tawara, I.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.; Fujita, T. & Nakayama, E. (1999), Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res***59**(13), 3128-3133.

Orta, M.; Ordoqui, E.; Aranzábal, A.; Fernández, C.; Bartolomé, B. & Sanz, M. L. (2003), Anaphylactic reaction after artificial insemination. *Ann Allergy Asthma Immunol***90**(4), 446-451.

Sakaguchi, S.; Wing, K.; Onishi, Y.; Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. (2009), Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?, *Int Immunol***21**(10), 1105-1111.

Stumhofer, J. S.; Laurence, A.; Wilson, E. H.; Huang, E.; Tato, C. M.; Johnson, L. M.; Villarino, A. V.; Huang, Q.; Yoshimura, A.; Sehy, D.; Saris, C. J. M.; O'Shea, J. J.; Hennighausen, L.; Ernst, M. & Hunter, C. A. (2006), Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol***7**(9), 937-945.

Suzuki, Y.; Orellana, M. A.; Schreiber, R. D. & Remington, J. S. (1988), Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science***240**(4851), 516-518.

Tenorio, E. P.; Olguín, J. E.; Fernández, J.; Vieyra, P. & Saavedra, R. (2010), Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol***2010**, 786078.

Verdaguer, J.; Corominas, M.; Bas, J.; Valls, A.; Mestre, M.; Romeu, A.; Gonzalez, L.; Massip, E. & Buendia, E. (1993), IgE antibodies against bovine serum albumin in a case of eosinophilic gastroenteritis. *Allergy***48**(7), 542-546.

Villarino, A. V.; Stumhofer, J. S.; Saris, C. J. M.; Kastelein, R. A.; de Sauvage, F. J. & Hunter, C. A. (2006), IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol***176**(1), 237-247.

Wüthrich, B.; Stern, A. & Johansson, S. G. (1995), Severe anaphylactic reaction to bovine serum albumin at the first attempt of artificial insemination. *Allergy***50**(2), 179-183.

Yan, Y.; Kolachala, V.; Dalmaso, G.; Nguyen, H.; Laroui, H.; Sitaraman, S. V. & Merlin, D. (2009), Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One***4**(6), e6073.

Zenner, L.; Darcy, F.; Capron, A. & Cesbron-Delauw, M. F. (1998), *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol***90**(1), 86-94.

Figure Legends:

**Figure 1:** (A): Depletion efficacy of anti-CD25 (ppt). Flow cytometric analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the blood, spleen and MLN of naïve OF1 mice. Student T test was used to calculate the differences. n= 4 for naive mice and n = 5 for depleted mice for blood samples. n= 6 for naive mice and n= 2 for depleted mice for spleen whereas n=6 for naive mice and n = 2 for depleted mice for MLN. \* indicates P < 0.05.

(B): Flow cytometric examination in OF1 mice. Control infected and anti-CD25-Inf under short (day 6) and long (day 10) depletion protocol. Flow cytometric examination of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was performed in the spleens of mice at indicated days post-infection. Mann-Whitney test was used to compare the values between the two groups at each day. \* indicates statistically significant difference with P < 0.05. Kruskal-Wallis test was used to compare the values between day 3, day 6 and day 10 post-infection, § indicates statistically significant difference between two values with P < 0.05.

**Figure 2:** (A) Survival of OF1 mice after acute infection. Mice were injected with either PBS (PBS-Inf) or with anti-CD25 (ppt) under very long depletion protocol .n= 12 for both groups of mice. Similar results were obtained in two experiments. Small lines indicate days of antibody injections under very long depletion protocol.

(B) Survival of infected OF1 mice. Mice were injected with either anti-CD25 (ppt) under short depletion protocol (n=14) or under long depletion protocol (n=20) or with an isotype-control (ppt) (n=12). The experiment was repeated twice with short depletion protocol and four times with long depletion protocol. Five small lines indicate days of injections under long depletion protocol whereas three small lines indicate days of injections under short depletion control.

**Figure 3:** Hemorrhagic ileitis was observed on day 7 post-infection in mice injected with anti-CD25 (ppt) or control isotype (ppt). Post-mortem examination of intestines of naive (A & C) and antibody-injected-infected (B & D) OF1 mice at day 7 post-infection.

Histological examination of intestines of OF1 mice at day 6 post-infection after injections of PBS (E) and anti-CD25 (ppt) (F).

**Figure 4:** Total number of cells in spleens and MLN of naïve OF1 mice injected with anti-CD25 (ppt) or control isotype (ppt) under short depletion protocol. Spleen (A) and MLN (B) were collected 3 days after the last injection. n = 5 for all three groups of mice. \* indicates  $P < 0.05$  Kruskal-Wallis test.

**Figure 5:** Coomassie blue staining of ammonium-sulfate-precipitated hybridoma rat IgGs.

(A) MW indicates molecular weight marker, 1 indicates anti-CD25 (ppt), and 2 indicates isotype control (ppt).

(B) Coomassie blue staining of anti-CD25 before and after purification by affinity chromatography. MW indicates molecular weight marker, 1 indicates precipitated non purified anti-CD25 (ppt) and 2 indicates purified anti-CD25.

**Figure 6:** Western blot analysis of (1) BSA, (2) anti-CD25 (ppt), (3) anti-CD25 (affinity-column-purified), and (4) purified Rat IgG1 isotype, (MW) Molecular Weight Marker

(A) Pattern of proteins after Ponceau Red staining. (B) The same blot after anti-rat IgG probing.

**Figure 7:** Significantly higher levels of anti-BSA IgG antibodies were observed in the sera of mice injected with precipitated antibodies (anti-CD25 or control isotype). The OD405 values

of ELISA for the detection of anti-BSA IgG antibodies in the sera of naive (A; n=6) and infected (B to H) OF1 mice. Group B (n=14) was injected with PBS. Groups C (n=32) and G (n=20) were injected with precipitated or purified isotype control antibody, respectively. Groups D (n=17; short depletion), E (n=38; long depletion) and F (n=8; very long depletion) were injected with precipitated anti-CD25 and H (n=17; long depletion) were injected with purified anti-CD25. \* indicates  $P < 0.005$  Two tailed student T test between infected control and antibody injected group.

**Figure 8:** Production of serum IFN $\gamma$  and MCP-1, body weights, brain cyst load, anti-BSA IgG at day 6 post-infection in infected OF1 mice after injections of PBS (PBS-Inf) and BSA (BSA-Inf) (n= 10 for PBS-Inf; n= 10 for BSA-Inf group). (A) Serum IFN $\gamma$  production, (B) serum MCP1 level, (C) % of initial body weight of mice. (D) Brain cyst load at 6 weeks post-infection. (E) OD<sub>405</sub> values of ELISA for the detection of anti-BSA IgG total antibodies in the sera of three groups of mice: naïve (n=11), PBS-Inf (n=14) and BSA-Inf (n=14). \* indicates  $P < 0.05$  unpaired Student T test.

**Figure 9:** Parasitic load and cytokine production at day 6 post-infection in infected OF1 mice after short depletion protocol. Parasitic load after anti-CD25 (ppt) (Dep-Inf group) and isotype control (ppt) (Iso-Inf group) injections in the spleens (A) and in the intestines (B) of OF1 mice was observed on day 6 post-infection. The results are reported as tachyzoites per gram of organs in case of intestines and tachyzoites per organ in case of spleen from results on HFF culture. n=5 for each group.

(C, D and E): Cytokine production at day 6 post-infection in infected OF1 mice after Short-Dep protocol. (C) Serum IFN $\gamma$  production at day 6 post-infection. n= 25 for both groups. The experiment was repeated twice with similar results with n=15 for Iso-Inf group and n= 25 for

Dep-Inf group. (D) IFN $\gamma$  production from in-vitro stimulated splenocytes. n= 5 for each group. (E) IL-10 production from *in vitro* stimulated splenocytes. n=5 for each group.

(F and G): Cytokine production at days 3, 6 and 10 post-infection in infected OF1 mice after Long-Dep protocol. (F) represents the levels of IFN $\gamma$  in the intestinal secretions of mice at day 6 post-infection. n=5 for each group. \* indicates P < 0.05 unpaired Student T test. (G) represents IFN $\gamma$  in the 24hr supernatants of cultured fragments of small intestines. n=5 for each group.

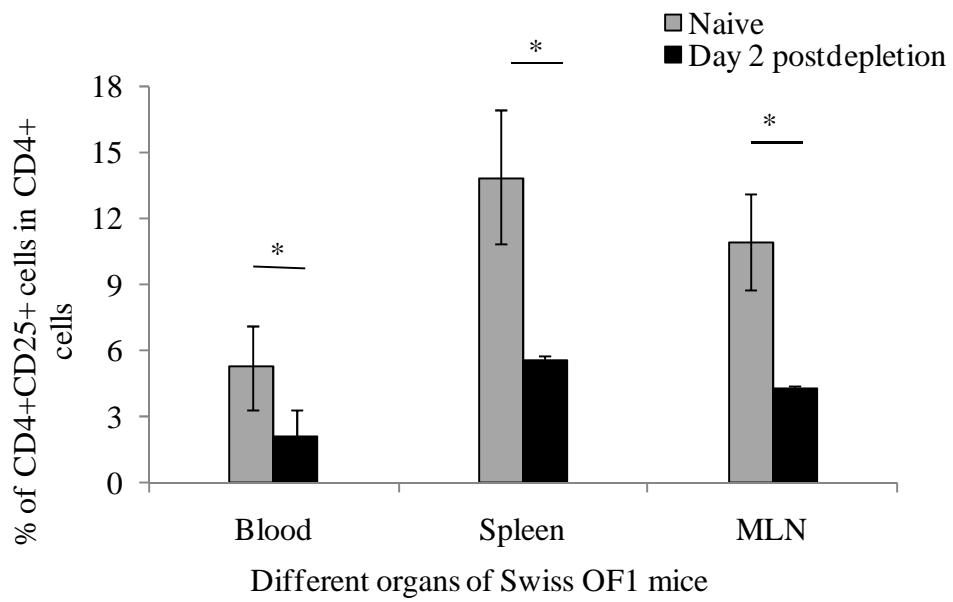
**Figure 10:** Body weight and brain cyst load in infected and depleted OF1 mice. (A) % of initial body weight of mice of the three groups: Iso-Inf (n= 12), Dep-Inf (Short Dep) (n= 14) and Dep-Inf (Long Dep) (n= 20) injected with control isotype (ppt), anti-CD25 (ppt) under short depletion protocol and anti-CD25 (ppt) under long depletion protocols, respectively. No significant difference was found in weight loss among three groups. (B) Brain cyst load at 6 weeks post-infection with n= 10 for Iso-Inf, n= 11 for Dep-Inf (Short Dep) and n = 11 for Dep-Inf (Long Dep) groups. \* indicates P < 0.05 Kruskal & Wallis test. Similar results were obtained in two experiments with similar tendencies but without statistically significant differences in the second experiment.

**Figure S1:** Anti-CD25 (ppt) or its isotype control (ppt) does not increase susceptibility of Balb/c mice during acute toxoplasmosis. (S1A) Survival of Balb/c mice (n=10 for each group). (S1B) Brain cyst load (n= 9 for Iso-Inf; n=10 for Dep-Inf). No significant difference was found between the groups using Mann-Whitney test. (S1C) Anti-BSA IgG at day 43pi (n= 9 in Iso-Inf; n= 10 for Dep-Inf group). \* indicated P<0.05 unpaired Student T test.

(S1D and E) Tails of Balb/c mice from (D) Iso-Inf group injected with isotype control (ppt) and (E) with anti-CD25 (ppt) at 7 weeks post-infection. 50% of Balb/c mice (5 out of 10) developed scurfy scars on their tails in the depleted group.

**Figure 1:**

**1A**



**1B**

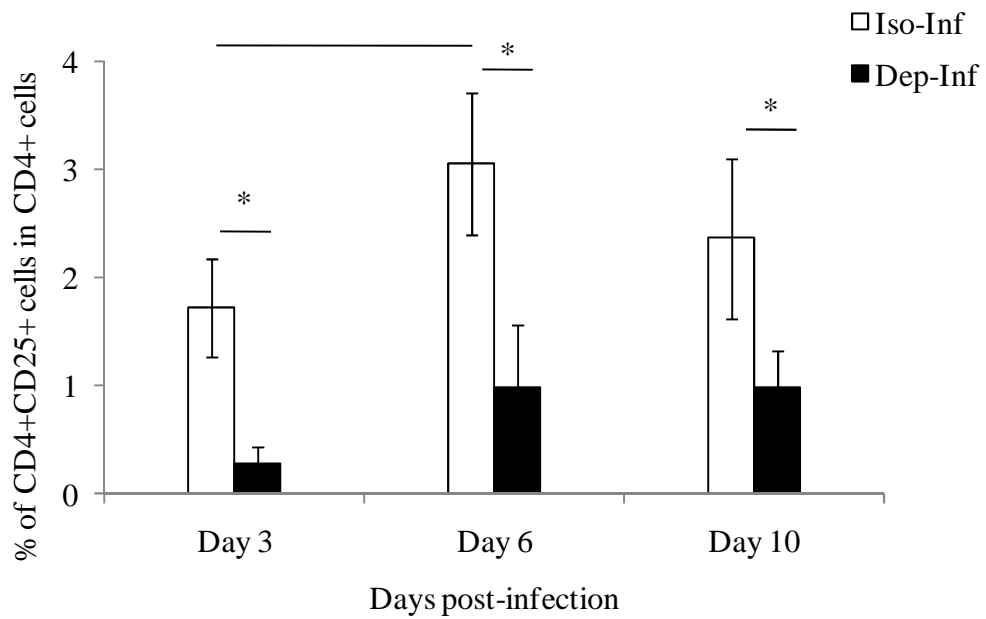
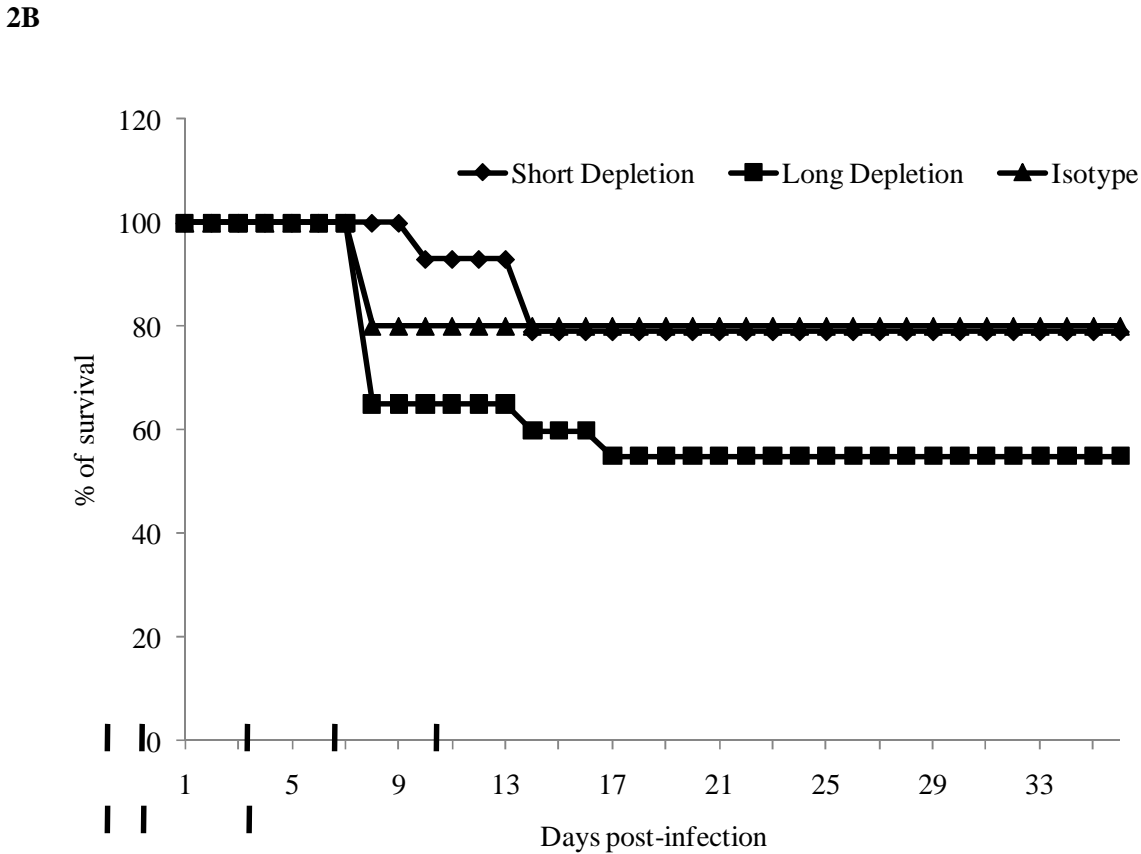
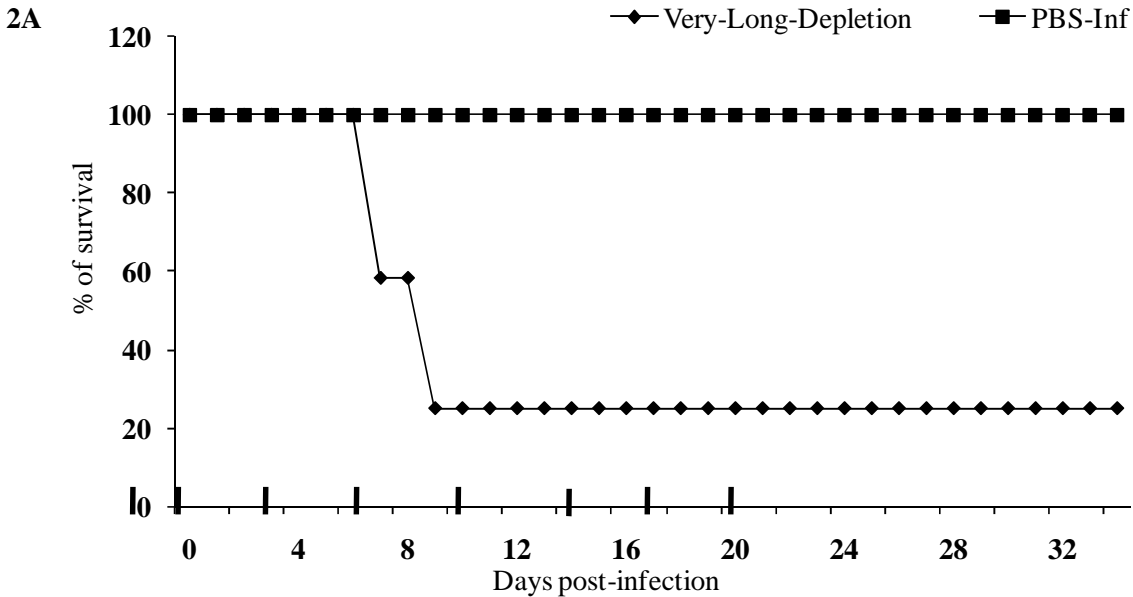


Figure 2:



**Figure 3:**

**3A**



**3B**



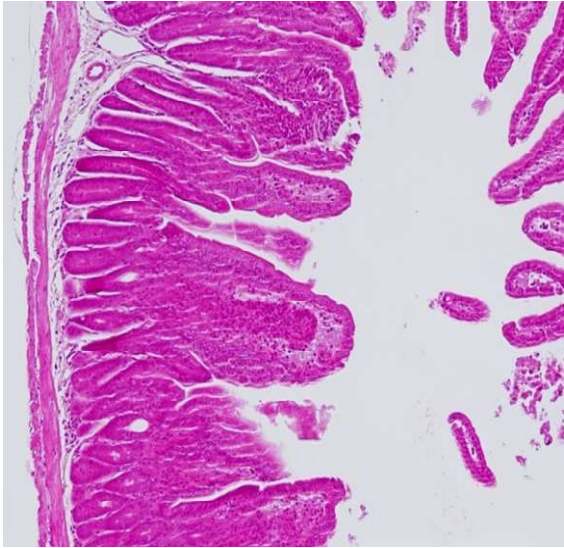
**3C**



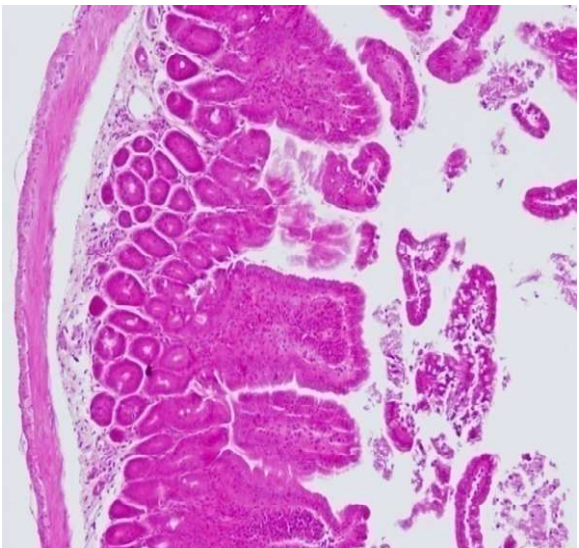
**3D**



**3E**

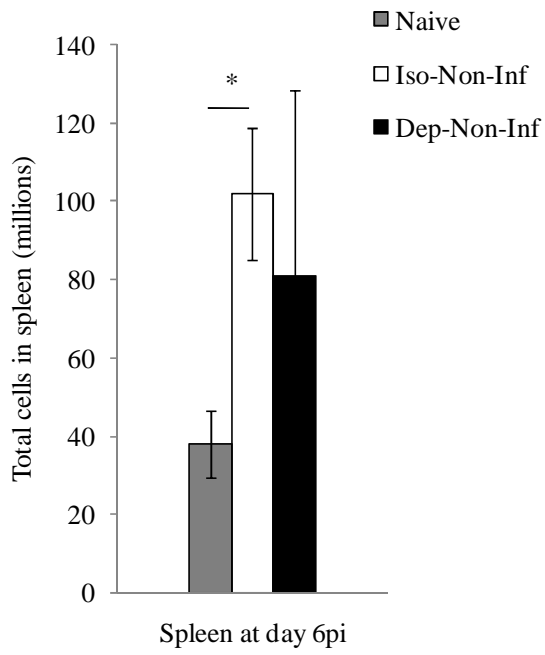


**3F**

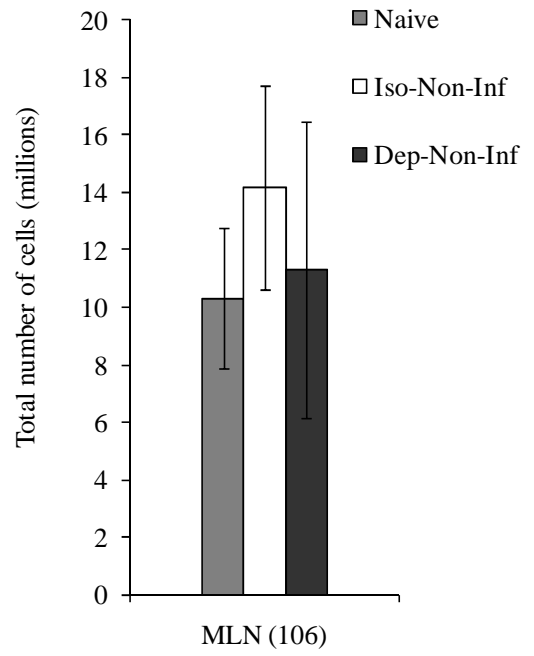


**Figure 4:**

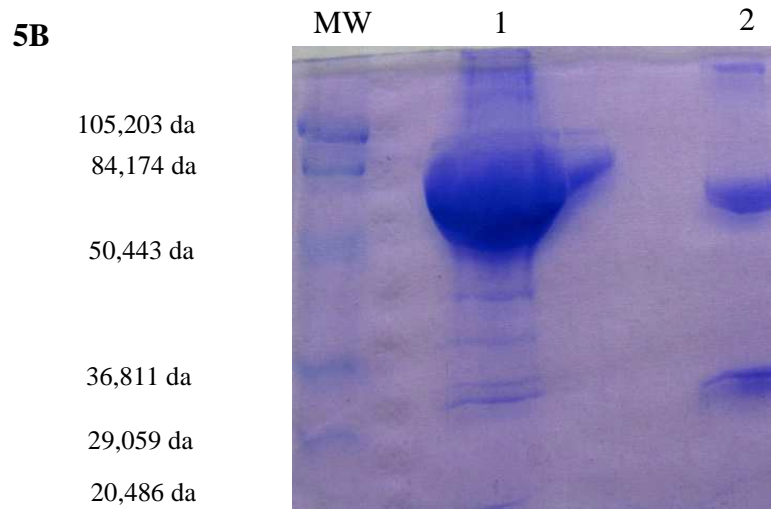
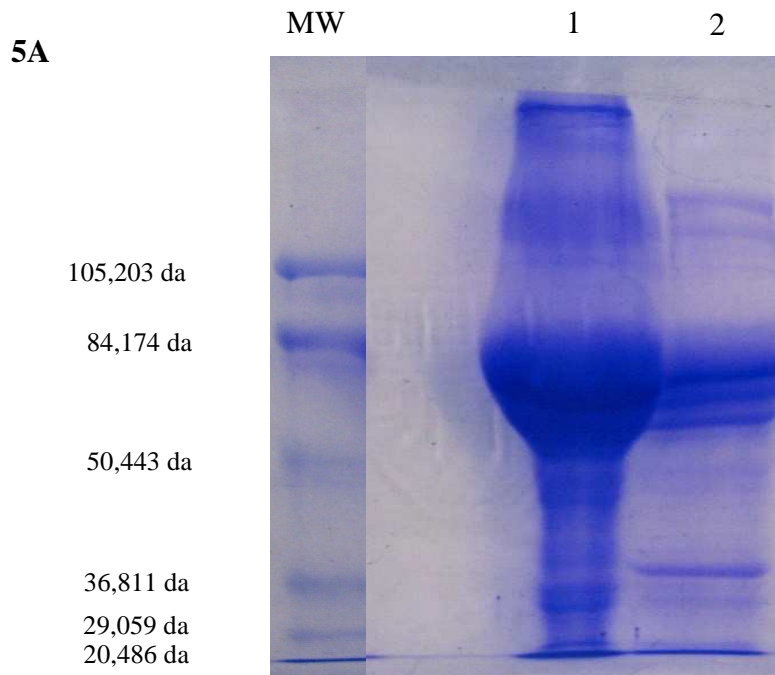
**4A**



**4B**



**Figure 5:**



**Figure 6:**

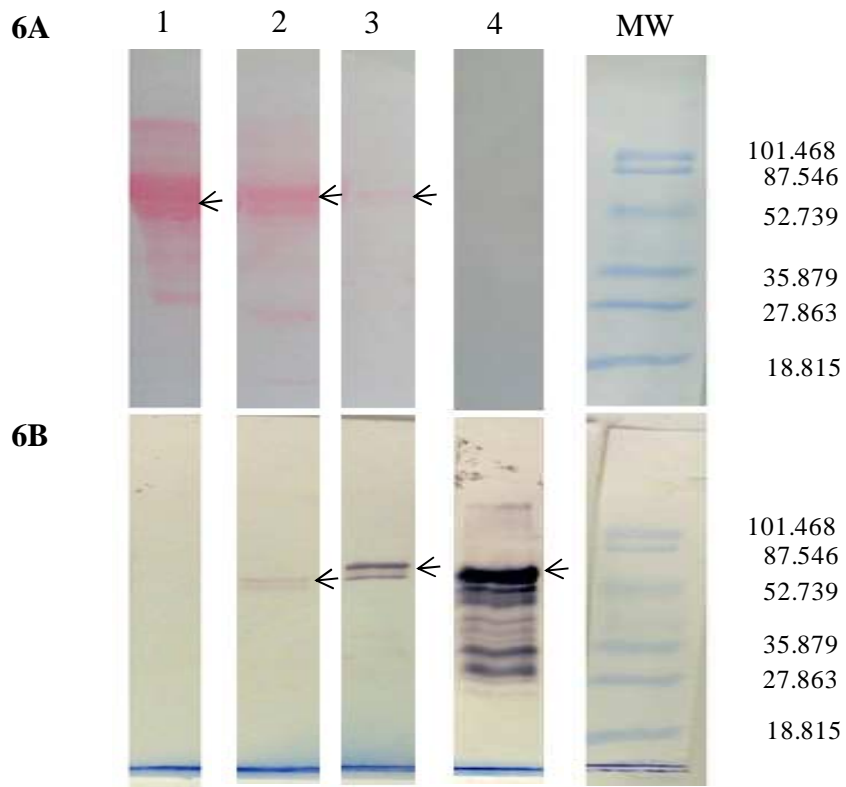
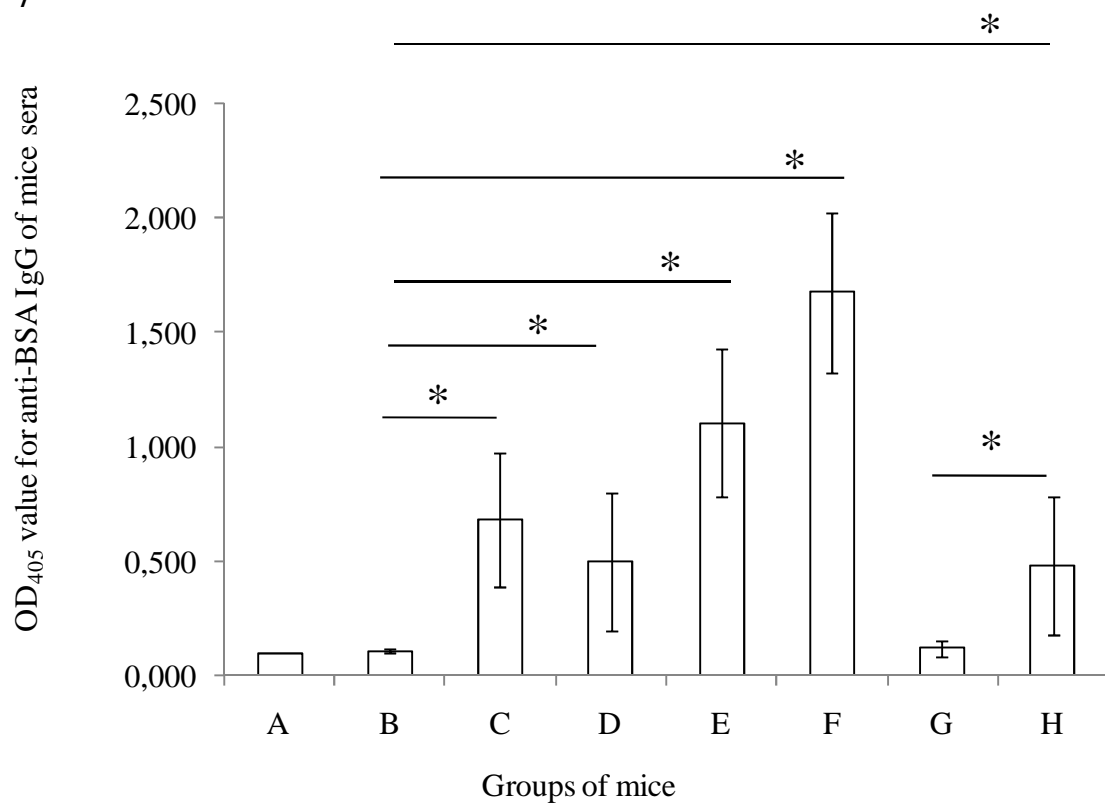
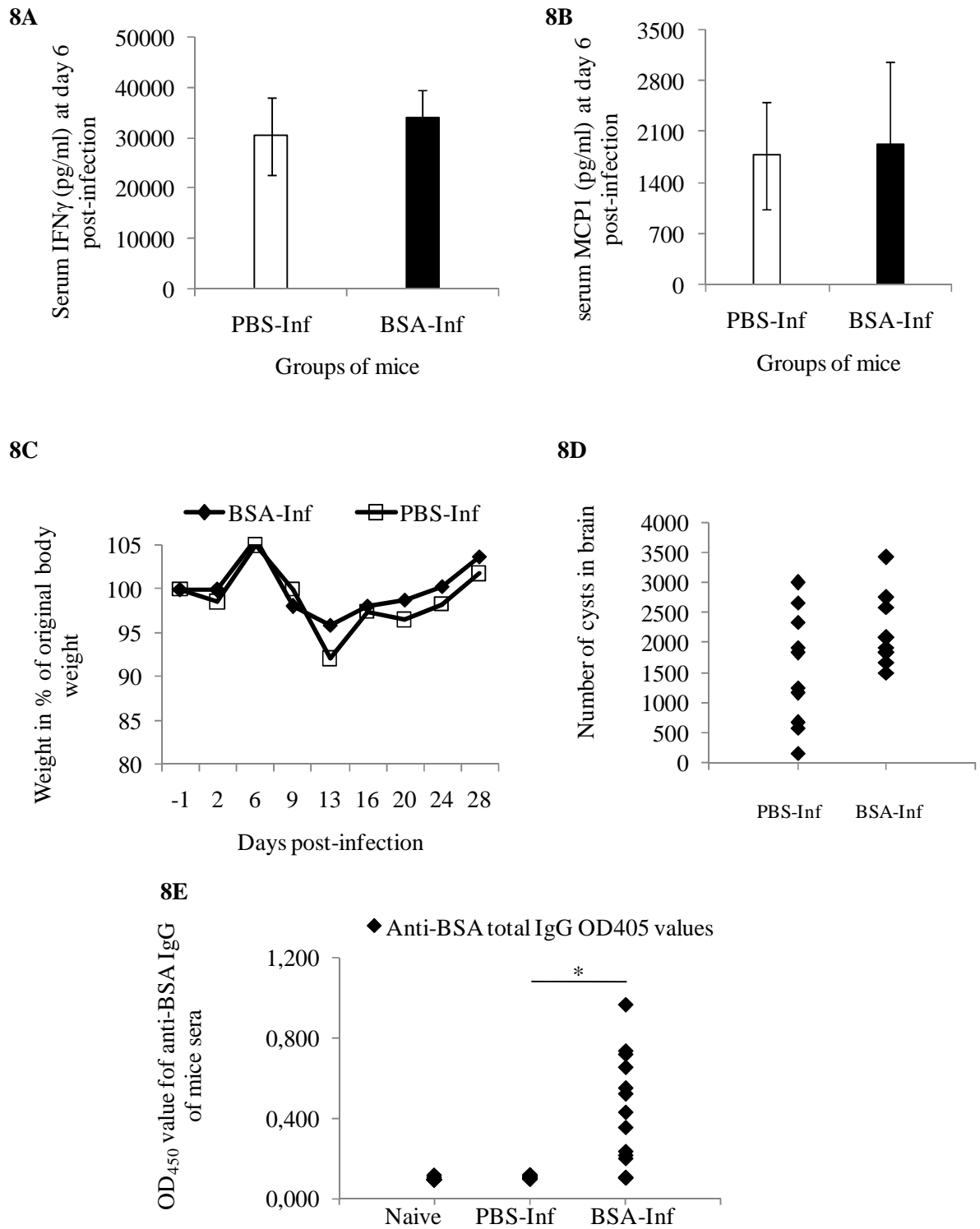


