

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE ED 523 Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

FACULTE de Pharmacie et de Médecine

UNITE DE RECHERCHE UMR INSERM 1094

Neuroépidémiologie Tropicale (NET)

Thèse N°

Thèse pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Immunologie et Infectiologie

présentée et soutenue par

Nour MAMMARI

le 08 juillet 2014

**Etude de la réaction immunitaire activée dans les cellules nerveuses
humaines infectées par différentes souches de *Toxoplasma gondii***

Thèse dirigée par

Pr. Marie-Laure Dardé et Dr. Bertrand Courtioux

JURY :

Rapporteurs

Mme. Isabelle Dimier-Poisson (Université François-Rabelais de Tours)

M. Alexander Pfaff (Université de Strasbourg)

Examineurs

M. Hervé Pelloux (Université de Grenoble)

Mme. Marie-Odile Jauberteau-Marchan (Université de Limoges)

Mme. Marie-Laure Dardé (Université de Limoges)

M. Bertrand Courtioux (Université de Limoges)



Remerciements

Suite à l'année passée pour obtenir mon Master

« Neuroparasitologie Tropicale et Neuroépidémiologie »

Mon travail de recherche en thèse j'ai poursuivi

Ce travail est loin d'être un travail solitaire

Et ça j'en ai la certitude

Je tiens à exprimer toute ma gratitude

Auprès du professeur Dreyfuss pour m'avoir donné

L'opportunité de réaliser ce Master

Sans la générosité et la bonne humeur

Le soutien de nombreuses personnes dont l'intérêt

A l'égard de ma recherche s'est manifesté

M'ont permis de progresser

Dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur »

A tous mille mercis pour votre bienveillance

Je vous témoigne toute ma reconnaissance

A mes directeurs de thèse en particulier

Pour avoir rendu possible pendant ces trois années

Cette aventure enrichissante et merveilleuse

Parfois difficile et douloureuse

A madame le Professeur Marie-Laure Dardé

De m'avoir permis de travailler

*Dans son laboratoire avec son protégé *Toxoplasma gondii**

Et monsieur Courtioux Bertrand
Pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant
D'être un de mes encadrants
Un remerciement spécial
Pour ses multiples conseils et son implication
Pour le temps passé et sa précieuse contribution
A la réalisation de ce travail doctoral
Pour ses disponibilités mêmes si serrées étaient
Les délais de relecture des documents que je lui adressais

Je tiens à remercier monsieur Pfaff de Strasbourg
Monsieur Pelloux de Grenoble, madame Poisson de Tours
Madame Jauberteau de Limoges également
D'avoir accepté de faire le déplacement
Pour prendre part au jury et ce malgré
Leur emploi du temps bien chargé

Je remercie toute l'équipe de l'UMR(1094)
Elisabeth, Pascale et Charlotte les secrétaires
Et tout particulièrement son directeur
En la personne de Pierre Marie Preux, professeur
Pour ses remarques pertinentes, pour ses encouragements
Les mercredis, lors des réunions d'équipe

Merci au docteur Philippe Vignolles pour les calculs statistiques
Sa grande disponibilité, sa patience et ses graphiques

Un grand merci aussi aux membres du service de Parasitologie

Du CHU et notamment au docteur Hommayoun Riahi

Mon principal fournisseur de cerveaux de souris

Et au docteur Daniel Ajzenberg pour ses précieux avis

Via monsieur le doyen de la faculté de Pharmacie

Le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, je remercie

Car il a financé en partie cette thèse en m'accordant

Un poste d'ATER: « l'apprenti enseignant »

Je remercie également tous les permanents

Du quatrième, professeur, maître de conférences ou non

Pour leur bonne humeur, nos sorties resto ou piscine

Nos discussions chaussures, promotions

Merci à Félicité, Sylvie, Martine

Aurélié, Jeanny et Rosehlyne

Un immense merci à tous les thésards

Présents et passés

Pour leur amitié et cette aventure partagée...

Bassel, Ryma, Mona, Emilie, Karim, Mustafa, Nivine, Nathalie et Hazard

Les quelques vers qui vont suivre sont plus personnels à formuler

C'est de l'autre côté de la Méditerranée

Que je suis née, que j'ai appris à marcher

Mes parents m'ont prénommée Nour, Nour Mammari

Fille du soleil, c'est à Oran que j'ai grandi

En Algérie

De tout cœur, je remercie mes parents pour l'amour

Qu'ils m'ont donné, témoigné chaque jour

De ma toute petite enfance à aujourd'hui

Grâce à eux, mon frère, ma sœur, je me suis épanouie

Je leur dois d'être celle que je suis

Leur soutien, leur aide, leur affection est sans frontière

Dans la poursuite de mes études en biologie

J'ai choisi malgré la distance

La France

Précisément Limoges, ville de caractère

Capitale du Limousin, de l'émail et du feu

Où vivent mon oncle, ma tante et Aïcha leur fille

A tous, merci pour votre accueil chaleureux

C'est aussi ça la famille

Mes derniers remerciements sont pour l'homme que j'aime

Pour son soutien, sa tendresse, sa force, son humour

Sa joie, sa gentillesse, son ouverture d'esprit, son amour

C'est pour tout ça que je te dédis ce poème

Adnan, une pluie de « merci » s'échappe de mon cœur

Mets-toi à l'abri ! Merci, merci, merci

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| I. Introduction..... | 17 |
| II. Revue de littérature sur <i>Toxoplasma gondii</i> et la réponse immunitaire..... | 21 |
| II.1 <i>Toxoplasma gondii</i> | 22 |
| II.1.1 Historique | 22 |
| II.1.2 Morphologie et formes évolutives de <i>T. gondii</i> | 22 |
| II. 1. 2. 1 Tachyzoïte..... | 22 |
| II. 1. 2. 2 Bradyzoïtes et kystes..... | 23 |
| II. 1. 2. 3 Sporozoïtes et oocystes | 25 |
| II.1.3 Cycle biologique de <i>T. gondii</i> | 25 |
| II.2 La biodiversité de <i>T. gondii</i> | 28 |
| II.2.1 Techniques d'étude | 28 |
| II.2.2 Haplogroupes de <i>T. gondii</i> | 29 |
| II.2.3 Génotype et virulence..... | 30 |
| II. 3 Déroulement de l'infection cellulaire par <i>T. gondii</i> et les protéines impliquées dans la virulence..... | 32 |
| II.3.1 L'attachement et la pénétration intracellulaire | 33 |
| II.3.1.1 L'attachement initial | 33 |
| II.3.1.2 L'attachement apical..... | 33 |
| II.3.2 La pénétration intracellulaire et la formation de la vacuole parasitophore | 35 |
| II.3.3 La multiplication au sein de la cellule et la sortie hors de la cellule..... | 36 |
| II.3.4 La conversion de tachyzoïtes en bradyzoïtes | 37 |
| II. 4 La toxoplasmose humaine | 38 |
| II.4.1 Epidémiologie | 38 |
| II.4.2 Les différents aspects de la toxoplasmose humaine..... | 39 |
| II.4.2.1 La toxoplasmose chez l'immunocompétent..... | 39 |
| II.4.2.2 La toxoplasmose chez l'immunodéprimé | 39 |
| II.4.2.3 La toxoplasmose congénitale..... | 40 |
| II.4.3 Diagnostic..... | 41 |
| II.4.3.1 Sérologie | 41 |
| II.4.3.2 Diagnostic parasitologique..... | 42 |
| II.4.4 Traitement | 42 |
| II.5 L'immunité anti-toxoplasmique..... | 43 |
| II.5.1 La réponse immunitaire intestinale | 43 |
| II.5.1.1 La réponse immunitaire innée..... | 43 |
| II.5.1.2 La réponse immunitaire adaptative | 44 |
| II.5.2 La réponse immunitaire systémique..... | 47 |
| II.5.2.1 La réponse immunitaire innée..... | 47 |
| II.5.2.2 La réponse immunitaire adaptative | 56 |
| II.5.3 L'immunité humorale..... | 59 |
| II.6 La réponse immunitaire cérébrale | 60 |
| II.6.1 L'immunité liée au système nerveux central..... | 60 |
| II.6.2 L'invasion de <i>T. gondii</i> dans le cerveau..... | 62 |
| II.6.3 La régulation du mécanisme immunitaire cérébral lors de l'infection par <i>T. gondii</i> | 63 |
| II.6.4 Les cellules effectrices du cerveau..... | 67 |
| II.6.4.1 Les cellules microgliales..... | 67 |
| II.6.4.2 Les astrocytes..... | 68 |
| III. Objectifs de la thèse | 69 |
| IV. Matériel biologique utilisé..... | 71 |
| IV.1 Cellules..... | 72 |
| IV.1.1 Cellules microgliales (CMH5)..... | 72 |
| IV.1.2 Cellules endothéliales (Hbmec)..... | 73 |

| | |
|---|------------|
| IV.1.3 Lignée cellulaire de neuroblastes humains (SH SY5Y) | 74 |
| IV.1.4 Les cellules fibroblastes humaines (MRC5)..... | 75 |
| IV.2 Souches parasitaires de <i>Toxoplasma gondii</i> | 76 |
| IV.2.1 Souche RH..... | 76 |
| IV.2.2 Souche Prugniaud (PRU)..... | 76 |
| IV.3 Obtention des tachyzoïtes..... | 76 |
| IV.3.1 L'isolement des kystes de la souche PRU | 76 |
| IV.3.2 Mise en culture des parasites sur cellules fibroblastes (MRC5)..... | 77 |
| IV.4 Infection des cellules nerveuses humaines par les souches de toxoplasmes..... | 77 |
| V. Chapitre I : Etude de l'expression des médiateurs immuns | 79 |
| V.1 Résumé détaillé..... | 80 |
| V.2 Article 1 (accepté par Plos One PONE-D-14-02963R1) : <i>In vitro</i> infection of human nervous cells by two strains of <i>Toxoplasma gondii</i> : A kinetic analysis of immune mediators and parasite multiplication | 84 |
| V.3 Article 2: <i>Effect of interferon gamma on immune mediators produced in human nervous cells infected by two strains of Toxoplasma gondii</i> | 85 |
| VI. Chapitre II : Etude des mécanismes apoptotiques..... | 103 |
| VI.1 Généralités | 104 |
| VI.1.2 Les principales voies de l'apoptose | 104 |
| VI.1.2.1 La voie intrinsèque | 104 |
| VI.1.2.2 La voie extrinsèque | 106 |
| VI.1.2.3 L'apoptose endoplasmique médiée par le reticulum..... | 108 |
| VI.2. Apoptose et <i>Toxoplasma gondii</i> (revue en préparation)..... | 109 |
| VI.3 Matériels et Méthodes | 129 |
| VI.3.1 Culture et infection cellulaire | 129 |
| VI.3.2 Analyse de l'apoptose..... | 129 |
| VI.3.2.1 La cytométrie en flux | 129 |
| VI.3.2.2 L'ELISA Cell Death | 129 |
| VI.3.2.3 La méthode TUNEL..... | 130 |
| VI.3.2.4 Extraction des protéines | 130 |
| VI.3.2.5 Western Blot..... | 131 |
| VI.3.2.6 Elisa Pro et active caspase 3..... | 132 |
| VI.3.2.7 Elisa caspase 8..... | 133 |
| VI.3.2.8 Analyse statistique..... | 134 |
| VI.4 Résultats | 135 |
| VI.4.1 Cytométrie en Flux | 135 |
| VI.4.2 Quantification des nucléosomes solubles (Elisa Cell Death) | 140 |
| VI.4.3 Quantification d'ADN fragmenté (Tunel)..... | 141 |
| VI.4.4 Détermination de l'expression des caspases 3 et 8 (Western Blot)..... | 142 |
| VI.4.5 Quantification de la procaspase 3, la caspase 3 et la caspase 8..... | 145 |
| VI.5 Synthèse des résultats et discussion | 149 |
| VII. Discussion générale, conclusions & perspectives..... | 153 |
| VII.1 Discussion générale & conclusions | 154 |
| VII.2 Perspectives | 167 |
| VIII. Bibliographie | 169 |

Liste des Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 <i>Ctenodactylus gundi</i> | 22 |
| Figure 2 L'ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> | 23 |
| Figure 3 Bradyzoïtes et kyste de <i>T. gondii</i> | 24 |
| Figure 4 Ultrastructure d'un bradyzoïte | 24 |
| Figure 5 Oocystes de <i>T. gondii</i> , A. non sporulé et B. sporulé | 25 |
| Figure 6 Cycle de vie de <i>T. gondii</i> et les différentes sources de contamination d'origine alimentaire et environnementale | 26 |
| Figure 7 Les étapes de l'infection et de la multiplication de <i>T. gondii</i> durant les trois stades infectieux chez leurs hôtes | 27 |
| Figure 8 Les étapes du processus de l'invasion de <i>T. gondii</i> | 34 |
| Figure 9 Représentation schématique des modes d'action des différentes RONs et ROPs de <i>T. gondii</i> | 36 |
| Figure 10 Cinétique de la réponse des anticorps (Ac) durant une infection par <i>T. gondii</i> | 41 |
| Figure 11 Schéma représentatif de la réponse immunitaire intestinale lors d'une primo-infection par <i>T. gondii</i> . | 46 |
| Figure 12 Schéma représentatif de l'activation de la voie immunitaire de type Th1 par <i>T. gondii</i> | 50 |

| | |
|--|-----|
| Figure 13 Schéma représentatif de l'activation de la voie de Th2 par <i>T. gondii</i> | 56 |
| Figure 14 Schéma illustrant les réponses immunitaires adaptatives, cellulaires et humorales activées durant une infection par contre <i>T. gondii</i> | 60 |
| Figure 15 Schéma général représentant la réponse immunitaire cérébrale durant une toxoplasmose cérébrale murine | 66 |
| Figure 16 Cellules microgliales (CMH5) | 73 |
| Figure 17 Cellules endothéliales (Hbmec) | 74 |
| Figure 18 Lignée cellulaire de neuroblastome humaine | 75 |
| Figure 19 Cellules fibroblastes humaines (MRC5) | 75 |
| Figure 20 Les principales voies apoptotiques | 107 |
| Figure 21 Voies apoptotiques du réticulum endoplasmique | 108 |
| Figure 22 Résultat de l'analyse par Cytométrie en Flux des cellules microgliales | 137 |
| Figure 23 Résultat de l'analyse par Cytométrie en Flux des cellules endothéliales | 138 |
| Figure 24 Résultat de l'analyse par Cytométrie en Flux des neurones | 139 |
| Figure 25 Résultats de taux d'apoptose activée dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 140 |
| Figure 26 Quantification des nucléosomes solubles du taux d'apoptose activée dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 141 |

| | |
|--|-----|
| Figure 27 Quantification du taux d'ADN fragmenté dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 142 |
| Figure 28 Expression de la caspase 8 et la procaspase 3 | 144 |
| Figure 29 Résultats de quantification de la caspase 3 active dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 146 |
| Figure 30 Résultats de quantification de la procaspase 3 dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 147 |
| Figure 31 Résultats de quantification de la caspase 8 active dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection | 148 |
| Figure 32 Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les cellules endothéliales (HbmeC) infectées par les souche RH et PRU à 24 h et à 48 h | 163 |
| Figure 33 Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les cellules microgliales (CMH5) infectées par les souche RH et PRU à 24 h et à 48 h | 164 |
| Figure 34 Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les neurones (SH SY5Y) infectés par les souche RH et PRU à 24 h et à 48 h | 166 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 Répartition des haplogroupes dans le monde | 30 |
| Tableau 2 Préparation de la gamme BSA, solution mère de BSA (SM)= 10 mg /mL | 131 |
| Tableau 3 Préparation des gammes VEH and STS | 133 |
| Tableau 4 Préparation de la gamme pour l'ELISA caspase 8 | 134 |
| Tableau 5 Résultat de l'activation de l'apoptose dans les cellules nerveuses humaines infectées par les souches RH et PRU | 160 |

Liste d'abréviations

- ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
- AIF:** Apoptosis Inducing Factor
- AMA1:** Antigène de la membrane apicale
- ANOVA:** Analysis Of Variance
- Apaf:** Apoptotic Peptidase Activating Factor
- CPA:** Cellules Présentatrices d'Antigènes
- ARN:** Acide ribonucléique
- ATF:** Activating Transcription Factor
- ATF6 β :** Facteur de transcription 6 β
- BHE:** Barrière Hémato-Encéphalique
- C-18:** Cyclophiline-18
- c-FLIP:** cellular FLICE-Like Inhibitory Protein
- CCR C-C:** Chemokine Receptor
- CD:** Cellules dendritiques
- CMH:** Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CMH5:** Cellules Microgliales Humaines 5
- CO₂:** Dioxyde de Carbone
- DISC:** Death Inducing Signaling Complex
- DMEM:** Dulbecco's Modified minimum Essentiel Medium
- dNTP:** Déoxynucléotide Triphosphate
- DO:** Densité Optique
- dUTP:** Désoxyuridine Nucléotide Triphosphate
- ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- FADD:** Fas-Associated protein with Death Domain
- GPI:** Glycosylphosphatidylinositol
- GRA:** Protéines de granules denses
- GTPase:** Guanosine TriPhosphatase
- HAART:** Traitement antirétroviral hautement actif
- Hbmec:** Cellules Endothéliales Humaines de la moelle osseuse

IDO: Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN- γ : Interféron Gamma
Ig: Immuno-globulines
GTP: GTPase interféron inductible
IL: Interleukine
iNOS: inductible de l'oxyde nitrique
IP: Iodure de Propidium
IRG: Immunity Related GTPases
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
LT: Lymphocyte T
MCP-1 (CCL2): Monocyte Chimoattractant Protein-1
MEM: Modified Eagl's medium
MIC: Micronème
MIF (GIF): Macrophage Migration Inhibitory Factor
MIP 2: Macrophage Inflammatoire Protéine-1 α
MLST: Multilocus Sequence Typing
MMP-9: Métalloproteinases-9
MRC5: Cellules fibroblastiques humaines
MS: Microsatellites
MVP: Membrane de Vacuole Parasitophore
NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
NK: Natural Killer
NO: Monoxyde d'azote
NTPase: Nucleotid TriPhosphatase
NuMA: Nuclear Mitotic Apparatus protein
PARP: Poly (ADP-ribose) Polymérase
Pb: Paires de bases
PCR-RFLP: Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism
STR: Short Tandem Repeat
PGE2: Prostaglandine E2
Rantes: Regnault on Activation and Normally T-cell Epressed
RE: Réticulum endoplasmique
RON: Rhoptry Neck
Rops: Rhoptries

SAG: Surface AntiGen

Serpin E1: Serine Proteinase Inhibitors

SH SY5Y: Cellulaire de neuroblastome humain

sICAM-1: soluble InterCellular Adhesion Molecule-1

SIDA: Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

SNC: Système Nerveux Central

SNPs: Single Nucleotide Polymorphism

SRS: SAG1 related sequence

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STR: Short Tandem Repeat

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

TdT: Terminal desoxynucleotidyl Transferase

TE: Toxoplasmose encéphalique

TGFβ: Facteur de croissance de transformation - β

TLR: Toll Like Receptors

TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha

TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein

TRAF: TNF Receptor-Associated Factor

TUNEL: Terminal desoxynucleotidyl transferase d'UTP Nick End Labelling

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VP: Vacuole parasitophore

μm : micromètre

Résumé

L'encéphalite toxoplasmique est le résultat de la réactivation d'une toxoplasmose latente. Elle représente la manifestation clinique la plus fréquente, caractérisée par des lésions multiples nécrosantes au niveau du cerveau. La réponse immunitaire a un impact majeur sur le contrôle de la persistance des kystes toxoplasmiques dans le système nerveux central. Ce processus n'est pas bien élucidé chez l'homme. Pour cela, le but de notre étude était de déterminer les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection des cellules nerveuses humaines infectées par deux souches de *Toxoplasma gondii in vitro*. L'étude de la cinétique de différentes cytokines et chémokines a été réalisée dans des cellules microgliales, des cellules endothéliales et des neurones infectés *in vitro* par les souches RH (type I) et PRU (type II) de *T. gondii*. Les protéines pro-inflammatoires ont été dosées et la charge parasitaire a été quantifiée à 8 h, 14 h, 24 h et 48 h post infection. Notre travail a montré des résultats originaux qui pourraient expliquer la cinétique immunitaire et parasitaire mise en jeu dans les premières heures de l'infection et être essentiels pour le contrôle de la persistance du parasite. Nous avons également montré que le traitement des cellules nerveuses humaines par l'IFN- γ avant l'infection a un effet significatif sur la synthèse de certaines protéines pro-inflammatoires et sur la multiplication de la souche RH dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales stimulées. Ces recherches ont été poursuivies par une étude sur les voies de l'apoptose activées dans les cellules nerveuses humaines infectées par le toxoplasme. Ces cellules ont été infectées par les deux souches de *T. gondii* pour 24 h et 48 h. L'analyse des mécanismes apoptotiques a montré que la souche PRU induit une forte réponse apoptotique dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales infectées. La souche RH induit une réponse apoptotique seulement dans les neurones infectés. Ces données indiquent que la souche PRU semble être plus pro-inflammatoire et présente un profil apoptotique plus agressif seulement dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales humaines. Au contraire de la souche RH qui présente un profil pro-inflammatoire plus faible et une réaction apoptotique seulement dans les neurones.

Abstract

Toxoplasma encephalitis resulting from a reactivation of a latent toxoplasmosis is the most frequent clinical manifestation, characterized by multiple necrotizing brain lesions. The immune response has a major impact on controlling parasite persistence in the brain. This process is poorly understood especially in human. For that, the aim of our study is to determine *in vitro* the immune mechanism involved in human nervous cells infected with two strains of *Toxoplasma gondii in vitro*. The kinetic study of different cytokine and chemokine production was realized *in vitro* with infected: microglial cells, endothelial cells and neurons by RH (type I) and PRU (type II) strains of *T. gondii*. The pro-inflammatory proteins including the immune responses were assayed in the supernatant of co-cultures and the parasite burden was quantified at 8 h, 14 h, 24 h and 48 h. Our work provided the original results that could explain the immune and parasitic kinetic in the early hours of infection that are the key for controlling the persistence of the parasite. We have also shown that treated human nervous cells by IFN- γ before infection has a significant effect on the synthesis of some pro-inflammatory proteins and the multiplication of RH strain in IFN γ -stimulated microglial and endothelial cells. This research is pursued by a study of apoptosis pathway activated in human nervous cell infected with *Toxoplasma*. Human nervous cells are infected with the two strains for 24 h and 48 h. Analysis of apoptotic mechanisms showed that PRU strain induced a strong apoptotic response in infected microglial and endothelial cells. RH strain induced an apoptotic response only in infected neurons. These data indicate that the PRU strain is more pro-inflammatory and has an aggressive apoptotic profile only in human microglial cells and endothelial cells. Instead of the RH strain which has a lower pro-inflammatory profile and a strong apoptotic reaction in neurons only.