Figure 7:

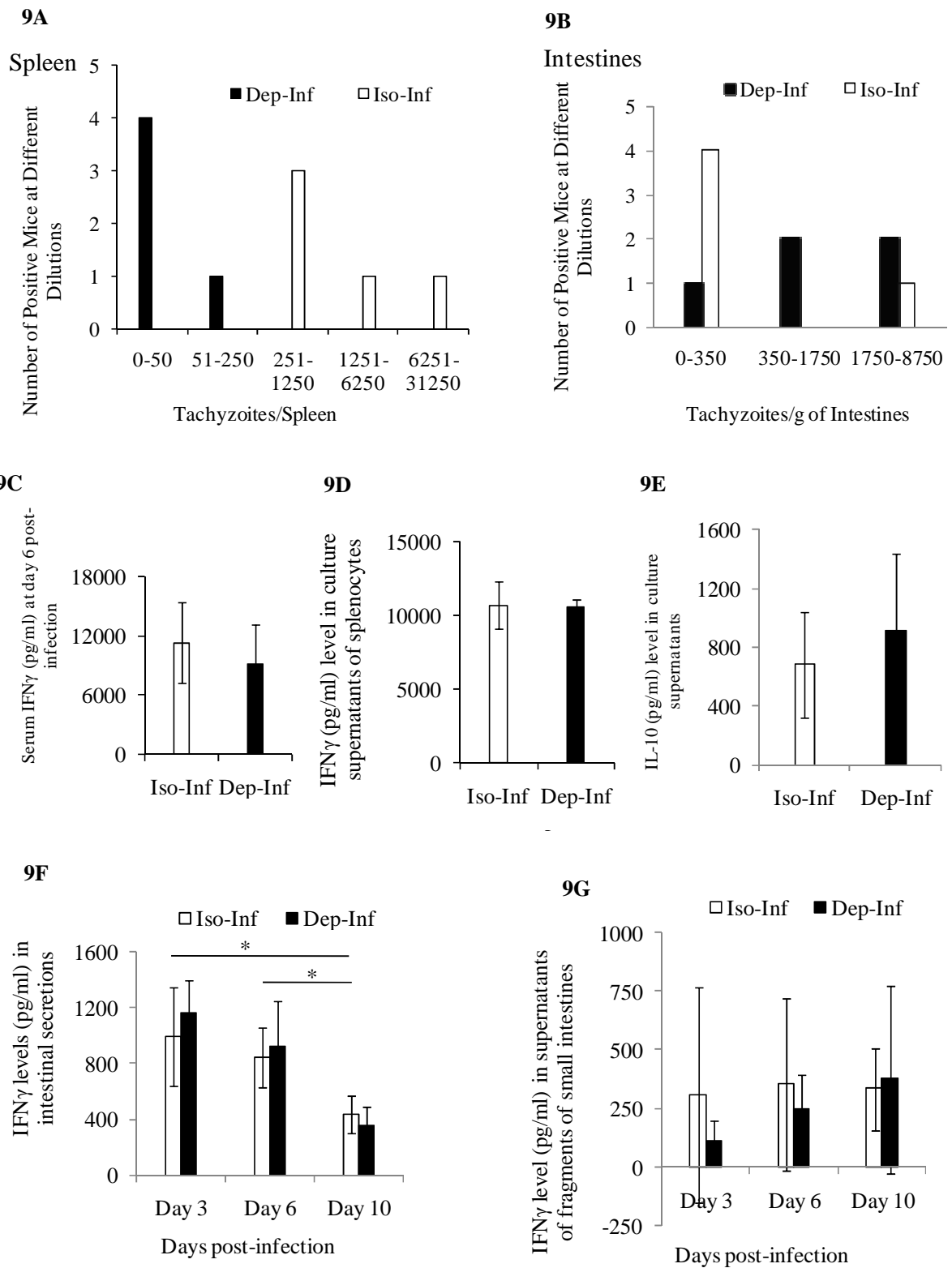
7



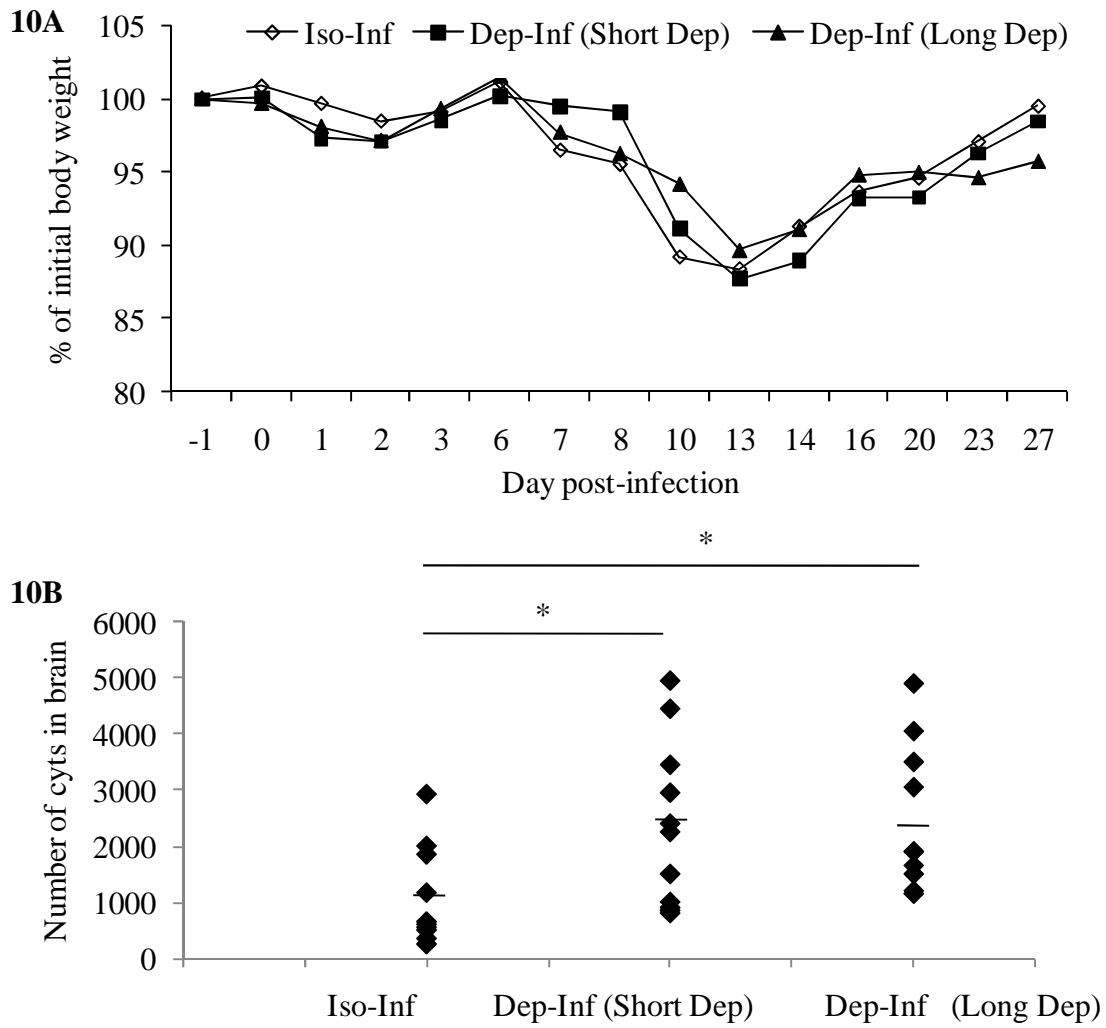
**Figure 8:**



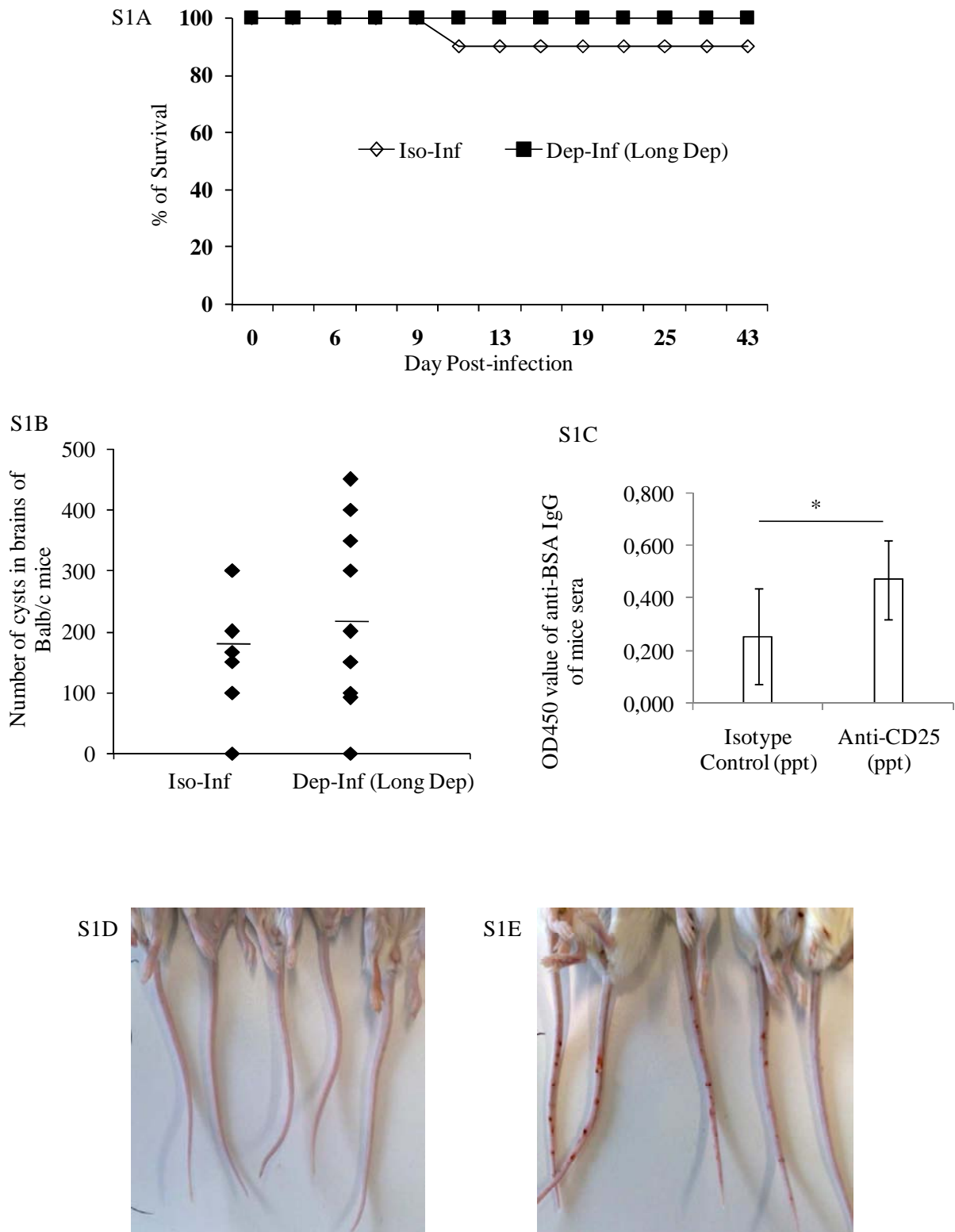
**Figure 9:**



**Figure 10:**



**Figure S1:**



## B. Article-II

### **Depletion of CD25<sup>+</sup> cells during acute toxoplasmosis does not significantly increase mortality in OF1 mice**

#### **Objectif :**

Déterminer le rôle des cellules T régulatrices (Treg) chez les souris OF1 (naturellement résistantes) pendant la toxoplasmose avec une souche de type-II de *Toxoplasma gondii*.

#### **Méthodes :**

Déplétion des cellules Treg CD25<sup>+</sup> en utilisant l'anticorps monoclonal anti-CD25 purifié et son contrôle isotypique purifié su colonne d'affinité.

Analyse de la survie et la charge parasitaire cérébrale des souris infectées déplétées ou non-déplétées.

#### **Résultats :**

- Pas de différence significative dans la survie et la charge parasitaire cérébrale des souris déplétées ou non-déplétées.
- Pas de différence de production d'IFN $\gamma$  au niveau systémique malgré une production significativement plus élevée d'IL12 dans les souris infectées-déplétées.
- Augmentation du pourcentage de cellules CD25<sup>+</sup> au cours de l'infection.

#### **Conclusions :**

L'anti-CD25 n'est pas un bon outil pour dépléter les cellules Treg pendant la toxoplasmose aiguë. L'utilisation de l'anti-CD25 dans la phase aiguë de la toxoplasmose déplete les deux populations cellulaires, les cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et les cellules T effectrices (Teff) CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, simultanément même si l'effet est préférentielle dans notre modèle sur les Treg. Donc il faut prendre en compte les effets de l'anti-CD25 sur les cellules effectrices exprimant le CD25 lors de l'utilisation de l'anticorps anti-CD25 comme outil de

déplétion dans les conditions inflammatoires comme la toxoplasmose aiguë dans lesquels il y a une augmentation du nombre des cellules Teff  $CD4^+Foxp3^-CD25^+$ .

L'effet de déplétion des deux populations régulatrices et effectrices pourrait expliquer que la survie et la charge parasitaire ne soient pas modifiées dans nos conditions expérimentales.

Short Title: Treg during acute toxoplasmosis

**Depletion of CD25<sup>+</sup> cells during acute toxoplasmosis does not significantly increase mortality in Swiss OF1 mice**

Haroon AKBAR<sup>1\*§</sup>, Stéphanie GERMON<sup>1</sup>, Patricia BERTHON<sup>2</sup>, Isabelle DIMIER-POISSON<sup>1</sup>, Nathalie MOIRÉ<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> UMR0483 Université-INRA Laboratoire d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses, UFR de Pharmacie, Université François Rabelais de Tours, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France.
- <sup>2</sup>INRA - UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380 Nouzilly, France.

\*Corresponding author: [drharoonakbar@yahoo.co.uk](mailto:drharoonakbar@yahoo.co.uk)

§ Present Address: Department of Parasitology, University of Veterinary and Animal Sciences, Syed Abdul Qadir Jillani (Out Fall) road, 54000, Lahore, Pakistan.

Accepté à la revue « Memórias do Instituto Oswaldo Cruz »

## **Abstract**

The IL2R alpha chain (CD25) is expressed on regulatory T cells (Treg), which constitute more than 85% of the CD25<sup>+</sup> T cell population in a naive mouse. CD25 is also expressed on effector T cells (Teff) in mice suffering from an acute infection by the obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. Lethal toxoplasmosis is accompanied by a significant loss of Treg in mice naturally susceptible to toxoplasmosis. The present study was done to explore the role of Treg cells using an anti-CD25 antibody-mediated depletion in mice naturally resistant to toxoplasmosis. Although a significant decrease in the percentage of Treg cells was observed following anti-CD25 monoclonal antibody (mAb) injections, the depletion of CD25<sup>+</sup> cells during acute toxoplasmosis did not significantly increase the mortality of Swiss OF1 mice, and no significant difference was observed in the brain parasitic load between the mice in the depleted-infected and isotype-infected groups. We found no significant difference between the titres of total IgG in the sera of the mice from the two groups in the chronic phase. However, CD25<sup>+</sup> cells depletion was followed by significantly higher levels of IL12 in the serum of depleted mice than in that of mice injected with the isotype control antibody.

**Keywords:** Treg/depletion/toxoplasmosis

## Introduction

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite of worldwide significance, responsible for one of the main zoonotic diseases occurring also in developed countries. Cellular responses play an important role in protecting the host against *T. gondii* infection (Dubey 2008, Suzuki *et al.* 1988). In mice infected with acute toxoplasmosis, the production of IL12 and of IFN $\gamma$  by the dendritic cells (DC) and CD4<sup>+</sup> T cells respectively, triggers a Th1-type protective immune response (Aliberti *et al.* 2000, Gazzinelli *et al.* 1996). The protection provided by a Th1-type response needs to be properly regulated, otherwise an excessive immune response could be deleterious for the host, as happens in case of C57BL/6 mice with acute toxoplasmosis. These mice die of an uncontrolled Th1-type immune response that causes a lethal necrotic inflammation of the intestine during the acute phase of the infection (Liesenfeld *et al.* 1996). Recently it has been found (Oldenhove *et al.* 2009) that these mice exhibit a sharp decline in the percentage of regulatory T cells (Treg) just before death, supporting the idea of a defective immuno-regulation. Treg cells are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells, and their main function is to maintain immune homeostasis and tolerance (Sakaguchi *et al.* 2009). They express constitutively interleukin-2 receptor chain alpha (IL2R $\alpha$ ), also known as CD25, a surface receptor, and the intracellular marker forkhead box-p3 transcription factor (Foxp-3) (Sakaguchi *et al.* 2009). The CD25 expression in Treg is maintained by IL2 (Curotto de Lafaille *et al.* 2004). Depending on the origin, generation, different types of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells have been described with two main subsets defined as natural Treg cells (nTreg) (developing in the thymus) and inducible Treg (iTreg) cells (developing in the periphery from conventional CD4<sup>+</sup> T cells) (Belkaid, 2007). Both nTreg and iTreg express CD25 and until now no specific phenotypic marker has been described to identify one from the other population. Treg cells play different roles in parasitic infections,

such as in leishmaniasis and malaria (Belkaid *et al.* 2002, Hisaeda *et al.* 2004). In malaria, Treg cells have been reported either to have beneficial effects or to exacerbate disease and death (for review Finney *et al.* 2009).

A collapse of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells has been observed in an acute and lethal model of toxoplasmosis demonstrating the importance of Treg cells in regulating immune responses (Oldenhove *et al.* 2009). The regulation of the immune response in resistant strains of mice during acute toxoplasmosis remains to be explored, as only a few contradictory reports, in terms of mortality, exist so far (Oldenhove *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2010, Morampudi *et al.* 2011). The level of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells appears to be correlated with the resistance of mice to acute toxoplasmosis (Oldenhove *et al.* 2009, Couper *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2010 and 2011). CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells do not decrease significantly in a toxoplasmosis-resistant mouse model (Balb/c) (Oldenhove *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2011) whereas a very marked reduction in the percentage of these cells does occur in an acute toxoplasmosis-susceptible mouse model (C57/BL6) (Oldenhove *et al.* 2009).

Different approaches have been used to analyse Treg cell functions. These have included the depletion of CD25<sup>+</sup> Treg cells using anti-CD25 monoclonal antibody (mAb) (Hisaeda *et al.* 2004, Couper *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2010). The depletion mechanism is not fully understood but anti-CD25 treatment caused the downregulation or shedding of CD25 marker on Treg cells and reduced the percentage of Foxp3 positive cells (Kohm *et al.* 2006, McNeill *et al.* 2007). One study describes the role of FcγRIII<sup>+</sup> phagocytes in anti-CD25 mAb mediated depletion of Treg cells (Setiady *et al.* 2010).

In the work reported here, we studied the effects of anti-CD25 mAb-mediated depletion of CD25<sup>+</sup> cells in Swiss OF1 mice (which are naturally resistant to toxoplasmosis) during acute infection with strain 76K, a type-II strain of *T. gondii*. Although a significant reduction of CD25<sup>+</sup> Treg cells was observed in both spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) on day 6

post-infection (pi), with significant production of serum IL12, no significant difference was observed in mortality, or brain parasitic load in the mice receiving anti-CD25 mAb compared to those receiving isotype control mAb. At the same time, we did find a significant increase in CD25<sup>+</sup>Teff cells in mice receiving isotype control mAb. On the other hand, no significant difference was found for the CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg/CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff ratio between mice from the infected groups injected with either anti-CD25 mAb or isotype control mAb. Hence anti-CD25 mAb mediated depletion of CD25<sup>+</sup> cells did not significantly increase the mortality of a naturally resistant strain (Swiss OF1) of mouse during acute infection with *T. gondii*.

## **Materials and Methods**

### **2.1 Mice**

Six to 8 week old Swiss OF1 female mice were purchased from Janvier (France), and were kept in the animal house of the University of Tours. The mice were given food and water ad libitum. The infected animals were observed for the onset of clinical signs or symptoms daily (e.g. coat, response to external stimuli and physical activity in the cage) until euthanized.

### **2.2 Parasites and Infections**

*T. gondii* strain 76K was used to infect the mice. The 76K strain is being maintained in female CBA/J mice. Every month, the naïve CBA/J mice are infected orally with 50 cysts of this strain collected from the brain of a CBA/J mouse in chronic phase of the infection.

Brains containing the cysts were homogenised in RMPI-1640 medium (Dutscher, Brumath, France), and the cysts were counted under microscope. Swiss OF1 mice were orally infected with 50 cysts.

### **2.3 Antibody treatments**

The monoclonal antibody used against the CD25 was a rat IgG1 (PC61 clone; ATCC). The isotype control rat IgG1 was obtained from the CRL1912 hybridoma (a kind gift of Dr Laleh Majlessi, Institut Pasteur, Paris, France). Both antibodies were purified by ammonium sulfate (40%) precipitation from the supernatants of the hybridoma culture. After precipitation, the supernatant was extensively dialysed against a phosphate buffered saline solution (PBS). The concentrated and dialysed supernatants of hybridomas were purified using HiTrap Protein-G HP columns (GE Healthcare) following the manufacturer's recommendations. The purified antibodies were assayed for protein concentration by the micro-BCA technique using a commercial kit (Sigma-Aldrich from Servilab, Le Mans, France) containing purified BSA as standard protein.

The mice were depleted of CD25<sup>+</sup> cells by the intra-peritoneal injection of anti-CD25 antibody (500µg per mouse per administration) on days -1, 0, 3 and 6 of infection. The isotype-control group was also injected at the same time and same dose as the anti-CD25 mAb treated group.

### **2.4 Blood leucocytes, spleen cells and MLN cells**

Blood was collected from the medial canthus of the mouse eyes in anti-coagulant (EDTA or Heparin)-coated blood collection tubes, and mixed thoroughly. The red blood cells were lysed

twice with 5ml of lysis buffer (0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0M KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.3) for two minutes at room temperature. The lysis reaction was stopped by adding 20ml of RPMI-1640 supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Dutscher, Brumath, France).

Mice were euthanized by cervical dislocation on day 6pi. Spleens and MLN were collected and cell suspensions were prepared as previously described (Ismael *et al.* 2003). The cells were stained with specific antibodies in 96-well plates, with 5×10<sup>5</sup> cells/well.

## **2.5 Flow cytometry**

The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were analysed by flow cytometry using FACScalibur (BD, Le Pont de Claix, France). Anti-mouse CD4-(H129-19) FITC, anti-mouse CD25-PE (7D4) monoclonal labelled antibodies and their corresponding isotype controls were obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Cells were incubated for 15 minutes at 4°C for saturation in 200 µl of 4% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) prepared in PBS, and then stained in the same medium. For Foxp3 staining, the cells were labelled using the Foxp3 staining set (clone FJK 16s) purchased from eBiosciences (Clinisciences, Montrouge, France) according to the recommended protocols. For each sample, at least 50,000 events were acquired.

## **2.6 ELISA and brains cyst load**

Cytokine and chemokine levels (IFN $\gamma$ , IL10, IL12 p70, MCP1) were quantified from mouse serum by ELISA using OptEIA kits (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) following the manufacturer's recommendations.

Serum samples were collected 6 weeks pi before the mice were euthanized for the detection of *Toxoplasma* specific IgG. The titres were calculated as described previously (Ismael *et al.* 2003).

The brains were collected in 5ml of RPMI-1640, and homogenised with a potter. The number of parasite cysts in the homogenate was calculated under microscope by 10 counts per mouse using 10 µl of homogenate for each count.

## **2.7 Statistics**

The two-tailed Mann-Whitney test, Student's t-test, Kruskal Wallis test, were used to compare the values.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **Ethics**

All experiments were performed in accordance with the guidelines on animal experimentation of the “Université François Rabelais de Tours, France”.

## **Results**

### **4.1 Clinical signs and survival of mice acutely infected with *T. gondii* after CD25<sup>+</sup> cell depletion**

Mice orally infected with 50 cysts of *Toxoplasma gondii* were divided into two groups: one treated with the anti-CD25 mAb (anti-CD25 group) and the other treated with the isotype control mAb (control mAb group). Clinical signs and survival of the mice were monitored to

find out whether the anti-CD25 mAb administration increased the susceptibility of the mice to acute toxoplasmosis. We confirmed that the anti-CD25 mAb injection induced significant depletion (by about 60%) of CD25<sup>+</sup> cells in the blood of the naive mice (data not shown). All the mice in both infected groups became sick at day 6 pi and developed a ruffled coat that lost its sheen and became dull in appearance. This continued till 11 days pi. On day 13 pi, all the mice in the control mAb group started to recover, whereas those in the anti-CD25 group still displayed clinical signs. The survival of the mice was followed up to six weeks pi. Twenty-seven percent mortality was observed in the anti-CD25 group from day 19 to day 28 pi (Fig. 1a). The difference in mortality between the groups was not significant (P=0.2463).

The parasite load was estimated in mice brains during the chronic phase of infection at six weeks pi. The depletion of CD25<sup>+</sup> cells did not cause any significant difference in the number of tissue cysts in the brains of the anti-CD25 mice compared to those in the control mAb group (926 ± 733 cysts in the control mAb group versus 1026 ± 592 cysts in the anti-CD25 group) (Fig. 1b).

Serum was collected from the mice in the sixth week pi, and used to determine the total IgG titre. In both experiments, all groups had a high IgG titre, but no significant difference was observed between the titres of total IgG antibodies in the sera of mice injected with either the anti-CD25 antibody or the isotype control mAb (Table 1).

#### **4.2 Increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells among the CD4<sup>+</sup> blood cells during acute toxoplasmosis**

To find out whether acute infection caused an increase in the percentage of CD25<sup>+</sup> cells, we performed a kinetic study to determine the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells among the circulating CD4<sup>+</sup> cells in the blood of the mice (Fig. 2a) after infection. A significantly higher

percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells ( $5.23 \pm 1.92$  before infection versus  $12.07 \pm 2.59$  after infection) was found at day 3 pi ( $P < 0.05$ ). At day 6 pi, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the blood of the infected mice was not significantly different from that before infection.

#### **4.3 Effect of infection and depletion on the CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell population**

We further identified the depleted population after the anti-CD25 mAb injections. For this purpose, the mice were euthanized at day 6 pi. Hypertrophy of the spleens and MLNs was observed in both infected groups of mice. The total number of splenocytes was significantly higher in both infected groups than in the naive mice (Fig. 2b). The total number of MLN cells was increased in both infected groups; in the control mAb group this difference was statistically significant, whereas in the anti-CD25 group it was not (Fig. 2c).

At day 6 pi, the number of CD4<sup>+</sup> spleen cells was also higher in both infected groups (Table 2). This difference in number was significant in the control mAb group, but not in the anti-CD25 group for spleen and not significant in either group for MLN compared to the naive group (Table 2).

Despite the increased number of CD4<sup>+</sup> cells in spleens and MLNs of infected groups, their percentage was significantly lower in both organs compared to that in naïve mice (Table 2).

We next examined CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells after the anti-CD25 mAb treatment. A significantly greater number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells was found in both spleen and MLN of the control mAb group compared to the naive mice (Fig. 2d & 2f). The number was not significantly greater in the anti-CD25 group than that in either the naive or the control mAb group. Similarly, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells was significantly lower in both the spleen and MLN of the anti-CD25 group than in the control mAb group (Fig. 2e & 2g). As CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells

include both CD25<sup>+</sup> Treg and CD25<sup>+</sup> Teff cells, we used Foxp3, to differentiate between CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Teff cells.

#### **4.4 Effect of infection and CD25<sup>+</sup>-cell depletion on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff cells and on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg/CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff ratio**

A significantly greater number of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells was observed in the spleens of the control mAb group compared to the naive group (Fig. 2d). No significant difference was observed for the anti-CD25 group compared to either of the other groups (Fig. 2d). Similarly, more Treg cells, although the difference was not significant, were observed in MLN in the control mAb group than in the naive group. The number of Treg was not significantly different in the anti-CD25 group compared to either the naive or control mAb group (Fig. 2f).

A significantly lower percentage of Treg cells was observed in the anti-CD25 group than in either the naive group or the control mAb group in both spleen and MLN at day 6 pi (Fig. 2e & 2g). No significant difference was observed between the percentages of Treg in the control mAb group and the naive group. This was the case for both spleen and MLN (Fig. 2e & 2g).

A significantly greater number and percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Teff cells was observed at day 6 pi in the control mAb group than in the naive mice. This was observed in both spleen and MLN (Fig. 2d, 2e, 2f, 2g). No significant difference in either the number or percentage was observed in the anti-CD25 group for either spleen or MLN compared to the naive or groups.

The CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg/CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff ratio was lower in the anti-CD25 and control mAb groups than in the naive group, and this was observed for both spleen and MLN.

The value in the anti-CD25 group was significantly lower than in the naive group. There was no significant difference between the naive and control mAb groups, or between the control mAb and anti-CD25 groups (Fig. 3a).

#### **4.5 CD25<sup>+</sup> cell depletion did not significantly reduce the production of the cytokines, IFN $\gamma$ , IL10 and chemokine MCP-1, but did cause a significant increase in IL12 production**

Although a significant reduction in the percentage of Treg cells was observed at day 6 pi in the anti-CD25 group, no difference in the parasitic load of the brains was observed. We therefore determined the levels of the chemokine MCP-1, and cytokines IL12, IFN $\gamma$  and IL10 in the sera of the mice at day 6 pi. There was a significant production of both MCP-1 (Fig. 3b) and IFN $\gamma$  (Fig. 3d) in both the control mAb and anti-CD25 groups compared to the naive group. The production of IL10 was significantly greater in the control mAb group, but not in the anti-CD25 group, than in the naive mice (Fig. 3e). No significant difference was noted in the level of IL12 production between the naive mice and those in the control mAb group (Fig. 3c).

Similarly no significant differences were found between the control mAb and anti-CD25 groups for the levels of MCP-1, IFN $\gamma$  and IL10 (Fig. 3b, 3d, 3e). The only difference was found for IL12 production, which was significantly greater in the anti-CD25 group than in either the naive group or the control mAb group (Fig. 3c).

## **Discussion**

One of the main objectives of this work was to study the role of Treg cells during acute toxoplasmosis in a resistant out-bred mouse strain. The present study was done in a naturally-resistant mouse model, Swiss OF1 mice, using a type-II strain (76K) of *T. gondii* administered by oral route. The oral route is a natural route of infection for most of animal and human infections. Swiss OF1 mice are an out-bred mouse strain displaying individual variability of infection resistance. The results observed with this strain can readily be extrapolated to farm animals, and possibly also to human (Rai *et al.* 2009).

Treg cells were depleted using anti-CD25 mAb, a classical technique used in several other models of infection (Couper *et al.* 2007, Hisaeda *et al.* 2004, Kotner & Tarleton 2007). In the current study, anti-CD25 mAb efficiently depleted CD25<sup>+</sup> cells (by about 60% in blood, spleen and MLN cells) in the naive mice (unpublished observations) in a manner comparable to that reported earlier (Couper *et al.* 2007, Kotner & Tarleton 2007, Morampudi *et al.* 2011). Anti-CD25 mAb caused also a significant reduction (about 40%) in the percentage and number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the spleen and MLN of the infected mice. In infected mice, anti-CD25 mAb administration preferentially targets Foxp3<sup>+</sup> Treg cells with 40 to 57% depletion in spleen and MLN respectively as described in the work of Morampudi *et al.* (2011) and Tenorio *et al.* (2011). However, no significant difference was found in the Treg/Teff ratios between both infected groups, and consistent with this, no significant differences were observed between the two groups for mortality, brain parasitic load, or total serum IgG levels.

In one experiment, one out of eleven mice died and two mice were euthanized due to loss of more than 20% of their bodyweight. These two mice were found to be immunosuppressed as they displayed spleen atrophy (data not shown). This was probably due to the immunosuppressive effects of anti-CD25 mAb (Waldmann 2007). However, no significant difference in mortality was observed in OF1 mice following injections of anti-CD25 mAb.

This is consistent with data reported by Oldenhove *et al.* (2009) and Morampudi *et al.* (2011) using Balb/c resistant mice, but not with the findings of Couper *et al.* (2009) in susceptible C57BL/6 mice.

No significant difference was found in the brain parasitic load between infected OF1 mice receiving anti-CD25 mAb or the isotype control antibody, which conflicts with the findings of Couper *et al.* (2009) and Morampudi *et al.* (2011), who observed a rise in number of cysts in brain after the depletion of CD25<sup>+</sup> cells. The significant difference in brain parasitic load observed by Couper *et al.* (2009) might be due to the facts that Couper *et al.* (2009) used a naturally susceptible mouse strain (C57BL/6) and showed a more pronounced effect of anti-CD25 mAb on effector T cells during acute toxoplasmosis. Similarly, Tenorio *et al.* (2011) reported that anti-CD25 mAb has more pronounced effect on effector T cells in acute toxoplasmosis-susceptible mouse model (C57BL/6).

Morampudi *et al.* (2011) observed a higher parasitic load in the brain of Balb/c mice after depletion with PC61. The discrepancy between the study of Morampudi and the present work, in term of parasitic load could be due of the kinetic of injection of PC61 and the difference in mouse strain.

Consistent with the lack of effect on parasitic load, anti-CD25 administration had no effect on circulating IFN $\gamma$  level in our experimental condition. Whereas Couper *et al.* (2009) observed that anti-CD25 mAb treatment leads to reduced circulating IFN $\gamma$  level, consistent with the preferential depletion of Teff cells in the C57BL/6 mice. On the contrary, Morampudi *et al.* (2011) observed increased IFN $\gamma$  level and high parasite burden after antibody treatment of Balb/c mice consistent with the preferential depletion of Treg cells in these mice (Tenorio *et al.* 2011). In our experiments, although anti-CD25 mAb administration preferentially targets Treg, no significant difference in the Treg/Teff ratio was found between the two infected

groups given anti-CD25 mAb or the control mAb, respectively. This may account for the similar IFN $\gamma$  level in both groups.

IFN $\gamma$  is produced by CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff cells (Couper *et al.* 2009) and natural killer cells (Gazzinelli *et al.* 1993) during acute toxoplasmosis and is responsible for the control of parasite replication. The IFN $\gamma$  production is largely IL12-dependent (Gazzinelli *et al.* 1993, Gazzinelli *et al.* 1994, Khan *et al.* 1994). CD25<sup>+</sup> cell depletion induced the significant production of IL12 that is not followed in our experiment by increased serum IFN $\gamma$  level in depleted infected mice. IL12 is produced by dendritic cells (DC) (Aliberti *et al.* 2000) and macrophages (Robben *et al.* 2004). Treg cells exert their regulatory function on effector T cells and also on antigen presenting cells (APC) (Mahnke *et al.* 2007). CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen-4) of Treg cells can prevent the maturation (by down-regulation of CD80/86) of DC by engaging with the B7 of these cells (Grainger *et al.* 2010, Mahnke *et al.* 2007). Decreased regulatory activity due to the depletion of Treg cells can result in the production of more IL12 by DC.