I. Introduction

La toxoplasmose est une infection due à un protozoaire *Toxoplasma gondii*. Cette zoonose est cosmopolite et on estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par ce parasite. Sa prévalence chez l'homme est variable. Elle est inférieure à 30 % dans les pays scandinaves et dans le Royaume-Uni, elle varie de 20 à 50 % en Europe du Sud ainsi que dans les régions humides de l'Afrique et de 50 à 70 % en Europe de l'Ouest (AFSSA, 2005). Le cycle commence chez le chat dont la contamination a lieu après ingestion des kystes tissulaires trouvés dans la viande des animaux infectés. Le chat élimine le parasite sous forme d'oocystes dans le milieu extérieur où ils peuvent acquérir leur caractère infectieux. L'homme s'infecte soit en mangeant des viandes crues contenant des kystes de *T. gondii* soit en ingérant des oocystes à partir de végétaux contaminés. Suite à cette infection, le sujet immunocompétent hébergera dans son système nerveux central des kystes toxoplasmiques latents. L'infection toxoplasmique chronique est asymptomatique bien que des études tendent à montrer qu'elle pourrait être un facteur associé à des pathologies neurologiques chroniques (schizophrénie, épilepsie, tumeurs cérébrales) (Dalimi and Abdoli, 2012) (Carter, 2013). Lorsque l'infection a lieu chez une femme enceinte, la contamination du fœtus est possible avec des conséquences variables en fonction du stade d'embryogénèse et du degré de maturité de son système immunitaire. Les atteintes neurologiques (hydrocéphalie, microcéphalie, retard mental, calcifications intracrâniennes) ou oculaires (rétinoblastome) de la toxoplasmose congénitale traduisent le tropisme neurologique de ce parasite. De même, lors d'une dégradation progressive des fonctions du système immunitaire suite à une infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou à un traitement immunosuppresseur, le cerveau est la cible privilégiée de la réactivation des kystes toxoplasmiques latents. Cette réactivation se traduit par des lésions cérébrales nécrosantes qui caractérisent la toxoplasmose cérébrale.

Ces éléments montrent d'une part la situation particulière du système nerveux central dans l'infection et dans la pathologie toxoplasmique, et d'autre part le rôle majeur de la réponse immunitaire sur la persistance des kystes parasitaires dans le cerveau.

La réaction immunitaire protectrice contre le toxoplasme est très complexe. Au cours d'une primo-infection, les composants de la réaction immunitaire non spécifique interviennent en premier. Les tachyzoïtes de *T. gondii* atteignent la lumière intestinale, pénètrent dans les cellules intestinales, puis se multiplient dans les cellules de la *lamina propria*. A ce stade, les entérocytes infectés activent une réaction immunitaire afin de limiter

la multiplication parasitaire. Cette réponse fait intervenir essentiellement les neutrophiles, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques via la sécrétion de différentes protéines chémoattractives. Secondairement, une réponse immunitaire cellulaire est activée spécifiquement contre le parasite. Il s'agit essentiellement d'une réponse immunitaire de type Th1. Cette réponse est marquée par une production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène, et la production d'IFN- γ par les cellules T CD4⁺, T CD8⁺ ainsi que les cellules NK. La réaction de type Th1 induit le plus souvent une réaction inflammatoire locale, d'où l'intérêt de l'activation d'une réaction immunitaire de type Th2 qui inhibe l'activation de la réponse immunitaire Th1. La réponse Th2 est médiée principalement par deux interleukines IL-4 et IL-10. Cette régulation immunitaire semble avoir un grand intérêt dans la diminution des réactions inflammatoires responsables de la plupart des lésions, mais elle rend le terrain favorable à la multiplication parasitaire.

Malgré les réactions immunitaires mises en place contre *T. gondii*, ce dernier a la capacité de s'échapper et de disséminer via la voie sanguine pour infecter les différents organes. Dans le système nerveux central, les tachyzoïtes ont la capacité de franchir la barrière hémato-méningée, d'infecter différents types de cellules nerveuses et de se transformer en bradyzoïtes enkystés qui persistent durant toute la vie de l'hôte. Plusieurs études ont montré chez le modèle murin l'importance de l'IFN- γ dans ce contrôle.

Ce processus fait aussi appel à l'influence du parasite sur les voies apoptotiques des cellules hôtes. Des études sur le modèle murin montrent que *T. gondii* a la capacité d'activer l'apoptose des cellules hôtes pendant la phase aiguë de l'infection. En revanche, il peut l'inhiber pendant la phase chronique afin de persister et se multiplier. *Toxoplasma gondii* module les réponses de la cellule hôte soit en activant l'expression des protéines anti-apoptotiques, soit en inhibant la production des protéines pro-apoptotiques ; ceci diffère selon le profil de virulence de la souche parasitaire. Les mécanismes par lesquels *T. gondii* peut échapper à la réaction immunitaire cérébrale et moduler les réactions de défenses des cellules hôtes restent encore mal connus en particulier chez l'homme. Ceci se traduit par la difficulté d'études des processus qui se déroulent dans le système nerveux, et d'autre part, de l'existence de plusieurs facteurs pouvant interférer avec ces réponses, facteurs liés à l'hôte et au parasite.

Parmi ces facteurs liés à l'hôte, le statut immunitaire joue un rôle majeur. Lors d'une immunodépression, en particulier au cours de l'infection VIH, la réactivation des bradyzoïtes

contenus dans les kystes toxoplasmiques latents est responsable d'une toxoplasmose cérébrale. Ce processus montre l'implication de la réaction immunitaire cellulaire et de ses médiateurs immuns dans le contrôle de l'infection toxoplasmique latente.

Parmi les facteurs parasitaires, le génotype a aussi un rôle dans l'influence de l'évolution de l'infection toxoplasmique. Les souches de type I sont associées à une forte virulence chez les souris alors que celles de type II ou III sont considérées comme avirulentes pour la souris. Les tachyzoïtes du type I ont la capacité de traverser les barrières épithéliales et atteignent les sites immunoprivilégiés plus rapidement que les souches de type II. Chez l'homme, plusieurs études ont rapporté des toxoplasmoses acquises graves dues à des souches atypiques chez des personnes immunocompétentes. Une surreprésentation d'autres souches atypiques a été observée chez les patients atteints d'une toxoplasmose oculaire. L'influence de la souche parasitaire sur le développement de l'infection ou de la pathologie cérébrale reste cependant méconnue.

Les mécanismes par lesquels *T. gondii* peut moduler les réponses de l'hôte (immunitaires et apoptotiques) lors du développement d'une toxoplasmose cérébrale ont été bien étudiés dans le modèle murin mais beaucoup moins chez l'homme. Dans le premier chapitre de cette thèse nous nous sommes intéressés à étudier la cinétique des médiateurs immuns et de la charge parasitaire lors des premières 48 heures de l'infection des cellules nerveuses humaines par deux types de souches de *T. gondii*. Les résultats de cette première étude n'ont pas montré une production de l'IFN- γ dans les cellules humaines testées. Comme cette cytokine a un rôle majeur dans le contrôle de l'infection toxoplasmique cérébrale dans le modèle murin, nous avons voulu identifier son rôle dans les cellules nerveuses humaines infectées par le toxoplasme. Ces cellules nerveuses humaines ont été stimulées par l'IFN- γ avant d'être infectées afin de déterminer l'effet de cette cytokine sur la production des médiateurs immuns et sur la prolifération parasitaire. En plus de la réaction immunitaire, dans un deuxième chapitre, nous avons étudié les mécanismes apoptotiques activés ou inhibés dans les cellules nerveuses humaines infectées par deux souches de *T. gondii*.

II. Revue de littérature sur *Toxoplasma gondii* et la réponse immunitaire

II.1 *Toxoplasma gondii*

II.1.1 Historique

La toxoplasmose est une infection causée par le parasite *Toxoplasma gondii* (pour toxo = arc et plasma = vie). Ce parasite a été mis en évidence par Nicolle et Manceaux en 1908 dans les tissus du rongeur, *Ctenodactylus gundi* (Figure 1) à l'Institut Pasteur de Tunis. La même année, Splendore a découvert le même parasite dans les tissus de lapin au Brésil (Quinn and McCraw, 1972).

T. gondii a ensuite été mis en évidence dans de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux à travers le monde et également chez l'homme. En 1923, *T. gondii* a été retrouvé dans la rétine d'un enfant qui présentait une hydrocéphalie, mais le rôle pathogène du parasite dans le modèle humain n'était pas encore identifié (Quinn and McCraw, 1972). En 1950 Wolf et Cowen ont décrit la toxoplasmose congénitale chez l'homme (Cowen and Wolf, 1950).



Figure 1 : *Ctenodactylus gundi*

(<http://www.zoochat.com/160/common-gundi-ctenodactylus-gundi-229099/>).

II.1.2 Morphologie et formes évolutives de *T. gondii*

II. 1. 2. 1 Tachyzoïte

Le tachyzoïte est la forme végétative qui caractérise la phase de la multiplication rapide de l'infection toxoplasmique. Après la primo-infection le tachyzoïte se dissémine via la circulation sanguine afin d'infecter les différents organes tels que la rate, les muscles, la rétine et le cerveau. Cette forme végétative se présente sous la forme d'un croissant mesurant

environ 6 μm de long sur 2 μm de large, avec une extrémité antérieure effilée et postérieure arrondie. Le tachyzoïte est recouvert par une paroi pelliculaire recouvrant une structure microtubulaire. Il contient un anneau polaire, un conoïde, des rhoptries, des granules denses, des micronèmes, des mitochondries, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des ribosomes, des micropores, un apicoplaste et un noyau. Le noyau est généralement situé vers l'extrémité postérieure ou dans la zone centrale de la cellule. La chromatine est distribuée dans tout le noyau et le nucléole (Dubey et al., 1998) (Figure 2). Le tachyzoïte se multiplie dans les cellules nucléées de l'hôte par un processus de multiplication asexuée appelée endodyogénie. Ce processus a lieu au sein d'une vacuole parasitophore (VP), aboutissant ainsi à la formation d'une structure en rosette. Le tachyzoïte n'intervient pas dans la contamination orale, car c'est un organisme très fragile rapidement détruit par l'acidité gastrique (Dubey et al., 1998).

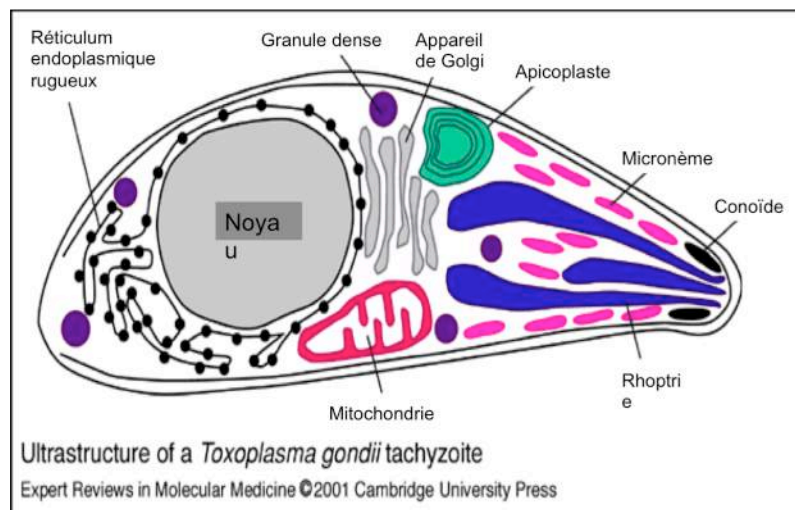


Figure 2: L'ultrastructure d'un tachyzoïte de *T. gondii*

(http://www.phsource.us/PH/HELM/PH_Parasites/toxoplasmosis.htm).

II. 1. 2. 2 Bradyzoïtes et kystes

Le terme bradyzoïte (brady = lent) a été proposé par Frenkel en 1973 pour décrire le stade enkysté dans les tissus (Dubey et al., 1998). Les bradyzoïtes se caractérisent par une multiplication lente, marquant la phase chronique de l'infection toxoplasmique. Au cours de ce stade, les kystes persistent essentiellement dans les tissus cardiaques, musculaires, rétinien

et le système nerveux central (SNC). Ils ont une forme sphérique mesurant de 10 à 200 μm de diamètre renfermant plusieurs centaines à milliers de bradyzoïtes (Figure 3). Le bradyzoïte résulte de l'évolution d'un tachyzoïte. Il s'en distingue par une taille plus petite et une forme plus mince, des rhoptries plus denses, un noyau sub-terminal et des granules de stockage d'amylopectine (Dubey et al., 1998) (Figure 4). La paroi du kyste est détruite par la pepsine ou la trypsine, mais les bradyzoïtes sont résistants à cette digestion. Ceci explique leur rôle dans la contamination orale (Jacobs et al., 1960). Les kystes tissulaires jouent un rôle important dans le cycle de vie de *T. gondii* car les hôtes carnivores peuvent être infectés par l'ingestion de viande infectée.

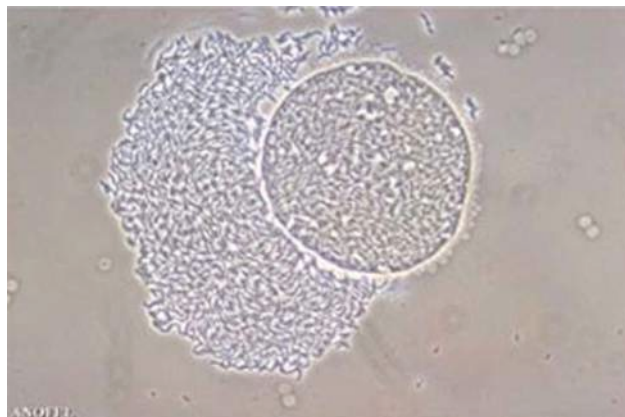


Figure 3: Bradyzoïtes et kyste de *T. gondii* : rupture de la paroi et libération des bradyzoïtes sous l'action de la trypsine (x100) (AFSAA, 2005).

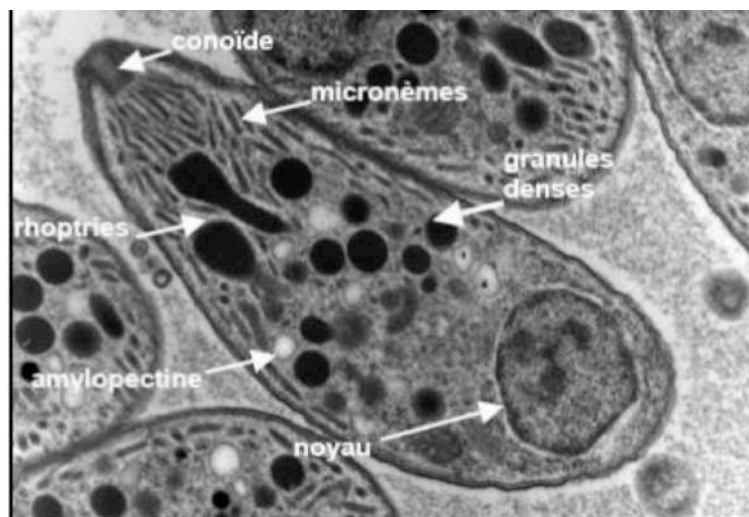


Figure 4: Ultrastructure d'un bradyzoïte (AFSAA, 2005).

II. 1. 2. 3 Sporozoïtes et oocystes

L'oocyste a une forme ovoïde mesurant environ 14 μm de long et 9 μm de large. Il est éliminé dans les fèces du chat sous forme non sporulé (immature). Il subit une maturation dans le milieu extérieur en se divisant en deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes infectieux (Figure 5). L'oocyste sporulé (mature) est résistant aux conditions extérieures grâce à la structure complexe de sa paroi. Elle est constituée de couches distinctes, extrêmement résistantes aux agressions physiques et chimiques (Speer et al., 1998). Ceci va favoriser ainsi la contamination de l'hôte intermédiaire.

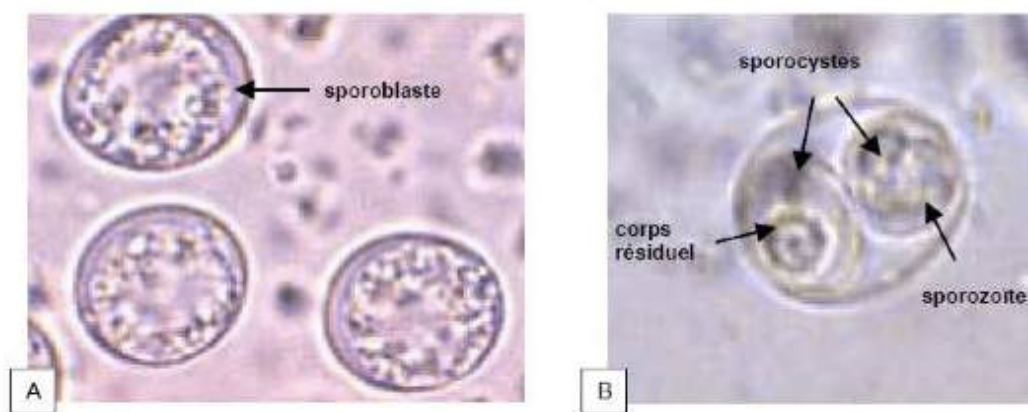


Figure 5: Oocystes de *T. gondii*, A. non sporulé et B. sporulé (AFSSA, 2005).

II.1.3 Cycle biologique de *T. gondii*

Le cycle de vie de *T. gondii* est complexe, caractérisé par un cycle sexué et asexué. Le cycle de vie sexué n'a lieu que chez les félinés (chats), hôtes définitifs du parasite. Le cycle de vie asexué se déroule à l'intérieur de toutes les cellules des mammifères ou des oiseaux (Dubey et al., 1998) (Figure 6).

Durant la phase sexué, les gamètes sont formés dans l'épithélium intestinal du chat. Les oocystes non sporulés sont libérés dans la lumière intestinale et passent dans l'environnement avec les fèces. La sporogonie se produit à l'extérieur de l'hôte et conduit au développement de deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes (Jackson and Hutchison, 1989; Tenter et al., 2000). La phase asexuée s'effectue chez les animaux à sang chaud et les oiseaux. Selon le stade de l'infection, aiguë ou chronique, les éléments asexués

sont constitués de deux phases distinctes : les tachyzoïtes qui se caractérisent par une croissance rapide et les bradyzoïtes qui se caractérisent par une croissance lente (Black and Boothroyd, 2000). *Toxoplasma gondii* peut pénétrer chez l'hôte sous la forme d'un oocyste ou d'un kyste tissulaire. Les oocystes ou les kystes ingérés libèrent respectivement des sporozoïtes ou des bradyzoïtes dans l'intestin grêle. Les sporozoïtes ou les bradyzoïtes infectent l'épithélium intestinal et se différencient en tachyzoïtes qui diffusent ensuite dans l'organisme via les monocytes et les macrophages (Sumyuen et al., 1995) (Figure 7). Afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes au sein du kyste à l'intérieur de la cellule hôte (Figure 7) (Gross and Bohne, 1994).

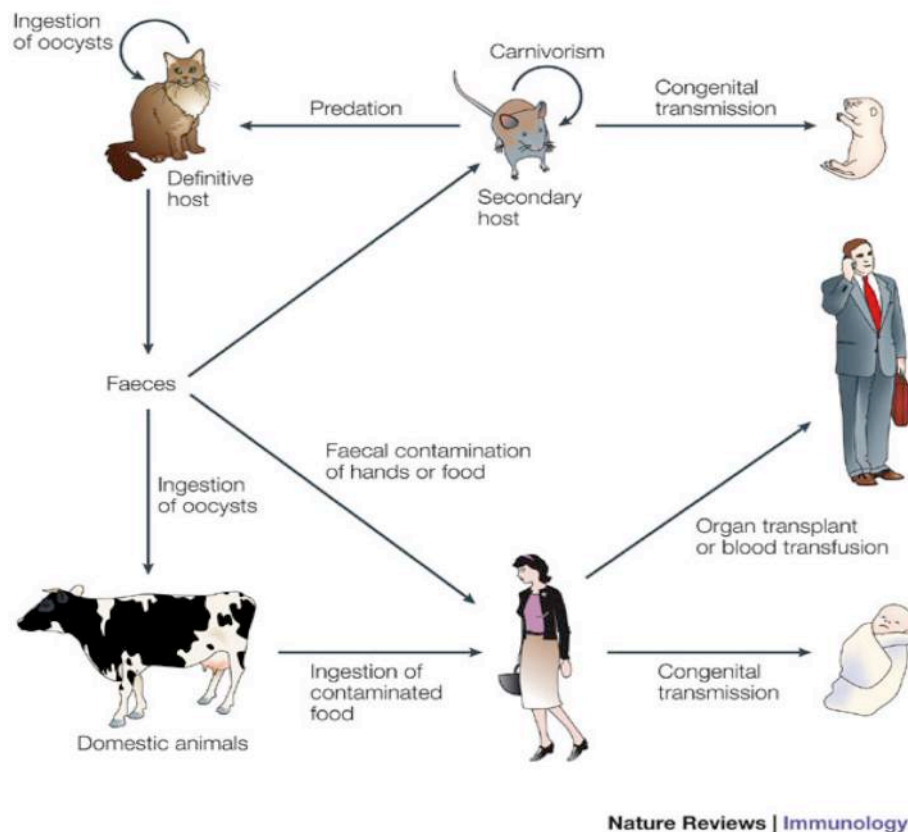


Figure 6: Cycle de vie de *T. gondii* et les différentes sources de contamination d'origine alimentaire et environnementale (Aliberti, 2005).

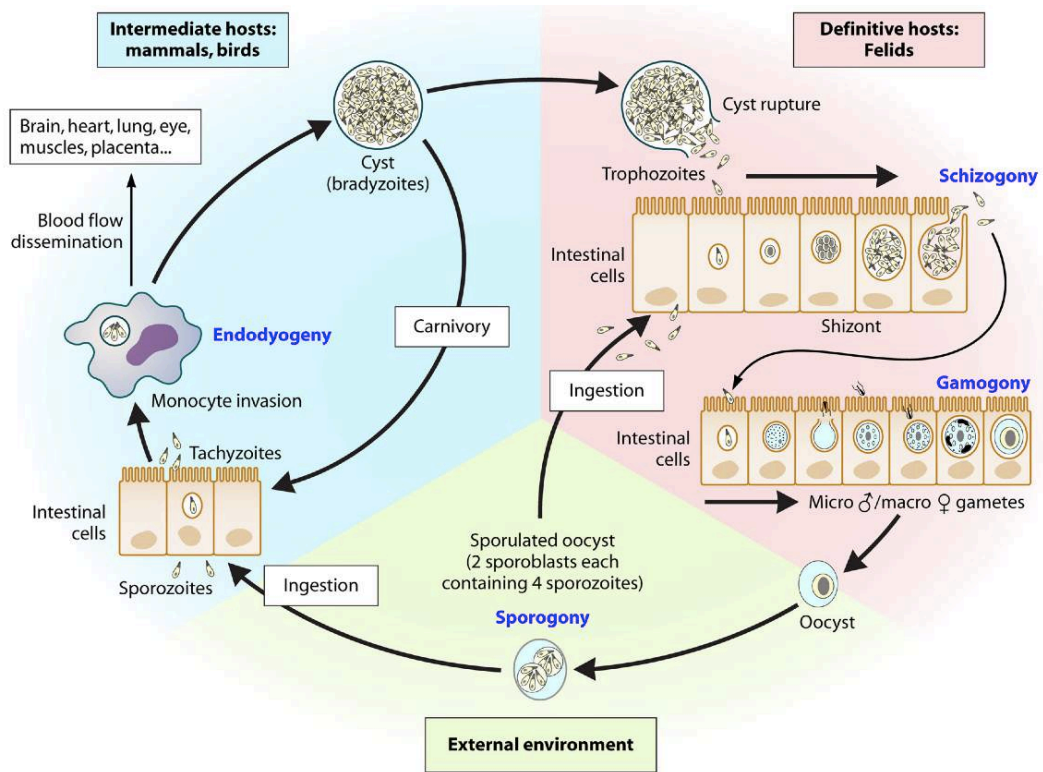


Figure 7: Les étapes de l'infection et de la multiplication de *T. gondii* durant les trois stades infectieux chez leurs hôtes (Robert-Gangneux and Darde, 2012).

II.2 La biodiversité de *T. gondii*

II.2.1 Techniques d'étude

Avant le séquençage du génome de *T. gondii*, l'analyse des isoenzymes fut la première méthode d'étude de la diversité des souches. Six systèmes enzymatiques ont permis la description de 12 zymodèmes (Darde et al., 1988) (Darde et al., 1992) (Darde, 1996). La majorité des isolats toxoplasmiques étudiés était regroupée en trois principaux zymodèmes Z1, Z2 et Z3. Ces trois zymodèmes ont ensuite été démontrés comme correspondant aux trois lignées clonales principales définies par d'autres méthodes d'analyse : type I, type II et type III (Howe and Sibley, 1994) (Darde, 1996). D'autres zymodèmes représentés par des isolats uniques ont été définis par la suite comme des souches atypiques.

Après l'identification de la séquence de *T. gondii* (Ajioka et al., 1998) (Manger et al., 1998), un large éventail de marqueurs génétiques polymorphes a été déterminé (Ajzenberg et al., 2010).

- Les marqueurs SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sont des mutations ponctuelles dans le génome pouvant entraîner l'apparition ou la disparition d'un site de restriction. Ceci leur permet d'être étudiés par la technique de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Sibley and Boothroyd, 1992) (Howe and Sibley, 1995) (Howe et al., 1997) (Su et al., 2006). Khan et al., ont identifié 250 marqueurs SNP (Khan et al., 2005), mais seulement 9 à 11 marqueurs sont utilisés habituellement pour le typage des isolats de *T. gondii* (Su et al., 2006).
- Le séquençage multilocus MLST (Multilocus Sequence Typing) est la technique optimale pour le typage des isolats. Elle a été utilisée essentiellement dans des analyses phylogénétiques (Lehmann et al., 2000) (Sibley and Ajioka, 2008) (Su et al., 2012) ; mais en raison de son coût et de ses contraintes techniques, elle est très peu utilisée dans les études épidémiologiques.
- Les séquences microsatellites sont des marqueurs plus polymorphes que les SNPs détectés par PCR-RFLP. Ces séquences sont de courtes répétitions en tandem de deux à six nucléotides. Elles sont connues pour être hypervariables, car elles se caractérisent par une accumulation de mutations engendrées par l'enzyme polymérase pendant la réplication. Elles sont bien adaptées à l'identification individuelle des isolats et ont une plus grande

résolution dans les études de génétique des populations. À ce jour, 15 microsatellites localisés sur 10 chromosomes de *T. gondii* sont utilisés (Ajzenberg et al., 2010).

De la multiplicité des outils utilisés a résulté une diversité de dénomination des génotypes et des groupes génétiques selon les équipes de recherche. Des efforts ont été faits pour remplacer les données provenant de ces différentes techniques afin d'aboutir à un regroupement des génotypes utiles pour des études cliniques et fondamentales (Su et al., 2012).

II.2.2 Haplogroupes de *T. gondii*

Les premières études cherchant à définir la structure de la population de *T. gondii* ont conclu à une faible diversité génétique et à une structure simple faite de 3 types clonaux principaux, les types I, II et III. Ces études initiales ont été conduites essentiellement sur des isolats originaires d'Europe ou des Etas Unis.

Le génotypage d'un grand nombre d'isolats de tous les continents associant des marqueurs de PCR-RFLP, le séquençage d'introns et les marqueurs microsatellites a révélé une structure beaucoup plus complexe de la population de *T. gondii*. Le regroupement génétique des nombreux génotypes définis par ces marqueurs a abouti à la description de 15 haplogroupes (Su et al., 2012). Au sein des haplogroupes 1, 2 et 3, on retrouve respectivement les types I, II et III correspondant aux 3 principales lignées clonales décrites initialement. Les autres haplogroupes regroupent des génotypes dont certains correspondent à de nouvelles lignées clonales retrouvées sur plusieurs continents (Su et al., 2012) (Mercier et al., 2011). La diversité maximale est observée sur le continent sud-américain. Les souches les plus divergentes sont retrouvées en forêt amazonienne en Guyane Française (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des haplogroupes dans le monde.

| Continents | Haplogroupes retrouvés | Remarques |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|
| Europe | 2++,3 | HG1 (type I) : absent. |
| Amérique du Nord | 2, 3, 12, 1 | HG1 (type I) : rare. |
| Amérique centrale et du Sud | 6, 9, 14, 3, 4, 8, 1,2 5, 10, 15 | HG 5-10 :+++ Amazonie. |
| Afrique tropicale | 6, 14, 3 | H 6 (<i>Africa 1</i>) et HG 14 (<i>Africa 3</i>) : Amérique du Sud |
| Asie | 13, 3, 1, 2 | HG 13 (<i>Chinese 1</i>) : Asie + Amérique. |

II.2.3 Génotype et virulence

Des caractéristiques biologiques ont été associées aux groupes génétiques. La principale caractéristique ayant permis une classification des souches est la virulence expérimentale. Les souches virulentes chez la souris présentent plusieurs propriétés qui peuvent expliquer la diffusion rapide du parasite et le nombre des tissus envahis par ce dernier. Ceci pourrait être déterminé dans l'hôte via la migration rapide du parasite à travers l'épithélium ou à travers la matrice extracellulaire (Barragan and Sibley, 2002) et en culture cellulaire via le taux de multiplication parasitaire élevé et le faible taux de conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Saeij et al., 2005). Ces caractéristiques, en particulier la virulence expérimentale dans le modèle murin, sont bien définies pour les 3 types de souches initialement décrits.

Le type I est très virulent chez la souris, la dose létale (DL) DL90 est <10 chez les souris. La multiplication *in vitro* est trois fois plus rapide que celle des souches de type II et III (Boothroyd and Grigg, 2002). En revanche, les souches de type I sont non virulentes chez le rat et peuvent être complètement éliminées par leur système immunitaire chez certaines souches de rat (Cavailles et al., 2006) (Li et al., 2012). Parmi les souches de type I, la souche

RH, isolée en 1939 d'un patient aux Etats Unis, fait office de souche de référence pour la plupart des études expérimentales et génétiques (Sabin, 1941). D'autres souches de type I isolées à partir d'animaux et d'humains conservent le même profil de virulence chez la souris, par exemple : GT1, VEL (Howe and Sibley, 1995). Chez l'homme l'isolement de souches de type I reste cependant un évènement rare (Ajzenberg, 2010).

Le type II correspond à des souches non virulentes chez la souris (DL100=10³). Elles sont responsables d'une infection toxoplasmique chronique chez la souris, induisant la persistance des kystes tissulaires dans les muscles et le cerveau. En Europe et en Amérique du Nord, elles sont à l'origine de la plupart des infections chez l'homme et chez les animaux domestiques (Howe and Sibley, 1994) (Gross et al., 1997). En France, elles sont responsables de la majorité des cas de toxoplasmose congénitale ou oculaire (Darde et al., 1992) (Ajzenberg et al., 2002) (Fekkar et al., 2011).

Les souches de type III sont de virulence variable. Elles peuvent être non virulentes chez la souris causant une infection chronique similaire à celle du type II, ou présenter une virulence intermédiaire entraînant une toxoplasmose subaiguë avec une mort de la souris 10 à 30 jours après une inoculation orale.

Les isolats des souches atypiques varient d'un profil très virulent, intermédiaire ou non virulent, en fonction des différences dans la combinaison de gènes qu'ils présentent (Grigg and Suzuki, 2003) (Saeij et al., 2005) (Darde, 2008). Généralement, les génotypes avec une majorité d'allèles de type I sont les plus virulents (Mercier et al., 2010).

L'expression de la virulence chez les humains est un phénomène complexe en raison de beaucoup d'autres facteurs qui peuvent influencer le pouvoir pathogène des souches de *T. gondii*. En effet, l'expression de la pathogénicité est le résultat de l'interaction de facteurs parasitaires comme le stade infectieux, l'inoculum et le patrimoine génétique de la souche et de facteurs d'hôte comme le statut immunitaire ou des facteurs génétiques de l'hôte (Maubon et al., 2008). Toute analyse de la relation entre le génotype et la pathogénicité doit tenir compte de ces différents facteurs. Ceci explique pourquoi la relation entre la souche et le rôle pathogène chez l'homme n'est pas encore élucidée.

La gravité de l'infection humaine peut dépendre du génotype de la souche de *T. gondii*. Elle est faible dans les pays d'Europe occidentale et d'Amérique du Nord, où les souches de type II prédominent (Howe and Sibley, 1995). En revanche, l'infection toxoplasmique,

congénitale ou acquise est plus sévère en Amérique du Sud, avec notamment des atteintes oculaires plus fréquentes et plus sévères (Gilbert et al., 2008) (Pfaff et al., 2014). Des cas de toxoplasmoses graves, multiviscérales chez des patients immunocompétents en Guyane (Carne et al., 2002) et au Surinam (Demar et al., 2007) ont été associés à des souches atypiques « Amazoniennes » acquises par consommation de gibier ou ingestion d'eau de surface en Guyane Française.

Cependant, chez l'homme, le même type de souche peut être responsable de différents rôles pathogènes. Ainsi, les souches de type II sont impliquées dans 96 % des cas de toxoplasmose congénitale asymptomatiques ou sévères en France (Ajzenberg et al., 2002), dans 85 % des toxoplasmoses des patients immunodéprimés ayant contracté l'infection en Europe (Ajzenberg et al., 2009) et dans 73 % des cas de maladie oculaire en France (Fekkar et al., 2011), mais elles sont aussi retrouvées chez des patients asymptomatiques comme le montrent les études de sérotypage (Morisset et al., 2008). L'étude réalisée chez 85 patients immunodéprimés (VIH et non VIH) a mis en évidence que, dans ce contexte, le génotype de la souche infectante n'a pas d'effet sur la manifestation clinique (Ajzenberg et al., 2009), indiquant le rôle majeur du statut immunitaire sur l'expression de la virulence des souches de *T. gondii*. Chez ces patients, il n'a pas été retrouvé en particulier de distribution différente entre type II et non-II selon que la symptomatologie était cérébrale ou extracérébrale.

II. 3 Déroulement de l'infection cellulaire par *T. gondii* et les protéines impliquées dans la virulence

Toxoplasma gondii a la capacité d'envahir une grande variété de cellules hôtes. Il pénètre dans les cellules par un processus de pénétration actif qui ne dépend pas de la réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte (Dobrowolski and Sibley, 1996). Ce processus étant actif, il s'appuie sur la mobilité du parasite et la sécrétion séquentielle de protéines parasitaires à partir des organites sécrétoires : les micronèmes (protéines MIC), les rhoptries (protéines ROP et RON) et les protéines de granules denses (protéines GRA) (Sharma and Chitnis, 2013). Les différentes étapes de l'infection cellulaire, et par là même les protéines qui y participent, sont impliquées dans l'expression de la virulence parasitaire (Besteiro et al., 2011). Le polymorphisme de certains gènes impliqués dans ces fonctions pourrait expliquer les différences de virulence entre les souches. La mise en évidence du rôle

de ces gènes polymorphes a été facilité par des croisements expérimentaux chez le chat entre les différentes souches de *T. gondii* (Saeij et al., 2006) (Taylor et al., 2006) (Reese et al., 2011).

II.3.1 L'attachement et la pénétration intracellulaire

II.3.1.1 L'attachement initial

Les protéines SAGs sont des antigènes de surface de *T. gondii*, appartenant à la famille des SRS (SAG1 related sequence) (Lekutis et al., 2001). Elles jouent un rôle essentiel dans l'adhésion de la cellule hôte et l'invasion (Figure 8) (Grimwood and Smith, 1992) (Mineo et al., 1993) (Robinson et al., 2004). Les protéines SAGs établissent des liaisons réversibles, latérales et de faible affinité avec la cellule hôte. L'attachement initial des parasites aux cellules hôtes est établi particulièrement par une liaison de SAG3 aux glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface cellulaire (Carruthers and Boothroyd, 2007).

II.3.1.2 L'attachement apical

L'attachement à la membrane de la cellule hôte est une condition préalable à l'invasion assurée par les protéines de micronèmes (MIC) (Cowper et al., 2012). Les protéines MIC (MIC1, MIC2, MIC3 et MIC4) sont associées en complexe à la membrane parasitaire après leur sécrétion. Elles relient le système actine-myosine du parasite à la surface de la cellule hôte, facilitant ainsi l'entrée du parasite dans la cellule (Hager and Carruthers, 2008). Ce processus est appelé «la motilité» (Figure 8). MIC3 reste associé à la surface apicale du parasite pour médier l'attachement en se liant au récepteur de croissance épidermique (EGF) de la cellule hôte cible (Carruthers and Boothroyd, 2007) (Sharma and Chitnis, 2013).

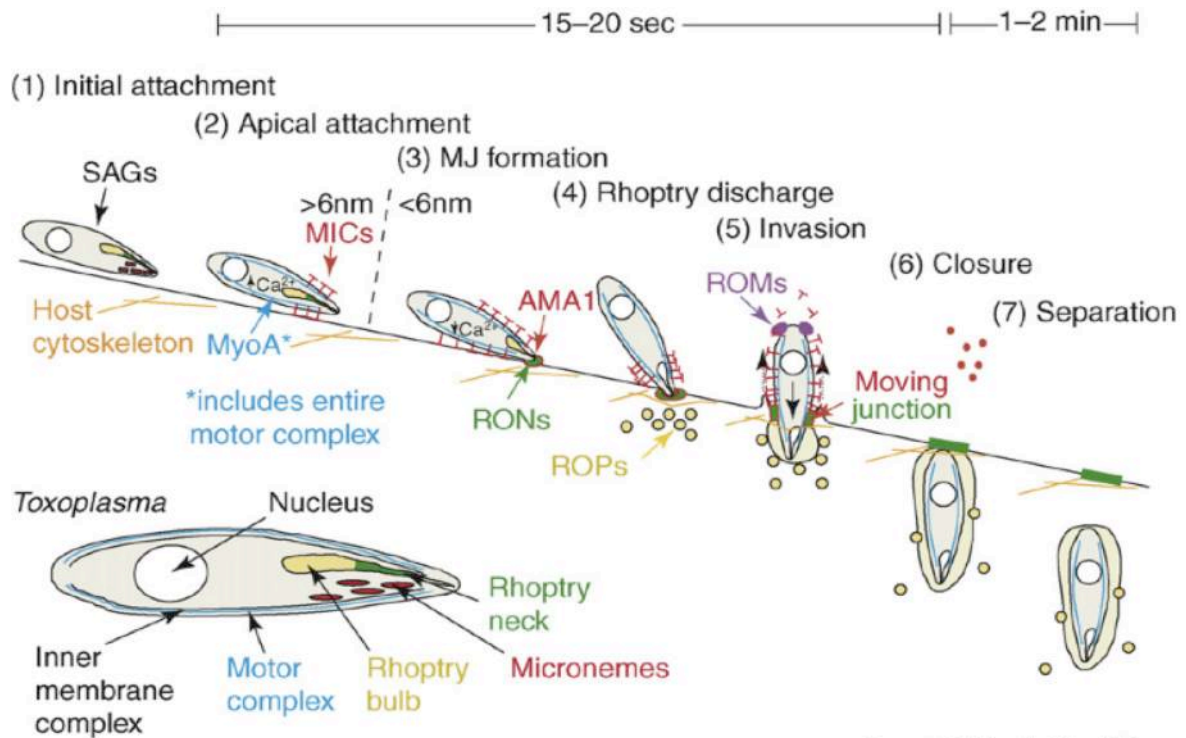


Figure 8: Les étapes du processus de l'invasion de *T. gondii*. (1) Suite à l'engagement initial avec la surface des cellules via des protéines telles que SAG1, les parasites se réorientent et s'attachent (2). Au début de l'invasion, les micronèmes (rouge) sont sécrétées, forment la jonction mobile pour stabiliser les interactions entre le parasite et la cellule (3). Les rhoptries (vert) sont sécrétées lors de la pénétration du parasite, soit vers la localisation de la vacuole parasitophore (VP), ou dans le cytoplasme de l'hôte (4, 5). L'internalisation du parasite (6) conduit à l'achèvement de la VP, les protéines de granules denses qui sont sécrétées vont maintenir la croissance et la reproduction du parasite à l'intérieur de la cellule (7). Le complexe apical contenant les micronèmes, les rhoptries, les granules denses et le complexe du moteur est représenté en bas à gauche (Carruthers and Boothroyd, 2007).

II.3.2 La pénétration intracellulaire et la formation de la vacuole parasitophore

L'entrée du parasite dans la cellule hôte est un processus actif et rapide (15 à 30 s) distinct des événements d'endocytose (Figure 8). Le toxoplasme forme une liaison étanche entre son extrémité apicale et la membrane de la cellule hôte, appelée « la jonction mobile ». Cette dernière se déplace à partir de l'extrémité apicale à l'extrémité postérieure du parasite, ce qui conduit à l'internalisation du parasite dans une VP. La création de cette jonction autour du parasite nécessite la distribution d'un antigène de la membrane apicale (AMA1) sur toute la surface du parasite (Dubremetz, 2007) (Figure 8). Après la fixation initiale du parasite sur la cellule hôte, les protéines de rhoptries, ROPs et RONs (Rhoptry-Neck, protéines de la partie effilée des rhoptries), sont libérées par le parasite (Mital et al., 2005). L'ensemble AMA1, RON2 et RON4 et les ROPs forme la jonction mobile (Figure 8).

La formation de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) nécessite la sécrétion de protéines de rhoptries (Figure 8) (Figure 9) (Dubremetz, 2007). La libération des protéines ROPs est régulée par le Ca^{2+} endogène phospholipase-dépendant (Saffer and Schwartzman, 1991). Les protéines ROPs ont des rôles parasitaires différents ; ROP2 et ROP4 sont impliquées dans l'acquisition de la lactoferrine de l'hôte (Dziadek et al., 2007). ROP18 est associée à la face cytosolique de la MVP. Elle exerce une activité de protéine kinase, ce qui lui permet d'être impliquée dans le contrôle de la croissance du parasite et de sa virulence (El Hajj et al., 2007) (Figure 9). La protéine ROP16 a un effet sur l'expression des gènes de l'hôte, ce qui pourrait réguler l'expression de différents médiateurs immunitaires (Laliberte and Carruthers, 2008) (Figure 9).

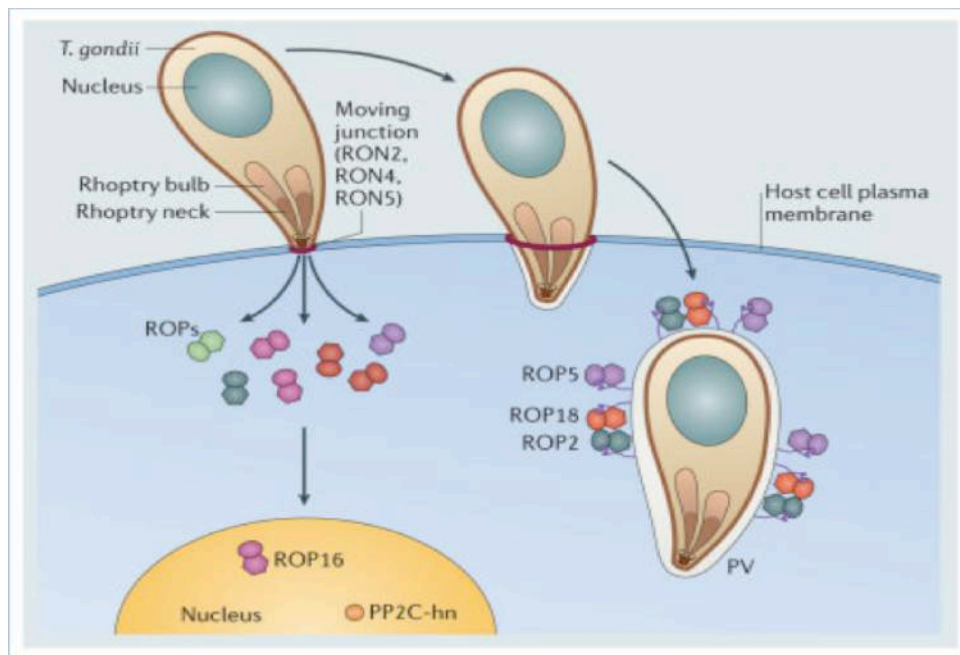


Figure 9: Représentation schématique des modes d'action des différentes RONS et ROPs de *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012).

Les protéines de granules denses (GRA) contribuent également à la formation de la MVP pendant la première heure après l'invasion. Elles sont libérées pendant ou après l'invasion du parasite dans la cellule hôte. Ces protéines contribuent à former le réseau intra-vacuolaire des tubules membranaires dans la lumière de la VP (Mercier et al., 2005). Les GRA 3 et GRA 5 sont distribuées sur la membrane vacuolaire. Les GRA 1, GRA 2, GRA 4 et GRA 6 sont distribuées sur le réseau intravasculaire (Sibley et al., 1995). Ainsi, les GRA qui sont libérées dans la VP peuvent aider le parasite à se reproduire et à échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Ce réseau aurait un rôle dans le développement des échanges entre le parasite et la cellule hôte.

II.3.3 La multiplication au sein de la cellule et la sortie hors de la cellule

Dans la vacuole parasitophore (VP), les tachyzoïtes se divisent pendant 6 à 9 h, par un processus d'endodyogénie, conduisant à la formation de deux cellules filles au sein de chaque cellule mère. Généralement, entre 64 à 128 parasites peuvent ainsi s'accumuler dans la VP (Black and Boothroyd, 2000). La sortie des parasites de la cellule est un processus actif

dépendant d'une augmentation de la concentration du calcium après la libération des réserves intracellulaires (Sibley, 2010).

II.3.4 La conversion de tachyzoïtes en bradyzoïtes

La conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes a été étudiée principalement chez la souris. En effet, 12 à 15 jours après l'infection des souris par voie orale, des lésions cérébrales ont été observées. Initialement, les lésions sont causées par des tachyzoïtes extracellulaires et intracellulaires situés dans des VPs ; seule une sous-population de tachyzoïtes est capable d'initier directement la formation des kystes tissulaires. Ces tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes alors que la paroi de la VP se transforme en paroi kystique à l'intérieur de la cellule hôte. Les bradyzoïtes se divisent et les kystes tissulaires s'agrandissent. Pendant ce développement précoce, la paroi kystique subit des modifications. Dans le kyste tissulaire précoce, les bradyzoïtes ont encore des caractéristiques ultrastructurales similaires aux tachyzoïtes, en particulier des rhoptries alvéolées (Dubey et al., 1998) mais ils expriment en plus des marqueurs spécifiques des bradyzoïtes (BAG1 , ENO1 , LDH2) (Sullivan and Jeffers, 2012). La conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes a été décrite pour la première fois *in vitro* dans des astrocytes (Jones et al., 1986). Cette conversion et la formation des kystes sont favorisées *in vitro* par des variations de facteurs physico-chimiques dans le système de culture (changements de pH, de concentration en oxygène, de température). Dans certaines études *in vitro*, le processus de formation d'un kyste à partir du moment où le parasite est entré dans la cellule hôte est similaire à celui observé *In vivo* (Soete et al., 1994).