IL10 is also produced by Treg cells, and regulates the production of IL12 by DC (Gazzinelli *et al.* 1996, Yanagawa *et al.* 2008). The drop in IL10 level after anti-CD25 mAb injections, might be responsible for the significant higher production of IL12 in depleted infected mice. However, it has also previously been described that CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> cells that co-produce IFN $\gamma$  are the primary source of IL10 during acute toxoplasmosis (Jankovic *et al.* 2007). Further experiments are required to determine the source of IL12 and IL10 in this context.

A significantly greater number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was observed in the infected mice than in the naive mice, as previously reported (Couper *et al.* 2009). This expansion in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells concerned both Foxp3<sup>+</sup> Treg and Foxp3<sup>-</sup> Teff since the absolute numbers of both populations were found to expand in parallel. The infection also resulted in a significantly greater percentage of Teff cells in spleen and MLN than in naive mice. Similar findings of an

increased expression of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teff cells have already been reported (Couper *et al.* 2009).

No significant difference was found in the percentage of Treg cells in spleen or MLN at day 6 pi compared to naive mice, similar to the findings of Tenorio *et al.* (2011) in resistant mice and contrary to previous reports of a drop in the percentage of Treg cells during acute toxoplasmosis in both susceptible mice (Ge *et al.* 2008, Oldenhove *et al.* 2009) and resistant mice (Tenorio *et al.* 2010).

Changes in Treg/Teff level could be a more informative measure of immune status than absolute Treg numbers as already described (Scholzen *et al.* 2009). In naive mice the ratio is greater than in infected mice suggesting an imbalance towards immune inhibition to maintain homeostasis. In infected mice, the ratio is slightly lower consistent with expansion of Teff cells necessary to control the parasite. No significant difference in the Treg/Teff ratio was found between the two infected groups given anti-CD25 mAb or the control mAb, respectively. This finding is correlated with a comparable susceptibility to the acute infection. Finally, we conclude that resistance to acute toxoplasmosis in Swiss OF1 mice is accompanied by the maintenance of the percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells. It is probable that the mortality observed in C57BL/6 (susceptible mice), whether after depletion during a sublethal infection (Couper *et al.* 2009) or from the lethal infection (Oldenhove *et al.* 2009), might be due to a significant decrease in the Treg/Teff ratio. We hypothesize that a depletion mechanism bringing about a change in the percentage of Treg or Teff cells that significantly alters the Treg/Teff balance in depleted infected mice during acute toxoplasmosis, might cause a significant change in the outcome of the infection.

In addition, we show that the inflammatory phase in Swiss OF1 mice suffering from acute toxoplasmosis, is also accompanied by a significant rise in the number and percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Teff cells that become another potential target for anti-CD25 mAb, as

already reported in C57BL/6 mice (Couper *et al.* 2009). Hence the potential effects of anti-CD25 mAb on CD25<sup>+</sup> non-Treg must be taken into account while using anti-CD25 mAb as a depletion tool of Treg.

### **Acknowledgement**

Haroon Akbar is on Overseas Scholarship Scheme for PhD studies in France by Higher Education Commission, Islamabad, Pakistan. The authors would like to thank M. T. Arias, M. Mas, S. Bigot, T. Papin and C. Rossignol for their excellent technical assistance.

## References

- Aliberti J, e Sousa CR, Schito M, Hieny S, Wells T, Hunagle GB, Sher A 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha<sup>+</sup> dendritic cells. *Nat Immunol*: 83-87.
- Belkaid Y 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev. Immunol.* 7: 875-888.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL 2002. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*420: 502-507.
- Couper KN, Blount DG, de Souza JB, Suffia I, Belkaid Y, Riley EM 2007. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol*178: 4136-4146.
- Couper KN, Lanthier PA, Perona-Wright G, Kummer LW, Chen W, Smiley ST, Mohrs M, Johnson LL 2009. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 182: 3985-3994.
- Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ 2004. CD25<sup>-</sup> cells generate CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory cells by peripheral expansion. *J Immunol*173:7259-7268.
- Dubey JP 2008. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55: 467-475.
- Finney OC, Riley EM, Walther M 2009. Regulatory T cells in malaria – friend or foe? *Trends in Immunol.* 31: 63-70.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6115-6119.
- Gazzinelli RT, Hayashi S, Wysocka M, Carrera L, Kuhn R, Muller W, Roberge F, Trinchieri G, Sher A 1994. Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. *J Eukaryot Microbiol* 41: 9S.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Casper P, Trinchieri G, Sher A 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 153: 2533-2543.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with

*Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF-alpha. *J Immunol* 157: 798-805.

Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu E, Liang YJ, Wang Y 2008. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> -regulatory T cells. *Parasite Immunol* 30: 471-481.

Grainger JR, Hall JA, Bouladoux N, Oldenhove G, Belkaid Y 2010. Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T-cell fate. *Immunol Rev* 234: 305-316.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 10: 29-30.

Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mévélec M-N 2003. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect Immun* 71: 6222-6228.

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204: 273-283.

Johanns TM, Ertelt JM, Rowe JH, Way SS 2010. Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent *Salmonella* infection. *PLoS Pathogens* 6: e1001043.

Khan IA, Matsuura T, Kasper LH 1994. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 62: 1639-1642.

Kotner J, Tarleton R 2007. Endogenous CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 75:861-869.

Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, Begolka WS, DeGutes M, Kasprovicz DJ, Ziegler SF, Miller SD 2006. Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 176:3301-3305.

Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y 1996. Association of CD4<sup>+</sup> T cell-dependent, interferon- $\gamma$ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184: 597-607.

Mahnke K, Bedke T, Enk AH 2007. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 250: 1-13.

McNeill A, Spittle E, Bäckström BT 2007. Partial depletion of CD69<sup>low</sup>-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scan J Immunol* 65: 63-69.

Morampudi V, De Craeye S, Le Moine A, Detienne S, Braun MY, D'Souza S 2011. Partial depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes Infect* 13(4): 394-404.

Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Santos LD, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S, Kastenmayer R, Hunter C, Grigg ME, Belkaid Y 2009. Decrease of Foxp3 (+) Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31: 1-15.

Rai D, Pham NL, Harty JT, Badovinac VP 2009. Tracking the total CD8 T cell response to infection reveals substantial discordance in magnitude and kinetics between inbred and outbred hosts. *J Immunol* 183: 7672-7681.

Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol* 172: 3686-3694.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21: 1105-1111.

Scholzen A, Minigo G, Plebanski M 2009. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends in Parasitology* 26: 16-25.

Setiady YY, Coccia JA, Park PU 2010. *In vivo* depletion of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fc R III<sup>+</sup> phagocytes. *Eur J Immunol* 40: 780-786.

Shevach EM 2009. Mechanisms of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS 1988. Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 4851 : 516-518.

Tenorio EP, Olgún JE, Fernández J, Vieyra P, Saavedra R 2010. Reduction of Foxp3<sup>+</sup> cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *T. gondii*. *J Biomed Biotechnol* 786078.

Tenorio EP, Fernández J, Olgún JE, Saavedra R 2011. Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 362-367.

Waldmann TA 2007. Anti-Tac (daclizumab, Zenapax) in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, and in the prevention of allograft rejection: a 25-year personal odyssey. *J Clin Immunol* 27: 1-18.

Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K 2008. Co-operative action of interleukin-10 and interferon- $\gamma$  to regulate dendritic cell functions. *Immunology* 127: 345-353.

## Legends of figures

**Figure 1:** a: Survival of mice injected with anti-CD25 or with isotype control antibody and infected 24 hours after the first antibody injection. n=11 for the anti-CD25 group, and n=10 for the control mAb group. The  $\chi^2$  test with the Yates correction was used to compare the mortality between the two groups. The difference between the two groups was non-significant, P=0.2463. The experiment was repeated twice with similar results. b: The brain cyst load on day 38 post-infection in mice injected with anti-CD25 or with isotype control antibody. n=8 for the anti-CD25 group and n=10 for the control mAb group. A two-tailed Mann-Whitney test was used to compare the groups. The difference was not significant, with  $P > 0.05$ . The graph is representative of two similar experiments.

**Figure 2:** (a) Swiss OF1 mice were infected orally with 50 cysts of *T. gondii*. The blood of mice was collected during acute infection at days 3, 6, 10, 13 and 17 post-infection. The % of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells was calculated in the CD4<sup>+</sup> cells of the lymphocyte population. The graph represents the average values found on each test day, along with the standard deviations. n=11 for naive mice, and n=5 for each day post-infection. The Kruskal Wallis test was used to compare the results, \* indicates a significant difference, with  $P < 0.05$ .

The graphs represent the average values along with the standard deviations of the total number of cells in spleen (b) and in MLN (c). The Kruskal-Wallis test was used to determine the difference between three groups. \* indicates a significant difference.  $P < 0.05$ . n=5 for each group.

The graphs represent the average values along with the standard deviations of the total number (in spleen/MLN) and percentages (among CD4<sup>+</sup>) of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Teff cells in spleen (d, e) and in MLN (f, g). The Kruskal-Wallis test was used to determine the differences between the three groups. The experiment was done once. \* indicates a significant difference,  $P < 0.05$ . n=5 for each group.

**Figure 3:** a: The graphs represent the Treg/Teff ratio in spleen and MLN. The Kruskal-Wallis test was used to determine the difference between the three groups. \* indicates a significant difference,  $P < 0.05$ .  $n=5$  for each group. Serum MCP-1 (b), IL12 (c), IFN $\gamma$  (d) and IL10 (e) levels in mice before infection or on day 6 post-infection in mice injected with anti-CD25 or isotype control antibody, determined by ELISA.  $n=10$  for naive mice,  $n= 11$  for the anti-CD25 group, and  $n=10$  for the control mAb group. The Kruskal-Wallis test was used to compare the groups, \* indicates a significant difference,  $P <0.05$ . Similar results were obtained in two experiments.

Table 1 Total serum IgG titres<sup>a</sup> during the chronic phase of infection

Experiment	control mAb <sup>1</sup> (mean ± SD)	anti-CD25 <sup>2</sup> (mean ± SD)
I	17.64 ± 0.57 <sup>b</sup> (n=10) <sup>c</sup>	18.08 ± 0.53 <sup>b</sup> (n=9) <sup>c</sup>
II	16.74 ± 1.60 <sup>b</sup> (n=10) <sup>c</sup>	16.39 ± 1.04 <sup>b</sup> (n=8) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>The antigen specific antibody titre expressed as log<sub>2</sub> of the reciprocal of the highest dilution producing an optical density (OD) that was 2.5 fold greater than that of the serum of the control mice

<sup>b</sup>Differences were found non-significant by non-parametric Mann-Whitney test with P >0.05.

<sup>c</sup>Number of mice

<sup>1, 2</sup>*T. gondii* infected groups injected with isotype control and anti-CD25 mAb, respectively.

Table 2 Total number and % of CD4<sup>+</sup> cells in spleen and MLN at day 6 post-infection

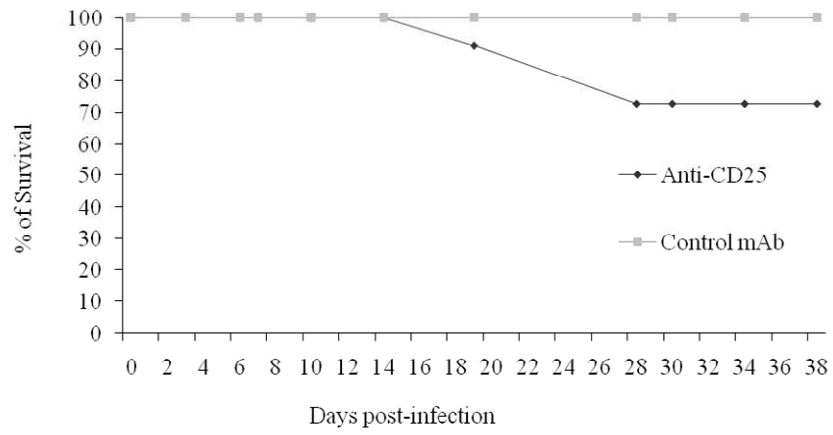
Organ		Naive mice	control mAb <sup>1</sup>	anti-CD25 <sup>2</sup>
		(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)
Spleen	Number (10 <sup>6</sup> )	9.9 ± 2.6	24.3 ± 8.3 <sup>a</sup>	20.5 ± 8.1
	%	26.2 ± 4.4	14.4 ± 2.8 <sup>a</sup>	13.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
MLN	Number (10 <sup>6</sup> )	6.4 ± 1.6	11 ± 3.6	9.6 ± 4.4
	%	62.3 ± 2	40 ± 4.2 <sup>a</sup>	41.3 ± 4.9 <sup>a</sup>

<sup>1,2</sup>*T. gondii* infected mice injected with isotype control and anti-CD25 mAb, respectively.

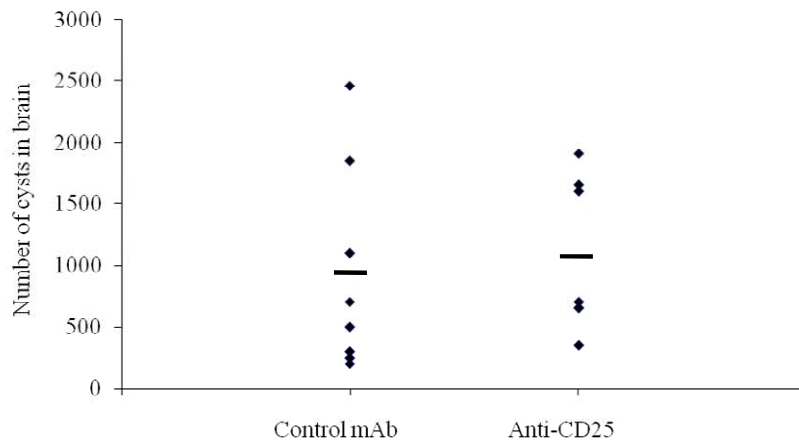
<sup>a</sup> Differences were found significant against naive group by non-parametric Kruskal Wallis test with P <0.05.

**Fig.1**

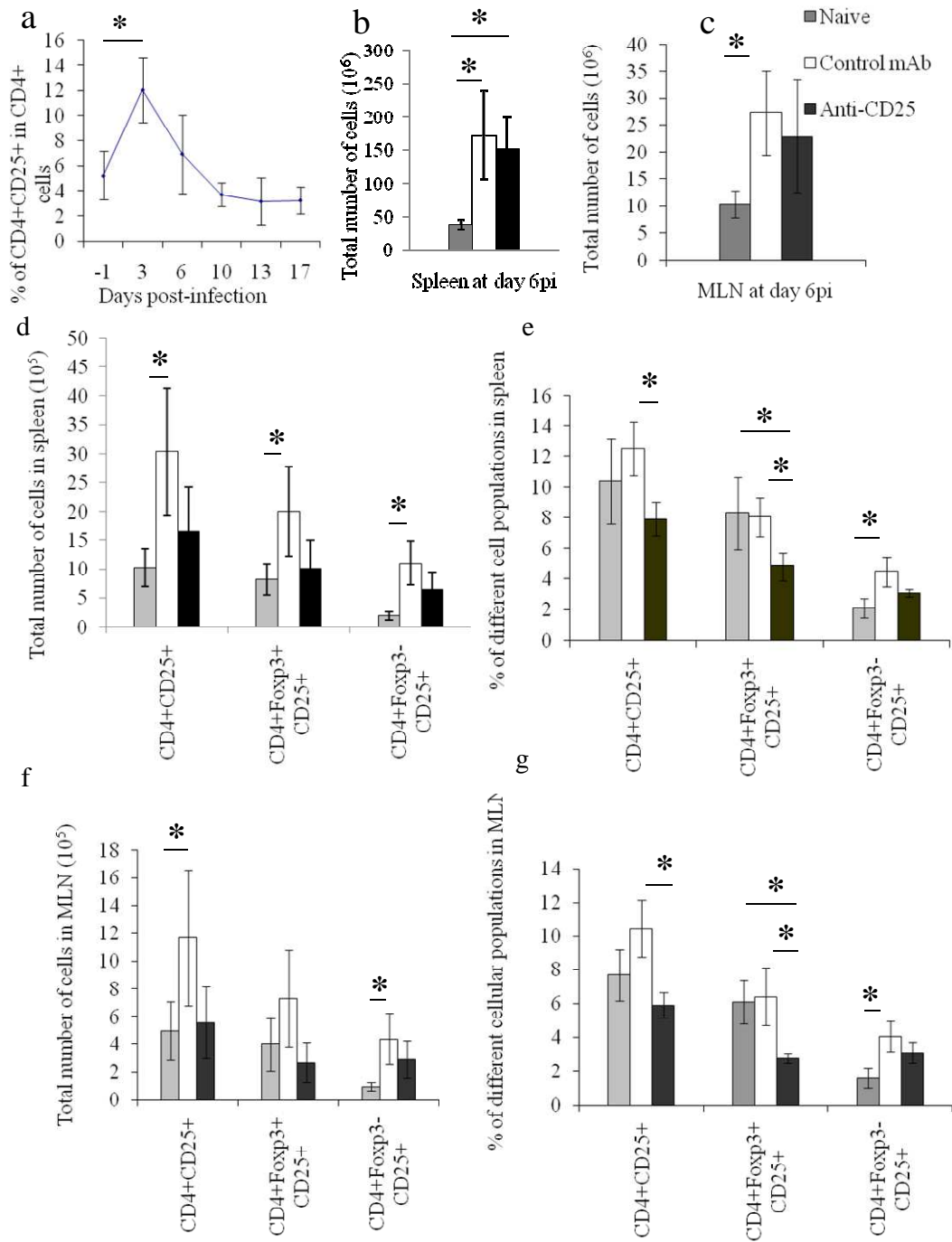
**a**



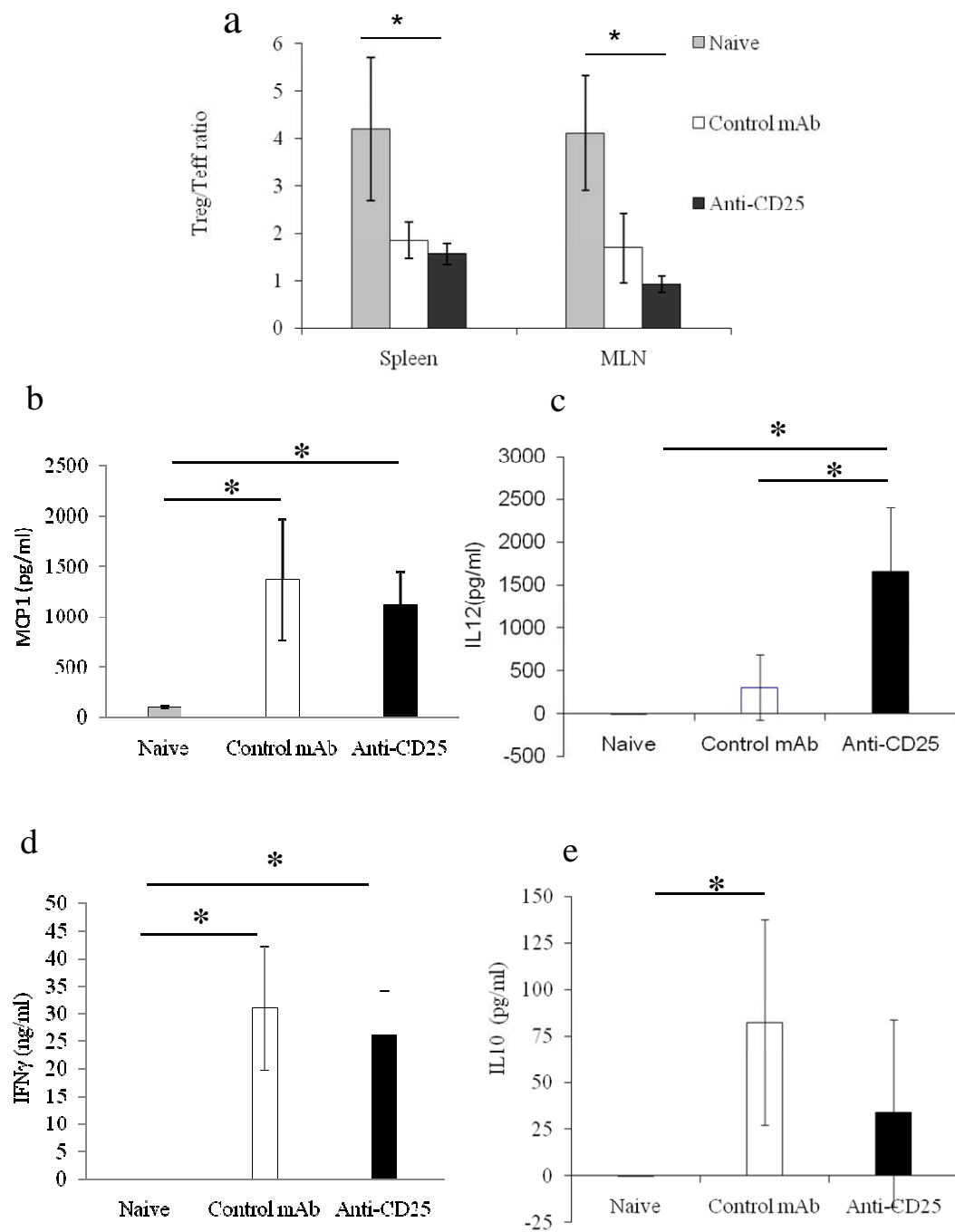
**b**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



## C. Article-III

### **Expansion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregulatory cells induced by a live, attenuated, replicating, type-I strain of *Toxoplasma gondii***

#### **Objectif :**

Etudier le mécanisme de protection et en particulier l'implication des Treg, après vaccination avec la souche de type I atténuée Mic1.3KO en comparaison avec la souche sauvage RH dont elle dérive qui est létale.

#### **Méthodes :**

Infection des souris OF1 avec 100 tachyzoïtes de RH ou de Mic1.3KO par voie intrapéritonéale

Etude de la réponse cellulaire locale (au niveau du péritoine) et systémique (sérum et rate) par dosage des cytokines IFN $\gamma$  et IL10.

Etude de la cinétique des cellules recrutées au niveau local par phénotypage à 4, 7 et 11 jours après infection.

Comparaison de la réponse cellulaire de la souche vaccinale et de la souche sauvage au niveau systémique par phénotypage des splénocytes 7 jours après l'infection.

#### **Résultats :**

La survie des souris vaccinées avec Mic1.3KO est corrélée à un contrôle de la parasitémie au niveau local et une augmentation significative toujours au niveau local des cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> suivi par une augmentation de cellules T effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

Au niveau systémique, la réponse immunitaire induite par la souche sauvage est une réponse cellulaire incontrôlée révélée par un pourcentage élevé de cellules exprimant des marqueurs d'activation et une parasitémie également incontrôlée.

Par contre, il n'y a pas de différence ni en nombre ni en pourcentage des cellules Treg au niveau splénique entre les deux groupes de souris. La seule différence est le phénotype "activé" des cellules Treg spléniques chez les souris infectées par la souche sauvage.

## **Conclusions :**

Les cellules Treg  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  recrutées au niveau local pourrait être impliquées dans la protection des souris après vaccination avec Mic1.3KO. Cette expansion ou recrutement local est suivi d'une expansion de cellules Teffectrices  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  et d'un contrôle local de la parasitémie au contraire de ce qui est observé avec la souche sauvage. Chez la souche sauvage, on observe peu de recrutement au niveau local corrélé à une augmentation exponentielle de la parasitémie à ce niveau jusqu'à la mort des souris. De plus, au niveau systémique, les souris infectées avec RH montrent une réponse inflammatoire avec un niveau fort d' $IFN\gamma$  au niveau systémique et l'expression de CD69 au niveau des splénocytes. Chez la souche sauvage la mortalité serait due à une parasitémie incontrôlée et à une réponse immunitaire incontrôlée.

**Expansion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregulatory cells induced by  
a live, attenuated, replicating, type-I strain of *Toxoplasma gondii***

Haroon Akbar<sup>1</sup>, Isabelle Dimier-Poisson, and Nathalie Moiré\*

Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37200 Tours, France  
INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

<sup>1</sup>Present Address: Department of Parasitology, University of Veterinary and Animal Sciences,  
Syed Abdul Qadir Jillani (Out Fall) road, 54000, Lahore, Pakistan.

**Key words:** Treg cells; attenuated live vaccine; *Toxoplasma gondii*

**Abbreviations:** dpi: days post infection    **PEC** : peritoneal exudate cell    **Teff** : T  
effector

Correspondence: Dr Nathalie Moiré

e-mail: [nathalie.moire@univ-tours.fr](mailto:nathalie.moire@univ-tours.fr)

Full correspondence : Dr Nathalie Moiré, UMR 1282 INRA-Université, UFR de Pharmacie,  
31 avenue Monge, 37200 Tours France

FAX : +33 2 47 36 72 52

## 1. Introduction

Toxoplasmosis is caused by a protozoan parasite that infects human beings and other warm-blooded animals. Infections in humans are generally asymptomatic, although immunosuppressed patients may exhibit severe symptoms. Similarly, primary infection during pregnancy can lead to miscarriage and neonatal malformations. Toxoplasmosis can be transmitted to human beings via ingestion of oocysts or via the consumption of meat products contaminated with tissue cysts [Tenter *et al.*, 2000]. The effective vaccination of domestic livestock can therefore prevent human infection with *Toxoplasma gondii*. It is possible to induce strong protection by immunization with a live attenuated strain [for review Jongert *et al.*, 2009]. Live attenuated vaccine strain models are also useful for advancing the understanding of the protective host immune response. However the data available about the mechanism of protection involved after vaccination with a type-I attenuated strain were performed with non-replicating, non persistent strains like cps-1 [Fox and Bzik 2002; Gigley *et al.*, 2009 a and b; Jordan *et al.*, 2009, Tait *et al.*, 2010,] and ts4 Gazzinelli 1991]. A strain known as Mic1-3KO was obtained by deleting the *MIC1* and *MIC3* genes [Cérède *et al.*, 2005] in our laboratory. This strain was derived from the highly virulent type-I RH strain, and its impaired invasion capability *in vitro* was correlated with decrease virulence when injected into outbred Swiss OF1 mice [Cérède *et al.*, 2005]. Type-I strains are characterized by the rapid dissemination of the parasite into the brain, and a high parasite burden inducing death rapidly after infection by a single viable parasite in mice [Saeij *et al.*, 2005]. We have shown that the deleted strain Mic1-3KO derived from a type-I strain behaves like a type-II strain in outbred mice in terms of virulence, dissemination throughout the tissues, and persistence in the brain [Moiré *et al.*, 2009].

Protective immunity against *T. gondii* is dependent on IFN $\gamma$  and on an IFN- $\gamma$  dependent mechanism [Suzuki *et al.*, 1988]. Following a challenge with a type-I parasite, high levels of IFN $\gamma$  are produced, and mice succumb to uncontrolled parasite growth and associated inflammation [Gravilescu *et al.*, 2001; Mordue *et al.*, 2001]. In a model of lethal toxoplasmosis induced after the oral infection of C57Bl/6 mice with a type-II strain, overproduction of IFN $\gamma$  is also responsible for the mortality. These mice display a sharp decline in the percentage of Treg cells just before death, supporting the hypothesis of defective immuno-regulation [Oldenhove *et al.* 2009]. Treg cells are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells, and their main function is to maintain immune homeostasis and tolerance [Sakaguchi *et al.* 2009]. They constitutively express the interleukin-2 receptor alpha chain (IL2R $\alpha$ ), also known as CD25, a surface receptor, and the intracellular marker, forkhead box-p3 transcription factor (Foxp-3) [Sakaguchi *et al.* 2009]. The role of Tregs in parasite disease was first described in the pioneering work of Belkaid [Belkaid *et al.*, 2002]. Treg are responsible for the persistence of the parasite. This persistence has been shown to be essential to maintain resistance to reinfection.

In the present study, we compare the local and systemic cellular response to the attenuated strain, Mic1.3KO, compared to that to the parental lethal RH strain in an attempt to identify mechanisms leading to protection. We show that an increase in the absolute CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg count is observed at the local site of infection after infection with attenuated Mic1.3KO. This increase is followed by an increase in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> effector cells and the control of parasitemia. In contrast, in the WT-infected mice, the increase in the Treg cell count is lower and the parasites are not controlled at this local site. The immune response at the local and systemic levels also becomes uncontrolled with high levels of IFN $\gamma$  until the animals died. Moreover, an activated phenotype of the splenocytes is observed for the RH-group with the expression of CD69 and constitutive production of IFN $\gamma$ .

## **Materials and methods**

### **Animals and parasites**

Eight-week-old female outbred Swiss OF1 mice were obtained from Janvier (France). The local Ethics Committee for animal experimentation approved all our experiments.

Two weeks before injection, RH tachyzoites harvested from the peritoneal cavity of the mice were cultured on human foreskin fibroblast (HFF) monolayers (ATCC CRL-1634, American Type Culture Collection), as previously described [Ismael *et al.*, 2003]. Mic1-3KO parasites were obtained by targeted disruption of the *MIC1* and *MIC3* genes in the  $\Delta$ HX RH strain of *T. gondii* as previously described [C  r  de *et al.*, 2005].

The Mic1-3KO tachyzoites were propagated by serial passage on HFF monolayers. Tachyzoites freshly harvested from a cell culture were counted using a Malassez counting chamber.

### **Cell culture conditions and cytokine quantification**

For cytokine detection, splenocytes were recovered and stimulated for 72h with 10  $\mu$ g/ml Toxoplasma lysate (ET) as described [Ismael *et al.*, 2003] or with purified anti-CD3 (145-2C11) (eBiosciences) at 1 $\mu$ g/ml in RPMI 1640 containing 5% FCS. The cells were added to 24-well plates at a concentration of  $5 \cdot 10^5$ /ml in a final volume of 1 ml, and supernatants were collected 24, 48 and 72h after activation.

Cells from peritoneal cavity were recovered after washing the cavity with 5 ml of ice-cold DMEM. The supernatant was collected after centrifuging and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed for cytokines. Cytokine levels (IFN $\gamma$ , IL10, and IL2) were quantified in the serum, cell culture supernatants and peritoneal lavages by ELISA using OptEIA kits (BD Biosciences) or Ready-set-Go Kit (eBiosciences) for IL2.

### **Cell surface staining and intracellular staining**

$10^6$  cells were used for splenocyte staining. Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from uninfected mice for the day 0 controls, and from infected mice on days 4, 7, and 11 post-infection by peritoneal lavage with 5 ml of ice-cold PBS. PECs were washed once in PBS, and counted to determine total viable cell numbers recovered by trypan blue exclusion.  $2-5 \times 10^5$  PECs were stained using standard procedures in 5% FCS in  $1 \times$  PBS and Mouse Fc Block (BD Biosciences). Single-cell suspensions were used for the surface markers PE-conjugated anti-mouse CD3 (17A2), anti-mouse FITC-conjugated CD11b (MI/70) and CD11c (N418) (eBiosciences), Antibodies for the detection of CD4 (GK1.5), CD8 (eBioH35-17.2), CD69 (H1.2F3), and Foxp3 (FJK-16s) were purchased from eBiosciences. Antibodies for IL10 detection were purchased from BD Biosciences. For cytokine detection, restimulation was carried out for 18h with  $10 \mu\text{g/ml}$  ET in RPMI 1640 containing 5% FCS. The cells were added to 6-well plates at the concentration of  $10^6/\text{ml}$  in a final volume of 5 ml. The culture medium was then removed and replaced by fresh culture medium containing PMA ( $50 \text{ ng/ml}$ ) and ionomycin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of brefeldin A ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) for a further 4h period.

### **Statistical analysis**

Analyses were performed with StatXact software (Cytel Studio) using non-parametric exact tests with strata to take into account the variability between repetitions of the same experiment. Differences between the groups were compared using Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis non-parametric tests with Dunn's post test using PRISM software (Graphpad). All statistical tests were two-sided and  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all tests. All results are expressed as the median plus the range (unless otherwise specified)

## **Results**

### **High local cellular response is induced after infection with Mic1.3KO**

Inoculation of persistent, live-attenuated Mic1.3KO tachyzoites protects outbred OF1 mice against both a low and high-dose lethal type-I challenge [Penarete *et al.*, 2010, personal data], unlike the wild-type RH strain from which it is derived, inducing lethality in all the infected mice. All the mice injected with 100 RH tachyzoites succumbed between days 8 to 10, whereas 80% long-term survival was observed for the mice injected with 100 Mic1.3KO tachyzoites [Moiré *et al.*, 2009]. To further evaluate the role of the cellular immune response in the protection induced by this live, attenuated, replicating strain, we compared parameters associated with the development of immunity in mice injected with Mic1.3KO and RH tachyzoites. The total numbers of PECs, lymphocytes, and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations were checked on days 4, 7 and 11 pi and compared to naive mice (Figure 1 A to E) in response to Mic1.3KO and to RH the strain. Total PEC numbers were compared to naive mice, and both groups displayed a slightly higher total PEC count after infection (Figure 1A). This difference was significant at day 11 for the Mic1.3KO-injected group. The Mic1.3KO-

group had more PECs than the RH-group on days 4 and 7, but a significant difference between these two groups was only observed 7dpi when compared in 4 different experiments. We used flow cytometry-based differential analysis of PECs from naive and infected mice. Populations were established on the basis of SSC and FSC data, and of CD3, CD11b and CD11c staining. Three populations were determined as described [Gigley *et al.*, 2009], and the lymphocyte gate was defined as FSC<sup>low</sup> SSC<sup>low</sup>. The absolute number of lymphocytes was evaluated by multiplying the total PEC number by the % of cells in the lymphocyte gate. The total lymphocyte count paralleled the kinetics of the total PEC count (data not shown). The CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> counts were monitored in the two groups and compared to the naive group (Figure 1B to 1E). The CD8<sup>+</sup> count was significantly higher for the RH-group than for the naive group day 4 pi. For CD4 there was no difference. The Mic1.3KO group had significantly more CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells than the naive group on day 11 for CD4<sup>+</sup> and on days 4 and 11 for CD8<sup>+</sup>, respectively. A significant difference ( $p=0.017$ ) between the two groups was observed for day 4 for the CD4<sup>+</sup> cells.

This high cell count is correlated with low parasitemia in the Mic1.3KO-infected mice. Parasitemia was monitored in the peritoneum by a direct count on days 4, 7, and 11 (Figure 2). On day 4, few parasites were found in both groups (less than  $2 \cdot 10^4$ ), and the difference between the 2 groups was not significant. However, on day 7 parasitemia was significantly higher in the RH-injected group ( $16 \cdot 10^6$ ) than in the Mic1.3KO group ( $0.002 \cdot 10^6$ ), and than on day 4 ( $0.02 \cdot 10^6$ ). This high parasitemia was correlated with a high cell mortality rate (between 25 to 90%) in PECs recovered from RH-group mice. In the Mic1.3KO group, parasitemia remained very low even 11 dpi, and the number of parasites never increased significantly between days 4 and 11. Taken together these data suggest that between day 4 and 11 the parasite was being controlled at the local level in the Mic1.3KO-

group mice in contrast to the RH-group, where the parasite count increased exponentially until the animals died.

### **A high systemic cellular response is induced after infection**

After infection, the number of spleen cells had increased in both infected groups 4 dpi (Figure 3A). In the Mic1.3KO-treated group, this increase compared to the naive group persisted until 11 dpi. At 7dpi there was a significant difference between the two infected groups. In the RH-infected group the cell number was significantly lower than at 4 dpi and also to that in the Mic1.3KO group observed in 4 different experiments. This suggests that after infection a strong immune response at the local level was induced on day 4 in both infected groups. This response was further enhanced in the Mic1.3KO group at the systemic level, since a high cell count was maintained until 11dpi.

We had previously shown that the IFN $\gamma$  level in the peritoneal cavity is significantly higher in the RH-group than in the Mic1.3KO group [Moiré *et al*, 2009]. Dissemination of the parasite during acute infection also induces high levels of systemic IFN $\gamma$ . However, the role of IFN $\gamma$  in generating protection is unclear, because overproduction can be lethal under certain conditions. We measured the level of systemic IFN $\gamma$  on days 4, 7 and 11 (Figure 3B). In control, naive mice, IFN $\gamma$  was not detected (data not shown). The serum level of IFN $\gamma$  rose significantly following infection, and differed significantly in the two infected groups at 7 dpi. In the RH-infected group, the level increased significantly between days 4 and 7 and paralleled parasite multiplication. In the Mic1.3 KO group, the level also increased significantly between days 4 and 7, and subsequently remained at similar level until day 11. To further evaluate the role of systemic IFN $\gamma$ , Ag-specific IFN $\gamma$  production was measured in spleen cell supernatant following a 48h restimulation with soluble *Toxoplasma* antigens (ET)

(Figure 4A). The IFN $\gamma$  level was below the detection threshold on day 4 in both groups (data not shown). At day 7, the level was very high and significantly different in the 2 groups. Cells from the RH-group produced higher levels of IFN $\gamma$  than those from the Mic1.3KO group. In the RH-group, the IFN $\gamma$  level without Ag restimulation was already very high and not significantly different from the level found without Ag

The IL10 level was measured in the same supernatant, and found to be significantly different in the 2 groups (Figure 4B). Spleenocytes of animals in the RH-group produced less IL10 than those from the Mic1.3KO group. However, for both groups the production was dependent on Ag restimulation. CD4<sup>+</sup> T cells have been described as the major source of host-protective IL10 following infection with type-II *Toxoplasma* strains (Jankovic *et al.*, 2007). To further investigate the cellular source of IL10, spleen cells were cultured with the *Toxoplasma* Ag, and then with PMA and ionomycin in order to track the IL10-secreting cells by flow cytometry (Figure 5). There was no significant change in either group in the percentage of IL10-secreting cells. However, the main sources of IL10 in both groups were the CD4<sup>+</sup> cells, since the percentage of CD4<sup>+</sup> cells amongst IL10-producing cells in 2 different experiments was 28% and 30% for the RH and the Mic1.3KO groups, respectively (fig 5B).

### **Infection with RH induced an activated phenotype at the systemic level**

Taken together, these observations suggest that despite a strong cellular response, parasitemia was not controlled in the RH-group in contrast to the Mic1.3KO-group, in which the cellular response and the parasitemia were controlled. To further explore the uncontrolled cellular response induced in the RH-group, we investigated the expression of phenotypic markers associated with activation and regulatory activity. Cells were further analyzed directly *ex vivo* from the spleen by flow cytometry (Table 1) on day 7. The CD69 marker was chosen, because

it is known to be an early activation marker antigen of lymphocytes, and its selective expression in inflammatory infiltrates suggests that it plays a role in the pathogenesis of inflammatory diseases [Sancho *et al.*, 2005]. CD25<sup>+</sup> is also a marker of activation that is induced on cells after antigenic stimulation, but it is also constitutively expressed by Treg cells.

The percentage of CD69<sup>+</sup> cells was significantly higher in the RH group (11.8%) than in the naive (3.7%) and Mic1.3KO groups (1.9%) at 7dpi. Moreover in the RH-group, only 36% of CD69<sup>+</sup> cells were CD3<sup>+</sup>, in contrast to the Mic1.3KO group where CD69<sup>+</sup> cells were predominantly CD3<sup>+</sup> (75%) (data not shown). The kinetics of the expression of CD69 was monitored in both groups up to 11 dpi (for the Mic1.3KO-group alone), and this higher level was only seen at 7 dpi in the RH-group (data not shown). For the Mic1.3KO-group, this level had not increased at 11 dpi, suggesting that CD69 expression may be correlated with the excessive cellular response and mortality observed in the RH-group.

The expression of CD25 was monitored in the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> populations and compared to that in the naive group (Table 1). Both the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> populations expressed CD25<sup>+</sup>, but at low level at day 7 pi. Moreover, the percentage of CD25<sup>+</sup> cells was not significantly different in the naive and infected groups. However, the difference between the 2 infected groups was significant for the CD4<sup>+</sup> population ( $p=0.0033$ ) in three different experiments, which showed that the RH-group expressed more CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells than the Mic1.3-KO-group. To further characterize the population expressing CD25 within the CD4<sup>+</sup> cells, the expression of Foxp3, which is a specific marker of Treg, was determined on day 7. The spleen cells were stained with the Foxp3 ab in both infected groups. Three populations (CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>, and CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) were observed within the CD4<sup>+</sup> gated population in both groups. The total percentage and number of the Foxp3<sup>+</sup> population did not

differ significantly in the 2 groups, however a higher percentage of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells was found in the RH-infected group ( $p < 0.001$ ) in 4 different experiments (Figure 5).

The IL2 level was quantified in spleen culture supernatants after activating with anti-CD3 (Figure 6A). The level was significantly higher in the naive mice than in either of the infected groups, and was also higher in the Mic1.3KO-group than in the RH-group at 7dpi. In contrast, the level of IFN $\gamma$  was higher in the same supernatant for the RH-group than for the KO-group (Figure 6B).

### **Infection with Mic1.3KO induced local recruitment/expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells**

To further study Treg at the site of primary infection, the number of Treg was evaluated (Figure 7) in PECs at various different times after infection. For the RH-group, this analysis could only be done at 4 dpi, because at 7 dpi there was a high level of cell mortality, and the permeabilization step further increased this mortality to 100% (data not shown).

At 4 dpi, the number and percentage of Foxp3<sup>+</sup> cells was slightly and non-significantly higher for the RH group than for the naive mice (Figure 7A). Nor was there any significant difference in the number or percentage of Foxp3<sup>+</sup> cells in the 2 infected groups at this time. For the Mic1.3KO group, the total Foxp3<sup>+</sup> count at day 4 was significantly greater ( $25.9 \cdot 10^4$  versus  $1.8 \cdot 10^4$  for the naive group), and was less markedly and non-significantly increased on days 7 and 11 than in the naive group (Figure 7B). For the Mic1.3KO group, the number and percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> effector cells were also increased exponentially between day 0 and 11 (Figure 7C). Both counts and percentages were significantly different from day 0 at 7 and 11 dpi.

## **Discussion**

Attenuated strains have been shown to be valuable candidates for toxoplasmosis vaccines. They are also useful in understanding the host immune response and protective immunity to *T. gondii*. Most of the data concerning the protective cellular response induced by type-I parasites has been obtained using the replication-deficient *cps1* strain. This strain is completely avirulent and described as being non-persistent [Fox et Bzik, 2002 ]. Type-I strains are uniformly lethal except after attenuation, which leads to lower replication and dissemination in the host and the development of long-term immunity. In the present study we compared the local and systemic cellular responses after infection with the attenuated Mic1-3KO parasite and the parent RH type-I strain from which it is derived. Mic1.3KO induced protection against both type-I and type-II challenges [Penarete *et al.*, 2010; Mévélec *et al.*, 2010]. This protection is long-lasting (personal data), and the parasite has been shown to persist as cysts in the mouse brain [Moiré *et al.*, 2009]. The control of acute infection and long-lasting immunity both depend on the TH1 cellular response and the production of IFN $\gamma$ . Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> have been described as playing a critical role in protective immunity to *T. gondii* [Gazzinelli, 1991]. CD8<sup>+</sup> cells are the primary effector cells providing protection after challenge with a type-II strain [Tait *et al.*, 2010] or vaccination with an attenuated type-I strain [Gazzinelli *et al.*, 1991; Gigley *et al.*, 2009a; Jordan *et al.*, 2009]. CD4<sup>+</sup> cells also play a role in the effector response by secreting IFN $\gamma$ , and are also the primary regulator cells implicated in the control of immunopathology induced in C57BL/6 mice after oral infection [Liesenfeld *et al.*, 1996; Jankovic *et al.*, 2007]

In this study, we show that the protective immunity elicited by the attenuated strain Mic1.3KO is primarily local, with considerable expansion/recruitment of PECs and lymphocytes until day 11 of infection. Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were shown to expand to a significantly greater extent at the local level in the Mic1.3KO group from day 4 to

11 than in the naive group. In the CD8<sup>+</sup> population, the expansion began on day 4 and was still very high at day 11. For the CD4<sup>+</sup> population, the expansion was significant at day 11. This was correlated with parasite control, since the number of parasites in the peritoneum never increased between days 4 to 11, whereas in the RH-group the number of parasites increased exponentially between days 4 and 7. For the RH-group, the analysis of PECs after day 4 was not reliable due to the high cell mortality induced by high parasite replication. These results are consistent with data obtained by others [Gigley *et al.*, 2009a] using the non-replicating strain cps1-1 since in their experiment CD8<sup>+</sup> cells were the first to be recruited in the peritoneum, from day 2, followed by the CD4<sup>+</sup> cells from day 6 after infection. In their experiment, the recruitment of both populations of T cells paralleled the local production of IFN $\gamma$ . In our study, the levels of IFN $\gamma$  in the peritoneum on days 4 and 7 were lower in the Mic1.3KO group than in the RH-group. Systemic IFN $\gamma$  production (spleen and serum) was also lower in the Mic1.3KO group than in the RH- group, whereas the IL10 level was higher in the Mic1.3KO group in the spleen. The pathology and lethality induced by infection with the type-I strain were associated with the overinduction of TH1 cytokines, and especially with IFN $\gamma$  production [Gravilescu *et al.*, 2001; Mordue *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2003] suggesting that the control of parasitemia and the survival of Mic1.3KO-infected mice may be related to control of IFN $\gamma$  level. Moreover, the production of IFN $\gamma$  in the spleen cells of the RH group was not antigen dependent, and the cells did not require any further activation *in vitro* to produce IFN $\gamma$ , in contrast to splenocytes from the Mic1.3KO group which did require *in-vitro* activation with the specific Ag to produce IFN $\gamma$ . The data suggest that splenocytes from the RH-group are in an activated state and the expression of CD69 by these cells further supports this hypothesis. This expression was not observed until day 7, one to three days before the mice died. CD69 expression was not observed in the Mic1.3KO group even at day 11. Expression of CD69<sup>+</sup> T cells is known to be localized at sites of chronic inflammation and

at sites of active immune response *in vivo* [Sancho *et al.*, 2005]. The role of CD69 has not yet been elucidated, and previous data have suggested that CD69 is an activating molecule, although recent studies have also reported regulatory functions. CD69 regulates immune and inflammatory responses by acting as a brake on the differentiation of TH17 effector cells [Martin *et al.*, 2010].

The role of Treg cells, essentially a CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> subset, in the control of the cellular immune response after Mic1.3KO vaccination was further explored in an attempt to understand the mechanism of control of this response. We observed an expansion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells at the local site on day 4 after infection in the Mic1.3KO group. This expansion was transient, since on days 7 and 11 the number of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells was not significantly different from that in the control naive group. This expansion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells was followed by expansion of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T effector cells from day 7 to day 11. This expansion was correlated with parasite control for the Mic1.3KO-group, since after day 4 the number of parasites did not increase in contrast to the RH-group, in which the number of parasites continued to increase exponentially at this local level until the animals died between days 8 and 10.

This increase in Treg is limited to local sites, since both the number and percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells remained unchanged in spleens until day 7 of infection in both groups. However, in the RH-group, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> was slightly higher than in the Mic1.3KO-group on day 7. However, the number of these cells was the same in both groups, suggesting that the total population of Treg Foxp3<sup>+</sup> does not differ quantitatively in the 2 groups, but may be qualitatively different.

The Foxp3<sup>+</sup> Treg count collapsed at the local and systemic sites was associated with mortality in C57BL/6-susceptible mice after oral lethal infection [Oldenhove *et al.*, 2009]. This collapse occurred very shortly before the animals died. The collapse of Treg in this

model was due to the withdrawal of IL2. In our experiment, we did not detect a collapse of Treg in the RH-group at either the local or systemic level, but a fall in the IL2 level was also observed in the RH-group after anti-CD3 activation *in vitro*. The low level of IL2 in the RH-group may result from greater consumption of IL2 rather than from lower IL2 release, since cells are not impaired in IFN $\gamma$  production and may therefore be correlated to the expansion of Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells. IL2-dependent mechanism is involved in the transient immunosuppression observed during acute toxoplasmosis [Tenorio]. Reduced IL2 levels are observed in spleen cell supernatants and these reduced IL2 levels favours the competition for this cytokine between Treg and Teff.

However, the low expansion of Treg at the local site of infection may explain the difference between the Mic1.3KO and RH groups. In resistant mouse strains, Treg cells are thought to reduce immunopathology since depletion of these cells induces morbidity due to increased production of pro-inflammatory cytokines and higher parasitemia after oral infection of Balb/c resistant mice [Morampudi *et al.*, 2011]. In this study, mice of both the resistant Balb/c and susceptible C57BL/6 strains had a higher CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> count at the local level 6 days post-infection than naive mice, and the absolute count for the resistant strain was higher than that in the susceptible strain. This suggests that difference in Treg counts may account for the differences in mortality. This may also have been true in our experiment, since the Treg count was lower for the RH-group than for the Mic1.3KO-group, and the Teff/Treg ratio was significantly higher on day 4 for the RH-group than for the Mic1.3KO group; a difference that has also been reported by Morampudi *et al.* [2011] between susceptible and resistant mice.

The higher parasite burden observed at the local site in the RH-group is surprising, and may not result from reduced production of IFN $\gamma$ , as has been reported for a non-lethal model [Couper *et al.*, 2009]. A higher parasite burden was also observed at the local site of Treg-

depleted Balb/c mice after oral infection [Morampudi *et al.*, 2011]. The authors argue that this high parasite burden may be an indirect effect of the high level of pro-inflammatory cytokines. Tissue destruction by uncontrolled levels of IFN $\gamma$  has been shown to increase susceptibility to *T. gondii* infection [Liesenfeld *et al.*, 1996], and in C57BL/6 mice severe necrosis of the intestine is observed after oral infection. Alternatively, very high production of non antigen-specific IFN $\gamma$  may lead to the exhaustion of the response as a result of negative feed-back or by saturation of the IFN receptor leading to impairment of the IFN $\gamma$ -induced response. This could be related to a failure to induce *in vitro* Ag-specific IFN $\gamma$  production after stimulation with the Ag extract in spleen cells from RH-group.

Treg expansion/recruitment and accumulation at local sites of infection has been extensively described in various different parasite infections, especially in chronic infections [Finney *et al.*, 2007, Grainger *et al.*, 2010, McSorley *et al.*, 2008]. Increased numbers of Treg cells at local sites may result from recruitment and accumulation *in situ*, or from expansion of naturally-occurring Tregs or their generation from peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. Both possibilities have been detected, and Suffia *et al.* [2005] showed that most of the Treg cells that are recruited at the infection site in fact come from the compartment of natural Tregs present in naive animals. Moreover, results from studies performed in the context of malarial infection showed that both natural Treg expansion and *de-novo* generation from peripheral CD4<sup>+</sup>T cells account for the increase in the numbers of Treg cells present during infection [Scholzen *et al.*, 2010]. We were unable to find out whether the cells resulted from expansion or recruitment, but the high number present at the local site and the lack of change in the spleen, seems to justify the hypothesis that the high number of Treg cells may result from expansion/recruitment rather than from recruitment alone.

One of the mechanisms of the Treg cells regulatory function is IL10-dependent. We observed a higher level of IL10 in the spleen cell supernatant of the Mic1.3KO-group. Most of the

IL10-secreting cells in the spleen (75%) were CD4<sup>-</sup>, and we were unable to detect IL10 in the CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cell subset. This result is consistent with previous data reported by Jankovic *et al.* [2007], who showed that the main producer of IL10 during *T. gondii* infection within CD4 was the Foxp3<sup>-</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cell population.

In conclusion, this study is the first to provide evidence that Treg cells may contribute to protecting outbred mice after infection with an attenuated, replicating, type-I strain of *T. gondii*. Although a complex mechanism may underlie the protection induced by an attenuated type-I strain, we showed that a change either in Treg expansion or in the absolute number of Treg cells at the local site of infection or in both may be crucial in determining whether animals are protected or succumb.

### **Acknowledgements**

Haroon AKBAR is in receipt of funding from the Higher Education Commission, Islamabad, Pakistan. The authors would like to thank, S. Bigot and T. Papin for their technical assistance.

### **References**

**Belkaid, Y, Piccirillo, CA, Mendez, S, Shevach, EM and Sacks, DL**, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002.420: 502-507.

**Cérède, O., Dubremetz, J.F., So te, M., Desl e, D., Vial, H., Bout, D. and Lebrun, M.** Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp.Med.* 2005. 201: 453-463.

**Couper, KN, Lanthier, PA, Perona-Wright, G, Kummer, LW, Chen, W, Smiley, ST, Mohrs, M and Johnson, LL**, Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell

populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 2009. 182: 3985-3994.

**Finney, C. A., Taylor, M.D., Wilson, M.S. and Maizels, R.M.,** Expansion and activation of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur.J.Immunol.* 2007. 37: 1874-1886.

**Fox, B. A. and Bzik, D. J.,** De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii.* *Nature.* 2002. 415: 926-929.

**Gazzinelli, R. T.; Hakim, F. T.; Hieny, S.; Shearer, G. M. and Sher, A,** Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 1991. 146: 286-292.

**Gazzinelli, RT, Wysocka, M, Hieny S, Schariton-Kersten, T, Cheever, A, Kühn, R, Müller, W, Trinchieri, G and Sher, A,** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF-alpha. *J Immunol* 1996. 157: 798-805.

**Gigley, J. P., B. A. Fox and Bzik, D. J.,** Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *J. Immunol.* 2009. 182:1069-1078.

**Gigley, J. P., B. A. Fox, and Bzik, D. J.,** Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. *Infect. Immun.* 2009, 77: 5380-5388.

**Grainger, JR, Hall, JA, Bouladoux, N, Oldenhove, G and Belkaid, Y,** Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T –cell fate. *Immunol Rev.* 2010. 234: 305-316.

**Gravilescu, L. C. and Denkers, E. Y.**, IFN $\gamma$  overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 2001.167: 902-909.

**Ismael, A., Sekai, D. B., Collin, C., Bout, D. and M ev elec, M. N.**, 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 and 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.

**Jongert, E.; Roberts, C. W., Gargano, N., Förster-Waldl, E., Förster-Wald, E. and Petersen, E**, Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities., *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 252-266.

**Jordan, K. A., Wilson, E. H., Tait, B. A., Fox, D. S., Roos, D. J., Bzik, F. Dzierszinski and C. A. Hunter**, Kinetics and phenotype of vaccine-induced CD8+ T-cell responses to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2009. **77**: 3894-3901.

**Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J. S. and Suzuki, Y.**, Association of CD4<sup>+</sup> T cell-dependent, interferon- $\gamma$ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.*1996.184: 597-607.

**Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M.A., Y n ez-Mo, M. and Sánchez-Madrid, F.**, [CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation.](#) *Mol Cell Biol.* 2010. 30: 4877-4889.

**McSorley, H. J., Harcus, Y.M., Murray, J., Taylor, M.D. and Maizels, R.M.**, Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J.Immunol.* 2008. 181: 6456-6466.

Mévélec, M.N., Ducournau, C., Bassuny Ismael, A., Olivier, M., Sèche, E., Lebrun, M., Bout D. and Dimier-Poisson, I., [Mic1-3 Knockout \*Toxoplasma gondii\* is a good candidate for a vaccine against \*T. gondii\*-induced abortion in sheep.](#) *Vet Res.* 2010; 41: 49.

Moiré, N, Dion, S., Lebrun, M., Dubremetz, J.F. and Dimier-Poisson, I., [Mic1-3KO tachyzoite a live attenuated vaccine candidate against toxoplasmosis derived from a type I strain shows features of type II strain.](#) *Exp Parasitol.* 2009. 123: 111-117.

Morampudi, V., De Craeye, S., Le Moine, A., Detienne, S., Braun, M.Y. and D'Souza, S., Partial depletion of CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2011. 13: 394-404.

Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A. and Sibley, L.D., Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 2001. 167: 4574-4584.

Nguyen, T.D., Bigaignon, G., Markine-Goriaynoff, D., Heremans, H., Nguyen, T.N., Warnier, G., Delmee, M., Warny, M., Wolf, S.F., Uyttenhove, C., Van Snick, J. and Coutelier, J.P., Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and  $\gamma$  interferon. *J. of Med. Microbiol.* 2001. 52, 869-876.

Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Santos, L.D., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M.E., and Belkaid, Y., Decrease of Foxp3(+) Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* 2009. 31: 772-786.

Penarete-Vargas, D. M., Mévélec, M. N., Dion, S., Sèche, E., Dimier-Poisson, I. and

**Fandeur, T.**, Protection against lethal *Neospora caninum* infection in mice induced by heterologous vaccination with a mic1 mic3 knockout *Toxoplasma gondii* strain., *Infect Immun.* 2010.**78**, 651-660.

**Saej, J.P., Boyle, J.P. and Boothroyd, J.C.**, Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitol.* 2005.21: 476-481.

**Sancho, D., Gomez, M. and Sanchez-madrid F.**, CD69 is a immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunol.* 2004; 26:136-140.

**Scholzen, A., Minigo, G. and Plebanski, M.**, Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends in Parasitol.* 2010 26(1): 16-25.

**Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. and Belkaid, Y.A.**, Role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol.*2005.174: 5444-5455.

**Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S.**, Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*1988. 240: 516-518.

**Tait E. D., Kimberly, A. J., Dupont, C. D., Harris, T. H., Gregg, B., Wilson, E. H., Pepper, M., Dzierszynski, F., Roos, D. S. and Hunter, C. A.**, Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2010.185: 1502-1512

**Taylor, M. D., van der W.N., Harris, A., Graham, A.L., Bain,O., Allen, J.E. and Maizels, R.M.**, Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. *Eur.J.Immunol.* 2009. 39: 192-206.

**Tenorio, E. D., Fernández, J., Castellanos, C., Olgún, J. E. and Saavedra R.**, CD4+Foxp3+ Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii* induced T-cell suppression

through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur. J. immunol.* 2011. 41: 1-13.

**Tenter, A.M., Heckerath, A.R. and Weiss, L.M.,** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 2000.30, 1217-1258.

## Legends to Figures

**Figure 1:** Infection with Mic1.3KO induces a strong local cellular response. Peritoneal exudate cells (PECs) were recovered at the times indicated post-infection and either counted directly (A) or stained (B to E) with anti-CD4 (B and C) or with anti-CD8 (D and E) mAbs. Populations were based on SSC and FSC data, and on CD3, CD11b and CD11c staining. Three populations were determined and the lymphocyte gate was defined as  $FSC^{low} SSC^{low} CD3^{+}$ . (A) Cumulative data from 2 different experiments with 5 or 6 animals per group per time point are represented \*  $p < 0.05$ . (B to E) Results are representative of two independent experiments with 5 mice per group per time point injected with 100 tachyzoites of RH (B and D) or Mic1.3KO (C and E). \*  $p < 0.05$ .

**Figure 2:** Parasitemia is controlled at the local level after injection with Mic1-3KO. Parasites were counted directly after peritoneal lavage at the times indicated post-infection with 100 RH or Mic1-3KO tachyzoites. Results are expressed as the median plus a range. Cumulative data from 4 different experiments are shown (4 to 6 mice per group per time point per experiment).

**Figure 3:** Infection with RH induces a strong systemic response. Splenocytes were recovered at the times indicated post-infection and counted (A). Results are representative of three independent experiments with 5 or 6 mice per group and per time point injected with 100 RH or Mic1.3KO tachyzoites. (B) Sera were recovered at the times indicated post-infection, and the  $IFN\gamma$  levels were quantified. Results are representative of three independent experiments

with 5 or 6 mice per group per time point injected with 100 tachyzoites of RH (empty circles) or Mic1.3KO (plain circles). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Wilcoxon-Mann Whitney exact test with strata.

**Figure 4:** Infection with RH induces a strong systemic, non-specific  $\text{IFN}\gamma$  production. Splenocytes were recovered 7 days post-infection with RH or Mic1-3KO tachyzoites, and stimulated for 72h with parasite extract. Culture supernatants were collected after a 48-h stimulation period.  $\text{IFN}\gamma$  (A) and IL10 (B) level was determined. Results are representative of four independent experiments with 4 to 6 mice per group.\*  $p < 0.05$  Wilcoxon-Mann Whitney exact test with strata. (C) Percentages of IL10-producing cells and nature of the cells producing IL10 (D). Splenocytes obtained 7 dpi were cultured for 18h with ET, and for a further 4h period with PMA, ionomycin and brefeldin A. Cells were stained with anti-CD4 and IL10 mAbs, and analyzed by FACS. The lymphocyte gate was defined using FSC and SSC characteristics. At least 30,000 events were acquired in the lymphocyte gate. Results are representative of three independent experiments with 4 to 6 mice per group. Results are expressed as the median plus a range. (D) IL10-secreting cells in the  $\text{CD4}^+$  population. Individual data of one mouse per group representative of two independent experiments with 5 animals per group.

**Figure 5:**  $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$  cells are qualitatively different after infection with RH or Mic1.3KO. Splenocytes obtained 7 dpi were stained with anti-CD4 anti-CD25 and anti-Foxp3 mAbs and analyzed by FACS. The lymphocyte gate was defined using the FSC and SSC characteristics. The  $\text{CD4}^+$  subregion was subgated, and 10,000 events were acquired for this population. The percentage of the total  $\text{Foxp3}^+$  or  $\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  population within the  $\text{CD4}^+$  cells. Results are

representative of four independent experiments with 4 to 6 mice per group. \*  $p < 0.05$  Wilcoxon-Mann Whitney exact test with strata.

**Figure 6:** Splenocytes of mice infected with RH have a low level of IL2 but not of IFN $\gamma$ . Splenocytes were recovered 7 dpi with RH or Mic1-3KO tachyzoites, and cultured with medium (empty circles) or anti-CD3 antibody (plain circles), and supernatants recovered 24 h and 48h after activation. IL2 (A) and IFN $\gamma$  (B) were quantified by ELISA.

**Figure 7:** CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells are recruited/expanded before CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teff cells at the local site after infection with Mic1.3KO. PECs recovered at the times indicated post-infection were stained with anti-CD4 anti-CD25 and anti-Foxp3 mAbs, and analyzed by FACS. The lymphocyte gate was defined using the FSC and SSC characteristics. The CD4<sup>+</sup> subregion was subgated and 10,000 events were acquired for this population. (A) shows the percentage of total Foxp3<sup>+</sup> population within the CD4<sup>+</sup> cells recovered 4dpi. \*  $p < 0.05$  using Kruskal-Wallis test. For the calculation of the count (B and C), the absolute number of lymphocytes was evaluated by multiplying the total PEC count by the percentage of the lymphocyte gate compared to the whole population. Treg cells were defined as Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and Fopx3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (B), and Teff cells as Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (C) within the CD4<sup>+</sup> population. Results are representative of two independent experiments with 5 mice per group and per time point injected. \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test.

Table 1. Splenocytes from the RH-group mice presented an activation phenotype after infection

Groups	Percentage of positive cells			
	CD69 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
Naive	3.7±2.7	3.8±0.6	2.8±0.6	0.9±0.6
<b>RH</b>	11.8±5*	6.5±0.8*	3.4±1.1*	1.5±0.6
<b>Mic1.3KO</b>	1.9±1.2	2.0±.7	1.2±0.7	0.8±0.6

Splenocytes obtained at 7 dpi were stained with different mAbs as indicated and analyzed by FACS. Results are representative of three independent experiments with 4 to 6 mice per group. \*p<0.05 between the two infected groups. Kruskal-Wallis

Figure 1

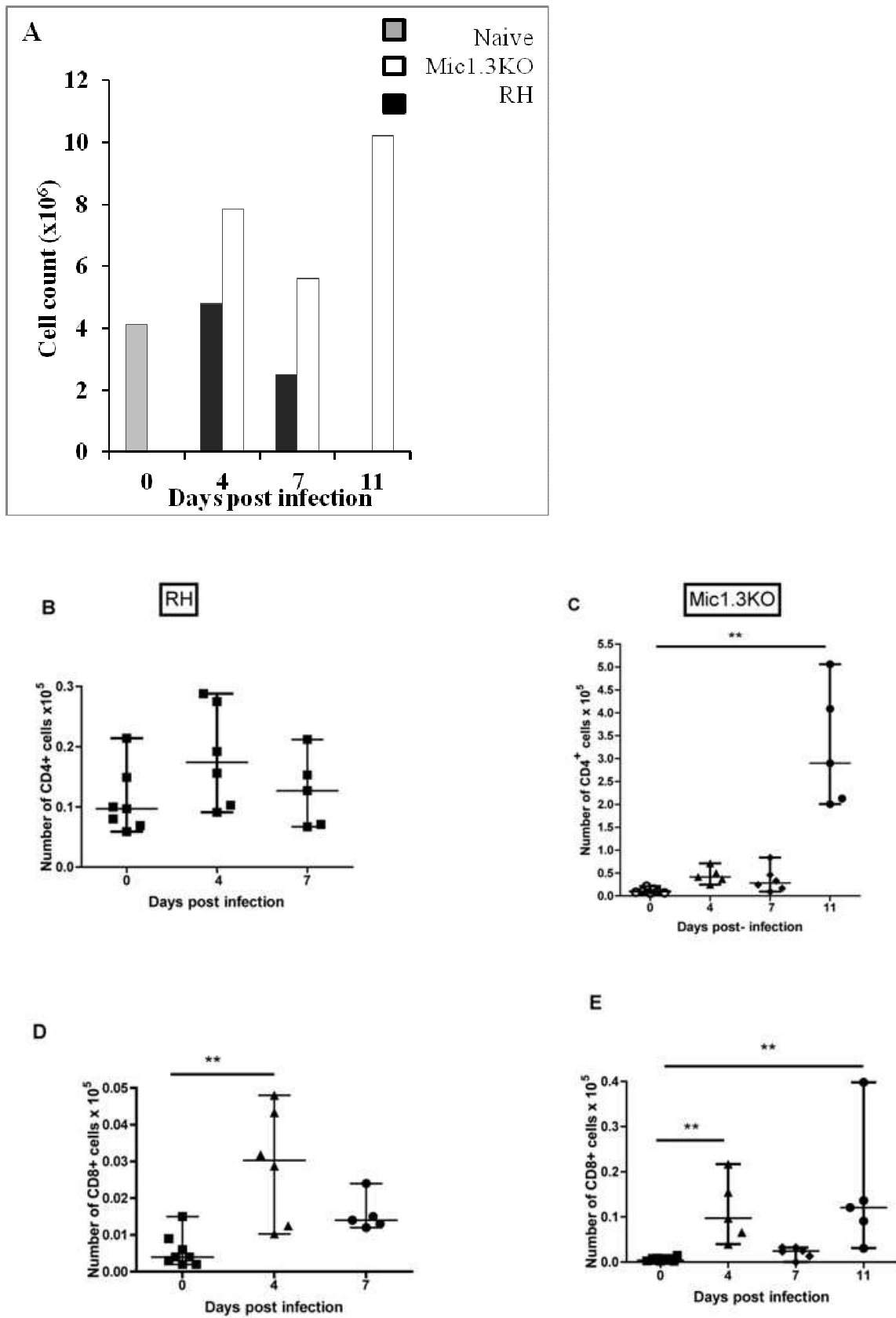


Figure 2

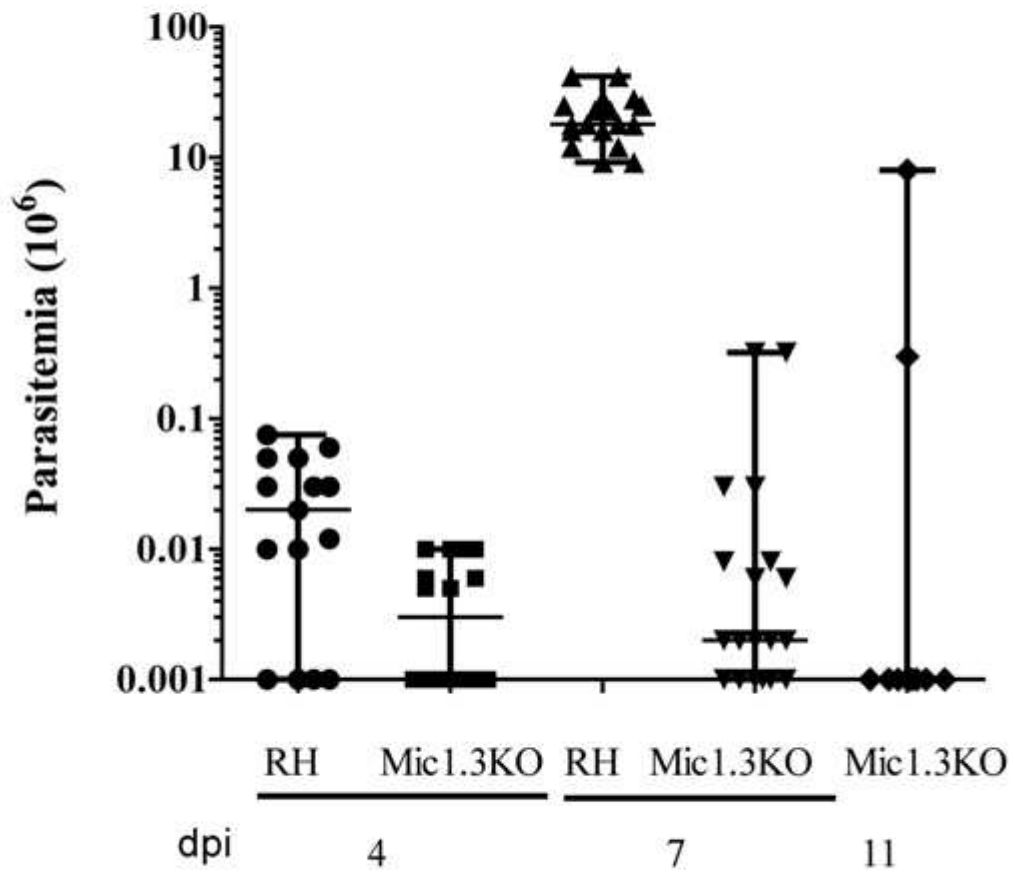
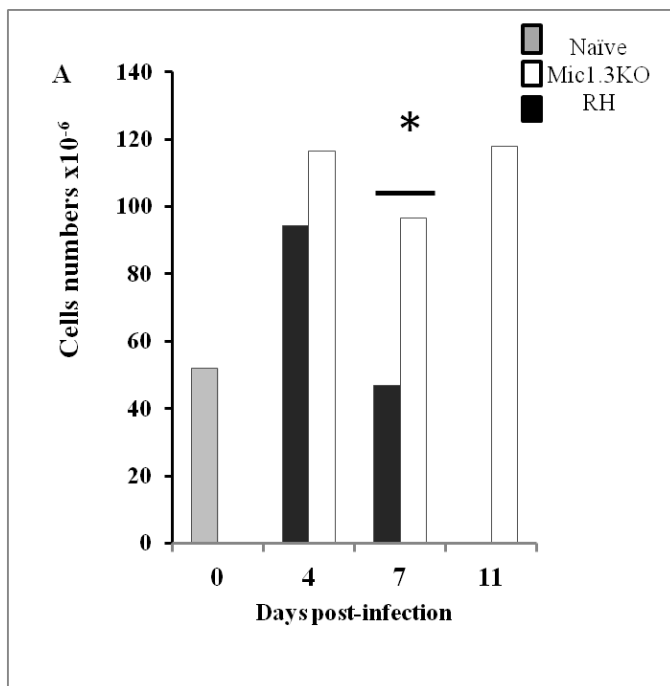