II. 4 La toxoplasmose humaine

II.4.1 Epidémiologie

Environ un tiers de la population humaine mondiale est infectée par le toxoplasme (Montoya et al., 2001), ce qui fait de la toxoplasmose la zoonose la plus fréquente. La prévalence varie de 10 à 80 %, selon les régions et selon les différentes communautés d'une même région (Pappas et al., 2009). Une faible séroprévalence d'environ 10 à 30 % a été rapportée en Amérique du Nord, en Asie du Sud-Est, en Europe du Nord et dans les pays sahéliens de l'Afrique. Une prévalence modérée d'environ 30 à 50 % a été observée dans les pays d'Europe centrale et méridionale. Les prévalences élevées ont été essentiellement identifiées en Amérique latine et dans les pays d'Afrique tropicale (AFSSA, 2005).

La séroprévalence de la toxoplasmose humaine peut être influencée par de nombreux facteurs. Au cours du cycle évolutif de *T. gondii*, les facteurs climatiques sont essentiels à la survie des oocystes, favorisant ou non leur sporulation et leur maturation dans le milieu environnemental, ce qui va induire l'infection des animaux producteurs de viande. Des prévalences plus élevées sont classiquement observées dans les pays tropicaux caractérisés par un climat humide et chaud. Inversement, les prévalences sont souvent plus faibles (< 30 %) dans les pays arides et froids (AFSSA, 2005). D'autre part, les facteurs anthropiques (habitudes alimentaires, degré d'hygiène) expliquent une grande partie des variations de la séroprévalence chez l'homme. La séroprévalence maximale peut être atteinte dès l'enfance dans les populations confrontées à de mauvaises conditions d'hygiène, probablement en lien avec la contamination tellurique ou hydrique par ingestion d'oocystes (Jones and Dubey, 2010). Ces différents modes d'infection par *T. gondii* dépendent des niveaux socio-économiques y compris au sein des pays développés (Dubey and Jones, 2008) avec la consommation de la viande crue de mouton et de bœuf et des crudités infectés (Baril et al., 1999) (Halos et al., 2010). En 2011, 3 infections toxoplasmiques sévères (dont deux toxoplasmoses congénitales) étaient dues à des souches atypiques virulentes probablement liées à l'ingestion de viande de cheval infectée et importée du Brésil et du Canada (Pomares et al., 2011).

II.4.2 Les différents aspects de la toxoplasmose humaine

II.4.2.1 La toxoplasmose chez l'immunocompétent

Elle est généralement bénigne et asymptomatique dans plus de 80 % des cas dans les pays européens ou en Amérique du Nord (Montoya and Liesenfeld, 2004). Les syndromes classiques de la toxoplasmose aiguë chez l'immunocompétent sont semblables à ceux de la mononucléose infectieuse, caractérisés par : une fièvre (15 à 20 %) (Ekman et al., 2012), une asthénie (45 à 81 %) et une adénopathie (69 à 81 %) (Bottieau et al., 2006) (Durlach et al., 2003). Plus rarement des atteintes oculaires ou des formes multiviscérales graves ont été décrites (Montoya and Liesenfeld, 2004) (Carme et al., 2009), en lien avec des souches atypiques, d'origine sud-américaine (Sepulveda-Arias et al., 2014) (Sobanski et al., 2013).

II.4.2.2 La toxoplasmose chez l'immunodéprimé

Le statut immunitaire de l'hôte est d'importance primordiale dans l'infection toxoplasmique. Cette infection est opportuniste chez les personnes immunodéprimées, quelle que soit la souche infectante. L'altération de l'immunité cellulaire causée par une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou suite aux traitements immunosuppresseurs conduit à une toxoplasmose sévère. Le mécanisme résulte généralement de la réactivation d'une infection toxoplasmique latente (Botterel et al., 2002) (Rogers et al., 2008) (Martina et al., 2011). Le risque est étroitement lié à la durée et au degré d'immunodépression. Dans le cas d'une greffe d'organe solide, il s'agit plus souvent d'une transmission de kystes du donneur au receveur (Roemer et al., 2001) (Derouin and Pelloux, 2008). Chez les patients infectés par le VIH, l'incidence de la toxoplasmose est étroitement liée aux taux de lymphocytes T CD4⁺, avec un risque accru lorsque le nombre est inférieur à 100 cellules/ μ L. L'encéphalite toxoplasmique est la manifestation clinique la plus fréquente chez ces patients. Elle est mortelle en absence de traitement (Abgrall et al., 2001). Le traitement antirétroviral hautement actif (HAART) a permis de réduire l'incidence de l'encéphalite toxoplasmique chez les patients VIH positifs (Lejeune et al., 2011). Après le cerveau, les organes les plus fréquemment touchés sont: les poumons (Rabaud et al., 1996), les yeux et le cœur. Toutefois, *T. gondii* a aussi été isolé à partir de nombreux autres organes tels que le pancréas (Hofman et al., 1993), le foie, la moelle osseuse, la vessie, les ganglions lymphatiques, les reins, la rate et la peau (Rabaud et al., 1994) (Arnold et al., 1997).

II.4.2.3 La toxoplasmose congénitale

En France, la séroprévalence de l'infection toxoplasmique a été estimée à 82 % dans les années 60, à 66 % dans les années 80 et à 44 % en 2003. Dans 75 % des cas de séroconversion, la toxoplasmose est asymptomatique (Villena et al., 2010).

Alors que la primo-infection est souvent asymptomatique chez les femmes enceintes, les tachyzoïtes peuvent traverser le placenta et infecter le fœtus. L'infection du fœtus peut causer une rétinobulbite, une hydrocéphalie associée à un retard mental, des convulsions, voire la mort du fœtus (McAuley, 2008). Le placenta est une barrière efficace au début de la gestation, mais devient plus perméable aux tachyzoïtes pendant la grossesse, ce qui permet le passage du parasite dans environ 30 % des cas pendant le deuxième trimestre et dans 60 à 80 % des cas au cours du troisième trimestre (Robert-Gangneux et al., 2011). La sévérité de l'infection chez le fœtus dépend du stade de la grossesse au cours duquel la femme enceinte acquiert l'infection. Chez 80 % des femmes infectées pendant le troisième trimestre de grossesse, l'infection est asymptomatique (Dunn et al., 1999). Toutefois, lorsque la transmission transplacentaire se produit au cours du premier trimestre, les conséquences sur le développement du fœtus sont sévères, conduisant souvent à des anomalies graves (lésions cérébrales ou oculaires) ou à une fausse couche spontanée. Les lésions oculaires sont également plus sévères en début de grossesse. Elles peuvent provoquer une cataracte, une augmentation de la pression intra-oculaire, un strabisme, une névrite optique, une nécrose rétinienne, une uvéite ou une rétinobulbite (Roberts et al., 2001) (Delair et al., 2011). Au cours du deuxième trimestre, l'infection fœtale se caractérise par une gravité variable. Les examens échographiques peuvent révéler une hépatosplénomégalie ou des calcifications cérébrales. Par ailleurs, lors d'une infection en fin de grossesse, les symptômes sont moins sévères et la majorité des enfants infectés naissent sains. En revanche, ils peuvent présenter une déficience visuelle beaucoup plus tard (rétinobulbites, strabisme, cécité) (Tenter et al., 2000) (Peyron et al., 2011).

II.4.3 Diagnostic

II.4.3.1 Sérologie

La sérologie est la base du diagnostic de l'infection à *T. gondii* en particulier dans les toxoplasmoses du patient immunocompétent. La production d'IgA et d'IgM débute le plus souvent au cours de la première semaine et atteint un plateau au bout d'un mois (Figure 10). Les IgE spécifiques sont également produites pendant la primo-infection, mais elles disparaissent rapidement (Foudrinier et al., 2003). Le taux des IgM spécifiques diminue généralement après 1 à 6 mois pour devenir négatif chez 25 % des patients en moins de 7 mois (Gras et al., 2004). Les IgA spécifiques sont rarement détectées après 9 mois (Nascimento et al., 2008). La synthèse d'IgG débute environ 2 semaines après l'infection et atteint un plateau dans les 2 ou 3 mois. Les anticorps IgG persistent pendant toute la vie à des titres résiduels, très variables selon les patients (Figure 10).

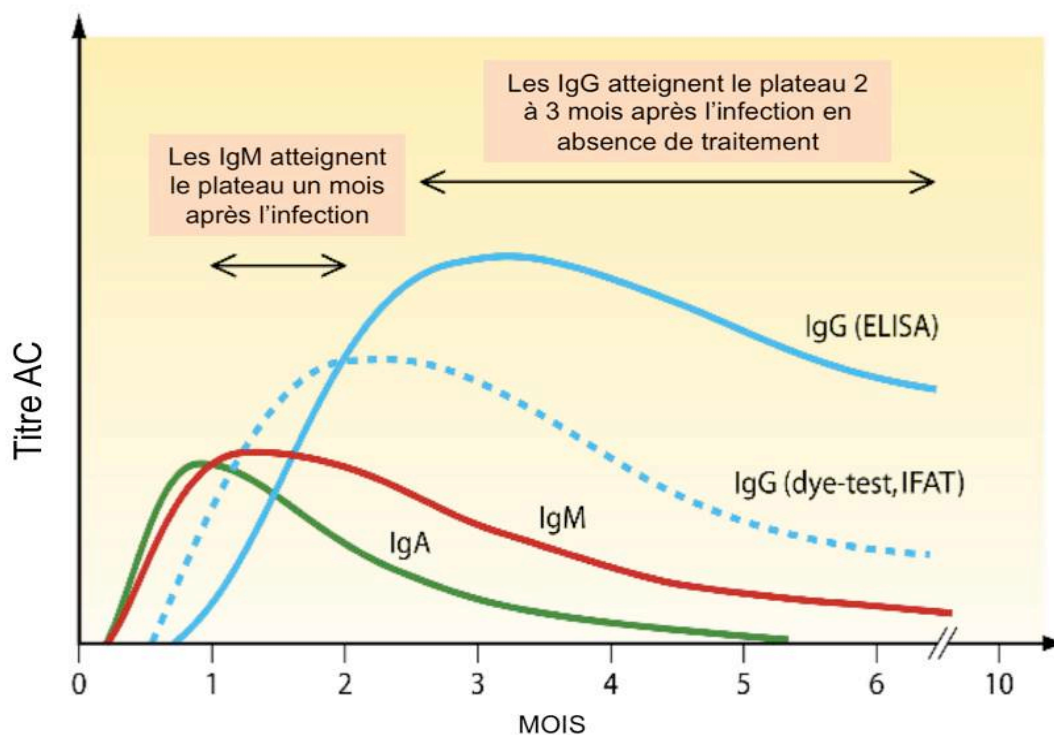


Figure 10: Cinétique de la réponse des anticorps (Ac) durant une infection par *T. gondii* (Robert-Gangneux and Darde, 2012).

II.4.3.2 Diagnostic parasitologique

La visualisation directe du parasite dans les produits pathologiques est rarement possible. La détection de l'ADN de *T. gondii* dans des fluides corporels et les tissus est utilisée pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, oculaire, cérébrale et disséminée (Montoya, 2002). Les gènes B1, P30 et ADNr18 ont été largement utilisés pour détecter l'ADN de *T. gondii* dans une variété de tissus (Jones et al., 2000). Le gène B1 est répété 35 fois dans le génome du parasite (Burg et al., 1989) ; ce qui augmente la sensibilité de la détection de faibles nombres de toxoplasme par PCR (Wastling et al., 1993). Dans les PCR diagnostiques, ce gène tend à être remplacé par un gène de 529 pb répété 200 à 300 fois dans le génome de *T. gondii*. L'utilisation du gène 529 pb a encore augmenté la sensibilité du diagnostic de *T. gondii* par rapport au gène B1 (Edvinsson et al., 2006). L'inoculation à la souris des produits pathologiques reste pratiquée dans des laboratoires de référence. Outre le diagnostic, elle permet l'isolement de la souche pour une meilleure caractérisation.

II.4.4 Traitement

Une fois l'infection diagnostiquée, il n'y a généralement pas besoin de traitement, sauf sur des terrains particuliers ou lors de manifestations symptomatiques (Evengard et al., 1997) (Petersen, 2007). Les traitements les plus actifs reposent sur l'association de sulfamides (sulfadiazine ou sulfadoxine) et de pyriméthamine. Ils sont utilisés dans le traitement des toxoplasmoses congénitales, des toxoplasmoses oculaires et dans les toxoplasmoses des patients immunodéprimés. Les femmes enceintes sont traitées avec la spiramycine dès la détection de l'infection pour limiter le risque de passage transplacentaire du parasite.

Ces divers médicaments ne sont actifs que sur le stade tachyzoïte. Ils permettent donc de lutter contre l'infection aiguë ou la réactivation d'une infection latente. Mais ils sont inefficaces pour éradiquer le parasite durant la phase latente de l'infection. En effet, des études récentes montrent qu'il existe des molécules qui pourraient cibler le stade bradyzoïte de *T. gondii* ou empêcher la conversion bradyzoïtes-tachyzoïtes; mais ceci n'a été développé que chez la souris (Zhang et al., 2013) (Bhadra et al., 2013) ou *in vitro* (Maubon et al., 2010).

II.5 L'immunité anti-toxoplasmique

II.5.1 La réponse immunitaire intestinale

II.5.1.1 La réponse immunitaire innée

Au cours d'une infection toxoplasmique intestinale murine et humaine, *T. gondii* traverse la couche épithéliale intestinale grâce à des mécanismes de transmigration affectant les protéines des jonctions épithéliales serrées (Weight and Carding, 2012). Après le passage du parasite au travers de la barrière épithéliale intestinale, les tachyzoïtes infectent en premier les monocytes et les neutrophiles (Coombes et al., 2013), puis les macrophages et les lymphocytes (Gregg et al., 2013) (Figure 11).

Chez la souris, les neutrophiles ont la capacité de migrer dans la lumière intestinale pour encapsuler les parasites afin d'empêcher leur dissémination dans la muqueuse intestinale. Cependant, les tachyzoïtes ont été détectés dans des cellules dendritiques murines CD11c+ dans la *lamina propria* de l'intestin dès le 2^{ème} jour post infection ; dans les ganglions lymphatiques mésentériques du 3^{ème} au 7^{ème} jour post infection (Courret et al., 2006). Ces cellules dendritiques ont un rôle dans la présentation de l'antigène et la diffusion parasitaire durant une infection orale ou intrapéritonéale réalisée chez les souris (Courret et al., 2006).

Les cellules dendritiques murines et humaines infectées par *T. gondii* acquièrent un phénotype d'hypermobilité via un mécanisme dépendant du processus GABAergique de ces cellules hôtes (Fuks et al., 2012). Toujours chez les deux modèles expérimentales, dans la muqueuse intestinale, une réponse immunitaire visant à éliminer le parasite est rapidement déclenchée après la primo-infection (Lieberman and Hunter, 2002) (Buzoni-Gatel et al., 2006). Les cellules du système immunitaire inné, y compris les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles produisent l'IL-12. Cette cytokine participe à la différenciation des cellules T naïves en cellules T de type Th1 (Figure 11). Ces cellules vont à leur tour sécréter l'IFN- γ afin d'activer d'autres cellules immunitaires comme les cellules NK (Pepper et al., 2008). Dans la muqueuse intestinale, les cellules NK activées produisent l'IL-15 et l'IL-18. L'interaction de ces deux cytokines induit une forte réaction inflammatoire médiée essentiellement par le recrutement des monocytes via la

chémokine CCL3 et son récepteur CCR1 (Schulthess et al., 2012). Les monocytes recrutés amplifient la réaction immunitaire inflammatoire, et activent ainsi une voie immunitaire de type Th1 durant laquelle les macrophages produisent le $\text{TNF}\alpha$ et le NO pour limiter la multiplication parasitaire (Figure 11) (Alexander et al., 1997).

II.5.1.2 La réponse immunitaire adaptative

La protéine de surface SAG1 de *T. gondii* a été identifiée comme étant un initiateur essentiel de la réponse immunitaire adaptative (Rachinel et al., 2004).

Chez la souris, si la réponse immunitaire n'est pas contrôlée, l'IFN- γ peut affecter l'intégrité intestinale, provoquant une inflammation aiguë et conduisant à l'infiltration des cellules inflammatoires, ce qui peut conduire à une hémorragie et à des lésions de la barrière épithéliale. Ceci est démontré dans l'étude de Liesenfeld et al., durant laquelle les souris infectées par voie orale avec des kystes meurent entre 7 et 10 jours d'une iléite aiguë, suite à une réponse immunitaire intestinale dirigée contre les toxoplasmes présents dans la paroi intestinale (Liesenfeld et al., 1996). En revanche, l'étude réalisée chez les souris CBA, qui ont un patrimoine génétique différent, montre que celles-ci régulent leur réponse immunitaire intestinale et meurent après un mois avec une infection toxoplasmique cérébrale, liée à une réplication intense du parasite dans le cerveau (Liesenfeld et al., 1996).

Chez la souris une réaction immunitaire adaptative est activée pour contrôler la réponse pro-inflammatoire. Dans la muqueuse intestinale, cette réaction est médiée par l'activation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ via le récepteur des chémokines CXCR3 (Cohen et al., 2013). Ces cellules vont initier une voie immunitaire de type Th2 qui inhibe la sécrétion des protéines pro-inflammatoires, limitant donc la réaction inflammatoire dans la muqueuse intestinale. Les cellules T CD4⁺ interagissent avec les cellules épithéliales intestinales infectées pour initier la production des cytokines pro-inflammatoires (Mennechet et al., 2002). Ensuite, les lymphocytes T CD8 $\alpha\beta$ activés interviennent pour diminuer cette réaction intestinale pro-inflammatoire (Mennechet et al., 2004). Dans la muqueuse intestinale réside également une population de cellules Treg, qui, lors d'une infection toxoplasmique, sont activées. Les cellules Treg expriment T-bet (T-box expressed in T cells) sous l'effet de l'IL-27 dans la muqueuse et de l'IFN- γ en périphérique. Ces cellules activées produisent l'IL-10 qui inhibe les cytokines de type Th1 et donc diminue la réaction pro-inflammatoire dans la muqueuse intestinale (Hall et al., 2012).

Chez l'homme, peu d'études ont été rapportées sur la réponse immunitaire adaptative intestinale durant l'infection *par T. gondii*. Une réponse immunitaire protectrice au niveau de la muqueuse est nécessaire pour limiter la multiplication du parasite dès qu'il pénètre la barrière intestinale empêchant ainsi l'envahissement de l'hôte par le parasite. Les cellules T CD8+ et les anticorps, spécialement les IgA spécifiques jouent un rôle important dans cette réponse immunitaire protectrice. Il a été suggéré que ces deux acteurs de la réponse immunitaire pourraient être une stratégie thérapeutique ciblée contre la primo-infection toxoplasmique humaine (Bout et al., 2002)

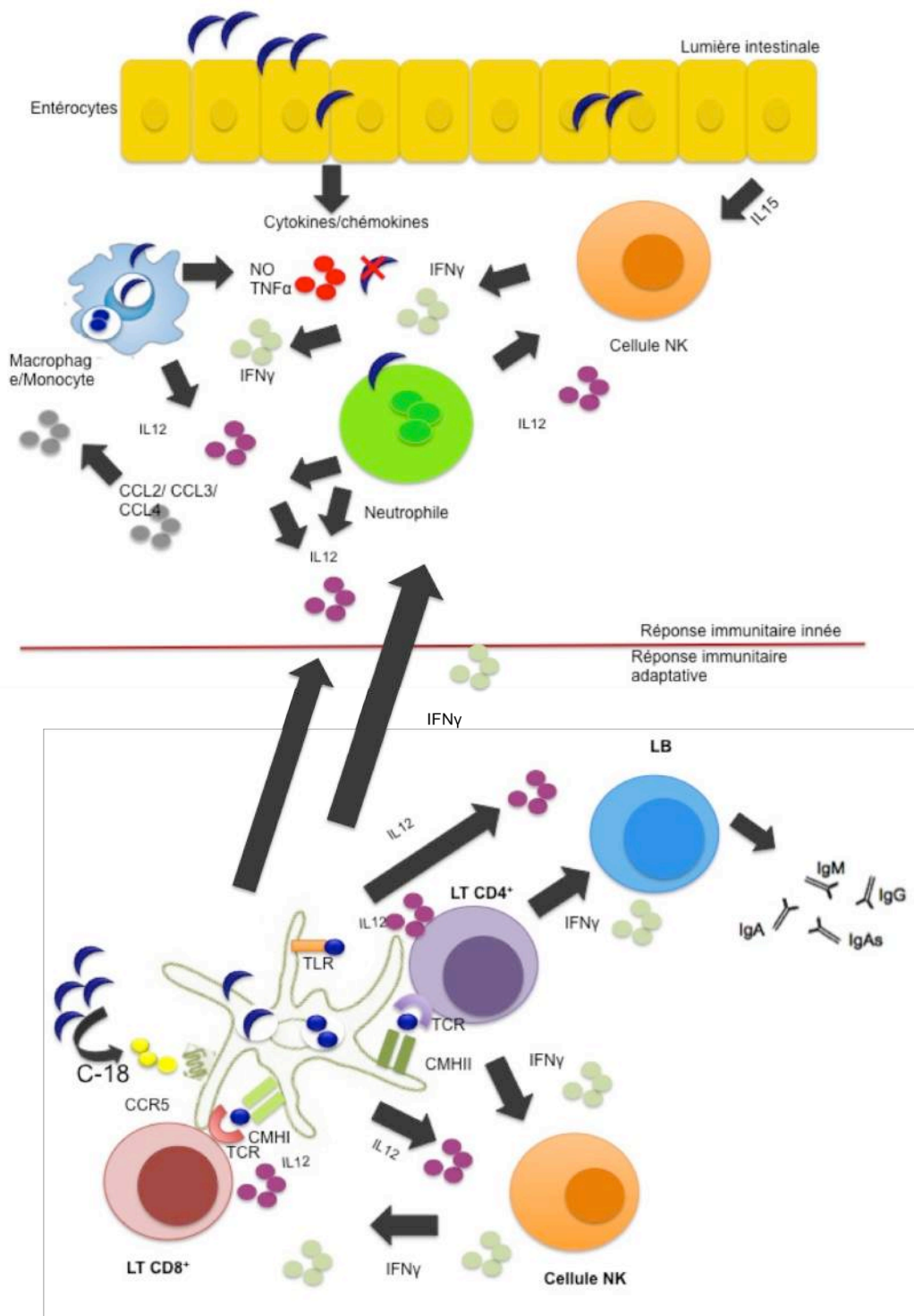


Figure 11: Schéma représentatif de la réponse immunitaire intestinale lors d'une primo-infection par *T. gondii*.

II.5.2 La réponse immunitaire systémique

II.5.2.1 La réponse immunitaire innée

Après l'invasion de la muqueuse intestinale, le parasite va disséminer dans tout l'organisme via la circulation sanguine. Dans un premier temps, les cellules immunitaires de la réponse innée (monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques) sont recrutées sur chaque site de l'infection. Tous ces types cellulaires ont un rôle dans la résistance du parasite et le ralentissement de sa multiplication (Liu et al., 2006) (Dunay et al., 2008). Toutefois, une des fonctions les plus importantes de la réponse immunitaire innée contre *T. gondii* est la capacité à détecter l'agent pathogène et à produire la cytokine IL-12.

Chez la souris et l'Homme, l'IL-12 active toutes les cellules de la première barrière immunitaire et stimule la différenciation des cellules T et la production d'IFN- γ par ces cellules (Figure 12) (Gazzinelli et al., 1993). L'IFN- γ est le principal médiateur de la résistance à *T. gondii* chez la souris. Cette cytokine initie de multiples mécanismes intracellulaires destinés à éliminer le parasite et à inhiber sa réplication. L'interleukine-12 a été décrite comme étant une molécule de signalisation importante pour l'activation de la réponse immunitaire suite à l'infection par *T. gondii* (Bashyam, 2007). La réponse immunitaire de type Th1 est définie par la production de l'IL-12 et de l'IFN- γ . Les souris qui sont à la fois infectées par *T. gondii* et déficientes en IL-12 ou IFN- γ succombent car elles sont incapables de contrôler la charge parasitaire (Gazzinelli et al., 1994).

Réaction immunitaire innée dépendante des TLRs

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre les maladies infectieuses. La défense contre les micro-organismes dépend de la reconnaissance des motifs moléculaires du non-soi (pathogen-associated molecular patterns ou PAMP) par des molécules réceptrices (PRR) exprimées principalement sur les cellules de l'immunité innée. Les TLRs représentent une classe des PRR. L'activation des TLRs entraîne le recrutement de cellules effectrices et la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui ensuite module les réponses immunitaires innées et acquises (Kawai and Akira, 2005).

a) Chez la souris :

La protéine adaptatrice MyD88 fonctionne en aval de la majorité des TLRs ainsi que du récepteur de l'IL-1 (IL-1R). La protéine MyD88 joue un rôle essentiel dans l'activation des voies de signalisation : facteur nucléaire-kB (NF-kB) et mitogen-activated protein kinase (MAPK), ce qui conduit par la suite à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, IFN- γ et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF α). Le rôle de MyD88 dans la résistance aux infections bactériennes, virales et parasitaires (protozoaires) (Scanga et al., 2002) est largement démontrée. Les souris déficientes en MyD88 sont très sensibles à l'infection par *T. gondii* alors que les souris dépourvues d'IL-1 présentent une résistance normale à l'infection par *T. gondii* suggérant ainsi que l'absence de MyD88 altère la fonction de la signalisation TLRs (Yarovinsky, 2008) (Scanga et al., 2002).

Des études *in vitro* sur des hamsters chinois (CHO) ont démontré que la synthèse des TLR2 et TLR4 dépend de la sécrétion du TNF α en présence des glycosylphosphatidylinositol (GPI) extraites à partir des tachyzoïtes (Debierre-Grockiego et al., 2007a). Une souris KO pour le TLR2 produit de l'IL-12, mais succombe en raison de la charge parasitaire élevée de des souches virulentes de *T. gondii* (Scanga et al., 2002). De même, le TLR4 n'est pas impliqué dans la production de l'IL-12 (Scanga et al., 2002), mais il peut être un co-activateur de la transmission de la signalisation des cytokines dans le modèle murin (Debierre-Grockiego et al., 2007a). Il a été démontré que le TLR9 est nécessaire à l'activation d'une réponse inflammatoire Th1 après une infection orale par *T. gondii* (Minns et al., 2006). Ces auteurs ont également montré que la protéine chaperon UNC93B1 favoriserait la translocation des TLR7 et 9 nécessaires aux mécanismes de résistance.

En plus des TLRs décrits précédemment, la signalisation du récepteur TLR11 médiée par la protéine adaptatrice MyD88 est indispensable à l'activation de la réponse immunitaire innée chez la souris (Yarovinsky et al., 2005). En effet, une inhibition de l'expression des UNC93B, protéine chaperon impliquée dans le trafic intracellulaire des TLRs, entraîne une perte du mécanisme de résistance à l'infection toxoplasmique chez la souris (Melo et al., 2010). Cette protéine interagit directement avec le TLR11. Cette interaction induit à la régulation de la réponse des cellules dendritiques contre *T. gondii* (Pifer et al., 2011).

Le TLR11 est important pour la sécrétion de l'IL-12 chez la souris ; cela est confirmé chez une souris KO pour le TLR11 qui présente de faibles niveaux de production d'IL-12 (Yarovinsky et al., 2005). Le TLR11 fonctionne aussi en formant un complexe hétérodimère avec le TLR12, uniquement chez la souris. La formation de ce complexe est également importante pour la réponse des cellules dendritiques et la production de l'IL-12 (Koblansky et al., 2013) (Andrade et al., 2013). Le TLR12 exerce le même rôle que TLR11, mais il est exprimé d'une manière spécifique dans les cellules hématopoïétiques, contrairement au TLR11 qui est exprimé dans ces cellules ainsi que dans les cellules endothéliales (Koblansky et al., 2013). Une déficience du gène codant pour le TLR12 entraîne une perte de résistance à l'infection toxoplasmique de même qu'une déficience du gène codant pour MyD88 (Koblansky et al., 2013).

b) Chez l'homme :

Contrairement au modèle murin, les TLRs responsables de l'activation de la réaction immunitaire sont mal définis chez l'Homme, lors de l'infection par *T. gondii*. Il a été décrit que la reconnaissance du parasite par les TLRs intracellulaires (TLR3, 7 et 9) chez l'Homme facilite la résistance à l'infection toxoplasmique et l'activation des monocytes et des cellules dendritiques humaines (Andrade et al., 2013).

Chez l'homme, Le TLR11 existe, mais il est non fonctionnel (Roach et al., 2005) et le TLR12 n'existe pas. Le mécanisme d'activation de la réaction immunitaire et la production de l'IL-12 et de l'IFN- γ chez l'Homme semble être différent de celui activé chez la souris. Une étude récente sur les récepteurs innés humains a montré que chez l'Homme le TLR5 pourrait avoir un rôle similaire au TLR11 dans l'activation de la production des cytokines (Salazar Gonzalez et al., 2014). D'autres études basées sur l'analyse d'association génétique lors de la toxoplasmose congénitale chez l'homme a révélé plusieurs gènes qui pourraient être impliqués dans la modulation des réponses immunitaires à *T. gondii*. Parmi les gènes recherchés : le TLR9, le récepteur purinergique P2X7 et un membre de la famille des récepteurs NOD-like NALP1 (Peixoto-Rangel et al., 2009) (Lees et al., 2010) (Witola et al., 2011).

Le récepteur purinergique P2X7 est associé à la toxoplasmose congénitale et oculaire (Jamieson et al., 2010). Des résultats récents ont montré qu'un polymorphisme de P2RX7 (un

gène codant pour le récepteur P2X7) influe la sensibilité de l'infection par *T. gondii* (Jamieson et al., 2010).

Le blocage de l'expression du gène NAPL1 améliore la prolifération de *T. gondii* dans des cellules humaines (Witola et al., 2011) et NALP1 pourrait être impliqué dans le processus d'élimination du parasite intracellulaire. À ce jour, les événements moléculaires responsables de l'activation de NALP1 dans le cytosol des cellules infectées ne sont pas encore élucidés mais l'identification de l'implication de NALP1 dans le processus d'élimination de *T. gondii* pourrait être une des clés du système de reconnaissance intracellulaire de *T. gondii* chez l'Homme.

Les études décrites ci-dessous montrent que la plupart des études ciblant l'activation de la réaction immunitaire ainsi que sa signalisation est bien élucidée dans le modèle murin. En revanche, chez l'homme malheureusement peu de recherches sont rapportées sur ce sujet. C'est pourquoi, le mécanisme immunitaire au cours d'une infection toxoplasmique chez l'Homme est mal connu.

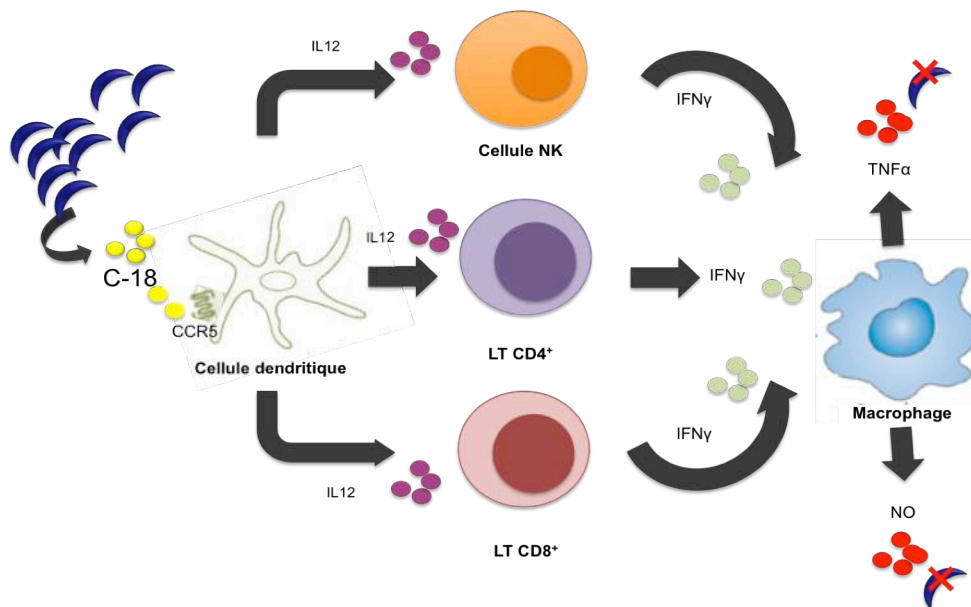


Figure 12: Schéma représentatif de l'activation de la voie immunitaire de type Th1 par *T. gondii*.

Les cellules immunitaires de la réponse immunitaire innée

Après l'invasion du parasite, la réponse immunitaire innée joue un rôle important dans le contrôle de l'infection jusqu'à ce que l'immunité adaptative entre en jeu.

De nombreuses études ont cherché à définir les types de cellules primaires, qui sont responsables de la production de l'IL-12 *in vivo* et ont identifié les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques comme étant des sources de sécrétion de cette cytokine (Bliss et al., 2000) (Scanga et al., 2002) (Mordue and Sibley, 2003) (Whitmarsh et al., 2011).

II.5.2.1.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont une source de production d'IL-12 au cours de la toxoplasmose, car ils ont une caractéristique unique qui se manifeste par leur apparente capacité à stocker des cytokines sans besoin de stimulation microbienne. Il a été rapporté que les neutrophiles de souris contiennent de l'IL-12, l'IL-6 et MIP-2 en l'absence d'infection (Terebuh et al., 1992) (Bliss et al., 1999a) (Bliss et al., 2000; Bliss et al., 1999b) (Matzer et al., 2001). En outre, environ 40 % de neutrophiles dans le sang périphérique des souris non infectées sont IL-12 positifs (Bliss et al., 2000). L'accumulation intracellulaire d'IL-12 semble être un composant normal de la maturation des neutrophiles.

Les neutrophiles d'origine humaine et murine produisent aussi de l'IL-12, du TNF- α , MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4), lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* avec des antigènes de *T. gondii* (Bliss et al., 1999a) (Bliss et al., 1999b). L'épuisement des neutrophiles entraîne une baisse des niveaux d'IL-12 et une augmentation de la prolifération parasitaire (Bliss et al., 2001). Les souris déficientes en récepteur CXCR2 récepteur d'IL-8, essentiel pour le recrutement des neutrophiles au site de l'infection, présentent une augmentation de la charge parasitaire dans le système nerveux central (SNC), (Del Rio et al., 2001). Les neutrophiles recrutés au site de l'infection par des chémokines comme l'IL-8 et MCP1, sont eux-mêmes destinés à produire immédiatement les cytokines et les chémokines régulatrices du recrutement d'autres cellules immunitaires (Cassatella et al., 1995) (Bliss et al., 1999b). Les neutrophiles sont également impliqués dans d'autres mécanismes effecteurs qui ciblent directement les parasites, y compris la phagocytose, la libération des enzymes protéolytiques et la formation des pièges extracellulaires (Nakao and Konishi, 1991) (Abi Abdallah et al., 2012). Alors que la phagocytose de *T. gondii* par les neutrophiles a été observée *in vitro* (Nakao and Konishi,

1991) (Konishi and Nakao, 1992), plusieurs études ont rapporté que p47phox, un composant de l'enzyme nécessaire pour le métabolisme oxydatif généré par les neutrophiles après phagocytose, est inutile pour la résistance à *T. gondii* (Alexander et al., 1997) (Egan et al., 2008). En effet, des études d'imagerie *in vivo* ont montré un rassemblement de neutrophiles autour des cellules infectées, sachant que les parasites présents dans les neutrophiles semblent être en grande partie intacts (Chtanova et al., 2008). Toutefois, l'infection par *T. gondii* induit une augmentation d'ADN extracellulaire au site de l'infection, qui dépend de la présence des neutrophiles, ce qui pourrait expliquer que les neutrophiles libèrent l'ADN afin de former des pièges extracellulaires pour le toxoplasme (Abi Abdallah et al., 2012). Des études *in vitro* ont montré que la formation de ces pièges entraîne une diminution de la viabilité du parasite et peut contribuer *in vivo* à la lutte contre ce dernier.

L'absence de neutrophiles induit une dérégulation des voies immunitaires Th1 à Th2 et une sensibilité accrue pour l'infection chez la souris (Romani et al., 1997). En effet, les souris déficientes en neutrophiles présentent une très faible activation des deux voies immunitaires (Th1 et Th2), ce qui conduit à une augmentation de la charge parasitaire et une infection létale (Bliss et al., 2001).

II.5.2.1.2 Les monocytes

Les monocytes sont également nécessaires à la résistance contre la toxoplasmose. Les souris déficientes en récepteur CCR2 pour MCP1, nécessaire au recrutement des monocytes au site de l'infection, sont sensibles à l'infection toxoplasmique (Robben et al., 2005) (Benevides et al., 2008) (Dunay et al., 2010). Les monocytes inflammatoires sont aussi capables de produire l'IL-12 *in vitro* et *in vivo* lorsqu'ils sont stimulés par *T. gondii* (Robben et al., 2005) (Aldebert et al., 2007). Ces cellules contribuent au contrôle direct de *T. gondii* via la production d'oxyde nitrique (NO), qui inhibe la réplication du parasite (Dunay and Sibley, 2010). À l'appui de ce modèle, il a été démontré que les monocytes inflammatoires expriment la synthétase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS), l'enzyme responsable de la production du NO. *In vitro*, les monocytes sont capables d'inhiber la réplication de *T. gondii* ou de les lyser (Mordue and Sibley, 2003). En outre, les souris KO en CCR2 $-/-$ (récepteur de CCL2) infectées par de faibles doses de *T. gondii* par voie orale succombent environ 3 à 4 semaines après l'infection ; ceci est associé à une diminution de l'expression d'iNOS et à une augmentation de la charge parasitaire dans le SNC (Benevides et al., 2008). Bien que les monocytes soient clairement critiques à la survie des souris au cours de la toxoplasmose, leur rôle ne se limite pas à la production du NO ; des souris déficientes en iNOS survivent à

l'infection aiguë (Robben et al., 2005) (Dunay et al., 2010). Les monocytes produisent aussi de l'IL-1 en réponse à des antigènes solubles de *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1995). Ce facteur peut améliorer les mécanismes effecteurs anti-toxoplasmiques dans les macrophages et les astrocytes *in vitro* (Hammouda et al., 1995) (Halonen et al., 1998a). De plus, l'IL-1 réagit en synergie avec l'IL-12 pour promouvoir la production de l'IFN- γ à partir des cellules immunitaires de la réponse innée et adaptative (Hunter et al., 1995) (Shibuya et al., 1998). Il est également possible que les monocytes soient capables de se différencier en cellules dendritiques, pour induire des réponses immunitaires adaptatives (Dominguez and Ardavin, 2010), ou en macrophages qui peuvent alors contrôler l'infection par des mécanismes immuns dépendants de GTPase (Zhao et al., 2009).

II.5.2.1.3 Les macrophages

Il a été démontré *in vitro* que les macrophages activés par l'IFN- γ limitent la croissance parasitaire via un mécanisme NO dépendant (Figure 12). Des études *in vitro* ont montré que les macrophages de la moelle osseuse ont la capacité d'induire l'inhibition de la multiplication des tachyzoïtes via l'iNOS et l'arginase-1. Le rôle de la protéine iNOS a été défini dans l'inhibition à long terme de la multiplication des parasites à l'intérieur des macrophages (Schroeder et al., 2013). Toutefois, l'IGTP est également nécessaire à la destruction des tachyzoïtes par des macrophages activés par l'IFN- γ (Butcher et al., 2005) (Ling et al., 2006). Des études utilisant des macrophages péritonéaux de souris sensibilisées avec des tachyzoïtes ont montré que l'IGTP semble être un médiateur important pour éliminer les parasites via un mécanisme dépendant de l'IFN- γ , provoquant la diminution des VPs et la perturbation de la membrane plasmique du parasite (Ling et al., 2006).

II.5.2.1.4 Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules Natural Killer (NK) représentent une autre population de cellules impliquées dans l'immunité innée contre *T. gondii*. Elles produisent l'IFN- γ et le TNF α , qui vont à leur tour activer les cellules infectées afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires.

Les souris déficientes en lymphocytes T présentent une résistance contre l'infection, en raison de la capacité des cellules NK à produire de l'IFN- γ pendant la phase aiguë de l'infection (Johnson et al., 1993) (Denkers et al., 1993) (Hunter et al., 1994). L'importance des cellules NK au cours de la phase précoce de l'infection toxoplasmique a été illustrée dans l'étude de Khan *et al.* montrant que les souris déficientes en CCR5 présentent une mauvaise infiltration des cellules NK lors d'une infection par *T. gondii*. Le transfert de cellules NK

CCR5⁺ a abouti à la restauration des réponses inflammatoires adéquates conduisant ainsi à une production accrue de cytokines (Khan et al., 2006). La plupart des études se sont concentrées sur les premiers événements qui contrôlent l'activité des cellules NK, conduisant à un modèle dans lequel l'IL-12 est produite par d'autres cellules innées (les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques). Ces cellules favorisent la production de l'IFN- γ par les cellules NK (Gazzinelli et al., 1993) (Hunter et al., 1995). En plus de l'IFN- γ , ces cellules produisent l'IL-10 au cours de l'infection par *T. gondii* (Perona-Wright et al., 2009) (Wagage et al., 2014). Cette cytokine est importante pour le contrôle de l'inflammation lors de l'infection. Ceci est confirmé par des souris déficientes en IL-10 qui meurent pendant la phase aiguë de l'infection par *T. gondii*. Leur taux de mortalité est associé au développement d'une immunopathologie grave médiée par une réponse immunitaire Th1 dans le foie (Gazzinelli et al., 1996) et dans l'intestin (Suzuki et al., 2000). Les cellules NK humaines et murines peuvent également être cytotoxiques pour les cellules infectées par *T. gondii* (Subauste et al., 1992). Les cellules NK sont infectées par le parasite après la lyse des cellules infectées, ce qui peut favoriser la dissémination du parasite (Persson et al., 2009). Les cellules NK peuvent aussi servir à promouvoir les réponses immunitaires adaptatives. En absence de lymphocytes T CD4⁺, les cellules NK peuvent accomplir leur rôle en augmentant la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques (Combe et al., 2005) (Guan et al., 2007).

II.5.2.1.5 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire Th1 et lors de la différenciation de la voie Th2 (Figure13) (Bourguin et al., 1998) (Dimier-Poisson et al., 2003). Les cellules dendritiques activées subissent un changement dans l'expression des récepteurs de surface de chémokines. Ces derniers vont être stimulés par différents médiateurs immuns et vont induire la différenciation des cellules T naïves (Banchereau et al., 2000). Les cellules dendritiques acquièrent l'antigène dans les ganglions lymphatiques. Ceci est suivi par l'expression de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui sert à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (Itano and Jenkins, 2003) (Itano et al., 2003).

Les cellules dendritiques exposées *in vivo* à un extrait de tachyzoïtes de *T. gondii* deviennent insensibles au parasite. Ce phénomène, appelé « la paralysie des cellules dendritiques » est initié par le parasite afin de moduler la réaction inflammatoire pendant la phase aiguë de l'infection (Aliberti et al., 2002a). Ce mécanisme repose sur la production de

lipoxine A4, un inhibiteur de l'acide arachidonique de l'inflammation (Aliberti et al., 2002a) (Aliberti et al., 2002b).

Au cours de l'infection toxoplasmique chronique, les cellules dendritiques sont une source majeure dans la production d'IL-12 dans les organes infectés dont le SNC (Aliberti et al., 2004). Des expériences chez la souris ont montré que l'IL-12 est produite essentiellement par les cellules dendritiques CD8⁺ (Mashayekhi et al., 2011). La production de l'IL-12 par les cellules dendritiques pourrait nécessiter ou non la formation du complexe CD40 - CD40L (Seguin and Kasper, 1999) (Subauste and Wessendarp, 2000) (Schulz et al., 2000). En outre, les cellules dendritiques sont également activées par les TLR. *Toxoplasma gondii* conduit à l'activation des cellules dendritiques conventionnelles (cCD) ainsi que des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD) (Pepper et al., 2008). Ces cellules expriment fortement les CMHII et les molécules nécessaires à l'activation de la différenciation des lymphocytes T en LT CD4⁺. Les pCD une fois activées par *T. gondii* ont la capacité de produire des niveaux élevés d'IL-12. Ceci indique que ce type cellulaire a un rôle important dans la production des cytokines nécessaires à l'élimination du parasite (Pepper et al., 2008).

- Présentation de l'antigène aux cellules T :

Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène aux cellules du système immunitaire. Elles activent les cellules T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement via les CMHI et CMHII afin de développer une immunité protectrice contre *T. gondii* (Mellman and Steinman, 2001). Durant les deux phases de l'infection, aiguë et chronique, la multiplication de *T. gondii* est contrôlée essentiellement par les cellules T CD8⁺ ; ceci montre que l'antigène est présenté majoritairement par le CMHI (Parker et al., 1991). Les cellules dendritiques infectées *in vitro* par des tachyzoïtes activent la prolifération des cellules T CD8⁺ via la présentation de l'ovalbumine (antigène de *T. gondii*) (Dzierszinski et al., 2007). Les cellules dendritiques activées par la profiline (un autre antigène de *T. gondii*) activent les cellules CD4⁺ via l'interaction avec le TLR11 (Yarovinsky et al., 2006). Parmi les populations de cellules dendritiques, celles qui sont impliquées dans ce processus sont les CD8 α ⁺, CD11b⁺ et pCD. Les pCD sont impliquées dans la réponse initiale à *T. gondii* (Pepper et al., 2008). Ce sous-groupe de CD exprime à des niveaux élevés le CMHII et produit les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des cellules T CD4⁺ (Pepper et al., 2008). Les pCD jouent un rôle majeur au cours de la réponse innée activée pour le contrôle de *T. gondii*. Cependant, l'activation des pCD et la production de l'IL-12 sont

étroitement liées au TLR11. Les souris déficientes en TLR11 présentent une chute de production d'IL-12 et une augmentation des kystes toxoplasmiques (Koblansky et al., 2013). Le TLR11 pourrait en outre agir avec le TLR12 seulement dans les cellules hématopoïétiques. Ce complexe induit l'activation de la voie NF- κ B, puis la production de l'IL-12 dans les CD stimulées par un antigène de *T. gondii* (TgPRF) (Koblansky et al., 2013). Chez les souris déficientes en TLR11, une réponse immunitaire protectrice peut être développée par pCD via l'interaction du TLR12 et de TgPRF. Ce complexe va induire l'activation des cellules NK et ainsi la production de l'IFN- γ (Hunter et al., 1997) (Koblansky et al., 2013).