Figure 3

A



B

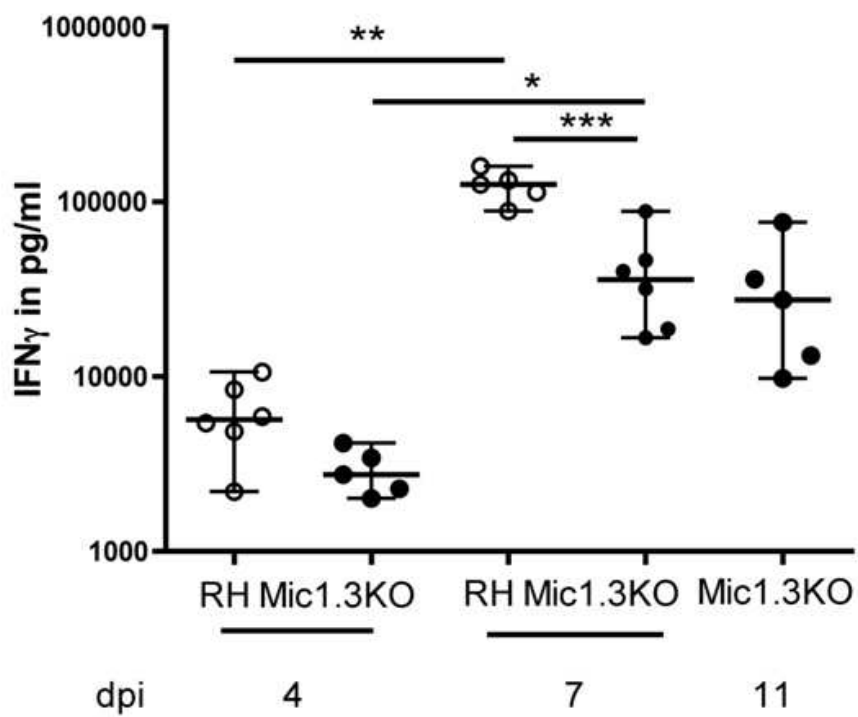
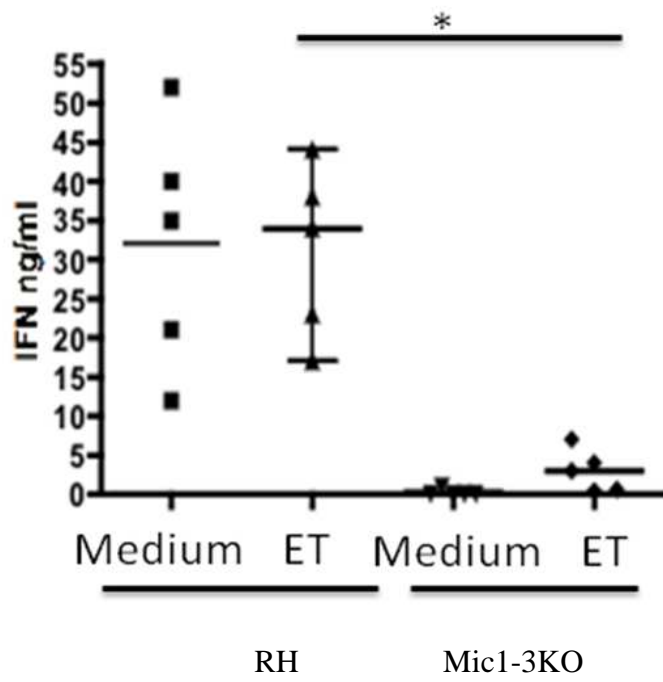


Figure 4

A



B

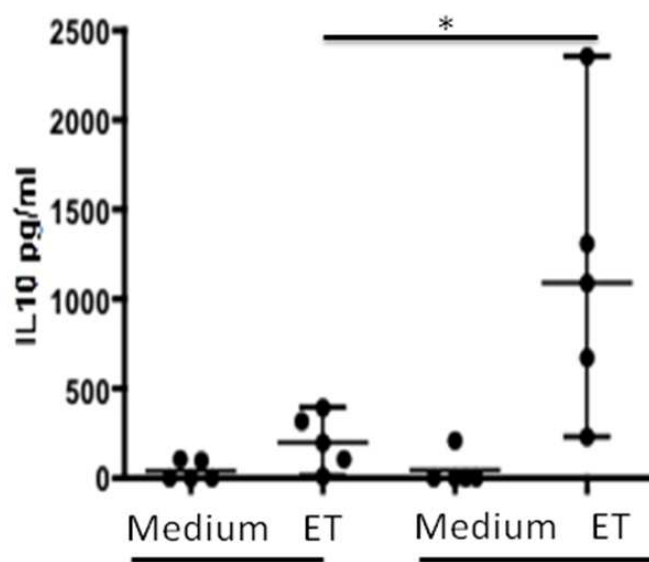


Figure 4

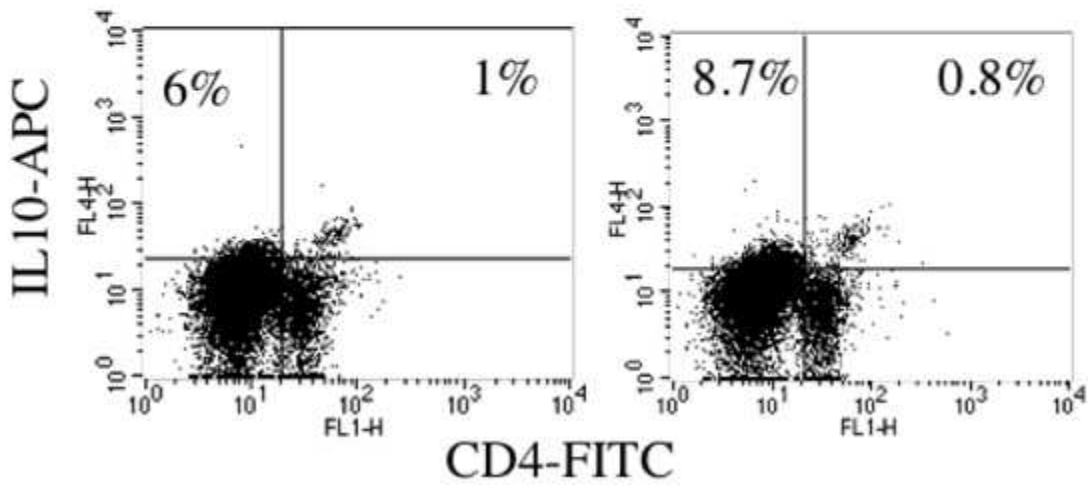
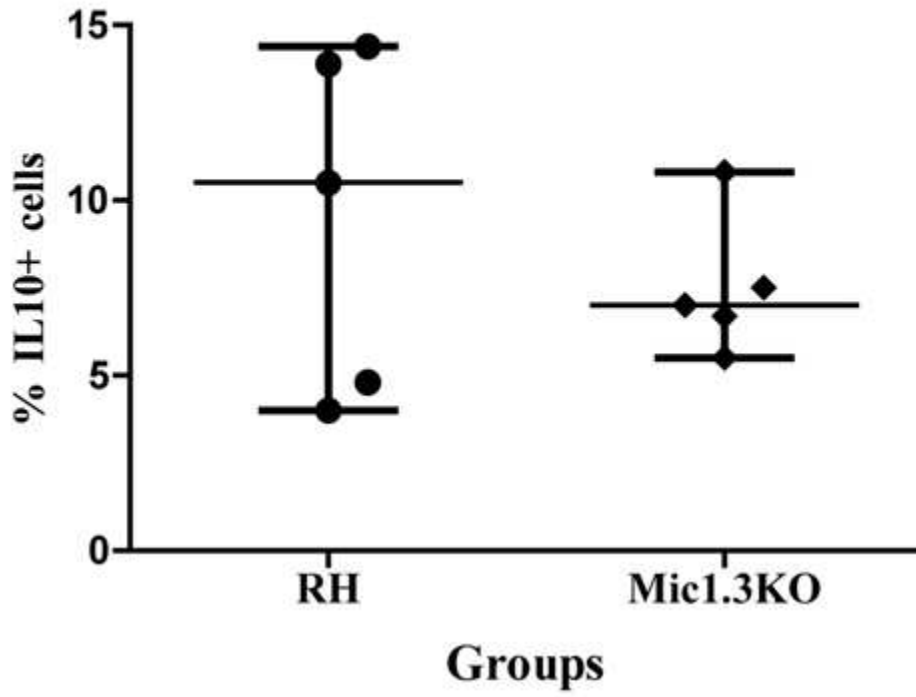


Figure 5

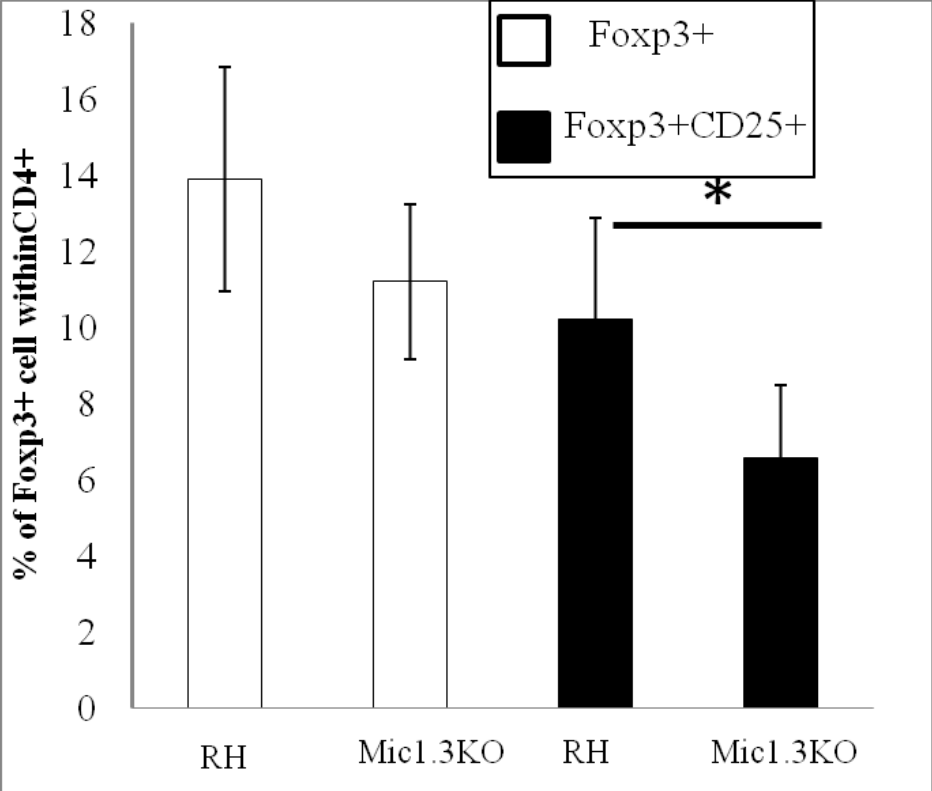
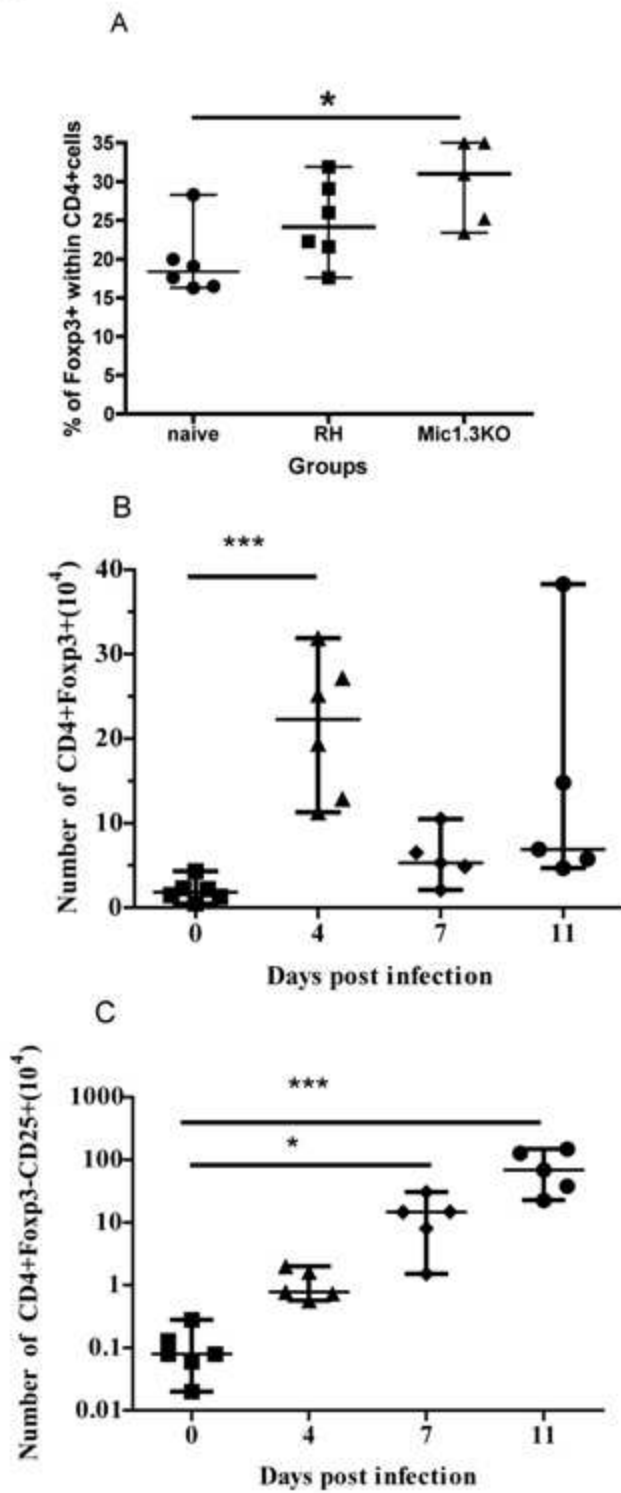




Figure 7



## Conclusions et perspectives

La toxoplasmose est une infection parasitaire chronique caractérisée par la persistance du parasite sous forme de kystes intracellulaires dans les tissus immunoprivilégiés de l'hôte infecté. Les cellules Treg, récemment démontré comme étant impliquées dans la persistance de certains protozoaires comme ceux responsables de la leishmaniose (Belkaid *et al.* 2002, Mendez *et al.* 2004), ou du paludisme (Hisaeda *et al.* 2004, Scholzen *et al.* 2010) apparaissent donc logiquement comme potentiellement responsables de la mise en place de la chronicité de l'infection toxoplasmique.

L'objectif principal de notre étude a donc été d'étudier le rôle de ces cellules Treg dans un modèle de toxoplasmose murine. Pour cela, nous avons utilisé deux types de souches sauvages (Type I et Type II) et une souche atténuée de type I (Mic1.3KO) de *T. gondii*. RH, souche de type I, est mortelle chez la souris ; un seul parasite vivant peut entraîner la mort des souris infectées en moins de 10 jours (Hitziger *et al.* 2005). Mic1.3KO est une souche vaccinale issue de la souche sauvage RH qui protège les souris contre une infection d'épreuve avec des souches virulentes de *T. gondii* (Cérède *et al.* 2005, Moiré *et al.* 2009). La souche 76K est une souche sauvage de type II qui n'induit pas de mortalité en phase aiguë en modèle murin. Elle est à l'origine de la plupart des infections chez l'homme même si des souches de type I sont également retrouvées dans certains cas d'infections humaines (Howe *et al.* 1997).

### **Utilisation du modèle murin non consanguin et choix du parasite**

L'étude présente a été réalisée chez les souris OF1, souris «outbred», ayant une grande variabilité individuelle. Ces souris sont plus représentatives de la variabilité observée chez les espèces cibles de la toxoplasmose et les résultats obtenus avec cette souche peuvent ainsi être rapidement extrapolés aux animaux de rente et éventuellement à l'homme (Rai *et al.* 2009). En outre, cette souche non consanguine a été utilisée dans d'autres modèles d'infection (Hécharde *et al.* 2004, Pujos *et al.* 2006). Plusieurs études sur les différents aspects (immunopathologie, réponse immune, vaccination, re-infection) de la toxoplasmose ont aussi été réalisées avec cette même souche de souris (Dao *et al.* 2001, Ismael *et al.* 2006, Moiré *et al.* 2009, Zenner *et al.* 1999). De plus, les souris OF1 sont naturellement résistantes à la toxoplasmose de type II (souche 76K) et sensibles à la toxoplasmose de type I (souche RH). L'étude des réponses immunitaires et protectrices induites lors d'une toxoplasmose, d'une part dans un modèle mimant l'infection naturelle et d'autre dans un modèle vaccinal, permettrait

une compréhension plus globale des réponses protectrices et non protectrices et s'inscrit dans une démarche de stratégie vaccinale.

La voie orale, voie naturelle d'infection, a été utilisée pour infecter les souris avec la souche 76K de type II. La voie intrapéritonéale a été utilisée pour la souche vaccinale Mic1.3KO et les tachyzoïtes de type RH. Cette voie d'infection est la seule utilisable puisque les tachyzoïtes sont sensibles à la dégradation par les enzymes digestives.

### **Cellules Treg et déplétion**

Plusieurs études portant sur le rôle de cellules Treg dans l'infection à *T. gondii* en modèle murin ont été menées en parallèle pendant le déroulement de cette thèse par différents laboratoires en utilisant des souris consanguines. Une étude a regardé plus précisément la cinétique des cellules Treg chez les souris C57BL/6, souris sensibles à la phase aiguë de la toxoplasmose. Il a été observé une diminution significative des cellules Treg chez la souris avant qu'elle ne succombe à l'infection (Oldenhove *et al.* 2009). Les autres études ont utilisé la technique de déplétion des cellules Treg avec l'anticorps anti-CD25 que ce soit chez les souris sensibles C57BL/6 (Couper *et al.* 2009, Morampudi *et al.* 2011, Tenorio *et al.* 2011) ou les souris résistantes Balb/c (Tenorio *et al.* 2010 et 2011, Morampudi *et al.* 2011) afin d'étudier leur rôle dans le développement de la maladie. Toutes ces études ont été faites avec une souche de type II de *T. gondii* soit ME49 (Couper *et al.* 2009, Oldenhove *et al.* 2009, Tenorio *et al.* 2010 et 2011) soit 76K (Morampudi *et al.* 2011). En ce qui nous concerne, nous avons donc étudié les deux souches de type I et II, ce qui nous a permis de comparer les résultats obtenus en terme de protection et de réponses immunitaires.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'anticorps anti-CD25 pour dépléter les cellules Treg, technique déjà utilisée dans plusieurs autres modèles d'infections (Hisaeda *et al.* 2004, Couper *et al.* 2007, Kotner et Tarleton 2007).

Les résultats obtenus montrent que l'injection de l'anticorps anti-CD25 purifié n'induit pas de mortalité significativement plus importante (27%) chez les souris OF1 infectées avec la souche 76K par rapport aux souris ayant reçu l'isotype contrôle purifié. Ces données sont en cohérence avec celles obtenues par Morampudi *et al.* (2011) mais en contradiction avec les

résultats de Tenorio *et al.* (2010) obtenus chez les souris résistantes Balb/c. Morampudi *et al.* (2011) n'ont pas observé de mortalité après déplétion avec l'anti-CD25 tandis que Tenorio *et al.* (2010) ont observé 50% de mortalité après déplétion.

Il est à noter que nos premières expériences de déplétion effectuées avec l'anticorps anti-CD25 ont été réalisées avec un anticorps non purifié précipité au sulfate d'ammonium identiquement aux expériences menées par l'équipe de Tenorio (Tenorio *et al.*, 2010). Nous avons alors observé une mortalité significativement supérieure à celle observée avec les anticorps purifiés (40% versus 27%). Les examens post mortem des souris après injection des anticorps non purifiés ont montré que celles-ci souffraient d'iléite. L'iléite est une inflammation intestinale classiquement observée chez les souris naturellement sensibles (C57L/6) infectées avec une dose létale de toxoplasme de type II (Mennechet *et al.* 2002). Les mécanismes impliqués dans l'inflammation intestinale observée chez les souris OF1 injectées avec les anticorps non purifiés restent pour l'instant inconnus. Un ou plusieurs des facteurs décrits ci-dessous pourraient jouer un rôle dans le développement de l'iléite observée.

Ainsi, il a été observé que l'albumine pouvait provoquer des réactions allergiques chez certaines femmes après un protocole d'insémination utilisant du milieu de culture contenant de l'albumine (Orta *et al.* 2003, Sonenthal *et al.* 1991, Wuthrich *et al.* 1995, Smith *et al.* 1992). Or, le milieu de culture utilisé pour cultiver les hybridomes contient 5% de SVF qui est une source d'albumine. Les surnageants d'hybridomes utilisés contiennent de l'albumine que l'on a pu visualiser sur gel de polyacrylamide. De plus, nous avons trouvé des IgG anti-BSA chez les souris infectées et injectées avec les anticorps précipités. Cependant, la BSA purifiée n'induit pas d'iléite chez les souris infectées pendant la phase aiguë de la toxoplasmose. Des IgE sont généralement sécrétées lors d'une réponse immunitaire contre un allergène. On pourrait ainsi rechercher la présence d'IgE anti-BSA dans les sérums des souris injectées avec les anticorps précipités pour vérifier si la BSA est le candidat allergique impliqué dans l'iléite observée après injections des anticorps précipités.

L'importance des dérivés bactériens dans l'induction de l'iléite après infection avec le toxoplasme a été décrite (Heimesaat *et al.* 2006, 2007 & 2007a). L'administration orale de lipide-1 d'*E.coli* par exemple aggrave l'iléite chez la souris infectées avec *T. gondii* (Heimesaat *et al.* 2006, 2007 & 2007a). Il serait important de vérifier l'absence d'endotoxine dans les surnageants des hybridomes pour essayer de déterminer la cause de l'iléite observée chez ces souris.

## Treg et infection toxoplasmique

Une réponse immunitaire très forte associée à une parasitémie et à une mortalité des cellules intrapéritonéales observées dans nos expériences pourraient être impliquées dans la mortalité des souris infectées avec la souche RH. En effet, nous avons observé une grande quantité d'IFN $\gamma$  systémique (rate et séra). Une forte inflammation, une péritonite, une hépatite (Mordue *et al.* 2001) et l'apoptose des splénocytes (Gavrilescu *et al.* 2001) ont été observés chez les souris infectées avec la souche RH. Une forte production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , le MCP-1 (Moiré *et al.* 2009, Mordue *et al.* 2001, Nguyen *et al.* 2003) sont observées avant la mortalité des souris infectées avec la souche RH. Une forte quantité d'IFN $\gamma$  dans le péritoine pourrait aussi être à l'origine de la mortalité observée car de très hauts niveaux de cytokines inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  sont associés à la lyse des cellules et la destruction des tissus pendant l'infection aiguë (Gavrilescu *et al.*, 2001). Les souris sensibles (C57BL/6) meurent pendant la phase aiguë de la toxoplasmose par sur production d'IFN $\gamma$  local et destruction des tissus (Ronet *et al.* 2005).

La charge parasitaire locale augmente exponentiellement entre le jour 4 et le jour 7 après infection dans la cavité péritonéale des souris OF1 infectées avec la souche RH au contraire des souris vaccinées avec Mic1.3KO pour lesquelles la charge parasitaire n'augmente plus après 4 jours post-infection. Ces parasitémies sont liés à l'induction de réponses immunitaires différentes entre les souris infectées avec les souches RH et Mic1.3KO. La différence dans le pouvoir d'adhésion aux cellules hôtes entre les parasites des souches RH et Mic1.3KO (Cérède *et al.* 2002, Cérède *et al.* 2005) pourrait expliquer la différence dans la charge parasitaire locale. Les parasites RH ont une croissance et une dissémination beaucoup plus rapide que les parasites Mic1.3KO qui se «comportent» comme des parasites de type II (Moiré *et al.* 2009). Ceci pourrait expliquer l'expansion exponentielle au niveau local des parasites RH observé entre le 4<sup>ème</sup> jour et le 7<sup>ème</sup> post infection.

En parallèle, nous n'avons pas trouvé de différence significative dans la charge parasitaire cérébrale observée dans les groupes déplétés et non-déplétés avec les anticorps purifiés (soit l'anti-CD25 soit l'isotype contrôle, respectivement); les résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Couper *et al.* (2009) et par Morampudi *et al.* (2011). Cependant, une augmentation significative de la charge parasitaire cérébrale des souris déplétées avec l'anti-CD25 non purifié a été observée. Les résultats obtenus avec les anticorps non purifiés sont en cohérence avec ceux obtenus par Couper *et al.* (2009) et Morampudi *et*

*al.* (2011). Cette divergence peut être due aux effets combinés spécifiques et non spécifiques de l'injection de l'anticorps anti-CD25. En effet, nous observons que la charge parasitaire intestinale des souris est augmentée dans le lot traité avec l'anti-CD25 non purifié vis-à-vis du lot traité par le contrôle isotypique. En présence de parasites, l'injection de ces anticorps non purifiés induit une inflammation intestinale qui pourrait limiter la multiplication des parasites. L'effet additionnel spécifique de l'anti-CD25 à savoir la déplétion des cellules CD25<sup>+</sup> pourrait être à l'origine de cette augmentation de la parasitémie. En effet, Couper *et al.* (2009) ont aussi observé une augmentation de la charge parasitaire dans l'iléum des souris déplétées et ont trouvé un lien direct entre la charge parasitaire intestinale et la pathologie intestinale et ont associé ces effets à la déplétion préférentielle des cellules Teff chez les souris sensibles (C57BL/6). De même, il a été observé que la déplétion augmentait la charge parasitaire ainsi que la pathologie au niveau intestinal chez les souris résistantes (Balb/c) à cause de la déplétion préférentielle des cellules Treg chez les souris résistantes (Morampudi *et al.* 2011).

## **Protection**

La protection observée chez les souris OF1 vaccinées avec la souche atténuée Mic1.3KO est d'abord locale (intrapéritonéale) avec une forte expansion et/ou recrutement des cellules au niveau du péritoine jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour post-infection. Les cellules CD8<sup>+</sup> sont les effecteurs principaux essentiels à l'établissement de la résistance et à la mise en place d'une immunité à long terme contre la toxoplasmose (Gigley *et al.* 2009, Casciotti *et al.* 2002, Suzuki et Remington 1988). Le rôle des CD4<sup>+</sup> est très important dans la mise en place de la réponse effectrice CD8<sup>+</sup> et aussi dans le maintien de cette réponse. La production d'IL2 par les CD4 a été montrée comme l'un des facteurs essentiels pour l'induction de la réponse CD8 effectrice (Gigley *et al.* 2009, Casciotti *et al.* 2002, Suzuki et Remington 1988).

Il a été également démontré que les cellules CD4<sup>+</sup> sont impliquées dans la protection des souris contre une infection toxoplasmique avec une souche de type II (Tait 2010) ou avec une souche vaccinale (Gazzinelli *et al.* 1991, Gigley *et al.* 2009, Jordan *et al.* 2009, Kasper et Khan 1998). Les cellules CD4<sup>+</sup> jouent un rôle important dans la protection en produisant l'IFN $\gamma$  ainsi que dans la régulation en diminuant l'immunopathologie après l'infection orale des souris sensibles (C57BL/6) (Gazzinelli *et al.* 1996, Jankovic *et al.* 2007).

Nous avons observé une augmentation significative des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au site d'infection (péritoine) chez les souris vaccinées avec Mic1.3KO. Les cellules CD8<sup>+</sup>

augmentent à j4 et ce jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour post-vaccination. L'expansion des cellules CD4<sup>+</sup> est significative à j11 post-infection chez les souris vaccinées avec la souche atténuée Mic1.3KO. Des résultats similaires ont été obtenus par Gigley *et al.* (2009) qui montrent un recrutement local de cellules CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> à j2 et à j6 post-infection, respectivement chez des souris infectées avec la souche atténuée cps1-1.

L'expression du marqueur CD69 par les splénocytes des souris infectées avec la souche RH 1 à 3 jours avant le décès de l'animal montre que ces cellules sont dans un état d'activation. On ne note pas d'expression du CD69 chez les souris vaccinées avec la souche Mic1.3KO jusqu'à 11 jours après infection. Le rôle du CD69 reste à déterminer. Les données de la littérature semblent contradictoires ; certains auteurs semblent montrer que le CD69 est une molécule d'activation mais d'autres la décrivent comme une molécule régulatrice. Ainsi, les cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> exprimant CD69 et le TGFβ membranaire ont un rôle régulateur (Han *et al.* 2008). De plus, CD69 régule les réponses immunes et inflammatoires en stoppant la différenciation des cellules T effecteurs Th17 (Martin *et al.* 2010).

Les neutrophiles et les monocytes participent aussi à la mise en place de la réponse protectrice. Les monocytes GR1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> et les neutrophiles GR1<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> sont recrutés au niveau de la cavité péritonéale après infection intrapéritonéale des souris avec la souche atténuée cps1-1 (Gigley *et al.* 2009). Il serait ainsi intéressant d'analyser les monocytes GR1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> et les neutrophiles GR1<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> dans la cavité péritonéale des souris vaccinées avec la souche Mic1.3KO pour comparer avec les résultats obtenus par Gigley *et al.* (2009).

Le pourcentage important de mortalité cellulaire nous à empêcher d'analyser le phénotype des cellules intrapéritonéales après 4 jours post-infection dans les souris infectées avec la souche RH. Une apoptose des cellules immunitaires (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, cellules NK1,1<sup>+</sup> et cellules B220<sup>+</sup>) a déjà été observée chez les souris infectées avec RH (Gavrilescu et Denkers 2001). Ces résultats montrent les effets délétères de la souche de type I, tandis que l'on observe une augmentation du nombre de cellules immunitaires (rates et ganglions mésentériques) chez les souris infectées avec 76K à jour 6 post-infection, ce qui montre les effets d'une réponse immune protectrice d'une souche non virulente de type II.

Il serait intéressant de faire l'analyse des cellules intrapéritonéales (recrutement et/ou expansion) après une infection des souris avec des tachyzoïtes d'une souche de type II. Ceci

nous permettrait de comparer cette réponse immune protectrice avec celle induite par la souche atténuée Mic1.3KO.

### **Rôle des cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans la protection**

Nous avons observé une augmentation significative du nombre des cellules Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> chez les souris OF1 infectées avec les souches 76K et Mic1.3KO.

Des résultats similaires ont été observés par Morampudi *et al.* (2011) chez les souris résistantes (Balb/c) pendant la phase aiguë de la toxoplasmose avec la souche 76K.

Nous avons aussi observé une diminution sensible du pourcentage des cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans les rates et les ganglions mésentériques des souris C57BL/6 à j7 post-infection (données non-publiées) comme cela a été observé par d'autres équipes (Oldenhove *et al.* 2009).

Ces données (augmentation du nombre des cellules Treg en corrélation avec la survie des souris; chute des cellules Treg avant la mort des souris) montrent qu'il existe un lien entre les cellules Treg et le mécanisme de résistance des souris à la phase aiguë de la toxoplasmose.

Il reste à déterminer si l'augmentation du nombre et du pourcentage de Treg observée provient de l'expansion ou d'un recrutement local de ces cellules. L'expansion ou le recrutement et l'accumulation de cellules Treg aux sites locaux d'infection ont été décrits dans plusieurs modèles de pathogènes particulièrement chez les parasites persistants (Belkaid *et al.* 2006, Grainger *et al.* 2010, Scholzen *et al.* 2010). Les mécanismes exacts impliqués dans l'expansion ou le recrutement cellulaire dans notre modèle d'infection reste à déterminer. La migration des cellules Treg aux sites d'inflammation est dépendante de récepteurs de homing des cellules Treg à savoir, le CD103 (Huehn et Hamann 2005), les récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR4, CCR5, P-selectin et E-selectin (Belkaid et Tarbell 2009). A ce jour, on ne sait pas s'il existe une différence dans le mécanisme de migration des cellules Treg chez les souris infectées avec les différentes souches de *T. gondii*. L'analyse des différents récepteurs de homing et l'utilisation des cellules Treg de souris transgéniques exprimant la GFP sous promoteur de foxp3 dans des souris consanguines, pourraient nous aider à répondre à ces questions.

Les cellules Treg peuvent s'accumuler aux sites d'inflammation ou d'infection (Wei *et al.* 2006). La cinétique, le phénotypage et l'activité *in vitro* des cellules Treg de la lamina propria et des plaques de Peyer pendant la phase aiguë de la toxoplasmose de type II après

infection par voie orale, donneraient plus de détails sur le rôle de cellules Treg dans la toxoplasmose aiguë. Les études effectuées par les autres équipes, montrent qu'il y a une augmentation des Treg au niveau local (LP) (Tenorio *et al.* 2011 et Morampudi *et al.* 2011) ce qui nous reste également à déterminer dans notre modèle d'infection avec la souche de type II chez les souris swiss OF1.

Dans une étude récente, il a été montré que l'activité suppressive des cellules Treg augmente quand ces cellules migrent d'abord aux sites d'inflammation et ensuite migrent aux ganglions lymphatiques drainants et dans les tissus (Zhang *et al.* 2009). Le site exact d'éducation et d'activité des cellules Treg n'est pas connu dans la toxoplasmose pendant une réponse immune optimale comme décrite récemment dans un modèle de greffe (Zhang *et al.* 2009).

Une perspective de ce travail est de voir quel rôle les cellules Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> joue chez les souris vaccinées dans le cas d'une épreuve avec *T. gondii* de type I et de type II. De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle des cellules Treg dans ces souris vaccinées pendant une réactivation suite une immunosuppression par exemple avec la dexaméthasone. Il serait intéressant du point de vue d'une réactivation de la toxoplasmose qui s'observe par exemple chez les patients atteints du SIDA.