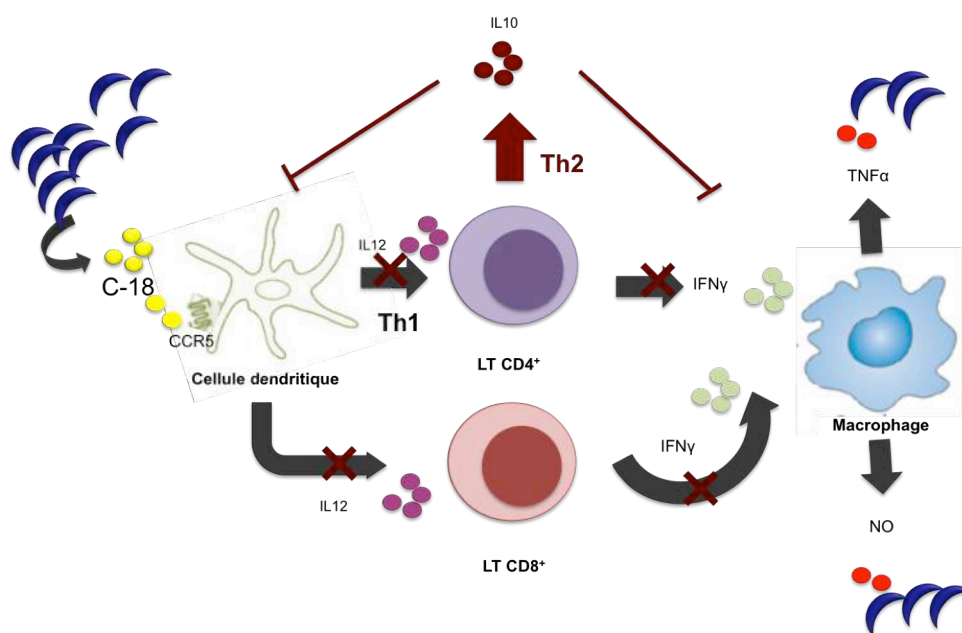


Figure 13: Schéma représentatif de l'activation de la voie de Th2 par *T. gondii*.

II.5.2.2 La réponse immunitaire adaptative

L'importance des réponses immunitaires adaptatives pour la résistance à *T. gondii* au cours de l'infection toxoplasmique humaine est démontrée par la sensibilité accrue des patients présentant des défauts primaires ou acquis dans la fonction des cellules T. Dans le modèle murin, les souris déficientes en lymphocytes B, lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺ survivent à la phase aiguë de l'infection, mais en phase chronique présentent une susceptibilité accrue à *T. gondii* (Denkers et al., 1997) (Kang et al., 2000).

Les cellules de la réponse immunitaire adaptative

II.5.2.2.1 Les cellules CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ sont essentielles à la réaction immunitaire durant une infection toxoplasmique. Cela a été défini chez les patients immunodéprimés VIH positifs (Israelski and Remington, 1988) et dans des modèles murins. Chez la souris, l'absence de lymphocytes T CD4⁺ a été associée à une susceptibilité accrue à *T. gondii* au cours de la phase chronique de l'infection (Johnson and Sayles, 2002). Les lymphocytes T CD4⁺ présentent plusieurs fonctions dans la médiation de la résistance de la toxoplasmose via leur activité complémentaire aux cellules CD8⁺ et aux cellules B (Figure 14) (Johnson and Sayles, 2002) (Lutjen et al., 2006).

- Les cellules T CD4⁺ sont impliquées dans le contrôle de l'infection chronique via leur capacité à produire l'IFN- γ et à exprimer le CD40L (CD154) ; ce dernier est nécessaire à la reconnaissance de l'antigène présenté par les CPA (Figure 12) (Gazzinelli et al., 1992) (Portillo et al., 2010).
- L'initiation des réponses des lymphocytes T nécessite que les cellules T CD4⁺ et les cellules T CD8⁺ naïves reconnaissent les CPA portant leur antigène correspondant sur les CMH I ou CMH II (Figure 14).

Les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques sont tous capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ (Jenkins et al., 2001). Des études *in vitro* ont montré que les cellules dendritiques murines sont capables de présenter aux lymphocytes T CD4⁺ un antigène dérivé de parasites vivants ou issu d'un parasite détruit par la chaleur (Goldszmid et al., 2009). L'antigène peut être aussi acquis par les CPA à travers des processus d'invasion (Koshy et al., 2010).

II.5.2.2.2 Les cellules CD8⁺

Les antigènes sécrétés par *T. gondii* sont préférentiellement présentés aux lymphocytes T (Gregg et al., 2011). La réponse des lymphocytes T CD8⁺ à *T. gondii* est maintenue par les lymphocytes T CD4⁺ au cours de la phase chronique de l'infection par *T. gondii* (Figure 14) (Combe et al., 2005) (Lutjen et al., 2006).

La réponse des lymphocytes T CD8⁺ est considérablement diminuée suite à une infection par la souche virulente de type I (Tait et al., 2010). La cause de la diminution de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ pourrait être due au facteur de virulence parasitaire ROP18 sur la cellule hôte, activant ainsi le facteur de transcription 6 β (ATF6β), qui conduit à sa dégradation (Yamamoto and Takeda, 2012). Les souris déficientes en ATF6β et infectées par *T. gondii* présentent une réponse dérégulée des lymphocytes T CD8⁺. Lorsqu'elles sont infectées par une souche RH déficiente en ROP18, ces souris induisent une forte production d'IFN-γ à partir de lymphocytes T CD8⁺ par rapport aux souris infectées par la souche RH sauvage. La réponse des lymphocytes T CD8⁺ peut également être diminuée en réponse à une déficience des cellules dendritiques lors d'une infection par la souche RH (Jordan et al., 2010). Cependant, le transfert d'un grand nombre d'antigènes spécifiques aux lymphocytes T CD8⁺ est capable de réduire la charge parasitaire au cours de l'infection par la souche RH. Il semble probable que la réponse des lymphocytes T CD8⁺ dépende de la virulence de la souche (Tait et al., 2010).

II.5.2.2.3 Les cellules Th17

Les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules de type T-helper 17 (cellules Th17) sont deux sous-ensembles distincts des cellules T CD4⁺. Les cellules Th17 décrites comme étant CD4⁺ CD17⁺, produisent de l'IL-17 qui participe à l'induction de l'inflammation (Crome et al., 2010). Une étude a montré le rôle pathogène potentiel des cellules Th17 dans l'inflammation du SNC lors de l'encéphalite toxoplasmique (Kelly et al., 2005). Chez les souris infectées par *T. gondii*, la déficience en IL-17 a conduit à des taux de mortalité plus élevés que chez les souris témoins (Kelly et al., 2005). Ces souris ont une faible charge parasitaire et une infiltration normale des neutrophiles (Kelly et al., 2005). Ceci suggère l'existence d'une interaction d'autres cytokines impliquées dans la réponse Th17. Stumhofer *et al.* ont montré que la déficience des souris infectées en IL-27 montrent une forte réponse de Th17 accompagnée d'une neuro-inflammation sévère (Stumhofer et al., 2006). Ces données indiquent que les réponses Th17 peuvent contribuer à l'inflammation persistante dans les organes affectés par *T. gondii*. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'IL-17 dans la réaction inflammatoire. En effet, cette cytokine favorise la production locale de l'IL-6, l'IL-1, TNFα, NO et des chémokines pro-inflammatoires (Afzali et al., 2007) (Ye et al., 2001). Comme l'IL-17 intervient dans plusieurs maladies autoimmunes, il a été suggéré par plusieurs auteurs qu'il pourrait être une bonne cible thérapeutique pour une infection toxoplasmique

oculaire. La délétion de l'IL-17A chez une souris infectée a montré une diminution de l'invasion des neutrophiles et une réduction des lésions inflammatoires locales dans l'iléon (Guiton et al., 2010). La neutralisation de l'IL-17A a induit une diminution de l'inflammation intraoculaire et une réduction de la charge parasitaire (Sauer et al., 2012). Ceci confirme l'implication de la réponse Th17 au cours de l'infection toxoplasmique oculaire.

II.5.3 L'immunité humorale

Il est reconnu depuis longtemps que l'infection par *T. gondii* conduit à la synthèse d'anticorps dirigés contre le parasite (Sabin and Feldman, 1948). Le rôle essentiel des anticorps dans l'immunité contre *T. gondii* est démontré avec des souris déficientes en lymphocytes B. Ces souris présentent une sécrétion normale d'IFN- γ , mais succombent à l'infection 3 à 4 semaines après l'infection. Cette mort est associée à des charges élevées de parasites dans le SNC (Kang et al., 2000). La diminution du taux d'anticorps peut s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité à *T. gondii* (Johnson and Sayles, 2002). Des études *in vitro* ont montré que les anticorps peuvent favoriser la phagocytose des parasites, bloquer leur invasion et aussi activer la voie classique du complément (Schreiber and Feldman, 1980) (Erbe et al., 1991). Le rôle *in vivo* de l'activation du complément est illustré par le traitement des souris avec un anticorps qui neutralise la protéine du complément C3, ce qui conduit à une sensibilité accrue à l'infection toxoplasmique (Johnson et al., 1996). Les cellules T CD4⁺ sont nécessaires à l'activation des lymphocytes B (Figure 14), comme cela a été mis en évidence par une étude réalisée sur des souris déficientes en lymphocytes T CD4⁺. Ces souris ont présenté de faibles taux de production d'anticorps spécifiques du parasite, indiquant que le défaut de la réponse anticorps contribue probablement à la dérégulation du contrôle de la multiplication parasitaire (Johnson and Sayles, 2002). Cependant, après la restauration du mécanisme, les souris reprennent la production d'anticorps spécifiques (Johnson and Sayles, 2002).

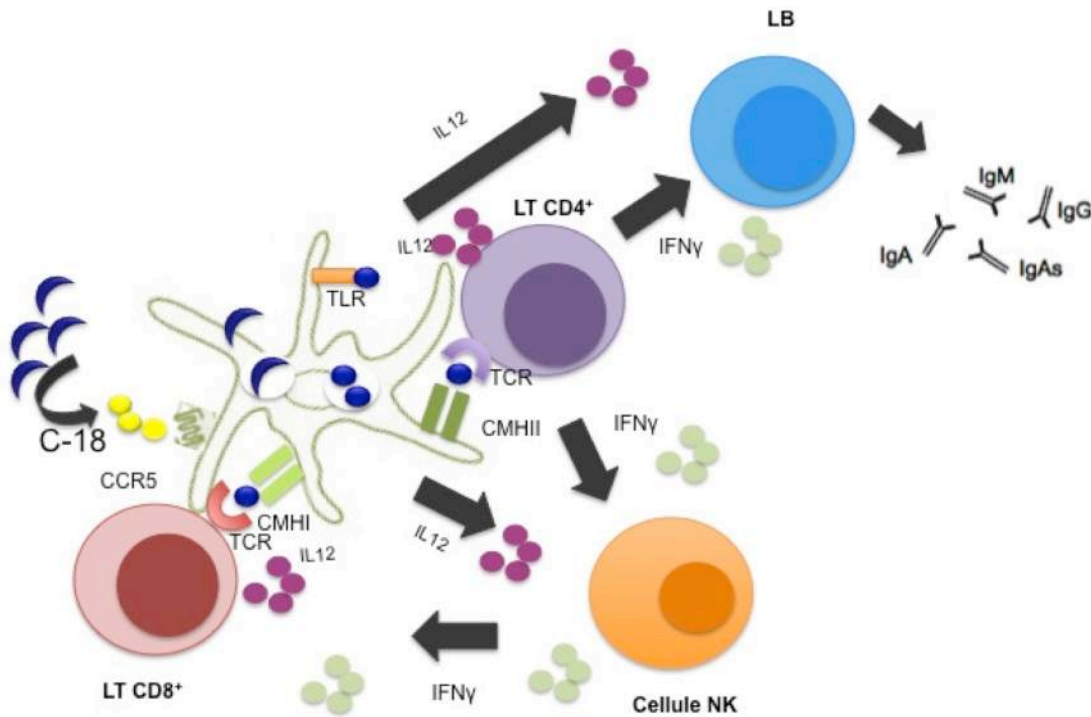


Figure 14: Schéma illustrant les réponses immunitaires adaptatives, cellulaires et humorales activées durant une infection par *T. gondii*.

II.6 La réponse immunitaire cérébrale

II.6.1 L'immunité liée au système nerveux central

Le système nerveux central est étroitement lié au système immunitaire à plusieurs niveaux. Le parenchyme cérébral est séparé de la périphérie par la barrière hémato-encéphalique (BHE), dont l'intégrité est maintenue par des jonctions endothéliales serrées. Cette barrière dans les conditions normales empêche l'entrée des médiateurs tels que les leucocytes activés, les anticorps, les facteurs du complément et les cytokines. La lignée cellulaire myéloïde joue un rôle crucial dans le développement des réponses immunitaires au niveau central, elle comprend deux sous-types principaux: les cellules microgliales, réparties dans le parenchyme cérébral ; les macrophages périvasculaires situés dans les capillaires du cerveau de la lame basale et le plexus choroïde.

Par ailleurs, les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules endothéliales et les neurones sont aussi impliqués dans la réponse immunitaire dans le SNC. En modulant la synaptogenèse, les cellules microgliales sont plus particulièrement impliquées dans la restauration de la

connectivité neuronale suite à une inflammation. Ces cellules libèrent des médiateurs immunitaires, tels que les cytokines, qui modulent la transmission synaptique et qui modifient la morphologie des épines dendritiques au cours du processus inflammatoire après une lésion. Ainsi, l'expression et la libération de médiateurs immunitaires dans le parenchyme cérébral sont étroitement liées aux changements morphophysologiques plastiques dans les épines dendritiques des neurones. En ce basant sur ces données, il a été proposé que ces médiateurs immunitaires sont également impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire.

La microvascularisation est un élément clé des dommages cérébraux. Les cellules endothéliales constituent une source importante de médiateurs immunitaires tels que les prostanoïdes et le NO, qui sont impliqués dans le processus d'adhésion cellulaire immunitaire (Sternberg, 2006). Les dommages à la BHE peuvent conduire à une perméabilité accrue, qui facilite l'accès des leucocytes au parenchyme cérébral. La libération des médiateurs de l'inflammation et des neurotoxines endogènes et la promotion de la phagocytose des débris cellulaires (Sternberg, 2006).

Les cellules microgliales activées en excès peuvent provoquer l'expression du CMHII. Cette molécule facilite l'implication de ces cellules dans les réponses immunitaires. L'activation des cellules microgliales influence fortement le profil de cytokines libérées par deux mécanismes distincts: les récepteurs de reconnaissance et l'activation de la réponse immunitaire (John et al., 2003). L'activation des monocytes et des macrophages représente un élément important de la réponse immunitaire innée ; elle induit la production de cytokines pro-inflammatoires et des chémokines comme l'IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein), MIP-1 α et MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Proteins). Des cytokines régulatrices peuvent aussi être activées au sein du SNC, telles que l'IL-4 et l'IL-10 (John et al., 2003). L'expression du CMHII et des molécules d'adhérence (CD11a, CD40, CD54, CD80, CD86) dans les cellules microgliales activées, indique que ces cellules peuvent acquérir l'activité de présentation de l'antigène et participer dans l'activation des cellules T (Benn et al., 2001) (Goverman, 2009). Ceci suggère l'existence d'un réseau d'interactions complexes reliant les cellules microgliales, les astrocytes et les cellules T ; ce qui crée un équilibre entre les signaux Th1/Th2, qui définit la réponse immunitaire du système nerveux central (Benn et al., 2001) (de Araujo et al., 2009).

Le rôle des astrocytes dans le SNC est encore plus complexe que celui des cellules microgliales. Les astrocytes sont divisés en deux principaux sous-types: les astrocytes fibreux situés dans la substance blanche; les astrocytes protoplasmiques situés dans la substance grise. Ces dernières contribuent à la formation de la BHE (Sternberg, 2006) (Truckenmiller et al., 2005) (Kerschensteiner et al., 2009). Les astrocytes agissent également comme des neuroprotecteurs en sécrétant des neurotrophines et en libérant des molécules pro-inflammatoires potentiellement toxiques (Sternberg, 2006).

Le troisième type de cellules gliales est les oligodendrocytes. Ce type cellulaire participe activement à la myélinisation des neurones. Il est également impliqué dans la sécrétion des molécules inflammatoires spécifiques (Chavarria and Alcocer-Varela, 2004).

II.6.2 L'invasion de *T. gondii* dans le cerveau

Dans le cerveau, les cellules dendritiques et les monocytes sont les cellules les plus permissives à l'infection toxoplasmique initiale (Channon et al., 2000). Ces populations cellulaires jouent probablement un rôle important dans la diffusion du parasite, y compris dans le cerveau. Les cellules dendritiques CD11c⁺ CD11b⁻ infectées favorisent la diffusion du toxoplasme de la *lamina propria* aux ganglions lymphatiques mésentériques. Les monocytes CD11c⁺ CD11b⁻ sont la principale population de cellules qui contiennent les tachyzoïtes dans le sang (Courret et al., 2006). *Toxoplasma gondii* a été détecté dans les cellules mononucléées de souris infectées un jour après avoir reçu une injection intraveineuse de cellules CD11b⁺ (Courret et al., 2006) (Lambert et al., 2006).

La capacité de migration transépithéliale des tachyzoïtes est impliquée dans le passage du parasite à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ceci pourrait se faire grâce à l'interaction de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM- 1) des cellules de la BHE avec la protéine MIC2 du parasite (Barragan et al., 2005). Cette interaction est importante pour la transmigration des tachyzoïtes, comme démontré *in vitro* dans des monocouches de plusieurs lignées cellulaires différentes (Barragan et al., 2005).

Les macrophages sont aussi responsables de la dissémination de *T. gondii* dans le cerveau (Figure 15) (Suzuki et al., 2005) (Schaeffer et al., 2009) (Ploix et al., 2011). La migration des macrophages infectés dans le SNC est médiée par la voie uPA/uPAR et l'expression des métalloprotéinases 9 (MMP9) (Schuindt et al., 2012).

Dans le cerveau de souris pendant la phase aiguë de l'infection, les tachyzoïtes de *T. gondii* sont capables d'infecter toutes les cellules cérébrales, principalement, les cellules microgliales, les astrocytes et les neurones. Cependant, les cellules microgliales ont tendance à réagir contre le parasite. Ces cellules inhibent la croissance de *T. gondii* et peuvent donc fonctionner comme des inhibiteurs importants de propagation de *T. gondii* dans le SNC par des mécanismes indépendants du NO et d'IFN- γ ; mais ceci n'empêche pas *T. gondii* de pouvoir s'enkyster dans ces cellules (Luder et al., 1999) (Freund et al., 2001). Les astrocytes et les neurones de rat sont également des cellules hôtes appropriées pour la prolifération intracérébrale de la souche PLK (type II) (Luder et al., 1999). Ces cellules peuvent héberger les tachyzoïtes et les kystes de *T. gondii* pendant les deux phases respectives de l'infection (Haroon et al., 2012) (Contreras-Ochoa et al., 2013). Les astrocytes ont de plus la capacité de contrôler la prolifération des tachyzoïtes pendant la phase aiguë de l'infection. Dans les neurones, la présence de tachyzoïtes ou de bradyzoïtes modifie le fonctionnement des neurones infectés. Ces modifications vont favoriser la persistance du parasite (Haroon et al., 2012).

II.6.3 La régulation du mécanisme immunitaire cérébral lors de l'infection par *T. gondii*

Après que *T. gondii* ait pénétré dans le SNC à travers la BHE, une réponse immunitaire cérébrale est déclenchée contre le parasite. Les données expérimentales sur des modèles animaux montrent que la réponse immunitaire de type Th1 est activée contre *T. gondii* afin de contrôler la réplication du parasite dans le cerveau. Dans le modèle murin, cette réponse immunitaire conduit à la production d'IFN- γ après l'infection par la souche ME49 (type II) (Denkers and Gazzinelli, 1998) (Lieberman and Hunter, 2002) (Denkers et al., 2004). Cette cytokine est le principal médiateur de la résistance au parasite dans le modèle murin. Les souris déficientes pour le récepteur de l'IFN- γ ou celles qui sont neutralisées par un anticorps anti-IFN- γ , sont incapables de contrôler l'infection toxoplasmique aiguë (Scharton-Kersten et al., 1996; Suzuki et al., 1988). Au cours de cette réponse de l'hôte, d'autres cytokines et des chémokines sont produites. Ces dernières peuvent favoriser l'infiltration de cellules immunitaires vers le site de l'infection (Schluter et al., 2001).

Les lymphocytes T et l'IFN- γ sont essentiels pour le maintien de la latence de l'infection chronique dans le cerveau et la prévention de la réactivation de l'infection latente. L'activité protectrice des lymphocytes T (CD4⁺, CD8⁺) se traduit par la production d'IFN- γ (Figure 15) (Wang et al., 2004). L'activité protectrice de ces cellules a été démontrée lors d'un transfert de cellules immunitaires T, qui a conféré une protection contre la réactivation d'une toxoplasmose cérébrale chez une souris déficiente en IFN- γ (Kang and Suzuki, 2001). Cependant, la présence des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ semble être critique pour le maintien à long terme de la latence de l'infection toxoplasmique chronique dans le cerveau. En outre, l'ARNm codant pour l'IFN- γ a également été détecté dans les cerveaux de souris infectées par le toxoplasme et déficientes en cellules NK. Ceci suggère que l'IFN- γ pourrait être produit par des cellules non-T et des cellules non-NK. Cette production est importante pour le maintien de la toxoplasmose chronique dans le cerveau des souris (Kang and Suzuki, 2001). Les cellules microgliales et les macrophages sont identifiés comme les principales cellules non-T et non-NK qui expriment l'IFN- γ dans les cerveaux de souris infectées par *T. gondii* (Figure 15) (Suzuki et al., 2005) (Wang and Suzuki, 2007). Par conséquent, il est possible que la production de l'IFN- γ par ces cellules joue un rôle important dans la prévention de la toxoplasmose cérébrale. Les cellules microgliales jouent un rôle important d'une part dans le système de défense innée qui limite la prolifération parasitaire et d'autre part en régulant la production des chémokines qui facilitent l'accumulation de lymphocytes T au site de multiplication parasitaire (Figure 15) (Fischer et al., 1997b). Les astrocytes murins ont également été impliqués dans l'inhibition de la croissance de la souche de toxoplasme NTE (type II) *in vitro* (Halonen et al., 1998b). Les astrocytes infectés par ME49 (type II) produisent de l'IL-1, de l'IL-6 et du GM-CSF (Fischer et al., 1997b). Durant la réponse immunitaire innée, les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles produisent l'IL-12 en réponse à l'infection par *T. gondii*. Cette cytokine est essentielle pour la production de l'IFN- γ (Figure 15). La neutralisation de l'IL-12 avec des anticorps dirigés contre cette cytokine a entraîné une mortalité de 100 % des souris infectées avec une souche avirulente de *T. gondii*, la mortalité a été associée à une diminution de la production d'IFN- γ (Gazzinelli et al., 1994). Par ailleurs, l'IL-12 est également importante pour le maintien de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T durant une infection chronique (Yap et al., 2000). La production de l'IL-12 est régulée par la lipoxine A4 (LXA4), afin d'éviter des réactions inflammatoires pathogènes dans le cerveau au cours de la phase chronique de l'infection par *T. gondii* (Figure 15). Ceci a été démontré par la forte production de LXA4 dans le sérum des souris lors d'une infection toxoplasmique chronique. La 5-

lipoxigénase (5-LO) est une enzyme essentielle dans la production de LXA4, les souris déficientes en 5-LO ont succombé à l'infection au cours de la phase chronique, présentant ainsi une réaction inflammatoire cérébrale (Aliberti et al., 2002b). La LXA4 est importante pour la régulation négative des réponses pro-inflammatoires au cours de la phase chronique de l'infection par *T. gondii*. Des études ont montré que les lipoxines activent deux récepteurs (AhR et LXAR) dans des cellules dendritiques. Cette activation déclenche l'expression du suppresseur de la signalisation de cytokine (SOCS)-2. Les souris déficientes en SOCS-2 succombent à l'infection chronique par *T. gondii*. Ceci s'accompagne d'une forte production de l'IL-12, l'IFN- γ et de la réduction des kystes cérébraux (Machado et al., 2006).

Bien que les réponses immunitaires Th1 jouent un rôle essentiel dans la résistance à l'infection par *T. gondii*, des réponses immunitaires de type Th2 sont également impliquées dans l'immunité protectrice. L'IL-4 joue un rôle majeur dans le développement de la réponse immunitaire cellulaire et dans la différenciation des cellules T en cellules de type Th2. Durant la phase chronique de l'infection toxoplasmique, l'IL-4 inhibe la production des médiateurs pro-inflammatoires afin d'empêcher le développement des inflammations locales, favorisant la persistance des kystes dans le cerveau. Des souris déficientes en IL-4 meurent au cours de la phase tardive de l'infection (Suzuki et al., 1996). Dans ces souris, une étude histologique révèle des zones d'inflammation aiguë locales associées à la multiplication des tachyzoïtes dans le cerveau (Suzuki et al., 1996). Ces résultats indiquent que l'IL-4 est protecteur contre le développement de l'encéphalite toxoplasmique en empêchant la formation de kystes et la prolifération des tachyzoïtes dans le cerveau.

L'action de l'IL-4 durant la phase chronique de l'infection est renforcée par la production d'IL-10 par les lymphocytes T (Suzuki et al., 1996). L'IL-10 exerce également un rôle immuno-modulateur régulant la réponse immunitaire inflammatoire de type Th1 (Figure 15) (Kuhn et al., 1993). Les souris déficientes en IL-10 et traitées avec la sulfadiazine développent des réponses inflammatoires mortelles au niveau du cerveau lors de l'étape tardive de l'infection (Wilson et al., 2005). L'IL-10 est importante pour la survie des souris au cours des phases aiguë et chronique de l'infection. Ceci est confirmé par la neutralisation de cette cytokine dans des souris infectées par *T. gondii* (Jankovic et al., 2007) et suite à la vaccination des souris par des antigènes de *T. gondii* (E/SA) (Abdollahi et al., 2013).

II.6.4 Les cellules effectrices du cerveau

II.6.4.1 Les cellules microgliales

Cette population de cellules représente les macrophages du SNC qui pourraient avoir un rôle majeur dans le contrôle de l'infection toxoplasmique cérébrale. En effet, les cellules microgliales humaines et murines ont la capacité d'inhiber la prolifération des tachyzoïtes intracellulaires après une stimulation par l'IFN- γ et le lipopolysaccharide (Chao et al., 1993b) (Chao et al., 1994). Les cellules microgliales humaines peuvent également exercer cette inhibition après un traitement par le TNF- α et l'IL-6 (Chao et al., 1994). Ces cellules une fois activées inhibent la réplication parasitaire via la sécrétion du NO (Figure 15) (Chao et al., 1993a). En effet, chez la souris, les mécanismes de résistance peuvent être dépendants ou indépendants du NO (Freund et al., 2001), contrairement aux cellules microgliales humaines dont l'activité inhibitrice n'est pas dépendante du NO (Chao et al., 1994). Les cellules microgliales peuvent être activées pour inhiber la multiplication intracellulaire des tachyzoïtes suite à un traitement par le GM-CSF (Fischer et al., 1993) et le facteur de croissance de transformation - β (TGF β) combiné à l'IFN- γ (Chao et al., 1993b). Ceci a été confirmé par la détection de l'ARNm codant pour ces deux protéines dans le cerveau de souris infectées (Hunter et al., 1992) (Deckert-Schluter et al., 1995).

En outre, *in vivo*, l'IFN- γ stimule la production du TNF- α par les cellules microgliales de souris infectées par *T. gondii* (Figure 15) (Deckert-Schluter et al., 1999). L'IFN- γ induit également l'expression du CMH de I et II dans les cellules microgliales (Hermes et al., 2008). Une exposition des cellules microgliales au parasite (6 h ou 44 h) a induit une diminution de l'expression de la molécule CMH II (Luder et al., 2003) (Dellacasa-Lindberg et al., 2011), ce qui pourrait affecter éventuellement l'activation des cellules T. Le traitement de ces cellules par l'IFN- γ ne restaure pas le mécanisme de l'expression du CMH II (Dellacasa-Lindberg et al., 2011).

En plus de leur rôle dans l'immunité anti-parasitaire, les cellules microgliales ont un rôle dans la dissémination de *T. gondii* dans le SNC (Dellacasa-Lindberg et al., 2011). En effet, les cellules microgliales infectées par *T. gondii* présentent une hypermotilité aléatoire en l'absence de stimuli chémoattractifs (Dellacasa-Lindberg et al., 2011).

II.6.4.2 Les astrocytes

Les astrocytes représentent une autre population de cellules impliquées dans la prévention de la multiplication de *T. gondii* dans le cerveau (Figure 15). Les astrocytes humains inhibent la prolifération intracellulaire de tachyzoïtes par le NO suite à un traitement par l'IFN- γ et l'IL-1 β (Peterson et al., 1995). Il a été décrit également que les cellules humaines provenant d'astrocytome réduisent la multiplication intracellulaire du parasite via le TNF- α (Pelloux et al., 1996). Les astrocytes murins sont également capables d'inhiber la prolifération des tachyzoïtes *in vitro*. Le prétraitement des astrocytes murins avec l'IFN- γ aboutit à 65 % de diminution de la réplication des tachyzoïtes (Halonen et al., 1998a). Contrairement aux astrocytes humains, l'effet inhibiteur des astrocytes murins n'est pas dépendant du NO (Peterson et al., 1995) mais de l'Irgm3 (IGTP), l'une des GTPases de la p47 (Halonen et al., 2001). L'infection des astrocytes par des tachyzoïtes induit une accumulation de multiples GTPases de la p47, y compris l'Irga6 (IIGP1) et l'IGTP dans des VP (Martens et al., 2005). L'IGTP et l'IIGP1 sont impliquées dans le processus d'inhibition de la multiplication des tachyzoïtes de *T. gondii* dans les astrocytes murins via l'IFN- γ (Melzer et al., 2008). L'importance des astrocytes dans le contrôle de *T. gondii* dans le cerveau a été démontrée dans des souris déficientes en gp130, le récepteur de transduction de signal de l'IL-6 (Drogemuller et al., 2008). Ces souris ont développé une nécrose cérébrale mortelle associée à la perte des astrocytes GFAP⁺ dans les lésions inflammatoires et à une multiplication parasitaire incontrôlée (Drogemuller et al., 2008). L'expression de la gp130 astrocytaire est cruciale pour la survie des astrocytes GFAP⁺ dans le cerveau de souris infectées. Cet effet protecteur de la gp130 dans les astrocytes semble être impliqué dans le contrôle de la prolifération des tachyzoïtes de *T. gondii* dans le cerveau.

III. Objectifs de la thèse

Notre étude consiste à étudier *in vitro* les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection toxoplasmique cérébrale humaine. Ce travail comprend deux chapitres :

Dans **le premier chapitre** nous avons étudié la cinétique des médiateurs immunitaires pro-inflammatoires produits lors d'une infection *in vitro* de trois types de cellules nerveuses humaines (article publié dans le journal Plos One). Ces cellules ont été infectées par deux types de souches de *Toxoplasma gondii* pendant 8 h, 14 h, 24 h et 48 h. En parallèle, une cinétique de multiplication parasitaire a été effectuée dans le but de déterminer l'effet de la réponse immunitaire activée sur la prolifération parasitaire. Les résultats de ce premier travail expérimental nous ont conduits à étudier l'effet de l'IFN- γ sur la production des médiateurs immuns et sur la prolifération parasitaire lors de l'infection des trois types de cellules nerveuses humaines par les deux souches de *T. gondii* (article soumis à Parasitol. Res).

Dans **le deuxième chapitre**, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de l'apoptose des cellules hôtes infectées par le toxoplasme. Nous avons donc étudié les voies apoptotiques activées ou inhibées dans trois types de cellules nerveuses humaines infectées par deux souches de *T. gondii*. Cette infection a été réalisée à 24 h et à 48 h, afin de déterminer l'effet du parasite sur la réponse de la cellule hôte. Cette partie expérimentale est précédée d'une revue de la littérature sur l'apoptose et le toxoplasme (Revue en préparation).

IV. Matériel biologique utilisé

Afin de déterminer les mécanismes immunitaires et apoptotiques mis en jeu lors d'une infection toxoplasmique cérébrale humaine, nous avons étudié l'expression des médiateurs immuns et des caspases dans les cellules nerveuses humaines : des cellules microgliales (CMH5), des cellules endothéliales (Hbmec) et une lignée neuronale issue de neuroblastome (SH SY5Y). Ces cellules ont été infectées par deux types de souches de *Toxoplasma gondii*: RH (type I, virulente chez la souris) et PRU (type II, avirulente chez la souris)

IV.1 Cellules

IV.1.1 Cellules microgliales (CMH5)

Les CMH5 (Janabi et al., 1995) (de Gannes et al., 1998) sont des cellules microgliales humaines (Figure 16), elles ont été gracieusement mises à notre disposition par le Pr P. Vincendeau, (Bordeaux, France). Ce sont des cellules spécifiques du SNC, constituant la microglie. Il a été établi que les cellules à l'origine de ces CMH5 peuplent le système nerveux au cours du développement embryonnaire et fœtal bien avant la naissance, elles proviennent des monocytes sanguins ayant pénétré le SNC au cours de la seconde moitié du premier trimestre et tout au long de la première partie du deuxième trimestre. Lors des lésions du tissu nerveux, ces cellules peuvent s'activer et se transformer en macrophages.

Les CMH5 sont cultivées dans des flasques de 25 cm² à une densité d'environ 2 x 10⁶ cellules/mL dans un milieu de culture Dulbecco's Modified minimum Essential Medium (DMEM) (Gibco, Cergy Pontoise, France), contenant 0,2 mM de L-cystéine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 2 mM de L-glutamine (Gibco), 2 mM sodium pyruvate (Gibco), 100 UI/mL de streptomycine-pénicilline (Gibco), 25 mM d'Hepes (Gibco) et 0,1 mM de Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Ce milieu est supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco) préalablement décomplémenté à 56° C pendant une heure. Les flasques sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules sont trypsinées dès qu'elles sont à confluence, en utilisant la trypsine 1X (Gibco).

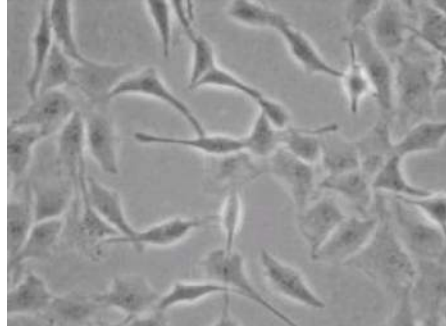


Figure 16 : Cellules microgliales (CMH5) (microscopie en contraste de phase ; x 200)

IV.1.2 Cellules endothéliales (Hbmec)

Les cellules endothéliales de moelle osseuse humaine (Hbmec) (Figure 17) ont été isolées par D. Paulin (Université de Paris 7, France), K. Schweitzer (Université libre d'Amsterdam, Pays-Bas) et B. Weksler (Weill Medical College de l'Cornell University, Royaume-Uni) (Schweitzer et al., 1995) (Schweitzer et al., 1997) (Liu et al., 1997). Les propriétés de ces cellules sont similaires à celles des cellules endothéliales cérébrales. Ceci a été défini par rapport à des molécules d'adhésion endothéliales, des marqueurs de surface cellulaire et des caractéristiques morphologiques. Ce sont des cellules hautement spécialisées responsables de la formation et des propriétés fonctionnelles de la BHE. Elles se caractérisent par leur capacité à former des jonctions serrées, ce qui leur permet de jouer un rôle de filtre vis-à-vis des différentes substances qui peuvent atteindre le SNC.

Les Hbmec sont cultivées dans des flasques de 25 cm² à une densité d'environ 2×10^6 cellules/mL dans un milieu de culture DMEM (Gibco), contenant : 10 mM d'Hepes (Gibco), 4,5 g/mL de glucose (Gibco), 2 mM de glutamine (Gibco), 2 mM sodium pyruvate (Gibco), 100 UI/mL de streptomycine-pénicilline (Gibco), 3500 UI/mL d'héparine (Gibco), 0,15 mg/mL de gentamicine (Gibco) et 2 mM de glycine (Gibco). Ce milieu est supplémenté avec 10 % de SVF (Gibco) préalablement décomplémenté à 56°C pendant une heure. Les flasques de culture cellulaire sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules sont trypsinées dès qu'elles sont à confluences en utilisant la trypsine 1X (Gibco).

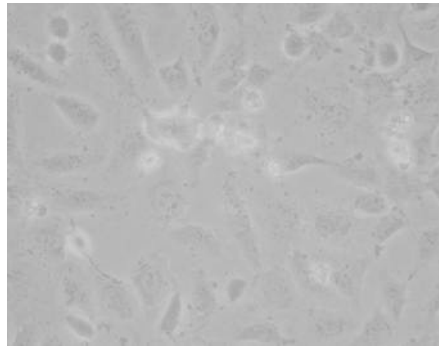


Figure 17 : Cellules endothéliales (HbmeC) (microscopie en contraste de phase ; x 200)

IV.1.3 Lignée cellulaire de neuroblastes humains (SH SY5Y)

Les SH SY5Y sont une lignée cellulaire de neuroblastes humaines issus d'un neuroblastome (Figure 18), qui ont été gracieusement mis à notre disposition par le Pr M.O. Jauberteau-Marchan (Limoges, France) (Ross et al., 1983). La lignée cellulaire SH SY5Y est sous clonée à partir de la lignée cellulaire d'origine SK-N-SH. Cette population de cellules a été isolée chez un patient atteint d'un neuroblastome. Les SH SY5Y sont souvent utilisées comme modèles *in vitro* de la fonction neuronale dans des recherches sur la maladie d'Alzheimer. Ces cellules expriment des facteurs de croissances neuronaux, des facteurs neurotrophiques, des neurofilaments et la neureguline-1 (Agholme et al., 2010) (Agholme et al., 2014).

Les SH SY5Y sont cultivées dans des flasques de 25 cm² à une densité d'environ 2 x10⁶ cellules/mL dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) constitué de : 2 mM de L-glutamine (Gibco), 2 mM de sodium pyruvate (Gibco), 100 UI/mL de streptomycine-pénicilline (Gibco). Ce milieu est complété avec 10 % SVF (Gibco) préalablement décomplémenté à 56°C pendant une heure. Les flasques de culture cellulaire sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules sont dédoublées dès qu'elles sont à confluence en utilisant du Versen 1X (Gibco).

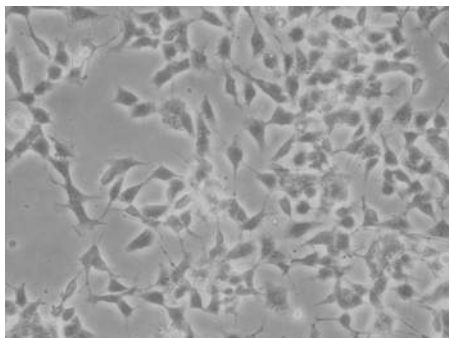


Figure 18 : Lignée cellulaire de neuroblastome humaine (SH SY5Y) (microscopie en contraste de phase ; x 200)

IV.1.4 Les cellules fibroblastes humaines (MRC5)

Les MRC5 (Figure 19) servent à la production des tachyzoïtes des deux souches de *T. gondii*. Elles sont cultivées dans des flasques de culture cellulaire de 25 cm² à une densité de 2×10^6 cellules/mL dans un milieu de culture Modified Eagle's medium (MEM) (Gibco) complétementé par 100 UI/mL de streptomycine-pénicilline (Gibco), 10 mM d'Hepes (Gibco), 2 mM de glutamine (Gibco). Ce milieu est supplémenté par 10 % de SVF (Gibco). Les flasques sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

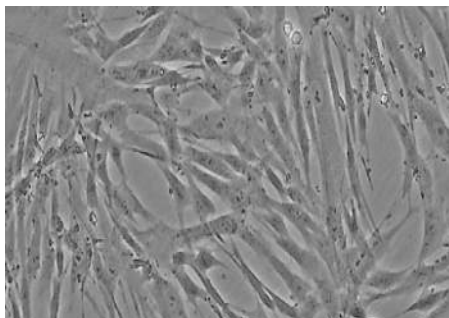


Figure 19 : Cellules fibroblastes humaines (MRC5) (microscopie en contraste de phase ; x 200)

IV.2 Souches parasitaires de *Toxoplasma gondii*

Les souches parasitaires ont été fournies par le Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*.

IV.2.1 Souche RH

La souche RH est une souche de type I. Cette souche a été isolée chez un enfant en 1939 aux Etats Unis. Elle est très virulente chez la souris (DL₉₀<10). Son entretien au laboratoire chez la souris nécessite un passage deux à trois fois par semaine car elle provoque la mort des souris en 3 à 4 jours. *In vitro*, sa multiplication est rapide entraînant une lyse cellulaire des cellules infectées à 48 heures post infection.

IV.2.2 Souche Prugniaud (PRU)

La souche PRU est une souche de type II. Elle a été isolée en 1964 à Limoges chez un nouveau-né mort de toxoplasmose congénitale à neuf jours de vie (Martrou, 1964). Elle est avirulente chez la souris (DL 100=10³) (Herrmann et al., 2012), responsable d'une infection chronique caractérisée par des kystes toxoplasmiques dans le cerveau des souris. *In vitro*, cette souche se multiplie plus lentement. Il faut environ 15 jours de culture sur cellules MRC5 pour obtenir le nombre de tachyzoïtes nécessaire aux expérimentations.

IV. 3 Obtention des tachyzoïtes

IV.3.1 L'isolement des kystes de la souche PRU

L'obtention des tachyzoïtes nécessite la mise en culture de kystes cérébraux. Pour cela, les kystes de la souche PRU sont obtenus à partir de cerveaux de souris Swiss infectées un mois avant. Les cerveaux de souris infectées sont extraits, broyés et homogénéisés par plusieurs passages à l'aide d'une aiguille de calibre 20 dans du MEM 0,1 % (Gibco) Tween 80 (Sigma -Aldrich). Les kystes ont été isolés par un gradient de Percoll (Blewett et al., 1983). Quatre-vingt dix millilitres de Percoll (Amersham Biosciences, Orsay, France) sont rendus isotoniques par 10 mL de 10X MEM. Le pH est neutralisé par du HCL à 10 %. Le

broyat de cerveau est dilué dans du MEM (Gibco) 0,1 % Tween- 80 % (Sigma- Aldrich) ; un volume de 1,5 mL de Percoll 30 % et un volume de 1,5 mL de 90 % de Percoll ont été successivement ajoutés sous la suspension. Après centrifugation (1811 g - 15 min), les kystes sont récupérés dans la couche de Percoll à 30 %. La suspension est centrifugée pour éliminer le Percoll restant et le culot récupéré dans du MEM 0,1 % Tween 80. Les bradyzoïtes de la souche PRU sont libérés des kystes par action de la trypsine 1X (Gibco) à 37 ° C pendant 10 minutes et récupérés après centrifugation (1811 g - 15 min).

IV.3.2 Mise en culture des parasites sur cellules fibroblastes (MRC5)

Les tachyzoïtes de la souche RH sont cultivés sur des MRC5 à confluence. Les MRC5 lysées après 48 h sont centrifugées à 804 g pendant 10 min. Le culot est ainsi repris dans un volume de 1 mL de MEM (Gibco) puis il est mis en culture sur de nouvelles MRC5 à confluence.

Pour la souche PRU, les bradyzoïtes sont ensuite cultivés sur des cellules MRC5 à confluence. Les bradyzoïtes se transforment en tachyzoïtes qui vont par la suite se multiplier. La multiplication de la souche PRU sur MRC5 est très lente ; il faut compter 15 à 20 jours de culture pour avoir le nombre de tachyzoïtes nécessaire à une infection de cellules nerveuses humaines sur flasques de 25 cm². Les flasques de culture cellulaire sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Dans chaque type de cellules infectées par la souche PRU une Reverse Transcriptase (RT)-PCR semi quantitative spécifique aux bradyzoïtes a été réalisée afin de vérifier si tous les bradyzoïtes se sont transformés aux tachyzoïtes.

IV.4 Infection des cellules nerveuses humaines par les souches de toxoplasmes

Après la multiplication des parasites sur les cellules MRC5, les tachyzoïtes des deux souches ont été libérés par la rupture des cellules infectées par des passages des cellules à travers des aiguilles de calibre 20 puis 27. Les débris cellulaires ont été éliminés par filtration à travers une membrane de polycarbonate de 3 µM (Nucleopore Whatman, Versailles, France). Les tachyzoïtes purifiés ont été suspendus dans du MEM (Gibco) et énumérés pour calculer le nombre de parasites destinés à l'infection des cellules nerveuses humaines.

Les trois types de cellules nerveuses : CMH5, Hbmec et SH SY5Y sont ensuite infectées séparément pendant 8 h, 14 h, 24 h et 48 h par les tachyzoïtes des souches RH et PRU selon le ratio de 2 tachyzoïtes pour une cellule (1:2). Après chaque période d'infection, les surnageants des co-cultures sont repris et congelés à -80°C jusqu'à l'utilisation. Les cellules sont décollées avec de la trypsine 1X (Gibco) pendant 10 min à 37°C. Elles sont ensuite centrifugées à 804g pendant 10 min. Les culots secs sont congelés à -80°C.

V. Chapitre I : Etude de l'expression des médiateurs immuns

V.1 Résumé détaillé

Le mécanisme immunitaire par lequel le toxoplasme s'installe dans le cerveau et se réactive suite à une immunodépression est bien étudié dans le modèle murin, mais mal élucidé chez l'homme. Plusieurs études ont montré, dans le modèle murin, que l'IFN- γ est le médiateur immunitaire majeur de la résistance contre *T. gondii*. Il limite la prolifération parasitaire et empêche le développement de la toxoplasmose cérébrale. Dans ce chapitre, nous présentons une étude de la réaction immunitaire mise en jeu lors de l'infection des cellules nerveuses humaines par des tachyzoïtes de deux souches de *T. gondii* à différents temps de l'infection précoce. L'objectif principal est de déterminer la cinétique de l'expression protéique de différents médiateurs immuns et de quantifier le taux de la multiplication des deux types de souches lors de l'infection des cellules nerveuses d'origine humaine pendant les premières 48 heures. Durant ces premiers travaux, il n'a pas été mis en évidence de production d'IFN- γ . Afin d'identifier l'effet de cette cytokine sur la production des médiateurs immuns identifiés et sur la prolifération parasitaire dans les cellules nerveuses humaines testées, ces cellules ont donc été stimulées par l'IFN- γ 24 h avant d'être infectées par les souches de *T. gondii*.