Dans leur travail, Belkaid *et al.* (2007) montrent que les cellules Treg contrôlent la persistance de *Leishmania major* après guérison de souris résistantes. Cette persistance a été montrée essentielle pour maintenir la résistance contre une réinfection avec des leishmanies. Le lien entre la persistance du toxoplasme et le maintien de la réponse protectrice reste à évaluer dans notre modèle de vaccination avec la souche Mic1.3KO.

### **Implication des cellules Teff CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> dans la protection**

Nous avons montré que la survie des souris OF1 dans la phase aiguë de la toxoplasmose est liée à une augmentation significative du nombre de cellules Teff CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>. On observe cette augmentation chez les souris infectées soit avec la souche 76K soit avec la souche vaccinale Mic1.3KO. Chez les souris vaccinées avec Mic1.3KO, nous avons observé une augmentation des cellules Teff de j7 à j11 post-infection

au niveau local. Pour les souris infectées avec la souche 76K, nous avons observé cette augmentation au niveau de la rate mais nous n'avons pas regardé au niveau local en particulier au niveau de la lamina propria.

Les cellules Teff  $CD4^+Foxp3^-CD25^+$  deviennent une autre cible potentielle de l'anti-CD25 du fait de l'augmentation de leur nombre pendant la phase aiguë de la toxoplasmose comme observé par Couper *et al.* (2009) dans le modèle de souris sensibles C57BL/6. Ils ont observé une augmentation significative des cellules Teff pendant la phase aiguë de la toxoplasmose chez la souris C57BL/6 mais n'ont pas observé d'augmentation du nombre des cellules Treg. Les effets potentiels de l'anti-CD25 sur les cellules Teff  $CD25^+$  doivent donc être pris en compte pendant la déplétion de cellules Treg avec l'anti-CD25.

L'anti-CD25 pendant la phase aiguë de la toxoplasmose induit une déplétion simultanée des cellules Treg et des cellules Teff. Ces résultats restreignent l'utilisation de l'anti-CD25 comme un outil de choix pour dépler les cellules Treg pendant une maladie inflammatoire comme par exemple la phase aiguë de la toxoplasmose.

Les expériences de transfert cellulaire sont un très bon moyen pour déterminer le rôle de cellules Treg mais ces expériences ne peuvent pas être faites chez les souris OF1 non consanguines. A ce jour, il n'y a aucune étude qui ait pu montrer la déplétion unique de cellules Treg dans les souris sauvages pendant la phase aiguë de la toxoplasmose. L'utilisation des différents produits induisant ou diminuant le nombre de cellules Treg pourrait être une solution à ce problème. Plusieurs types d'approches permettent l'étude des cellules Treg *in vivo*. En particulier, l'utilisation d'anticorps agonistes ou antagonistes permet d'inhiber ou d'activer les cellules Treg *in vivo* ou encore l'utilisation de différentes molécules ont également été décrit pour obtenir une expansion *in vivo* des cellules Treg comme la rapamycine ou la vitamine D3.

### **Cytokines et chimiokine**

Les chimiokines (MCP1) et cytokines inflammatoires (IL12 et  $IFN\gamma$ ) induisent une réponse immunitaire protectrice de type Th1 contre la toxoplasmose. La cytokine régulatrice IL10 est impliquée dans la régulation de l'intensité de cette réponse immunitaire protectrice (Gazzinelli *et al.* 1996, Wilson *et al.* 2005). Nous avons observé une production significative des chimiokines et cytokines MCP1,  $IFN\gamma$  et IL10 dans les séras des souris OF1 infectées avec

la souche 76K pendant la phase aiguë de la toxoplasmose. On observe ce même profil cytokinique dans les souris déplétées avec l'anticorps anti-CD25 et on ne trouve pas de différence significative entre les groupes déplétés et non déplétés. Ceci pourrait expliquer qu'il n'y ait pas de différence aussi bien dans la charge parasitaire que dans la survie des souris à l'issue de l'infection entre les souris déplétées et non déplétées.

Dans nos expériences, l'anticorps anti-CD25 n'a pas d'effet sur le taux d'IFN $\gamma$  sérique. Ces résultats sont cohérents avec la déplétion préférentielle de cellules Treg et au contraire de Couper *et al.* (2009) qui ont observé une diminution de l'IFN $\gamma$  sérique. Dans cette étude de Couper, une perte de contrôle sur la dissémination et l'enkystement parasitaire est aussi observée et est corrélée à une déplétion préférentielle des Teff. Morampudi *et al.* (2011) ont observé une augmentation de l'IFN $\gamma$  après déplétion avec l'anti-CD25 dans les souris Balb/c infectées avec la souche 76K et une augmentation de la charge parasitaire locale et cérébrale liée à la déplétion préférentielle de cellules Treg montrant ainsi un rôle protecteur de cellules Treg dans la toxoplasmose.

Nous avons également observé une augmentation significative de la production d'IL12 chez les souris déplétées avec l'anti-CD25. L'IL12 est produite par les cellules dendritiques (Aliberti 2005) et les macrophages (Robben *et al.* 2004) pendant l'infection toxoplasmique après stimulation du TLR-11 et du CCR5 par la profiline et la cyclophiline de *T. gondii*, respectivement (Egan 2009, Aliberti 2005). Nous avons également observé une production plus faible de la cytokine régulatrice IL10 dans nos expérience de déplétion. Cette diminution de la production d'IL10 pourrait être responsable de l'augmentation de la production d'IL12.

Nous avons observé une production importante d'IFN $\gamma$  systémique (rate et sérum) chez les souris infectées avec la souche RH par rapport aux souris infectées avec la souche vaccinale Mic1.3KO. La production importante de cytokines pro-inflammatoires est associée aux lésions tissulaires induites par une multiplication incontrôlée des parasites (Liesenfeld *et al.*, 1999, Mordue *et al.* 2001, Nguyen *et al.* 2003). La destruction des tissus par RH pourrait également être révélée par ce fort taux d'IFN $\gamma$ .

Nous avons observé que l'infection des souris OF1 avec la souche vaccinale Mic1.3KO induit une production élevée d'IL10 par rapport aux souris infectées avec la souche sauvage RH, indiquant une régulation de la réponse immunitaire (Gazzinelli *et al.* 1996, Wilson *et al.* 2005) chez les souris vaccinées.

En conclusion, nous avons montré que les cellules Treg jouent un rôle important dans la protection des souris OF1, en terme de survie, après infection avec une souche de type II et une souche vaccinale dérivée d'une souche de type I. Les souris OF1 infectées avec la souche 76K maintiennent le nombre de cellules Treg dans la rate et les ganglions mésentériques pendant la phase aiguë de la toxoplasmose. L'anticorps anti-CD25 n'a pas d'effets sur la pathologie de la toxoplasmose que ce soit en terme de mortalité ou en terme de charge parasitaire cérébrale chez les souris OF1. L'anticorps anti-CD25 est un bon outil pour dépléter les cellules exprimant le marqueur CD25 mais ne permet pas de différencier la population des cellules Treg CD25+ des autres populations cellulaires exprimant le CD25 comme la population de cellules Teff.

On observe une augmentation du nombre de cellules Treg au site de vaccination avec la souche Mic1.3KO suivie par une augmentation du nombre de cellules Teff. Nous avons observé que les souris OF1 infectées avec la souche RH meurent d'une réponse immunitaire incontrôlée et d'une forte parasitémie tandis que les souris vaccinées avec Mic1.3KO ne meurent pas grâce à une réponse immunitaire contrôlée et une faible parasitémie. De plus, il y a une production équilibrée des cytokines inflammatoires (IFN $\gamma$ ) et régulatrices (IL10) chez les souris vaccinées contrairement à ce que l'on observe au cours de l'infection des souris avec la souche virulente RH.

# Bibliographie

- Adams, L. B.; Hibbs, J. B.; Taintor, R. R. & Krahenbuhl, J. L. (1990), Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol***144**(7), 2725-2729.
- Ajzenberg, D.; Bañuls, A. L.; Su, C.; Dumètre, A.; Demar, M.; Carme, B. & Dardé, M. L. (2004), Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol***34**(10), 1185-1196.
- Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M.-H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty, P. & Dardé, M.-L. (2002), Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis***186**(5), 684-689.
- Akimova, T.; Beier, U. H.; Wang, L.; Levine, M. H. & Hancock, W. W. (2011), Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One***6**(8), e24226.
- Al-Khalidi, N. W.; Weisbrode, S. E. & Dubey, J. P. (1980), Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts to ponies. *Am J Vet Res* **41**(9), 1549-1551.
- Aliberti, J. (2005), Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol***5**(2), 162-170.
- Aliberti, J.; e Sousa, C. R.; Schito, M.; Hieny, S.; Wells, T.; Huffnagle, G. B. & Sher, A. (2000), CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* **1**(1), 83-87.
- de Araújo, F. F.; Vitelli-Avelar, D. M.; Teixeira-Carvalho, A.; Antas, P. R.; Gomes, J. A. S.; Sathler-Avelar, R.; Rocha, M. O. C.; Elói-Santos, S. M.; Pinho, R. T.; Correa-Oliveira, R. & Martins-Filho, O. A. (2011), Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis***5**(5), e992.
- Bailey-Bucktrout, S. L. & Bluestone, J. A. (2011), Regulatory T cells: stability revisited. *Trends Immunol***32**(7), 301-306.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998), Dendritic cells and the control of immunity, *Nature***392**(6673), 245-252.
- Barragan, A. & Sibley, L. D. (2002), Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med***195**(12), 1625-1633.
- Barsoum, R. S. (2004), Parasitic infections in organ transplantation. *Exp Clin Transplant***2**(2), 258-267.
- Battaglia, M.; Stabilini, A.; Migliavacca, B.; Horejs-Hoeck, J.; Kaupper, T. & Roncarolo, M.-G. (2006), Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol***177**(12), 8338-8347.
- Bayer, A. L. & Malek, T. R. Jiang, S., ed. (2008), *Regulatory T Cells and Clinical Application*, Springer Science + Business Media.

- Bayer, A. L.; Yu, A.; Adeegbe, D. & Malek, T. R. (2005), Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med***201**(5), 769-777.
- Belfort-Neto, R.; Nussenblatt, V.; Rizzo, L.; Muccioli, C.; Silveira, C.; Nussenblatt, R.; Khan, A.; Sibley, L. D. & Belfort, R. (2007), High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc***79**(1), 111-114.
- Belkaid, Y. (2007), Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol***7**(11), 875-888.
- Belkaid, Y.; Blank, R. B. & Suffia, I. (2006), Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev***212**, 287-300.
- Belkaid, Y.; Piccirillo, C. A.; Mendez, S.; Shevach, E. M. & Sacks, D. L. (2002), CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature***420**(6915), 502-507.
- Belkaid, Y. & Rouse, B. T. (2005), Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol***6**(4), 353-360.
- Belkaid, Y. & Tarbell, K. V. (2009), Arming Treg cells at the inflammatory site. *Immunity***30**(3), 322-323.
- Benenson, M. W.; Takafuji, E. T.; Lemon, S. M.; Greenup, R. L. & Sulzer, A. J. (1982), Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N Engl J Med***307**(11), 666-669.
- Bennett, C. L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M. E.; Ferguson, P. J.; Whitesell, L.; Kelly, T. E.; Saulsbury, F. T.; Chance, P. F. & Ochs, H. D. (2001), The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet***27**(1), 20-21.
- Benson, M. J.; Pino-Lagos, K.; Roseblatt, M. & Noelle, R. J. (2007), All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med***204**(8), 1765-1774.
- Bessières, M. H.; Berrebi, A.; Rolland, M.; Bloom, M. C.; Roques, C.; Cassaing, S.; Courjault, C. & Séguéla, J. P. (2001), Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol***94**(1), 37-45.
- Bettini, M. & Vignali, D. A. A. (2009), Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol***21**(6), 612-618.
- Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000), Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev***64**(3), 607-623.
- Bliss, S. K.; Gavrilescu, L. C.; Alcaraz, A. & Denkers, E. Y. (2001), Neutrophil depletion

during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun***69**(8), 4898-4905.

Bliss, S. K.; Marshall, A. J.; Zhang, Y. & Denkers, E. Y. (1999), Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol***162**(12), 7369-7375.

Bliss, S. K.; Zhang, Y. & Denkers, E. Y. (1999a), Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12, *J Immunol***163**(4), 2081-2088.

Bocian, K.; Borysowski, J.; Wierzbicki, P.; Wyzgal, J.; Klosowska, D.; Bialoszewska, A.; Paczek, L.; Górski, A. & Korczak-Kowalska, G. (2010), Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. *Nephrol Dial Transplant***25**(3), 710-717.

Bohne, W.; Heesemann, J. & Gross, U. (1994), Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun***62**(5), 1761-1767.

Bolacchi, F.; Sinistro, A.; Ciaprini, C.; Demin, F.; Capozzi, M.; Carducci, F. C.; Drapeau, C. M. J.; Rocchi, G. & Bergamini, A. (2006), Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol***144**(2), 188-196.

Boothroyd, J. C. & Grigg, M. E. (2002), Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?, *Curr Opin Microbiol***5**(4), 438-442.

Bopp, T.; Becker, C.; Klein, M.; Klein-Hessling, S.; Palmetshofer, A.; Serfling, E.; Heib, V.; Becker, M.; Kubach, J.; Schmitt, S.; Stoll, S.; Schild, H.; Staeger, M. S.; Stassen, M.; Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2007), Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med***204**(6), 1303-1310.

Borsellino, G.; Kleinewietfeld, M.; Mitri, D. D.; Sternjak, A.; Diamantini, A.; Giometto, R.; Höpner, S.; Centonze, D.; Bernardi, G.; Dell'Acqua, M. L.; Rossini, P. M.; Battistini, L.; Röttschke, O. & Falk, K. (2007), Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood***110**(4), 1225-1232.

Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. A. (2009), Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev***229**(1), 41-66.

Bowie, W. R.; King, A. S.; Werker, D. H.; Isaac-Renton, J. L.; Bell, A.; Eng, S. B. & Marion, S. A. (1997), Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet***350**(9072), 173-177.

Boyer, O.; Saadoun, D.; Abriol, J.; Dodille, M.; Piette, J.-C.; Cacoub, P. & Klatzmann, D. (2004), CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed

cryoglobulinemia vasculitis. *Blood***103**(9), 3428-3430.

Boyman, O.; Surh, C. D. & Sprent, J. (2006), Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther***6**(12), 1323-1331.

Brunkow, M. E.; Jeffery, E. W.; Hjerrild, K. A.; Paepfer, B.; Clark, L. B.; Yasayko, S. A.; Wilkinson, J. E.; Galas, D.; Ziegler, S. F. & Ramsdell, F. (2001), Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet***27**(1), 68-73.

Burchill, M. A.; Yang, J.; Vogtenhuber, C.; Blazar, B. R. & Farrar, M. A. (2007), IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol***178**(1), 280-290.

Buxton, D. (1998), Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res***29**(3-4), 289-310.

Buxton, D. (1993), Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol Today***9**(9), 335-337.

Buxton, D. & Innes, E. A. (1995), A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis, *Parasitology***110**, S11-S16.

Buxton, D.; Maley, S. W.; Wright, S. E.; Rodger, S.; Bartley, P. & Innes, E. A. (2007a), *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet Parasitol***149**(1-2), 25-28.

Buxton, D.; Maley, S. W.; Wright, S. E.; Rodger, S.; Bartley, P. & Innes, E. A. (2007), Ovine toxoplasmosis: transmission, clinical outcome and control. *Parassitologia***49**(4), 219-221.

Campbell, D. J. & Koch, M. A. (2011), Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol***11**(2), 119-130.

Canada, N.; Meireles, C. S.; Rocha, A.; da Costa, J. M. C.; Erickson, M. W. & Dubey, J. P. (2002), Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *J Parasitol***88**(6), 1247-1248.

Cao, X.; Cai, S. F.; Fehniger, T. A.; Song, J.; Collins, L. I.; Pionica-Worms, D. R. & Ley, T. J. (2007), Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity***27**(4), 635-646.

Carne, B.; Ajzenberg, D.; Demar, M.; Simon, S.; Dardé, M. L.; Maubert, B. & de Thoisy, B. (2009), Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Vet Parasitol***163**(1-2), 132-135.

Carne, B.; Bissuel, F.; Ajzenberg, D.; Bouyne, R.; Aznar, C.; Demar, M.; Bichat, S.; Louvel, D.; Bourbigot, A. M.; Peneau, C.; Neron, P. & Dardé, M. L. (2002), Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol***40**(11), 4037-4044.

- Carruthers, V. B. (2002), Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop***81**(2), 111-122.
- Casciotti, L.; Ely, K. H.; Williams, M. E. & Khan, I. A. (2002), CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. *Infect Immun***70**(2), 434-443.
- Cassan, C.; Piaggio, E.; Zappulla, J. P.; Mars, L. T.; Couturier, N.; Bucciarelli, F.; Desbois, S.; Bauer, J.; Gonzalez-Dunia, D. & Liblau, R. S. (2006), Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol***177**(3), 1552-1560.
- Channon, J. Y.; Seguin, R. M. & Kasper, L. H. (2000), Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun***68**(8), 4822-4826.
- Chardès, T. & Bout, D. (1993), Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol***144**(1), 57-60.
- Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K.-J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G. & Wahl, S. M. (2003), Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med***198**(12), 1875-1886.
- Chen, Y.; Kuchroo, V. K.; Inobe, J.; Hafler, D. A. & Weiner, H. L. (1994), Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science***265**(5176), 1237-1240.
- Cheng, G.; Yu, A. & Malek, T. R. (2011), T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunol Rev***241**(1), 63-76.
- Coe, D.; Begom, S.; Addey, C.; White, M.; Dyson, J. & Chai, J.-G. (2010), Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother***59**(9), 1367-1377.
- Cohen, A. D.; Schaer, D. A.; Liu, C.; Li, Y.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Kim, S. C.; Diab, A.; Rizzuto, G.; Duan, F.; Perales, M. A.; Merghoub, T.; Houghton, A. N. & Wolchok, J. D. (2010), Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One***5**(5), e10436.
- Collison, L. W.; Chaturvedi, V.; Henderson, A. L.; Giacomini, P. R.; Guy, C.; Bankoti, J.; Finkelstein, D.; Forbes, K.; Workman, C. J.; Brown, S. A.; Rehg, J. E.; Jones, M. L.; Ni, H.-T.; Artis, D.; Turk, M. J. & Vignali, D. A. (2010), IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol***11**(12), 1093-1101.
- Collison, L. W.; Pillai, M. R.; Chaturvedi, V. & Vignali, D. A. (2009), Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol***182**(10), 6121-6128.
- Collison, L. W.; Workman, C. J.; Kuo, T. T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K. M.; Cross, R.; Sehy, D.; Blumberg, R. S. & Vignali, D. A. (2007), The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature***450**(7169), 566-569.

- Combe, C. L.; Curiel, T. J.; Moretto, M. M. & Khan, I. A. (2005), NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect Immun* **73**(8), 4913-4921.
- Conrad, P. A.; Miller, M. A.; Kreuder, C.; James, E. R.; Mazet, J.; Dabritz, H.; Jessup, D. A.; Gulland, F. & Grigg, M. E. (2005), Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* **35**(11-12), 1155-1168.
- Coombes, J. L.; Siddiqui, K. R. R.; Arancibia-Cárcamo, C. V.; Hall, J.; Sun, C.-M.; Belkaid, Y. & Powrie, F. (2007), A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**(8), 1757-1764.
- Corthay, A. (2009), How do regulatory T cells work?, *Scand J Immunol* **70**(4), 326-336.
- Costa, A. J.; Araujo, F. G.; Costa, J. O.; Lima, J. D. & Nascimento, E. (1977), Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **63**(2), 212-218.
- Couper, K. N.; Blount, D. G.; de Souza, J. B.; Suffia, I.; Belkaid, Y. & Riley, E. M. (2007), Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J Immunol* **178**(7), 4136-4146.
- Couper, K. N.; Blount, D. G.; Wilson, M. S.; Hafalla, J. C.; Belkaid, Y.; Kamanaka, M.; Flavell, R. A.; de Souza, J. B. & Riley, E. M. (2008), IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* **4**(2), e1000004.
- Couper, K. N.; Lanthier, P. A.; Perona-Wright, G.; Kummer, L. W.; Chen, W.; Smiley, S. T.; Mohrs, M. & Johnson, L. L. (2009), Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* **182**(7), 3985-3994.
- Couper, K. N.; Roberts, C. W.; Brombacher, F.; Alexander, J. & Johnson, L. L. (2005), *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect Immun* **73**(12), 8060-8068.
- Couvreur, J. & Thulliez, P. (1996), [Acquired toxoplasmosis of ocular or neurologic site: 49 cases]. *Presse Med* **25**(9), 438-442.
- Curiel, T. J.; Coukos, G.; Zou, L.; Alvarez, X.; Cheng, P.; Mottram, P.; Evdemon-Hogan, M.; Conejo-Garcia, J. R.; Zhang, L.; Burow, M.; Zhu, Y.; Wei, S.; Kryczek, I.; Daniel, B.; Gordon, A.; Myers, L.; Lackner, A.; Disis, M. L.; Knutson, K. L.; Chen, L. & Zou, W. (2004), Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**(9), 942-949.
- Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. (2009), Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?, *Immunity* **30**(5), 626-635.

- Curotto de Lafaille, M. A.; Lino, A. C.; Kutchukhidze, N. & Lafaille, J. J. (2004), CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immuno* **173**(12), 7259-7268.
- Cérède, O.; Dubremetz, J. F.; Bout, D. & Lebrun, M. (2002), The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J* **21**(11), 2526-2536.
- Cérède, O.; Dubremetz, J. F.; Soète, M.; Deslée, D.; Vial, H.; Bout, D. & Lebrun, M. (2005), Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med* **201**(3), 453-463.
- Cérède, O.; Garcia-Réguet, N.; Conseil, V.; Bout, D.; Dubremetz, J. F. & Lebrun, M. (2001), [Identification and molecular characterization of a *Toxoplasma gondii* microneme], *Ann Pharm Fr* **59**(5), 293-296.
- D'Ambrosio, D.; Sinigaglia, F. & Adorini, L. (2003), Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immuno* **124**(3), 122-126.
- D'Cruz, L. M. & Klein, L. (2005), Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* **6**(11), 1152-1159.
- Dao, A.; Fortier, B.; Soete, M.; Plenat, F. & Dubremetz, J. F. (2001), Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int J Parasitol* **31**(1), 63-65.
- Dardé, M. L.; Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. (1992), Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* **78**(5), 786-794.
- Davidson, T. S.; DiPaolo, R. J.; Andersson, J. & Shevach, E. M. (2007), Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* **178**(7), 4022-4026.
- Deaglio, S.; Dwyer, K. M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.-F.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K.; Strom, T. B. & Robson, S. C. (2007), Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**(6), 1257-1265.
- Debierre-Grockiego, F.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Dubremetz, J.-F.; Geyer, H.; Geyer, R.; Weingart, R.; Schmidt, R. R. & Schwarz, R. T. (2003), Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages. *J Biol Chem* **278**(35), 32987-32993.
- Debierre-Grockiego, F.; Campos, M. A.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Bieker, U.; Resende, M. G.; Mansur, D. S.; Weingart, R.; Schmidt, R. R.; Golenbock, D. T.; Gazzinelli, R. T. & Schwarz, R. T. (2007), Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **179**(2), 1129-1137.

- Decoster, A.; Gontier, P.; Dehecq, E.; Demory, J. L. & Duhamel, M. (1995), Detection of anti-toxoplasma immunoglobulin A antibodies by Platelia-Toxo IgA directed against P30 and by IMx Toxo IgA for diagnosis of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbio* **133**(8), 2206-2208.
- Demar, M.; Ajzenberg, D.; Maubon, D.; Djossou, F.; Panchoe, D.; Punwasi, W.; Valery, N.; Peneau, C.; Daigre, J.-L.; Aznar, C.; Cottrelle, B.; Terzan, L.; Dardé, M.-L. & Carne, B. (2007), Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis* **45**(7), e88-e95.
- Demar, M.; Ajzenberg, D.; Serrurier, B.; Dardé, M. L. & Carne, B. (2008), Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* **78**(2), 195-197.
- Demengeot, J.; Zelenay, S.; Moraes-Fontes, M. F.; Caramalho, I. & Coutinho, A. (2006), Regulatory T cells in microbial infection. *Springer Semin Immunopatho* **128**(1), 41-50.
- Denkers, E. Y.; Butcher, B. A.; Rio, L. D. & Bennouna, S. (2004), Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* **34**(3), 411-421.
- Denkers, E. Y.; Caspar, P.; Hieny, S. & Sher, A. (1996), *Toxoplasma gondii* infection induces specific nonresponsiveness in lymphocytes bearing the V beta 5 chain of the mouse T cell receptor. *J Immuno* **1156**(3), 1089-1094.
- Denkers, E. Y. & Gazzinelli, R. T. (1998), Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* **11**(4), 569-588.
- Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Caspar, P. & Sher, A. (1993a), Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* **150**(2), 517-526.
- Denkers, E. Y.; Kim, L. & Butcher, B. A. (2003), In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Microbiol* **5**(2), 75-83.
- Denkers, E. Y.; Sher, A. & Gazzinelli, R. T. (1993b), CD8<sup>+</sup> T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. *Res Immunol* **144**(1), 51-57.
- Desmonts, G. (1986), [Immunity and toxoplasmosis in pregnant women in France], *Arch Fr Pediatr* **43**(5), 367.
- Desmonts, G. & Couvreur, J. (1974), Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* **50**(2), 146-159.
- Desmonts, G. & Couvreur, J. (1965), Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection. *Rev Fr Etud Clin Biol* **10**(9), 952-958.
- Dimier, I. H. & Bout, D. T. (1998), Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit

*Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology* **94**(4), 488-495.

Divekar, A. A.; Dubey, S.; Gangalum, P. R. & Singh, R. R. (2011), Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. *J Immunol* **186**(2), 924-930.

Dubey, J. P. (2008), The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* **55**(6), 467-475.

Dubey, J. P. (2003), Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals, *Korean J Parasitol.* **41**(1), 1-16.

Dubey, J. P. (1985), Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. *Am J Vet Res* **46**(8), 1753-1754.

Dubey, J. P.; Lindsay, D. S.; Saville, W. J.; Reed, S. M.; Granstrom, D. E. & Speer, C. A. (2001), A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol* **95**(2-4), 89-131.

Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. & Speer, C. A. (1998), Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **11**(2), 267-299.

Dubey, J. P.; Miller, N. L. & Frenkel, J. K. (1970), *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* **157**(11), 1767-1770.

Dubey, J. P.; Pas, A.; Rajendran, C.; Kwok, O. C. H.; Ferreira, L. R.; Martins, J.; Hebel, C.; Hammer, S. & Su, C. (2010), Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet Parasitol* **172**(3-4), 195-203.

Dubey, J. P.; Schares, G. & Ortega-Mora, L. M. (2007), Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* **20**(2), 323-367.

Dubey, J. P. & Sharma, S. P. (1980), Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* **166**(1), 111-114.

Dubey, J. P.; Speer, C. A.; Shen, S. K.; Kwok, O. C. & Blixt, J. A. (1997), Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* **183**(5), 870-882.

Dubey, J. P.; Sundar, N.; Hill, D.; Velmurugan, G. V.; Bandini, L. A.; Kwok, O. C. H.; Majumdar, D. & Su, C. (2008), High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol* **38**(8-9), 999-1006.

Dubey, J. P. & Thulliez, P. (1993), Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res* **54**(2), 270-273.

Dubey, J. P.; Urban, J. F. & Davis, S. W. (1991), Protective immunity to toxoplasmosis in

pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res* **52**(8), 1316-1319.

Dumètre, A. & Dardé, M. L. (2003), How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?, *FEMS Microbiol Rev* **27**(5), 651-661.

Dunay, I. R.; Fuchs, A. & Sibley, L. D. (2010), Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* **78**(4), 1564-1570.

Dunay, I. R. & Sibley, L. D. (2010), Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol* **22**(4), 461-466.

Dupouy-Camet, J.; Bougnoux, M. E.; de Souza, S. L.; Thulliez, P.; Dommergues, M.; Mandelbrot, L.; Ancelle, T.; Tourte-Schaefer, C. & Benarous, R. (1992), Comparative value of polymerase chain reaction and conventional biological tests for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis, *Annales de Biologie Clinique* **50**(5), 315-319.

Dwyer, K. M.; Deaglio, S.; Gao, W.; Friedman, D.; Strom, T. B. & Robson, S. C. (2007), CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signa* **13**(1-2), 171-180.

Ebinuma, H.; Nakamoto, N.; Li, Y.; Price, D. A.; Gostick, E.; Levine, B. L.; Tobias, J.; Kwok, W. W. & Chang, K.-M. (2008), Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* **82**(10), 5043-5053.

Egan, C. E.; Sukhumavasi, W.; Butcher, B. A. & Denkers, E. Y. (2009), Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* **156**(1), 17-24.

Elbez-Rubinstein, A.; Ajzenberg, D.; Dardé, M.-L.; Cohen, R.; Dumètre, A.; Yera, H.; Gondon, E.; Janaud, J.-C. & Thulliez, P. (2009), Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis* **199**(2), 280-285.

Elliott, D. E.; Li, J.; Blum, A.; Metwali, A.; Qadir, K.; Urban, J. F. & Weinstock, J. V. (2003), Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(3), G385-G391.

Ermann, J.; Hoffmann, P.; Edinger, M.; Dutt, S.; Blankenberg, F. G.; Higgins, J. P.; Negrin, R. S.; Fathman, C. G. & Strober, S. (2005), Only the CD62L<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* **105**(5), 2220-2226.

Erridge, C.; Duncan, S. H.; Bereswill, S. & Heimesaat, M. M. (2010), The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5. *PLoS One* **5**(2), e9125.

Ertelt, J. M.; Rowe, J. H.; Johanns, T. M.; Lai, J. C.; McLachlan, J. B. & Way, S. S. (2009), Selective priming and expansion of antigen-specific Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **182**(5), 3032-3038.

- Eyles, D. E. & Coleman, N. (1953), The relative activity of the common sulfonamides against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Am J Trop Med Hyg* **2**(1), 54-63.
- Falush, D.; Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2003), Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics***164**(4), 1567-1587.
- Fantini, M. C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P. R. & Neurath, M. F. (2004), Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* **172**(9), 5149-5153.
- Faria, A. M. C. & Weiner, H. L. (2005), Oral tolerance. *Immunol Rev* **206**, 232-259.
- Fekkar, A.; Ajzenberg, D.; Bodaghi, B.; Touafek, F.; Hoang, P. L.; Delmas, J.; Robert, P. Y.; Dardé, M. L.; Mazier, D. & Paris, L. (2011), Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J Clin Microbiol.* **49**, 1513-1517.
- Fentress, S. J.; Behnke, M. S.; Dunay, I. R.; Mashayekhi, M.; Rommereim, L. M.; Fox, B. A.; Bzik, D. J.; Taylor, G. A.; Turk, B. E.; Lichti, C. F.; Townsend, R. R.; Qiu, W.; Hui, R.; Beatty, W. L. & Sibley, L. D. (2010), Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* **8** (6), 484-495.
- Feuerer, M.; Hill, J. A.; Mathis, D. & Benoist, C. (2009), Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* **10**(7), 689-695.
- Fontenot, J. D.; Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2003), Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**(4), 330-336.
- Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2005), A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**(11), 1142-1151.
- Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Williams, L. M.; Dooley, J. L.; Farr, A. G. & Rudensky, A. Y. (2005a), Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**(3), 329-341.
- Fourcade, J.; Sun, Z.; Kudela, P.; Janjic, B.; Kirkwood, J. M.; El-Hafnawy, T. & Zarour, H. M. (2010), Human tumor antigen-specific helper and regulatory T cells share common epitope specificity but exhibit distinct T cell repertoire. *J Immunol* **184**(12), 6709-6718.
- Fourmaux, M. N.; Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Biderre, C.; Briche, I.; Loyens, A.; Odberg-Ferragut, C.; Camus, D. & Dubremetz, J. F. (1996), The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol Biochem Parasitol* **83**(2), 201-210.
- Fourmaux, M. N.; Garcia-Réguet, N.; Mercereau-Puijalon, O. & Dubremetz, J. F. (1996a), *Toxoplasma gondii* microneme proteins: gene cloning and possible function. *Curr Top Microbiol Immunol* **219**, 55-58.

- Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2010), Avirulent uracil auxotrophs based on disruption of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase elicit protective immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **78**(9), 3744-3752.
- Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2002), De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **415**(6874), 926-929.
- Frenkel, J. K. (1973), *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* **23**, 343-352.
- Frenkel, J. K. & Dubey, J. P. (2000), The taxonomic importance of obligate heteroxeny: distinction of *Hammondia hammondi* from *Toxoplasma gondii*—another opinion. *Parasitol Res* **86**(10), 783-786.
- Frenkel, J. K.; Dubey, J. P. & Miller, N. L. (1969), *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science* **164**(878), 432-433.
- Freyre, A.; Choromanski, L.; Fishback, J. & Popiel, I. (1993), 'Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*, *J Parasitol* **79**, 716-719.
- Fricker-Hidalgo, H.; Pelloux, H.; Racinet, C.; Grefenstette, I.; Bost-Bru, C.; Goullier-Fleuret, A. & Ambroise-Thomas, P. (1998), Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. *Placenta* **19**(7), 545-549.
- Fu, S.; Yopp, A. C.; Mao, X.; Chen, D.; Zhang, N.; Chen, D.; Mao, M.; Ding, Y. & Bromberg, J. S. (2004), CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62<sup>+</sup> T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant* **4**(1), 65-78.
- Fuentes, I.; Rubio, J. M.; Ramírez, C. & Alvar, J. (2001), Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* **39**(4), 1566-1570.
- Furtado, G. C.; Curotto de Lafaille, M. A.; Kutchukhidze, N. & Lafaille, J. J. (2002), Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* **196**(6), 851-857.
- Gandhi, R.; Farez, M. F.; Wang, Y.; Kozoriz, D.; Quintana, F. J. & Weiner, H. L. (2010), Cutting edge: human latency-associated peptide<sup>+</sup> T cells: a novel regulatory T cell subset. *J Immunol* **184**(9), 4620-4624.
- Garcia-Réguet, N.; Lebrun, M.; Fourmaux, M. N.; Mercereau-Puijalon, O.; Mann, T.; Beckers, C. J.; Samyn, B.; Beeumen, J. V.; Bout, D. & Dubremetz, J. F. (2000), The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* **2**(4), 353-364.
- Garín, M. I.; Chu, C.-C.; Golshayan, D.; Cernuda-Morollón, E.; Wait, R. & Lechler, R. I. (2007), Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Blood* **109**(5), 2058-2065.

Gavrilescu, L. C. & Denkers, E. Y. (2001), IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* **167**(2), 902-909.

Gazzinelli, R. T.; Hakim, F. T.; Hieny, S.; Shearer, G. M. & Sher, A. (1991), Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* **146**(1), 286-292.

Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Wynn, T. A.; Wolf, S. & Sher, A. (1993), Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 6115-6119.

Gazzinelli, R. T.; Oswald, I. P.; James, S. L. & Sher, A. (1992), IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* **148**(6), 1792-1796.

Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, W.; Trinchieri, G. & Sher, A. (1996), 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* **157**(2), 798-805.

Ge, Y. Y.; Zhang, L.; Zhang, G.; Wu, J. P.; Tan, M. J.; Hu, E.; Liang, Y. J. & Wang, Y. (2008), In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+ -regulatory T cells. *Parasite Immunol* **30**(9), 471-481.

Gershon, R. K.; Cohen, P.; Hencin, R. & Liebhaber, S. A. (1972), Suppressor T cells. *J Immunol* **108**(3), 586-590.

Ghoreishi, M.; Bach, P.; Obst, J.; Komba, M.; Fleet, J. C. & Dutz, J. P. (2009), Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin d analog calcipotriol. *J Immunol* **182**(10), 6071-6078.

Gigley, J. P.; Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2009a), Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *J Immunol* **182**(2), 1069-1078.

Gigley, J. P.; Fox, B. A. & Bzik, D. J. (2009), Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. *Infect Immun* **77**(12), 5380-5388.

Glasner, P. D.; Silveira, C.; Kruszon-Moran, D.; Martins, M. C.; Júnior, M. B.; Silveira, S.; Camargo, M. E.; Nussenblatt, R. B.; Kaslow, R. A. & Júnior, R. B. (1992), An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* **114**(2), 136-144.

de Godoi, F. S. L.; Nishi, S. M.; de Jesus Pena, H. F. & Gennari, S. M. (2010), *Toxoplasma gondii*: diagnosis of experimental and natural infection in pigeons (*Columba livia*) by

serological, biological and molecular techniques. *Rev Bras Parasitol Vet***19**(4), 238-243.

Gomez-Escobar, N.; Gregory, W. F. & Maizels, R. M. (2000), Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect Immun***68**(11), 6402-6410.

Gondek, D. C.; Lu, L.-F.; Quezada, S. A.; Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. (2005), Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol***174**(4), 1783-1786.

Grainger, J. R.; Hall, J. A.; Bouladoux, N.; Oldenhove, G. & Belkaid, Y. (2010), Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T-cell fate. *Immunol Rev***234**(1), 305-316.

Grohmann, U.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Calcinaro, F.; Falorni, A.; Candeloro, P.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Fioretti, M. C. & Puccetti, P. (2002), CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol***3**(11), 1097-1101.

Gross, U.; Kempf, M. C.; Seeber, F.; Lüder, C. G.; Lugert, R. & Bohne, W. (1997), Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite?, *Behring Inst Mitt*(99), 97-106.

Grossman, W. J.; Verbsky, J. W.; Tollefsen, B. L.; Kemper, C.; Atkinson, J. P. & Ley, T. J. (2004), Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood***104**(9), 2840-2848.

Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. (1997a), A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**(6652), 737-742.

Groux, H.; Sornasse, T.; Cottrez, F.; de Vries, J. E.; Coffman, R. L.; Roncarolo, M. G. & Yssel, H. (1997), Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* **158**(12), 5627-5631.

Guan, H.; Moretto, M.; Bzik, D. J.; Gigley, J. & Khan, I. A. (2007), NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J Immunol***179**(1), 590-596.

Guiton, R.; Vasseur, V.; Charron, S.; Arias, M. T.; Langendonck, N. V.; Buzoni-Gatel, D.; Ryffel, B. & Dimier-Poisson, I. (2010), Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis***202**(3), 427-435.

Guo, Z.; Jang, M. H.; Otani, K.; Bai, Z.; Umemoto, E.; Matsumoto, M.; Nishiyama, M.; Yamasaki, M.; Ueha, S.; Matsushima, K.; Hirata, T. & Miyasaka, M. (2008), CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int Immunol***20**(3), 307-315.

Hajj, H. E.; Lebrun, M.; Arold, S. T.; Vial, H.; Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2007), ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **3**(2), e14.

Hakim, F. T.; Gazzinelli, R. T.; Denkers, E.; Hieny, S.; Shearer, G. M. & Sher, A. (1991), CD8<sup>+</sup> T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J Immunol***147**(7), 2310-2316.

Han, Y.; Guo, Q.; Zhang, M.; Chen, Z. & Cao, X. (2009), CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol***182**(1), 111-120.

Héchar, C.; Grépinet, O. & Rodolakis, A. (2004), Molecular cloning of the Chlamydomonas abortus groEL gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J Med Microbiol* **53**(Pt 9), 861-868.

Heimesaat, M. M.; Bereswill, S.; Fischer, A.; Fuchs, D.; Struck, D.; Niebergall, J.; Jahn, H.-K.; Dunay, I. R.; Moter, A.; Gescher, D. M.; Schumann, R. R.; Göbel, U. B. & Liesenfeld, O. (2006), Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol***177**(12), 8785-8795.

Heimesaat, M. M.; Fischer, A.; Jahn, H.-K.; Niebergall, J.; Freudenberg, M.; Blaut, M.; Liesenfeld, O.; Schumann, R. R.; Göbel, U. B. & Bereswill, S. (2007a), Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal Escherichia coli. *Gut***56**(7), 941-948.

Heimesaat, M. M.; Fischer, A.; Siegmund, B.; Kupz, A.; Niebergall, J.; Fuchs, D.; Jahn, H.-K.; Freudenberg, M.; Loddenkemper, C.; Batra, A.; Lehr, H.-A.; Liesenfeld, O.; Blaut, M.; Göbel, U. B.; Schumann, R. R. & Bereswill, S. (2007), Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One***2**(7), e662.

Henriquez, S. A.; Brett, R.; Alexander, J.; Pratt, J. & Roberts, C. W. (2009), Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation***16**(2), 122-133.

Hesse, M.; Piccirillo, C. A.; Belkaid, Y.; Prufer, J.; Mentink-Kane, M.; Leusink, M.; Cheever, A. W.; Shevach, E. M. & Wynn, T. A. (2004), The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol***172**(5), 3157-3166.

Hill, D. & Dubey, J. P. (2002), *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect***8**(10), 634-640.

Hirota, K.; Yoshitomi, H.; Hashimoto, M.; Maeda, S.; Teradaira, S.; Sugimoto, N.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ito, H.; Nakamura, T.; Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. (2007), Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med***204**(12), 2803-2812.

Hisaeda, H.; Hamano, S.; Mitoma-Obata, C.; Tetsutani, K.; Imai, T.; Waldmann, H.; Himeno, K. & Yasutomo, K. (2005), Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during Plasmodium yoelii infection. *Eur J Immunol***35**(12), 3516-3524.

- Hisaeda, H.; Maekawa, Y.; Iwakawa, D.; Okada, H.; Himeno, K.; Kishihara, K.; Ichi Tsukumo, S. & Yasutomo, K. (2004), Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med***10**(1), 29-30.
- Hisaeda, H.; Sakai, T.; Maekawa, Y.; Ishikawa, H.; Yasutomo, K. & Himeno, K. (1996), Mechanisms of HSP65 expression induced by gamma delta T cells in murine *Toxoplasma gondii* infection. *Pathobiology***64**(4), 198-203.
- Hitziger, N.; Dellacasa, I.; Albiger, B. & Barragan, A. (2005), 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***7**(6), 837-848.
- Hori, S. (2011), Regulatory T cell plasticity: beyond the controversies. *Trends Immunol***32**(7), 295-300.
- Hori, S. (2010), Developmental plasticity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr Opin Immunol***22**(5), 575-582.
- Hori, S.; Haury, M.; Coutinho, A. & Demengeot, J. (2002), Specificity requirements for selection and effector functions of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**(12), 8213-8218.
- Hori, S.; Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2003), Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol***81**, 331-371.
- Hougardy, J. M.; Place, S.; Hildebrand, M.; Drowart, A.; Debie, A.-S.; Loch, C. & Mascart, F. (2007), Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **176**(4), 409-416.
- Howe, D. K.; Honoré, S.; Derouin, F. & Sibley, L. D. (1997), Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol***35**(6), 1411-1414.
- Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995), *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis***172**(6), 1561-1566.
- Huehn, J. & Hamann, A. (2005), Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol***26**(12), 632-636.
- Huehn, J.; Siegmund, K. & Hamann, A. (2005), Migration rules: functional properties of naive and effector/memory-like regulatory T cell subsets. *Curr Top Microbiol Immunol***293**, 89-114.
- Huehn, J.; Siegmund, K.; Lehmann, J. C. U.; Siewert, C.; Haubold, U.; Feuerer, M.; Debes, G. F.; Lauber, J.; Frey, O.; Przybylski, G. K.; Niesner, U.; de la Rosa, M.; Schmidt, C. A.; Bräuer, R.; Buer, J.; Scheffold, A. & Hamann, A. (2004), Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med***199**(3), 303-313.

Hutchison, W. M. (1965), Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature***206**(987), 961-962.

Héchar, C.; Grépinet, O. & Rodolakis, A. (2004), Molecular cloning of the Chlamydophila abortus groEL gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *J Med Microbiol***53**(Pt 9), 861-868.

Iellem, A.; Colantonio, L. & D'Ambrosio, D. (2003), Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur J Immunol***33**(6), 1488-1496.

Innes, E. A. (2010), A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health***57**(1), 1-7.

Innes, E. A. & Vermeulen, A. N. (2006), Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites Eimeria, Toxoplasma and Neospora. *Parasitology***133 Suppl**, S145-S168.

Ismael, A. B.; Dimier-Poisson, I.; Lebrun, M.; Dubremetz, J.-F.; Bout, D. & Mevelec, M.-N. (2006), Mic1-3 knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *J Infect Dis***194**(8), 1176-1183.

Jang, M.-H.; Seth, N. P. & Wucherpfennig, K. W. (2003), Ex vivo analysis of thymic CD4 T cells in nonobese diabetic mice with tetramers generated from I-A(g7)/class II-associated invariant chain peptide precursors. *J Immunol***171**(8), 4175-4186.

Jankovic, D.; Kullberg, M. C.; Feng, C. G.; Goldszmid, R. S.; Collazo, C. M.; Wilson, M.; Wynn, T. A.; Kamanaka, M.; Flavell, R. A. & Sher, A. (2007), Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med***204**(2), 273-283.

Jaron, B.; Maranghi, E.; Leclerc, C. & Majlessi, L. (2008), Effect of attenuation of Treg during BCG immunization on anti-mycobacterial Th1 responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One***3**(7), e2833.

Johanns, T. M.; Ertelt, J. M.; Rowe, J. H. & Way, S. S. (2010), Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent Salmonella infection. *PLoS Pathog***6**(8).

Johnson, L. L. & Sayles, P. C. (2002), Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun***70**(1), 185-191.

Joly, E. & Hudrisier, D. (2003), What is trogocytosis and what is its purpose?, *Nat Immunol***4**(9), 815.

Jongert, E.; Roberts, C. W.; Gargano, N.; Förster-Waldl, E.; Förster-Wald, E. & Petersen, E. (2009), Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz***104**(2), 252-266.

Jordan, K. A. & Hunter, C. A. (2010), Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol***126**(3), 318-325.

Jordan, K. A.; Wilson, E. H.; Tait, E. D.; Fox, B. A.; Roos, D. S.; Bzik, D. J.; Dzierszinski, F. & Hunter, C. A. (2009), Kinetics and phenotype of vaccine-induced CD8+ T-cell responses to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun***77**(9), 3894-3901.

Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. (2009), Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity***30**(5), 616-625.

Kandulski, A.; Wex, T.; Kuester, D.; Peitz, U.; Gebert, I.; Roessner, A. & Malfertheiner, P. (2008), Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter***13**(4), 295-303.

Kang, H.; Remington, J. S. & Suzuki, Y. (2000), 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**(5), 2629-2634.

Kang, J.; Huddleston, S. J.; Fraser, J. M. & Khoruts, A. (2008), De novo induction of antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J Leukoc Biol***83**(5), 1230-1239.

Kapp, J. A. & Bucy, R. P. (2008), CD8+ suppressor T cells resurrected. *Hum Immunol***69**(11), 715-720.

Kasper, L. H. & Khan, I. A. (1998), Antigen-specific CD8+ T cells protect against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect Immun***66**(4), 1554-1560.

Kastenmuller, W.; Gasteiger, G.; Subramanian, N.; Sparwasser, T.; Busch, D. H.; Belkaid, Y.; Drexler, I. & Germain, R. N. (2011), Regulatory T cells selectively control CD8+ T cell effector pool size via IL-2 restriction. *J Immunol***187**(6), 3186-3197.

Kelly, M. N.; Kolls, J. K.; Happel, K.; Schwartzman, J. D.; Schwarzenberger, P.; Combe, C.; Moretto, M. & Khan, I. A. (2005), Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun***73**(1), 617-621.

Khan, A.; Böhme, U.; Kelly, K. A.; Adlem, E.; Brooks, K.; Simmonds, M.; Mungall, K.; Quail, M. A.; Arrowsmith, C.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Collins, M.; Fosker, N.; Fraser, A.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Murphy, L.; O'Neil, S.; Rajandream, M.-A.; Saunders, D.; Seeger, K.; Whitehead, S.; Mayr, T.; Xuan, X.; Watanabe, J.; Suzuki, Y.; Wakaguri, H.; Sugano, S.; Sugimoto, C.; Paulsen, I.; Mackey, A. J.; Roos, D. S.; Hall, N.; Berriman, M.; Barrell, B.; Sibley, L. D. & Ajioka, J. W. (2006), Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res***16**(9), 1119-1125.

Khan, A.; Fux, B.; Su, C.; Dubey, J. P.; Darde, M. L.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B. M. & Sibley, L. D. (2007), Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A***104**(37), 14872-14877.

Khan, A.; Su, C.; German, M.; Storch, G. A.; Clifford, D. B. & Sibley, L. D. (2005),

- Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol***43**(12), 5881-5887.
- Khan, I. A.; Ely, K. H. & Kasper, L. H. (1994), Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol***152**(4), 1856-1860.
- Khan, I. A.; Green, W. R.; Kasper, L. H.; Green, K. A. & Schwartzman, J. D. (1999), Immune CD8+ T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompromised host, *Infect Immun***67**, 5869-5876.
- Khan, I. A.; Matsuura, T. & Kasper, L. H. (1996), Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol***8**(6), 887-896.
- Khan, I. A.; Murphy, P. M.; Casciotti, L.; Schwartzman, J. D.; Collins, J.; Gao, J. L. & Yeaman, G. R. (2001), Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol***166**(3), 1930-1937.
- Khan, I. A.; Schwartzman, J. D.; Matsuura, T. & Kasper, L. H. (1997), A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A***94**(25), 13955-13960.
- Khan, I. A.; Thomas, S. Y.; Moretto, M. M.; Lee, F. S.; Islam, S. A.; Combe, C.; Schwartzman, J. D. & Luster, A. D. (2006a), CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog***2**(6), e49.
- Khattari, R.; Cox, T.; Yasayko, S.-A. & Ramsdell, F. (2003), An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol***4**(4), 337-342.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008), Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol***38**(12), 1359-1370.
- Kim, J. M.; Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. (2007), Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol***8**(2), 191-197.
- Kim, L.; Butcher, B. A.; Lee, C. W.; Uematsu, S.; Akira, S. & Denkers, E. Y. (2006), *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol***177**(4), 2584-2591.
- Kinter, A. L.; Hennessey, M.; Bell, A.; Kern, S.; Lin, Y.; Daucher, M.; Planta, M.; McGlaughlin, M.; Jackson, R.; Ziegler, S. F. & Fauci, A. S. (2004), CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med***200**(3), 331-343.
- Kobayashi, M.; Aosai, F.; Hata, H.; Mun, H. S.; Tagawa, Y.; Iwakura, Y. & Yano, A. (1999), *Toxoplasma gondii*: difference of invasion into tissue of digestive organs between susceptible and resistant strain and influence of IFN-gamma in mice inoculated with the cysts perorally. *J Parasitol***85**(5), 973-975.

Koch, M. A.; Tucker-Heard, G.; Perdue, N. R.; Killebrew, J. R.; Urdahl, K. B. & Campbell, D. J. (2009), The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol***10**(6), 595-602.

Kocks, J. R.; Davalos-Miszlitz, A. C. M.; Hintzen, G.; Ohl, L. & Förster, R. (2007), Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue. *J Exp Med***204**(4), 723-734.

Kohm, A. P.; McMahon, J. S.; Podojil, J. R.; Begolka, W. S.; DeGutes, M.; Kasprovicz, D. J.; Ziegler, S. F. & Miller, S. D. (2006), Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol***176**(6), 3301-3305.

Kohm, A. P.; Williams, J. S.; Bickford, A. L.; McMahon, J. S.; Chatenoud, L.; Bach, J.-F.; Bluestone, J. A. & Miller, S. D. (2005), Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol***174**(8), 4525-4534.

Kolls, J. K. & Lindén, A. (2004), Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity***21**(4), 467-476.

Komatsu, N.; Mariotti-Ferrandiz, M. E.; Wang, Y.; Malissen, B.; Waldmann, H. & Hori, S. (2009), Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A***106**(6), 1903-1908.

Koo, L. & Young, L. H. (2006), Management of ocular toxoplasmosis, *Int Ophthalmol Clin.***46**(2), 183-193.

Koonpaew, S.; Shen, S.; Flowers, L. & Zhang, W. (2006), LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med***203**(1), 119-129.

Kotner, J. & Tarleton, R. (2007), Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun***75**(2), 861-869.

Kringel, H.; Dubey, J. P.; Beshah, E.; Hecker, R. & Urban, J. F. (2004), CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol***123**(1-2), 55-66.

Kubach, J.; Lutter, P.; Bopp, T.; Stoll, S.; Becker, C.; Huter, E.; Richter, C.; Weingarten, P.; Warger, T.; Knop, J.; Müllner, S.; Wijdenes, J.; Schild, H.; Schmitt, E. & Jonuleit, H. (2007), Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood***110**(5), 1550-1558.

Kullberg, M. C.; Jankovic, D.; Gorelick, P. L.; Caspar, P.; Letterio, J. J.; Cheever, A. W. & Sher, A. (2002), Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med***196**(4), 505-515.

Kursar, M.; Bonhagen, K.; Fensterle, J.; Köhler, A.; Hurwitz, R.; Kamradt, T.; Kaufmann, S.

- H. E. & Mittrücker, H.-W. (2002), Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrict memory CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Exp Med***196**(12), 1585-1592.
- Lahl, K.; Loddenkemper, C.; Drouin, C.; Freyer, J.; Arnason, J.; Eberl, G.; Hamann, A.; Wagner, H.; Huehn, J. & Sparwasser, T. (2007), Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med***204**(1), 57-63.
- Lambert, H. & Barragan, A. (2010), Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol***12**(3), 292-300.
- Lambert, H.; Hitziger, N.; Dellacasa, I.; Svensson, M. & Barragan, A. (2006), Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol***8**(10), 1611-1623.
- Lambert, H.; Vutova, P. P.; Adams, W. C.; Loré, K. & Barragan, A. (2009), The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun***77**(4), 1679-1688.
- Langermans, J. A.; der Hulst, M. E. V.; Nibbering, P. H.; Hiemstra, P. S.; Fransen, L. & Furth, R. V. (1992), IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol***148**(2), 568-574.
- Laurence, A.; Tato, C. M.; Davidson, T. S.; Kanno, Y.; Chen, Z.; Yao, Z.; Blank, R. B.; Meylan, F.; Siegel, R.; Hennighausen, L.; Shevach, E. M. & O'shea, J. J. (2007), Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity***26**(3), 371-381.
- Lebech, M.; Andersen, O.; Christensen, N. C.; Hertel, J.; Nielsen, H. E.; Peitersen, B.; Rechnitzer, C.; Larsen, S. O.; Nørgaard-Pedersen, B. & Petersen, E. (1999), Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. *Lancet***353**(9167), 1834-1837.
- Lee, I.; Wang, L.; Wells, A. D.; Dorf, M. E.; Ozkaynak, E. & Hancock, W. W. (2005), Recruitment of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med***201**(7), 1037-1044.
- Lehmann, J.; Huehn, J.; de la Rosa, M.; Maszyra, F.; Kretschmer, U.; Krenn, V.; Brunner, M.; Scheffold, A. & Hamann, A. (2002), Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**(20), 13031-13036.
- Lehmann, T.; Marcet, P. L.; Graham, D. H.; Dahl, E. R. & Dubey, J. P. (2006), Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**(30), 11423-11428.
- Lenschow, D. J.; Herold, K. C.; Rhee, L.; Patel, B.; Koons, A.; Qin, H. Y.; Fuchs, E.; Singh, B.; Thompson, C. B. & Bluestone, J. A. (1996), CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity***5**(3), 285-293.
- Li, M. O. & Flavell, R. A. (2008), Contextual regulation of inflammation: a duet by

transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity***28**(4), 468-476.

Li, S.; Gowans, E. J.; Chougnnet, C.; Plebanski, M. & Dittmer, U. (2008), Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol***82**(1), 21-30.

Liang, B.; Workman, C.; Lee, J.; Chew, C.; Dale, B. M.; Colonna, L.; Flores, M.; Li, N.; Schweighoffer, E.; Greenberg, S.; Tybulewicz, V.; Vignali, D.A. & Clynes, R. (2008), Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol***180**(9), 5916-5926.

Liang, S.; Alard, P.; Zhao, Y.; Parnell, S.; Clark, S. L. & Kosiewicz, M. M. (2005), Conversion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med***201**(1), 127-137.

Liang, S. C.; Tan, X.-Y.; Luxenberg, D. P.; Karim, R.; Dunussi-Joannopoulos, K.; Collins, M. & Fouser, L. A. (2006), Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med***203**(10), 2271-2279.

Liesenfeld, O.; Kang, H.; Park, D.; Nguyen, T. A.; Parkhe, C. V.; Watanabe, H.; Abo, T.; Sher, A.; Remington, J. S. & Suzuki, Y. (1999), TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol***21**(7), 365-376.

Liesenfeld, O.; Kosek, J.; Remington, J. S. & Suzuki, Y. (1996), Association of CD4<sup>+</sup> T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med***184**(2), 597-607.

Liesenfeld, O.; Kosek, J. C. & Suzuki, Y. (1997), Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun***65**(11), 4682-4689.

Liu, C.-H.; ting Fan, Y.; Dias, A.; Esper, L.; Corn, R. A.; Bafica, A.; Machado, F. S. & Aliberti, J. (2006), Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol***177**(1), 31-35.

Liu, Y.; Zhang, P.; Li, J.; Kulkarni, A. B.; Perruche, S. & Chen, W. (2008), A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol***9**(6), 632-640.

Lochner, M.; Peduto, L.; Cherrier, M.; Sawa, S.; Langa, F.; Varona, R.; Riethmacher, D.; Si-Tahar, M.; Santo, J. P. D. & Eberl, G. (2008), In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> and regulatory IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> RORgamma t<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med***205**(6), 1381-1393.

Long, S. A. & Buckner, J. H. (2008), Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>FOXP3<sup>(+)</sup> T cells. *J Autoimmun***30**(4), 293-302.

Long, T. T. A.; Nakazawa, S.; Onizuka, S.; Huaman, M. C. & Kanbara, H. (2003), Influence

of CD4+CD25+ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol***33**(2), 175-183.

Lundgren, A.; Suri-Payer, E.; Enarsson, K.; Svennerholm, A.-M. & Lundin, B. S. (2003), Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun***71**(4), 1755-1762.

Lühder, F.; Höglund, P.; Allison, J. P.; Benoist, C. & Mathis, D. (1998), Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med***187**(3), 427-432.

Lütjen, S.; Soltek, S.; Virna, S.; Deckert, M. & Schlüter, D. (2006), Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. *Infect Immun***74**(10), 5790-5801.

Mack, D. G. & McLeod, R. (1992), Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J Clin Invest***90**(6), 2585-2592.

Maizels, R. M. (2005), Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol***17**(6), 656-661.

Majlessi, L.; Lo-Man, R. & Leclerc, C. (2008), Regulatory B and T cells in infections. *Microbes Infect***10**(9), 1030-1035.

Malek, T. R. & Bayer, A. L. (2004), Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol***4**(9), 665-674.

Malek, T. R. & Castro, I. (2010), Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity***33**(2), 153-165.

Malek, T. R.; Porter, B. O.; Codias, E. K.; Scibelli, P. & Yu, A. (2000), Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *J Immunol***164**(6), 2905-2914.

Malek, T. R.; Yu, A.; Vincek, V.; Scibelli, P. & Kong, L. (2002), CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity***17**(2), 167-178.

Maloy, K. J.; Salaun, L.; Cahill, R.; Dougan, G.; Saunders, N. J. & Powrie, F. (2003), CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med***197**(1), 111-119.

Marson, A.; Kretschmer, K.; Frampton, G. M.; Jacobsen, E. S.; Polansky, J. K.; MacIsaac, K. D.; Levine, S. S.; Fraenkel, E.; von Boehmer, H. & Young, R. A. (2007), Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature***445**(7130), 931-935.

Martín, P.; Gómez, M.; Lamana, A.; Cruz-Adalia, A.; Ramírez-Huesca, M.; Ursa, M. A.; Yáñez-Mo, M. & Sánchez-Madrid, F. (2010), CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Mol Cell Biol***30**(20), 4877-4889.

- Masteller, E. L.; Tang, Q. & Bluestone, J. A. (2006), Antigen-specific regulatory T cells—ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol***18**(2), 103-110.
- Matsushima, H. & Takashima, A. (2010), Bidirectional homing of Tregs between the skin and lymph nodes. *J Clin Invest***120**(3), 653-656.
- Matsushita, N.; Pilon-Thomas, S. A.; Martin, L. M. & Riker, A. I. (2008), Comparative methodologies of regulatory T cell depletion in a murine melanoma model. *J Immunol Methods***333**(1-2), 167-179.
- Mayer, C. T.; Floess, S.; Baru, A. M.; Lahl, K.; Huehn, J. & Sparwasser, T. (2011), CD8(+) Foxp3(+) T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *Eur J Immunol***41**(3), 716-725.
- McColgan, C.; Buxton, D. & Blewett, D. A. (1988), Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy, *Vet Rec***123**(18), 467-470.
- McLeod, R.; Estes, R. G.; Mack, D. G. & Cohen, H. (1984), Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J Infect Dis***149**(2), 234-244.
- McLeod, R.; Frenkel, J. K.; Estes, R. G.; Mack, D. G.; Eisenhauer, P. B. & Gibori, G. (1988), Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol***140**(5), 1632-1637.
- McNally, A.; Hill, G. R.; Sparwasser, T.; Thomas, R. & Steptoe, R. J. (2011), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control CD8<sup>+</sup> T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**(18), 7529-7534.
- McSorley, H. J.; Harcus, Y. M.; Murray, J.; Taylor, M. D. & Maizels, R. M. (2008), Expansion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J Immunol***181**(9), 6456-6466.
- Meissner, M.; Reiss, M.; Viebig, N.; Carruthers, V. B.; Toursel, C.; Tomavo, S.; Ajioka, J. W. & Soldati, D. (2002), A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci***115**(Pt 3), 563-574.
- Mendez, S.; Reckling, S. K.; Piccirillo, C. A.; Sacks, D. & Belkaid, Y. (2004), Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med***200**(2), 201-210.
- Mennechet, F. J. D.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Li, W.; Vandewalle, A. & Buzoni-Gatel, D. (2002), Lamina propria CD4<sup>+</sup> T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol***168**(6), 2988-2996.

- Menning, A.; Höpken, U. E.; Siegmund, K.; Lipp, M.; Hamann, A. & Huehn, J. (2007), Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur J Immunol***37**(6), 1575-1583.
- Mercier, A.; Devillard, S.; Ngoubangoye, B.; Bonnabau, H.; Bañuls, A. L.; Durand, P.; Salle, B.; Ajzenberg, D. & Dardé, M. L. (2010), Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon, *PLoS Negl Trop Dis*.**4**(11), e876.
- Mets, M. B. & Chhabra, M. S. (2008), Eye manifestations of intrauterine infections and their impact on childhood blindness. *Surv Ophthalmol***53**(2), 95-111.
- Miller, M. A.; Grigg, M. E.; Kreuder, C.; James, E. R.; Melli, A. C.; Crosbie, P. R.; Jessup, D. A.; Boothroyd, J. C.; Brownstein, D. & Conrad, P. A. (2004), An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol***34**(3), 275-284.
- Minigo, G.; Woodberry, T.; Piera, K. A.; Salwati, E.; Tjitra, E.; Kenangalem, E.; Price, R. N.; Engwerda, C. R.; Anstey, N. M. & Plebanski, M. (2009), Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog***5**(4), e1000402.
- Mizui, M. & Kikutani, H. (2008), Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells?, *Immunity***28**(3), 302-303.
- Moiré, N.; Dion, S.; Lebrun, M.; Dubremetz, J.-F. & Dimier-Poisson, I. (2009), Mic1-3KO tachyzoite a live attenuated vaccine candidate against toxoplasmosis derived from a type I strain shows features of type II strain. *Exp Parasitol***123**(2), 111-117.
- Mondragon, R.; Howe, D. K.; Dubey, J. P. & Sibley, L. D. (1998), Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J Parasitol***84**(3), 639-641.
- Moore, A. C.; Gallimore, A.; Draper, S. J.; Watkins, K. R.; Gilbert, S. C. & Hill, A. V. S. (2005), Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. *J Immunol***175**(11), 7264-7273.
- Morampudi, V.; Craeye, S. D.; Moine, A. L.; Detienne, S.; Braun, M. Y. & D'Souza, S. (2011), Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes Infect*.
- Mordue, D. G.; Monroy, F.; Regina, M. L.; Dinarello, C. A. & Sibley, L. D. (2001), Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol***167**(8), 4574-4584.
- Mordue, D. G. & Sibley, L. D. (2003), A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol***74**(6), 1015-1025.
- Mottet, C.; Uhlig, H. H. & Powrie, F. (2003), Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol***170**(8), 3939-3943.

Mucida, D.; Kutchukhidze, N.; Erazo, A.; Russo, M.; Lafaille, J. J. & Curotto de Lafaille, M. A. (2005), Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest***115**(7), 1923-1933.

Mévélec, M.-N.; Ducournau, C.; Ismael, A. B.; Olivier, M.; Sèche, E.; Lebrun, M.; Bout, D. & Dimier-Poisson, I. (2010), Mic1-3 Knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against T. gondii-induced abortion in sheep. *Vet Res***41**(4), 49.

Nguyen, T. D.; Bigaignon, G.; Markine-Goriaynoff, D.; Heremans, H.; Nguyen, T. N.; Warnier, G.; Delmee, M.; Warny, M.; Wolf, S. F.; Uyttenhove, C.; Snick, J. V. & Coutelier, J.-P. (2003), Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. *J Med Microbiol***52**(Pt 10), 869-876.

Nicolle, C. & Manceaux, L. (1909), Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences***148**, 369-372.

Nicolle, C. & Manceaux, L. (1908), Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences***147**, 763-766.

Nocentini, G. & Riccardi, C. (2009), GITR: a modulator of immune response and inflammation. *Adv Exp Med Biol***647**, 156-173.

Nurieva, R.; Yang, X. O.; Martinez, G.; Zhang, Y.; Panopoulos, A. D.; Ma, L.; Schluns, K.; Tian, Q.; Watowich, S. S.; Jetten, A. M. & Dong, C. (2007), Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature***448**(7152), 480-483.

Oderup, C.; Cederbom, L.; Makowska, A.; Cilio, C. M. & Ivars, F. (2006), Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology***118**(2), 240-249.

Ohkura, N. & Sakaguchi, S. (2010), Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol***32**(2), 95-106.

Okamura, T.; Fujio, K.; Shibuya, M.; Sumitomo, S.; Shoda, H.; Sakaguchi, S. & Yamamoto, K. (2009), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A***106**(33), 13974-13979.

Okwor, I.; Liu, D.; Beverley, S. M. & Uzonna, J. E. (2009), Inoculation of killed *Leishmania major* into immune mice rapidly disrupts immunity to a secondary challenge via IL-10-mediated process. *Proc Natl Acad Sci U S A***106**(33), 13951-13956.

Oldenhove, G.; Bouladoux, N.; Wohlfert, E. A.; Hall, J. A.; Chou, D.; Santos, L. D.; O'Brien, S.; Blank, R.; Lamb, E.; Natarajan, S.; Kastenmayer, R.; Hunter, C.; Grigg, M. E. & Belkaid, Y. (2009), Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity***31**(5), 772-786.

Ong, Y.-C.; Reese, M. L. & Boothroyd, J. C. (2010), Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J Biol Chem***285**(37),

28731-28740.

Onishi, Y.; Fehervari, Z.; Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. (2008), Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**(29), 10113-10118.

Onizuka, S.; Tawara, I.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.; Fujita, T. & Nakayama, E. (1999), Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res***59**(13), 3128-3133.

Ono, M.; Yaguchi, H.; Ohkura, N.; Kitabayashi, I.; Nagamura, Y.; Nomura, T.; Miyachi, Y.; Tsukada, T. & Sakaguchi, S. (2007), Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature***446**(7136), 685-689.

Orta, M.; Ordoqui, E.; Aranzábal, A.; Fernández, C.; Bartolomé, B. & Sanz, M. L. (2003), Anaphylactic reaction after artificial insemination. *Ann Allergy Asthma Immunol***90**(4), 446-451.

Owen, M. R. & Trees, A. J. (1999), Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep, *J Parasitol***85**(2), 382-384.

Pandiyan, P.; Zheng, L.; Ishihara, S.; Reed, J. & Lenardo, M. J. (2007), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol***8**(12), 1353-1362.

Papiernik, M.; de Moraes, M. L.; Pontoux, C.; Vasseur, F. & Pénit, C. (1998), Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol***10**(4), 371-378.

Paust, S. & Cantor, H. (2005), Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev***204**, 195-207.

Penarete-Vargas, D. M.; Mévélec, M. N.; Dion, S.; Sèche, E.; Dimier-Poisson, I. & Fandeur, T. (2010), Protection against lethal *Neospora caninum* infection in mice induced by heterologous vaccination with a mic1 mic3 knockout *Toxoplasma gondii* strain. *Infect Immun***78**(2), 651-660.

Pereira, L. E.; Villinger, F.; Onlamoon, N.; Bryan, P.; Cardona, A.; Pattanapanyasat, K.; Mori, K.; Hagen, S.; Picker, L. & Ansari, A. A. (2007), Simian immunodeficiency virus (SIV) infection influences the level and function of regulatory T cells in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J Virol***81**(9), 4445-4456.

Pfefferkorn, E. R. & Pfefferkorn, L. C. (1976), *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol***39**(3), 365-376.

Pinon, J. M.; Dumon, H.; Chemla, C.; Franck, J.; Petersen, E.; Lebech, M.; Zufferey, J.; Bessieres, M. H.; Marty, P.; Holliman, R.; Johnson, J.; Luyasu, V.; Lecolier, B.; Guy, E.; Joynson, D. H.; Decoster, A.; Enders, G.; Pelloux, H. & Candolfi, E. (2001), Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A

antibodies. *J Clin Microbiol***39**(6), 2267-2271.

Pomié, C.; Ménager-Marcq, I. & van Meerwijk, J. P. M. (2008), Murine CD8<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol***69**(11), 708-714.

Pujol, C. A.; Scolaro, L. A.; Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. & Damonte, E. B. (2006), Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. *Planta Med* **72**(2), 121-125.

Radstake, T. R. D. J.; van Bon, L.; Broen, J.; Wenink, M.; Santegoets, K.; Deng, Y.; Hussaini, A.; Simms, R.; Cruikshank, W. W. & Lafyatis, R. (2009), Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One***4**(6), e5981.

Rai, D.; Pham, N.-L. L.; Harty, J. T. & Badovinac, V. P. (2009), Tracking the total CD8 T cell response to infection reveals substantial discordance in magnitude and kinetics between inbred and outbred hosts. *J Immunol***183**(12), 7672-7681.

Read, S.; Greenwald, R.; Izcue, A.; Robinson, N.; Mandelbrot, D.; Francisco, L.; Sharpe, A. H. & Powrie, F. (2006), Blockade of CTLA-4 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol***177**(7), 4376-4383.

Read, S.; Malmström, V. & Powrie, F. (2000), Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med***192**(2), 295-302.

Reikvam, A. & Lorentzen-Styr, A. M. (1976), Virulence of different strains of *Toxoplasma gondii* and host response in mice, *Nature***261**(5560), 508-509.

Richomme, C.; Aubert, D.; Gilot-Fromont, E.; Ajzenberg, D.; Mercier, A.; Ducrot, C.; Ferté, H.; Delorme, D. & Villena, I. (2009), Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol***164**(2-4), 296-300.

Ring, S.; Thome, M.; Pretsch, L.; Enk, A. H. & Mahnke, K. (2007), Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. *J Immunol Methods***326**(1-2), 10-21.

Rio, L. D.; Bennouna, S.; Salinas, J. & Denkers, E. Y. (2001), CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol***167**(11), 6503-6509.

Robben, P. M.; LaRegina, M.; Kuziel, W. A. & Sibley, L. D. (2005), Recruitment of Gr-1<sup>+</sup> monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med***201**(11), 1761-1769.

Robben, P. M.; Mordue, D. G.; Truscott, S. M.; Takeda, K.; Akira, S. & Sibley, L. D. (2004), Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol***172**(6), 3686-3694.

Robert-Gangneux, F.; Commerce, V.; Tourte-Schaefer, C. & Dupouy-Camet, J. (1999),

Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-Toxoplasma antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis***18**(9), 648-654.

Roncarolo, M. G.; Gregori, S.; Battaglia, M.; Bacchetta, R.; Fleischhauer, K. & Levings, M. K. (2006), Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev***212**, 28-50.

Ronet, C.; Darche, S.; de Moraes, M. L.; Miyake, S.; Yamamura, T.; Louis, J. A.; Kasper, L. H. & Buzoni-Gatel, D. (2005), NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol***175**(2), 899-908.

Sabin, A. B. (1941), Toxoplasmic Encephalitis in children, *J. Am. Med. Assoc.***116**(9), 801-807.

Saeij, J. P. J.; Boyle, J. P.; Collier, S.; Taylor, S.; Sibley, L. D.; Brooke-Powell, E. T.; Ajioka, J. W. & Boothroyd, J. C. (2006), Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science***314**(5806), 1780-1783.

Saeij, J. P. J.; Collier, S.; Boyle, J. P.; Jerome, M. E.; White, M. W. & Boothroyd, J. C. (2007), Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature***445**(7125), 324-327.

Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. & Toda, M. (1995), Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol***155**(3), 1151-1164.

Sakaguchi, S.; Wing, K.; Onishi, Y.; Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. (2009), Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?, *Int Immunol***21**(10), 1105-1111.

Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T. & Ono, M. (2008), Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell***133**(5), 775-787.

Salomon, B.; Lenschow, D. J.; Rhee, L.; Ashourian, N.; Singh, B.; Sharpe, A. & Bluestone, J. A. (2000), B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity***12**(4), 431-440.

Sarris, M.; Andersen, K. G.; Randow, F.; Mayr, L. & Betz, A. G. (2008), Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity***28**(3), 402-413.

Sayles, P. C.; Gibson, G. W. & Johnson, L. L. (2000), B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun***68**(3), 1026-1033.

Scharton-Kersten, T.; Caspar, P.; Sher, A. & Denkers, E. Y. (1996), *Toxoplasma gondii*: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol***84**(2), 102-114.

Scharton-Kersten, T.; Contursi, C.; Masumi, A.; Sher, A. & Ozato, K. (1997), Interferon

consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med***186**(9), 1523-1534.

Scharton-Kersten, T. M.; Yap, G.; Magram, J. & Sher, A. (1997a), Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med***185**(7), 1261-1273.

Schneider, M. A.; Meingassner, J. G.; Lipp, M.; Moore, H. D. & Rot, A. (2007), CCR7 is required for the in vivo function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med***204**(4), 735-745.

Scholzen, A.; Minigo, G. & Plebanski, M. (2010), Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. *Trends Parasitol***26**(1), 16-25.

Scholzen, A.; Mittag, D.; Rogerson, S. J.; Cooke, B. M. & Plebanski, M. (2009), *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. *PLoS Pathog***5**(8), e1000543.

Scott, P. & Hunter, C. A. (2002), Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol***14**(4), 466-470.

Setoguchi, R.; Hori, S.; Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2005), Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med***201**(5), 723-735.

Sharma, R. & Ju, S.-T. (2010), Genetic control of the inflammatory T-cell response in regulatory T-cell deficient scurfy mice. *Clin Immunol***136**(2), 162-169.

Shevach, E. M. (2009), Mechanisms of foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity***30**(5), 636-645.

Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. & Sakaguchi, S. (2002), Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol***3**(2), 135-142.

Sibley, L. D. & Ajioka, J. W. (2008), Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol***62**, 329-351.

Sibley, L. D. & Boothroyd, J. C. (1992), Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature***359**(6390), 82-85.

Sibley, L. D.; LeBlanc, A. J.; Pfefferkorn, E. R. & Boothroyd, J. C. (1992), Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics***132**(4), 1003-1015.

Sibley, L. D.; Mordue, D. G.; Su, C.; Robben, P. M. & Howe, D. K. (2002), Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci***357**(1417), 81-88.

Siegmund, K.; Feuerer, M.; Siewert, C.; Ghani, S.; Haubold, U.; Dankof, A.; Krenn, V.; Schön, M. P.; Scheffold, A.; Lowe, J. B.; Hamann, A.; Syrbe, U. & Huehn, J. (2005), Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood***106**(9), 3097-3104.

Silva, N. M.; Rodrigues, C. V.; Santoro, M. M.; Reis, L. F. L.; Alvarez-Leite, J. I. & Gazzinelli, R. T. (2002), Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun***70**(2), 859-868.

Silveira, C.; Belfort, R. J.; Burnier, M. J. & Nussenblatt, R. (1988), Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families, *Am J Ophthalmol.***106**(3), 362-364.

Silveira, C.; Ferreira, R.; Muccioli, C.; Nussenblatt, R. & Belfort, R. (2003), Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am J Ophthalmol***136**(2), 370-371.

Smith, Y. R.; Hurd, W. W.; Menge, A. C.; Sanders, G. M.; Ansbacher, R. & Randolph, J. F. (1992), Allergic reactions to penicillin during in vitro fertilization and intrauterine insemination. *Fertil Steril***58**(4), 847-849.

Soete, M.; Fortier, B.; Camus, D. & Dubremetz, J. F. (1993), *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp Parasitol***76**(3), 259-264.

Sonenthal, K. R.; McKnight, T.; Shaughnessy, M. A.; Grammer, L. C. & Jeyendran, R. S. (1991), Anaphylaxis during intrauterine insemination secondary to bovine serum albumin. *Fertil Steril***56**(6), 1188-1191.

e Sousa, C. R.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Jankovic, D.; Charest, H.; Germain, R. N. & Sher, A. (1997), 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***186**(11), 1819-1829.

e Sousa, C. R.; Yap, G.; Schulz, O.; Rogers, N.; Schito, M.; Aliberti, J.; Hieny, S. & Sher, A. (1999), Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology, *Immunity***11**(5), 637-647.

Speer, C. A.; Clark, S. & Dubey, J. P. (1998), Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol***84**(3), 505-512.

Speer, C. A. & Dubey, J. P. (1998), Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology***116** ( Pt 1), 35-42.

Splendor, A. (1908), Un nuovo protozoa parassita de conigli,, *Revista da Sociedade Scientifica de Sao Paulo***3**, 109-112.

Stalheim, O. H.; Hubbert, W. T.; Boothe, A. D.; Zimmermann, W. J.; Hughes, D. E.; Barnett,

D.; Riley, J. L. & Foley, J. (1980), Experimental toxoplasmosis in calves and pregnant cows. *Am J Vet Res***41**(1), 10-13.

Steinfeldt, T.; Könen-Waisman, S.; Tong, L.; Pawlowski, N.; Lamkemeyer, T.; Sibley, L. D.; Hunn, J. P. & Howard, J. C. (2010), Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol***8**(12), e1000576.

Stieve, E.; Beckmen, K.; Kania, S. A.; Widner, A. & Patton, S. (2010), *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. *J Wildl Dis***46**(2), 348-355.

Stock, P.; Akbari, O.; Berry, G.; Freeman, G. J.; Dekruyff, R. H. & Umetsu, D. T. (2004), Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol***5**(11), 1149-1156.

Su, C.; Howe, D. K.; Dubey, J. P.; Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2002), Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**(16), 10753-10758.

Suffia, I.; Reckling, S. K.; Salay, G. & Belkaid, Y. (2005), A role for CD103 in the retention of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol***174**(9), 5444-5455.

Suffner, J.; Hochweller, K.; Kühnle, M.-C.; Li, X.; Kroczeck, R. A.; Garbi, N. & Hämmerling, G. J. (2010), Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in Foxp3<sup>+</sup>LuciDTR mice. *J Immunol***184**(4), 1810-1820.

Sun, C.-M.; Hall, J. A.; Blank, R. B.; Bouladoux, N.; Oukka, M.; Mora, J. R. & Belkaid, Y. (2007), Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med***204**(8), 1775-1785.

Suri-Payer, E. & Cantor, H. (2001), Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T cells. *J Autoimmun***16**(2), 115-123.

Suzuki, H.; Kündig, T. M.; Furlonger, C.; Wakeham, A.; Timms, E.; Matsuyama, T.; Schmits, R.; Simard, J. J.; Ohashi, P. S. & Griesser, H. (1995), Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science***268**(5216), 1472-1476.

Suzuki, Y.; Conley, F. K. & Remington, J. S. (1990), Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect Immun***58**(9), 3050-3055.

Suzuki, Y.; Kang, H.; Parmley, S.; Lim, S. & Park, D. (2000), Induction of tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon-gamma in genetically resistant BALB/c mice. *Microbes Infect***2**(5), 455-462.

Suzuki, Y.; Orellana, M. A.; Schreiber, R. D. & Remington, J. S. (1988), Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science***240**(4851), 516-518.

Suzuki, Y. & Remington, J. S. (1990), The effect of anti-IFN-gamma antibody on the

protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J Immunol***144**(5), 1954-1956.

Suzuki, Y. & Remington, J. S. (1988), Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. *J Immunol***140**(11), 3943-3946.

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

Szanya, V.; Ermann, J.; Taylor, C.; Holness, C. & Fathman, C. G. (2002), The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol***169**(5), 2461-2465.

Tadokoro, C. E.; Shakhar, G.; Shen, S.; Ding, Y.; Lino, A. C.; Maraver, A.; Lafaille, J. J. & Dustin, M. L. (2006), Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **203**(3), 505-511.

Taher, Y. A.; van Esch, B. C. A. M.; Hofman, G. A.; Henricks, P. A. J. & van Oosterhout, A. J. M. (2008), 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* **180**(8), 5211-5221.

Tai, X.; Cowan, M.; Feigenbaum, L. & Singer, A. (2005), CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol***6**(2), 152-162.

Tait, E. D.; Jordan, K. A.; Dupont, C. D.; Harris, T. H.; Gregg, B.; Wilson, E. H.; Pepper, M.; Dzierszynski, F.; Roos, D. S. & Hunter, C. A. (2010), Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *J Immunol***185**(3), 1502-1512.

Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M.; Shimizu, J. & Sakaguchi, S. (1998), Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**(12), 1969-1980.

Takahashi, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Uede, T.; Shimizu, J.; Sakaguchi, N.; Mak, T. W. & Sakaguchi, S. (2000), Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**(2), 303-310.

Tang, Q.; Adams, J. Y.; Tooley, A. J.; Bi, M.; Fife, B. T.; Serra, P.; Santamaria, P.; Locksley, R. M.; Krummel, M. F. & Bluestone, J. A. (2006), Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* **7**(1), 83-92.

Tang, Q.; Boden, E. K.; Henriksen, K. J.; Bour-Jordan, H.; Bi, M. & Bluestone, J. A. (2004), Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J*

*Immunol***34**(11), 2996-3005.

Tang, Q.; Henriksen, K. J.; Bi, M.; Finger, E. B.; Szot, G.; Ye, J.; Masteller, E. L.; McDevitt, H.; Bonyhadi, M. & Bluestone, J. A. (2004), In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**(11), 1455-1465.

Tassi, P. (2007), *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia* **49**(1-2), 7-15.

Taylor, M. D.; LeGoff, L.; Harris, A.; Malone, E.; Allen, J. E. & Maizels, R. M. (2005), Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* **174**(8), 4924-4933.

Taylor, S.; Barragan, A.; Su, C.; Fux, B.; Fentress, S. J.; Tang, K.; Beatty, W. L.; Hajj, H. E.; Jerome, M.; Behnke, M. S.; White, M.; Wootton, J. C. & Sibley, L. D. (2006), 'A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* **314**(5806), 1776-1780.

Tenorio, E. P.; Fernández, J.; Olguín, J. E. & Saavedra, R. (2011), Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*.

Tenorio, E. P.; Olguín, J. E.; Fernández, J.; Vieyra, P. & Saavedra, R. (2010), Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 786078.

Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. (2000), *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**(12-13), 1217-1258.

Thornton, A. M.; Korty, P. E.; Tran, D. Q.; Wohlfert, E. A.; Murray, P. E.; Belkaid, Y. & Shevach, E. M. (2010), Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* **184**(7), 3433-3441.

Thornton, A. M. & Shevach, E. M. (1998), CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med***188**(2), 287-296.

Tivol, E. A.; Borriello, F.; Schweitzer, A. N.; Lynch, W. P.; Bluestone, J. A. & Sharpe, A. H. (1995), Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity***3**(5), 541-547.

Trzonkowski, P.; Szaryska, M.; Myliwska, J. & Myliwski, A. (2009), Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A***75**(3), 175-188.

Vercoulen, Y.; Wehrens, E. J.; van Teijlingen, N. H.; de Jager, W.; Beekman, J. M. & Prakken, B. J. (2009), Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells. *PLoS One* **4**(9), e7183.

- Vignali, D. A. (2008), How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol***38**(4), 908-911.
- Vigário, A. M.; Gorgette, O.; Dujardin, H. C.; Cruz, T.; Cazenave, P.-A.; Six, A.; Bandeira, A. & Pied, S. (2007), Regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol***37**(8-9), 963-973.
- Villegas, E. N.; Lieberman, L. A.; Carding, S. R. & Hunter, C. A. (2002), Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon. *Infect Immun***70**(9), 4757-4761.
- Villena, I.; Aubert, D.; Brodard, V.; Quereux, C.; Leroux, B.; Dupouy, D.; Remy, G.; Foudrinier, F.; Chemla, C.; Gomez-Marin, J. E. & Pinon, J. M. (1999), Detection of Specific Immunoglobulin E during Maternal, Fetal, and Congenital Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **37**(11), 3487-3490.
- Volpe, E.; Servant, N.; Zollinger, R.; Bogiatzi, S. I.; Hupé, P.; Barillot, E. & Soumelis, V. (2008), A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* **9**(6), 650-657.
- Wallon, M.; Dunn, D.; Slimani, D.; Girault, V.; Gay-Andrieu, F. & Peyron, F. (1999), Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA?, *Eur J Pediatr***158**(8), 645-649.
- Wallon, M.; Kodjikian, L.; Binquet, C.; Garweg, J.; Fleury, J.; Quantin, C. & Peyron, F. (2004), Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* **113**(6), 1567-1572.
- Wallon, M.; Liou, C.; Garner, P. & Peyron, F. (1999a), Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* **318**(7197), 1511-1514.
- Walther, M.; Jeffries, D.; Finney, O. C.; Njie, M.; Ebonyi, A.; Deininger, S.; Lawrence, E.; Ngwa-Amambua, A.; Jayasooriya, S.; Cheeseman, I. H.; Gomez-Escobar, N.; Okebe, J.; Conway, D. J. & Riley, E. M. (2009), Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog***5**(4), e1000364.
- Walther, M.; Tongren, J. E.; Andrews, L.; Korbel, D.; King, E.; Fletcher, H.; Andersen, R. F.; Bejon, P.; Thompson, F.; Dunachie, S. J.; Edele, F.; de Souza, J. B.; Sinden, R. E.; Gilbert, S. C.; Riley, E. M. & Hill, A. V. S. (2005), Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* **23**(3), 287-296.
- Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. (2009), How diverse—CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* **1**(1), 20-36.
- Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. (2008), TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* **28**(6), 647-659.

Wang, R.; Wan, Q.; Kozhaya, L.; Fujii, H. & Unutmaz, D. (2008), Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One* **3**(7), e2705.

Ward, S. M.; Fox, B. C.; Brown, P. J.; Worthington, J.; Fox, S. B.; Chapman, R. W.; Fleming, K. A.; Banham, A. H. & Klenerman, P. (2007), Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* **47**(3), 316-324.

Wastling, J. M.; Nicoll, S. & Buxton, D. (1993), Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J Med Microbiol* **38**(5), 360-365.

Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P.; Thompson, C. B.; Griesser, H. & Mak, T. W. (1995), Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl $\alpha$ -4. *Science* **270**(5238), 985-988.

Weaver, C. T. & Hatton, R. D. (2009), Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* **9**(12), 883-889.

Wei, S.; Kryczek, I. & Zou, W. (2006), Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* **108** (2), 426-431.

Weiner, H. L. (2001), The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R) 1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol* **2**(8), 671-672.

Weiner, H. L.; da Cunha, A. P.; Quintana, F. & Wu, H. (2011), Oral tolerance. *Immunol Rev* **241**(1), 241-259.

Wekerle, T. (2008), T-regulatory cells-what relationship with immunosuppressive agents?, *Transplant Proc* **40**(10 Suppl), S13-S16.

Wildin, R. S.; Ramsdell, F.; Peake, J.; Faravelli, F.; Casanova, J. L.; Buist, N.; Levy-Lahad, E.; Mazzella, M.; Goulet, O.; Perroni, L.; Bricarelli, F. D.; Byrne, G.; McEuen, M.; Proll, S.; Appleby, M. & Brunkow, M. E. (2001), X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* **27**(1), 18-20.

Wille, U.; Nishi, M.; Lieberman, L.; Wilson, E. H.; Roos, D. S. & Hunter, C. A. (2004), IL-10 is not required to prevent immune hyperactivity during memory responses to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **26**(5), 229-236.

Wille, U.; Villegas, E. N.; Striepen, B.; Roos, D. S. & Hunter, C. A. (2001), Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **23**(6), 291-296.

Willerford, D. M.; Chen, J.; Ferry, J. A.; Davidson, L.; Ma, A. & Alt, F. W. (1995), Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**(4), 521-530.

Wills-Karp, M.; Santeliz, J. & Karp, C. L. (2001), The germless theory of allergic disease:

revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* **1**(1), 69-75.

Wilson, D. C.; Matthews, S. & Yap, G. S. (2008), IL-12 signaling drives CD8<sup>+</sup> T cell IFN- $\gamma$  production and differentiation of KLRG1<sup>+</sup> effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol* **180**(9), 5935-5945.

Wilson, E. H.; Harris, T. H.; Mrass, P.; John, B.; Tait, E. D.; Wu, G. F.; Pepper, M.; Wherry, E. J.; Dzierzinski, F.; Roos, D.; Haydon, P. G.; Laufer, T. M.; Weninger, W. & Hunter, C. A. (2009), Behavior of parasite-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells in the brain and visualization of a kinesis-associated system of reticular fibers. *Immunity* **30**(2), 300-311.

Wilson, E. H.; Wille-Reece, U.; Dzierzinski, F. & Hunter, C. A. (2005), A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* **165**(1-2), 63-74.

Wilson, M. S. & Maizels, R. M. (2006), Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem Immunol Allergy* **90**, 176-195.

Wilson, M. S. & Maizels, R. M. (2004), Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **26**(1), 35-50.

Wilson, M. S.; Taylor, M. D.; Balic, A.; Finney, C. A. M.; Lamb, J. R. & Maizels, R. M. (2005a), Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* **202**(9), 1199-1212.

Wing, K.; Onishi, Y.; Prieto-Martin, P.; Yamaguchi, T.; Miyara, M.; Fehervari, Z.; Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2008), CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* **322**(5899), 271-275.

Wing, K.; Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. (2011), Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* **32**(9), 428-433.

Wohlfert, E. & Belkaid, Y. (2008), Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol* **28**(6), 707-715.

Wolf, A.; Cowen, D. & Paige, B. (1939), Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* **89**, 226-227.

Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A. D.; Stroud, J. C.; Bates, D. L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S. F.; Mathis, D.; Benoist, C.; Chen, L. & Rao, A. (2006), FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**(2), 375-387.

Wüthrich, B.; Stern, A. & Johansson, S. G. (1995), Severe anaphylactic reaction to bovine serum albumin at the first attempt of artificial insemination. *Allergy* **50**(2), 179-183.

Yamamoto, M.; Standley, D. M.; Takashima, S.; Saiga, H.; Okuyama, M.; Kayama, H.; Kubo, E.; Ito, H.; Takaura, M.; Matsuda, T.; Soldati-Favre, D. & Takeda, K. (2009), A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med* **206**(12), 2747-2760.

Yamazaki, S.; Dudziak, D.; Heidkamp, G. F.; Fiorese, C.; Bonito, A. J.; Inaba, K.; Nussenzweig, M. C. & Steinman, R. M. (2008), CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **181**(10), 6923-6933.

Yarovinsky, F.; Zhang, D.; Andersen, J. F.; Bannenberg, G. L.; Serhan, C. N.; Hayden, M. S.; Hieny, S.; Sutterwala, F. S.; Flavell, R. A.; Ghosh, S. & Sher, A. (2005), TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**(5728), 1626-1629.

Ye, P.; Rodriguez, F. H.; Kanaly, S.; Stocking, K. L.; Schurr, J.; Schwarzenberger, P.; Oliver, P.; Huang, W.; Zhang, P.; Zhang, J.; Shellito, J. E.; Bagby, G. J.; Nelson, S.; Charrier, K.; Peschon, J. J. & Kolls, J. K. (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**(4), 519-527.

Yu, A.; Zhu, L.; Altman, N. H. & Malek, T. R. (2009), A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* **30**(2), 204-217.

Zelenay, S. & Demengeot, J. (2006), Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol* **177**(4), 2036-2037; author reply 2037-2038.

Zenewicz, L. A.; Antov, A. & Flavell, R. A. (2009), CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* **15**(5), 199-207.

Zenner, L.; Foulet, A.; Caudrelier, Y.; Darcy, F.; Gosselin, B.; Capron, A. & Cesbron-Delauw, M. F. (1999), Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection, *Pathol Res Pract* **195**(7), 475-485.

Zhang, N.; Schröppel, B.; Lal, G.; Jakubzick, C.; Mao, X.; Chen, D.; Yin, N.; Jessberger, R.; Ochando, J. C.; Ding, Y. & Bromberg, J. S. (2009), Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* **30**(3), 458-469.

Zhao, D.-M.; Thornton, A. M.; DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. (2006), Activated CD4+CD25+ regulatory T cells selectively kill B lymphocytes, *Blood* **107**, 3925-3932.

Zheng, Y.; Chaudhry, A.; Kas, A.; deRoos, P.; Kim, J. M.; Chu, T.-T.; Corcoran, L.; Treuting, P.; Klein, U. & Rudensky, A. Y. (2009), Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**(7236), 351-356.

Zheng, Y.; Josefowicz, S. Z.; Kas, A.; Chu, T.-T.; Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2007), Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**(7130), 936-940.

Zhou, L.; Chong, M. M. W. & Littman, D. R. (2009), Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**(5), 646-655.

Zhu, J. & Paul, W. E. (2010), Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* **20**(1), 4-

12.

Ziegler, S. F. & Buckner, J. H. (2009), FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect***11**(5), 594-598.

## Annexes

Annexe-I : Présentation orale au Forum de l'Ecole Doctorale Santé, Sciences, Techniques, Université François Rabelais de Tours, France le 17 juin, 2009 :

J'ai obtenu le premier prix pour l'exposé oral en anglais.

### **Regulation of Immune Response during *Toxoplasmosis***

Haroon AKBAR\*, Stéphanie GERMON, Nathalie MOIRÉ, Isabelle DIMIER-POISSON, UMR0483, Université-INRA, Laboratoire d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses, UFR de Pharmacie, Université François Rabelais de Tours, Tours, 37200, France

The breakthrough experiments of Sakaguchi *et al* (1995) in the mouse model provided solid evidence that the regulation of body's immune system is a phenomenon mediated by a major role of regulatory T cells (Treg). Treg enable the immune system of the body to tolerate self antigens, thus preventing the development of autoimmune diseases (Sakaguchi *et al.* 1995). Not only Treg prevent the autoimmune diseases but also play important role in different infectious diseases including parasitic infections like malaria, leishmaniasis (Belkaid *et al.*, 2001; Hisaeda *et al.*, 2004). The regulations of immune response by Treg during both of these two parasitic infections help the parasites escape the complete elimination from the host. In *Leishmaniasis* it is useful in the sense that the persistence of a small number of parasites in the mice helps mice to maintain long-term immunity and protection against the future infection (Belkaid *et al.*, 2001). On the other hand, in case of malaria, the escape of parasites from the host's immune response with the help of regulatory T cells results into fatal outcome in terms of mortality of mice. This mortality of mice was preventable after anti-CD25 antibody treatment (Hisaeda *et al.*, 2004). Thus tolerance mediated by regulatory T cells is an important phenomenon of immune-regulation during parasitic diseases like *Leishmaniasis*.

*Toxoplasma gondii* persists chronically as cysts in the brain and muscles of its hosts, CD4+CD25+ regulatory T cells might have an important role in development of chronic form of this disease. We investigated the role of circulatory CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Toxoplasmosis*. In preliminary experiments, we infected outbred OF1 mice with the type II 76K strain of *Toxoplasma gondii* and followed the kinetic of CD4+CD25+ cells. A high rise of CD25 expression on circulating CD4+ T cells at day 4 postinfection was found. At the same time, the percentage of CD4+ T cells in the blood decreased slightly. From day 7 postinfection onwards, the percentage of CD25+ T cells starts decreasing until day 14 postinfection when it returns to initial level. To

further explore the role of Treg in Toxoplasmosis, we performed the depletion of Treg by the injections of anti-CD25 antibodies (clone: PC61) in OF1 mice. This resistant mouse strain showed about 58% mortality after depletion of CD25+ cells. On post-mortem examinations, we found the small intestine with hemorrhagic necrosis that is usually observed in a sensitive mouse strain (C57BL/6).

There could be two possible reasons for this mortality after anti-CD25 antibody treatment during acute phase of this infection. Firstly, this treatment caused the depletion of CD4+Foxp3+CD25+ regulatory T cells and consequently as described for the susceptible C57/BL6 mouse, the death is due to overproduction of inflammatory cytokines (especially IFN $\gamma$ ) and resulted into the necrosis of intestines. Secondly, this treatment might have depleted both CD25+ regulatory as well as CD25+ effector T cells with a consequent immunosuppression leading to extensive parasite multiplication in the intestinal wall resulting in necrosis. Further explorations of the immune response at this stage of infection are in progress.

\*Pakistan's Overseas Scholarship Scheme for PhD studies in France

Annexe-II : Présentation orale dans un congrès international en Hollande "10th International Congress on Toxoplasmosis" le 20 juin 2009

**CD4+CD25+ T cells in acute Toxoplasmosis, are necessary for the survival of resistant mice?**

Haroon AKBAR\*, Stéphanie GERMON, Nathalie MOIRÉ, Isabelle DIMIER-POISSON.

UMR0483, Université-INRA, Laboratoire d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses, UFR de Pharmacie, Université François Rabelais de Tours, Tours, 37200, France

The persistence of intracellular protozoan parasites in their hosts results into the long term immunity setup. One such example is Leishmaniasis. CD4+CD25+ regulatory T cells have been shown to be involved in the persistence of the parasites at cutaneous sites of infection and in turn provides protection to the host in case of following infection (Belkaid *et al.*, 2001). As we know that Toxoplasmosis persists chronically in the form of cysts in the brain and muscles of its hosts, CD4+CD25+ regulatory T cells might have an important role in development of chronic form of this disease and may play an important role to protect the hosts.

We investigated the role of circulatory CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Toxoplasmosis. In preliminary experiments, we infected outbred OF1 mice with the type II 76K strain of *Toxoplasma gondii* and followed the kinetic of CD4+CD25+ cells. A high rise of CD25 expression on circulating CD4+ T cells at day 4 postinfection was found. At the same time, the percentage of CD4+ T cells in the blood decreased slightly. From day 7 postinfection onwards, the percentage of CD25+ T cells starts decreasing until day 14 postinfection when it returns to initial level. This resistant mouse strain showed about 70% mortality after depletion of CD25+ cells using anti-CD25 (clone: PC61) antibody treatment. On post-mortem examinations of these mice, we found the small intestine with hemorrhagic necrosis. A sensitive mouse strain (C57BL/6) also suffers this type of intestinal necrosis. In this sensitive mouse strain, our early experiments show that there is a reduction in the percentage of regulatory T cells (CD4+CD25+Foxp3+) in the spleens and the mesenteric lymph nodes at day 7 postinfection with the same type II strain of *Toxoplasma gondii*.

We hypothesize two possible reasons for this mortality after anti-CD25 antibody treatment during acute phase of this infection. Firstly, this treatment caused the depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells and consequently as described for the susceptible C57/BL6 mouse, the death

is due to overproduction of inflammatory cytokines (especially IFN $\gamma$ ) and resulted into the necrosis of intestines. Secondly, this treatment might have depleted both CD25+ regulatory as well as CD25+ effector T cells with a consequent immunosuppression leading to extensive parasite multiplication in the intestinal wall resulting in necrosis. Further explorations of the immune response at this stage of infection are in progress.

\*Pakistan's Overseas Scholarship Scheme for PhD studies in France

## Résumé :

Une immunité concomitante à long terme est mise en place lors d'infections persistantes avec des parasites protozoaires intracellulaires responsables, par exemple, de la leishmaniose et du paludisme. Dans un modèle murin de leishmaniose, il a ainsi été démontré que les cellules T régulatrices  $CD4^+CD25^+$  sont impliquées dans la persistance des leishmanies aux sites d'infection cutanés et protègent l'hôte contre une ré-infection.

Le protozoaire *Toxoplasma gondii* est également à l'origine d'une infection chronique liée à l'installation du parasite dans le cerveau et les muscles de l'hôte dans des formes kystiques. Il était donc pertinent de s'intéresser à l'implication des cellules T régulatrices dans l'installation et la persistance du toxoplasme.

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-CD25 dans des expériences de déplétion pendant la phase aiguë de la toxoplasmose après infection de souris non consanguines avec une souche de toxoplasmes de type II. Aucune différence significative que ce soit en terme de mortalité ou de charge parasitaire cérébrale n'a été observée entre les souris infectées et déplétées et les souris infectées non déplétées. En complément de ces expériences, nous avons pu montrer que les cellules régulatrices  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  (Treg) sont une cible potentielle de l'anticorps anti-CD25 ainsi que les cellules T effectrices  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  (Teff); cellules qui expriment le marqueur CD25 en phase aiguë de l'infection.

Ainsi, les résultats observés dans ces expériences ne permettent pas de conclure sur l'implication des cellules Treg dans le contrôle de l'infection toxoplasmique en modèle murin dans la mesure où une déplétion simultanée des cellules Treg  $CD25^+$  et des cellules Teff  $CD25^+$  est observée avec l'anticorps anti-CD25.

Parallèlement, nous avons étudié le rôle des cellules Treg dans la protection des souris vaccinées par voie intrapéritonéale avec une souche vaccinale atténuée de type I de *T. gondii* (Mic1-3KO). Nous avons observé une forte expansion des cellules Treg au site d'infection 4 jours après vaccination suivie par l'expansion des cellules Teff entre 7 et 11 jours après vaccination. Les souris vaccinées avec la souche Mic1-3KO arrivent à contrôler la parasitémie et survivent à l'infection tandis que les souris infectées avec la souche sauvage RH de type I meurent d'une forte parasitémie et d'une réponse immunitaire incontrôlée. Les cellules Treg auraient donc, dans ce modèle de vaccination, une importance primordiale en contrôlant la réponse immunitaire cellulaire excessive observée chez la souris infectées avec la souche sauvage RH.

Mot-clés : Cellules Treg  $Foxp3^+$ , *Toxoplasma gondii* de Type I et Type II, Vaccination, Parasitémie

## Résumé en anglais:

Long term concomitant immunity is developed in case of persistent infections with intracellular protozoan parasites like for example in leishmaniosis and malaria. In a murine model of leishmaniosis, it has been demonstrated that  $CD4^+CD25^+$  regulatory T (Treg) cells are involved in the persistence of leishmania parasites at cutaneous sites of infection and protect the host against re-infection.

The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is also responsible for a chronic infection associated with the settlement of parasite in the brain and the muscles of the host in the form of cysts. It was therefore pertinent to know about the implication of Treg cells in the development and the persistence of toxoplasma. To attain this objective, we have used a monoclonal antibody anti-CD25 in depletion experiments during the acute phase of toxoplasmosis after infection of outbred mice with a type II toxoplasma strain. No significant difference was found in terms of mortality or in brain cyst load between depleted mice and non-depleted mice. In addition to these experiments, we have shown that not only the  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatory T (Treg) cells but also the  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  T effector (Teff) cells are a potential target of anti-CD25 antibody-depletion. These cells are induced to express CD25 during acute phase of the infection.

Thereby the results of these experiments do not allow to conclude definitively on the implication of Treg cells in the control of toxoplasmic infection since simultaneous depletion of  $CD25^+$  Treg and  $CD25^+$  Teff cells occurred.

At the same time, we have studied the role of Treg cells in the protection of mice vaccinated intraperitoneally with a type I attenuated strain of *Toxoplasma gondii* (Mic1-3KO). We have observed a high expansion of Treg cells at the site of infection 4 days after vaccination followed by expansion of Teff cells between 7 to 11 days post-vaccination. The mice vaccinated with the strain Mic1-3KO manage to control the parasitemia and survive the infection whereas the mice infected with the wild type strain RH parasites, die of a high parasitemia and of uncontrolled immune response. The regulatory T cells would thus have, in this model of vaccination, a vital importance in the control of excessive cellular immune response observed in mice infected with wild type strain RH.

Key-words :  $Foxp3^+$  Treg cells, Type I and Type II *Toxoplasma gondii*, Vaccination, Parasitemia