Pour répondre à notre objectif principal, des cellules nerveuses humaines, cellules microgliales (CMH5), cellules endothéliales (Hbmec) et neurones (SH SY5Y), ont été cultivés séparément dans des flasques de culture cellulaire. Chaque type cellulaire a été infecté par des tachyzoïtes de la souche RH (type I, virulente chez la souris) et de la souche PRU (type II, avirulente chez la souris) pendant 8 h, 14 h, 24 h et 48 h selon un ratio de 2 tachyzoïtes/1 cellule. Les médiateurs immunitaires ont été dosés dans les surnageants des co-cultures par la technique de Proteome Profiler Array ; la charge parasitaire a été quantifiée dans les culots cellulaires des co-cultures par la technique RT-PCR semi-quantitative à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques pour le gène 529 pb de *T. gondii*. Pour la souche PRU, l'absence de bradyzoïtes dans l'inoculum a été confirmée par une Reverse Transcriptase (RT)-PCR semi-quantitative en utilisant le gène BAG-1.

Les résultats montrent une expression des protéines pro-inflammatoires significativement différente d'une part entre les deux souches RH et PRU et d'autre part, entre les différentes cellules nerveuses humaines.

L'expression des cytokines (IL-6, IL-8), des chémokines (MCP-1 et GRO α) et de la protéine Serpine E1 est augmentée dans les cellules microgliales et dans les neurones à 24 h post infection par les deux souches de *T. gondii*. À ce stade d'infection, la charge parasitaire est diminuée dans ces cellules. Les interleukines -6 et -8 produites pourraient avoir un rôle dans l'activation de la réaction immunitaire pro-inflammatoire et dans le contrôle de la prolifération parasitaire comme décrit dans différentes études. Les chémokines décrites ont un rôle essentiel dans le recrutement des cellules immunitaires (macrophages, monocytes et neutrophiles) *in vivo*. Ceci pourrait initier la réaction immunitaire pour limiter la prolifération parasitaire dans les cellules microgliales et les neurones. De plus, la chémokine MIF est plus fortement produite dans les cellules microgliales que dans les autres cellules testées. Ceci pourrait renforcer la réaction immunitaire et le contrôle de la prolifération parasitaire par ce type cellulaire.

A l'opposé, dans les cellules endothéliales, la production des médiateurs immuns est augmentée à 8 h post infection. Elle diminue entre 14 h et 24 h post infection. Durant cette période d'infection, la charge parasitaire de la souche RH augmente et celle de la souche PRU se stabilise. Ceci suggère que ces cellules réagissent faiblement contre l'infection toxoplasmique en comparaison avec les cellules microgliales et les neurones.

En outre, on note que la souche PRU stimule la production pour toutes les cellules testées des facteurs de croissance des cellules immunitaires (G-CSF et GM-CSF). Ces protéines seraient susceptibles d'augmenter l'effet pro-inflammatoire de cette souche dans ces cellules.

Les résultats montrent également que seule la souche PRU stimule la production de la molécule sICAM par les cellules endothéliales. Cette production pourrait limiter la transmigration des parasites via les cellules nerveuses humaines. Enfin, pour la première fois, nous avons mis en évidence la production de la protéine Serpin E1 lors de l'infection toxoplasmique. Cette protéine est exprimée par les cellules microgliales et par les neurones infectés par les deux souches et par les cellules endothéliales seulement lorsque celles-ci sont infectées par la souche PRU. La Serpin E1 a été décrite comme inhibitrice de la voie uPA/uPAR qui favorise la sécrétion des MMP-9 par les macrophages infectés par *T. gondii*.

Par conséquent, la Serpin E1 pourrait limiter la dissémination des tachyzoïtes de *T. gondii* au sein du cerveau.

Après stimulation des cellules nerveuses humaines par l'IFN- γ , nous avons observé une diminution de la synthèse de MCP-1, G-CSF, GM-CSF et Serpin E1 et une augmentation de la synthèse des sICAM et C5/C5a. Les niveaux d'expression de ces protéines sont significativement différents entre les trois types cellulaires infectés par les deux souches de *T. gondii*.

- La synthèse de MCP-1 et G-CSF est significativement diminuée dans les cellules endothéliales par rapport aux autres cellules infectées par les deux souches de *T. gondii*.
- La synthèse de GM-CSF est significativement diminuée dans les trois types cellulaires stimulés et infectés par la souche RH.
- La synthèse de la Serpin E1 diminue significativement dans l'ensemble des cellules stimulées et infectées par les deux souches de *T. gondii*.
 - la diminution de MCP-1 et des facteurs de croissances pourrait diminuer l'activation des cellules pro-inflammatoires, et augmenter la multiplication parasitaire.
- La synthèse de sICAM et de C5/C5a augmente dans les neurones stimulés et infectés par la souche RH, entraînant ainsi une diminution de l'invasion parasitaire et une augmentation de l'attraction des cellules immunitaires.

La stimulation des cellules nerveuses humaines par l'IFN- γ a également altéré la multiplication des souches parasitaires.

- La charge parasitaire de la souche PRU est augmentée dans l'ensemble des cellules nerveuses stimulées.
- La réplication de la souche RH est contrôlée dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales stimulées mais pas dans les neurones stimulés.

Les résultats des deux études suggèrent que les cellules microgliales et les neurones ont la capacité de contrôler la multiplication parasitaire via la production d'IL-6, IL-8, MCP-1, GRO α et Serpin E1. La réaction immunitaire est plus forte à 24 h post infection, en lien avec une diminution de la charge parasitaire dans ces cellules. La souche PRU pourrait être plus inflammatoire que la souche RH par le fait qu'elle stimule la production des deux facteurs de

croissance (G-CSF et GM-CSF). La présence d'IFN- γ à 24 h post infection pourrait réguler la production des protéines pro-inflammatoires et l'invasion de la souche RH. De même, cette cytokine contrôle la prolifération de la souche RH mais seulement dans les cellules microgliales et endothéliales.

V.2 Article 1 (Publié par Plos One PONE-D-14-02963R1) : *In vitro* infection of human nervous cells by two strains of *Toxoplasma gondii*: A kinetic analysis of immune mediators and parasite multiplication



In Vitro Infection of Human Nervous Cells by Two Strains of *Toxoplasma gondii*: A Kinetic Analysis of Immune Mediators and Parasite Multiplication

Nour Mammari^{1‡*}, Philippe Vignoles¹, Mohamad Adnan Halabi², Marie Laure Darde^{1,3}, Bertrand Courtioux¹

1 National Institute of Health and Medical Research 1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Limoges, France; University of Limoges, National Center for Scientific Research France 3503 Institute of Genomic, Environment, Immunity, Health and Therapy, Limoges, France, **2** National Center for Scientific Research France 7276, France 3503 Institute of Genomic, Environment, Immunity, Health and Therapy, University of Limoges, Faculty of Pharmacy, Limoges, France, **3** University Hospital, Department of Parasitology, Biological Resource Centre for Toxoplasma, Limoges, France

Abstract

The severity of toxoplasmic infection depends mainly on the immune status of the host, but also on the *Toxoplasma gondii* strains, which differ by their virulence profile. The relationship between the human host and *T. gondii* has not yet been elucidated because few studies have been conducted on human models. The immune mechanisms involved in the persistence of *T. gondii* in the brains of immunocompetent subjects and during the reactivation of latent infections are still unclear. In this study, we analyzed the kinetics of immune mediators in human nervous cells *in vitro*, infected with two strains of *T. gondii*. Human neuroblast cell line (SH SY5Y), microglial (CMH5) and endothelial cells (HbmeC) were infected separately by RH (type I) or PRU (type II) strains for 8 h, 14 h, 24 h and 48 h (ratio 1 cell: 2 tachyzoites). Pro-inflammatory protein expression was different between the two strains and among different human nervous cells. The cytokines IL-6, IL-8 and the chemokines MCP-1 and GRO α , and SERPIN E1 were significantly increased in CMH5 and SH SY5Y at 24 h pi. At this point of infection, the parasite burden declined in microglial cells and neurons, but remained high in endothelial cells. This differential effect on the early parasite multiplication may be correlated with a higher production of immune mediators by neurons and microglial cells compared to endothelial cells. Regarding strain differences, PRU strain, but not RH strain, stimulates all cells to produce pro-inflammatory growth factors, G-CSF and GM-CSF. These proteins could increase the inflammatory effect of this type II strain. These results suggest that the different protein expression profiles depend on the parasitic strain and on the human nervous cell type, and that this could be at the origin of diverse brain lesions caused by *T. gondii*.

Citation: Mammari N, Vignoles P, Halabi MA, Darde ML, Courtioux B (2014) *In Vitro* Infection of Human Nervous Cells by Two Strains of *Toxoplasma gondii*: A Kinetic Analysis of Immune Mediators and Parasite Multiplication. PLoS ONE 9(6): e98491. doi:10.1371/journal.pone.0098491

Editor: Mohamed Ali Hakimi, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Received: February 5, 2014; **Accepted:** May 2, 2014; **Published:** June 2, 2014

Copyright: © 2014 MAMMARI et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from "3IS, infection et immunité sous immunosuppression" from FR 3503 GEIST, Limoges, France, and INSERM 1094 Tropical Neuroepidemiology Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nour.mammari@unilim.fr

‡ Current address: INSERM UMR1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Limoges, France

Introduction

The majority of human *Toxoplasma* infections in immunocompetent hosts are asymptomatic. After an acute infection, tachyzoites can escape from the immune system, leading to the formation of tissue cysts containing bradyzoites, especially in the brain. However, in the immunocompromised host, latent bradyzoites in cysts revert to tachyzoites, leading to reactivation of chronic toxoplasmosis and development of a toxoplasmic encephalitis [1]. Thus, the severity of *Toxoplasma* infection obviously depends on the host immune status.

The role of the *Toxoplasma* strain is more debated. Genotyping of *Toxoplasma* isolates from all continents revealed a complex population structure. Up to now, 15 haplogroups were described [2]. These haplogroups comprise the 3 main clonal lineages initially described (type I, II and III) and other haplogroups that cluster various atypical strains and new clonal lineages [3,4] [5]

[6]. On the basis of lethality in mice, type I strains were classified as virulent, and type II and III as non-virulent. These 3 types differ with respect to their ability to transmigrate across cellular barriers during invasion. Type I strains exhibit a higher migratory capacity than type II strains [7]. In humans, the influence of the strain in the clinical outcome is obvious in the severe cases of toxoplasmosis in immunocompetent patients due to the most divergent strains such as those circulating in the Amazonian forest [6]. Its role is also highly suspected in the higher occurrence and severity of ocular toxoplasmosis in South America [8]. But it remains unclear if the *Toxoplasma* strain has any influence on the development of brain infection. In a study performed on 88 immunocompromised patients, the distribution of type II vs non-type II strains was not significantly different when patients were stratified by underlying cause of immunosuppression, site of infection (cerebral or extra-cerebral), or outcome [9].

During a toxoplasmic infection, the immune response can firstly reduce the parasite proliferation during acute infection, and then maintains chronic infection in immunocompetent hosts. During acute infection, monocytes, neutrophils, and dendritic cells are recruited to the site of infection [10] [11] [12]. These cells also play a role for migration and dissemination of the parasite in peripheral tissues and the central nervous system (CNS). This process depends on the parasitic strain. The type II strains induce superior migration of infected dendritic cells compared to type I strains [7]. Experimental data on animal models suggest that the immune response type 1 (Th1) is activated against *T. gondii* to control parasite replication. This immune response leads to production of interferon-gamma (IFN- γ) in mice infected with RH (type I) or ME49 (type II) strains [10] [13]. IFN- γ is the major mediator of resistance to *T. gondii* in the murine model; it can inhibit parasite replication, preventing toxoplasmic encephalitis during the late stage of infection in mice. During this host response, other cytokines and chemokines are produced, which can promote infiltration of immune cells to the site of infection [14] [15] [16].

The early events that enable the parasite to cross the blood-brain barrier are poorly understood. Different experimental studies have demonstrated that brain endothelial cells infected with RH (type I), ME49 (type II) and PRU (type II) strains of *T. gondii* express ICAM-1, IL-6, and MCP-1 [17] [18] [19] [20]. These studies have reported a possible role of these cytokines in parasite invasion into the brain. After infection with the RH strain, mouse endothelial cells upregulated E-selectin, P-selectin and ICAM-1 expression, known to support the migration of immune cells to sites of inflammation [21] [22] [23]. After invasion step, *T. gondii* can infect microglial cells [24] [14], astrocytes [25] [14] [26] and neurons [16] [26] leading to cyst formation [14].

In the mouse brain, microglial cells play a major role in the control of infections caused by *T. gondii* type II. These cells inhibit efficiently parasite growth and may thus function as important inhibitors of *T. gondii* propagation within the CNS by IFN- γ and NO-independent mechanisms [24] [27]. *In vitro* comparison has shown that astrocytes are infected more efficiently than neurons and microglia [28] [27]. This is confirmed by *in vivo* experiments demonstrated that astrocyte is the predominant cell type infected by RH and PRU strains in the brain [26] [29]. Murine astrocytes have also been shown to inhibit *in vitro* the growth of NTE (type II) *Toxoplasma* strain [25]. Astrocytes infected by ME49 strain become activated to produce IL-1, IL-6 and GM-CSF [14]. These pro-inflammatory proteins together with microglia-produced cytokines play an important role in inducing infiltration of immune cells into the brain. In addition, Lüder *et al.* found that rat astrocytes and neurons are suitable host cells for the intra-cerebral proliferation of PLK strain (type II) [27]. It was described that both tachyzoites and bradyzoites can deregulate the function of murine neurons [30]. IFN γ and IL-6 production by murine neurons indicates that these cells contribute to intracellular control of type II and I strains [31] [32] [33].

Most of these results were obtained in the murine model. The role of human neuro-endothelial cells in neuro-invasion by the parasite and the behavior of human microglial cells and neurons after *T. gondii* infection remains to be shown.

In this study, we analyzed the production of immune mediators during different times following *Toxoplasma* infection in a human model. For that, three human brain cells: human microglial, human endothelial and a human neuroblast cell lines were used. These cells were infected *in vitro* by different *T. gondii* strains. Proteomic analysis and parasite quantification were performed at each time point of infection to identify the various pro-

inflammatory proteins produced by human nervous cells infected with different *T. gondii* strains and their impact on parasitic growth.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Limousin, France (Permit Number: 3-07-2012). All efforts were made to minimize suffering.

Parasite strains

Two strains of *Toxoplasma gondii* parasite were used: RH strain, a type I strain highly virulent in mice (DL90<10), and PRU strain, a type II strain with a non-virulent profile in mice (DL100 = 10³) [34].

Cyst isolation

PRU cysts were obtained from the brains of Swiss mice infected one month earlier. Infected mouse brains were extracted and homogenized by several passages through a 20-gauge needle in Modified Eagle's Medium (MEM) 0.1% (Gibco, Cergy Pontoise, France) Tween 80 (Sigma-Aldrich, Lyon, France), to disrupt tissues. PRU cysts were isolated by Percoll gradient [35]. Briefly, ninety milliliters of Percoll (Amersham Biosciences, Orsay, France) were rendered isotonic by adding 10 mL of 10 \times MEM. The pH was neutralized by adding HCL 10%. Brain homogenates were diluted in MEM, 0.1% Tween-80%; 1.5 mL of 30% Percoll and then 1.5 mL of 90% Percoll were successively added with a tapered Pasteur pipette under suspension. After centrifugation (1811 g), cysts were recovered in the 30% Percoll layer. The cyst suspension was centrifuged to eliminate the remaining Percoll, and the pellet was recuperated in MEM, 0.1% Tween-80. PRU bradyzoites were released from cysts by trypsin 1X (Gibco) at 37C $^{\circ}$ for 10 min and recovered after centrifugation (1811 g–15 min).

Tachyzoite production

RH tachyzoites from mouse ascites and PRU bradyzoites released from cysts were inoculated in human fibroblastic cell cultures (MRC5). After parasite multiplication, tachyzoites from both strains were released by disruption of infected cells by passages through 20 and 27 gauge needles. Cell debris were removed by filtration through polycarbonate membrane 3 μ M (Nucleopore Whatman, Versailles, France). Purified parasites were suspended in MEM and enumerated.

Human nervous cell lines

- Microglial cells (CMH5): Human microglial cells (CMH5) cells (kindly provided by Pr P. Vincendeau, Bordeaux, France) [36] [37] were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) inactivated at 56 $^{\circ}$ C for 1 h, 0.2 mM sterilized L-cysteine (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Gibco), 2 mM sodium pyruvate (Gibco), 100 UI/m streptomycin-penicillin (Gibco), 2 mM Hepes (Gibco) and 0.1 mM β - mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). CMH5 cells were seeded in culture flasks (25 cm²) at a density of 5 \times 10⁶ cells/mL. Confluent cells were trypsinized in DMEM.

-Endothelial cells (Hbmec): Human bone marrow endothelial cells (Hbmec) were obtained from the cell line established by D. Paulin (University of Paris 7, France), K. Schweitzer (Free University of Amsterdam, The Netherlands), and B. Weksler

(Weill Medical College of Cornell University, UK) [38], [39] and [40]. The properties of these cells are similar to those of endothelial brain cells, with respect to endothelial adhesion molecules, cell surface markers, and morphologic characteristics. Hbmecc cells were grown in DMEM, supplemented with 10% FBS inactivated at 56°C for 1 h, 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 100 UI/mL of streptomycin-penicillin, 10 mM Hepes buffer, 4.5 g/mL glucose, 3500 UI/mL heparin and 0.15 mg/mL gentamicin. Hbmecc cells were seeded in culture flasks (25 cm²) pre-treated with 2% gelatin at density of 4×10⁶ cells/mL. Confluent cells were trypsinized in PBS.

- Neuroblastoma cells (SH SY5Y): This human neuroblast cell line from neural tissue (SH SY5Y) (kindly provided from Pr M.O. Jauberteau-Marchan, Limoges, France) [41] is used in most of the researches on Alzheimer's disease [42] and presents all the characteristics of neurons. SH SY5Y were grown in RPMI 1640 medium (Gibco), supplemented with 10% FBS inactivated at 56°C for 1 h, 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 100 UI/mL streptomycin-penicillin. SH SY5Y cells were seeded in culture flasks (25 cm²) at density of 4×10⁶ cells/mL. Confluent cells were detached by Versen 1X (Gibco).

All cell lines were cultured at 37°C in humidified air containing 5% CO₂.

Parasite-cell co-cultures

The required number of cells were cultured 48 h before infection, time needed for cell adhesion. After cell adhesion, 6×10⁶ cells/mL of CMH5 were infected by 1.2×10⁷ tachyzoites/mL. For Hbmecc and SH SY5Y, 4×10⁶ cells/mL were infected by 8×10⁶ tachyzoites/mL (ratio: 1 cell/2 tachyzoites) of RH or PRU strains for 8 h, 14 h, 24 h and 48 h. Uninfected control cells were cultured under the same conditions. All co-cultures were performed separately in culture flasks (25 cm²). The experiments were performed four times, in the same conditions but at different times to ensure reproducibility of results. Infections with different strains were performed at different periods to avoid any contamination between strains.

After infection, supernatants were recovered and frozen at -80°C; cells were trypsinized for 10 min at 37°C. After centrifugation at 804 g for 10 min, cell pellets were recovered and frozen at -80°C.

Cytokine, chemokine & growth factor analysis

Cytokine, chemokine & growth factor production profiles were detected by Proteome Profiler array kit, type human cytokines array panel A (R&D, Lille, France). Each nitrocellulose membrane contains duplicated spots of 36 different antibodies anti-cytokines, chemokines, growth factors and adhesion proteins. The kit was used according to manufacturer's instructions. Each membrane was incubated with a mixture chemiluminescence substrate A&B (Promega, Lyon, France) and exposed to G-BOX (Syngene, Versailles, France). The image was captured using GeneSnap software (Syngene). Results appear as dark spots, protein expression levels were determined by quantifying the intensity of coloration, expressed as pixel units, using GeneTools software (Syngene). The negative control quantification value was subtracted from the quantification value of each spot.

RNA extraction & quantification of *T. gondii* burden by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNAs from each co-culture pellet were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Essones, France), according to

manufacturer's instructions. DNase was used to quantify the viable parasite burden in each co-culture by amplifying a *T. gondii* 529 pb repeat gene [43] [44]. qRT-PCR was performed using one step SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen). Each RNA sample (≤ 100 ng) was added to PCR tubes containing SYBR master mix (12.5 μL), RT Mix (0.25 μL), specific primers (Sigma-Aldrich) 529 pb (0.6 μM) sense: 5'AGGCGAGGTGAGGATGA3'; anti-sense: TCGTCTCGTCTGGATCGAAT 3' [44] and sterile water for final volume of 25 μL. Following assay optimization, negative samples were used. qRT-PCR was performed with a Rotor-Gene 6000 (Qiagen) using cycling conditions: reverse transcription 10 min at 55°C, PCR initial activation 5 min at 95°C, denaturation 5 sec at 95°C and annealing/extension 10 sec at 60°C for 40 cycles. Quantification was performed using a range of tachyzoites from 5×10⁴ to 1 *Toxoplasma* amplified by primers for the 529 pb gene. In addition, to verify the stage obtained after PRU culture in MRC5 cells, BAG-1, a bradyzoite-specific gene, was amplified by qRT-PCR using BAG-1 primers sense: 5'-TGA GCG AGT GTC CGG TTA TT-3' and anti-sense: 5'-ATT CCG TCG GGC TTG TAA T-3' [45] (Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

All experiments were performed four times and values of corrected pixels were obtained from pixel values of infected cells minus pixel values of uninfected cells. They were expressed by ± mean standard error. Statistical analysis was performed using a parametric ANOVA test and Tukey HSD (Honestly Significant Difference) test for multiple comparisons of means, with 95% confidence level. A value of *p*<0.05 was considered statistically significant.

In each kinetic study, the comparison of immune mediator production was performed between three groups: cells, strain and infection times. This was carried out firstly between each variable of each group: cell (CMH5 vs SH SY5Y) (SH SY5Y vs HBMECC) (HBMECC vs CMH5), strain (RH vs PRU) and idem for each period of infection. All interactions between the three groups were also studied (two by two).

The parasite burdens were evaluated as the ratio of final tachyzoite number/initial tachyzoite number. When the ratio was less than 100%, the tachyzoite mortality was higher than their proliferation. Based on the fact that 1 RH strain tachyzoite gives 2 tachyzoites after 7 h [46], 128 tachyzoites must be obtained after 48 h which represents a maximal ratio of 12800% parasite burden. Data on parasite multiplication rate were analyzed by Tukey HSD test, with 95% confidence level. A value of *p*<0.05 was considered statistically significant.

Results

For all infected cells by PRU strain, semi-quantitative RT-PCR for BAG-1 gene shown absence of bradyzoites in the inoculum.

1. Kinetics of pro-inflammatory proteins and *T. gondii* burden in infected human endothelial cells (Hbmecc)

As shown in Figure 1A, 1C, 1E, Hbmecc infected with RH strain showed a basal expression level for interleukins, chemokines and other inflammatory proteins in endothelial cells at T₀. Expression of IL-6 and IL-8 in endothelial cells reached peak levels at 8 h post infection. Production of interleukins declined at 14 h post infection. At 24 h post infection, IL-6 increased significantly whereas IL-8 remained at a low level compared to 8 h (Figure 1A). Chemokines: MCP-1, MIF, GROα and Rantes reached peak levels significantly at 8 h post infection (Figure 1C). Expression of all chemokines dropped between 14 h and 24 h post infection and

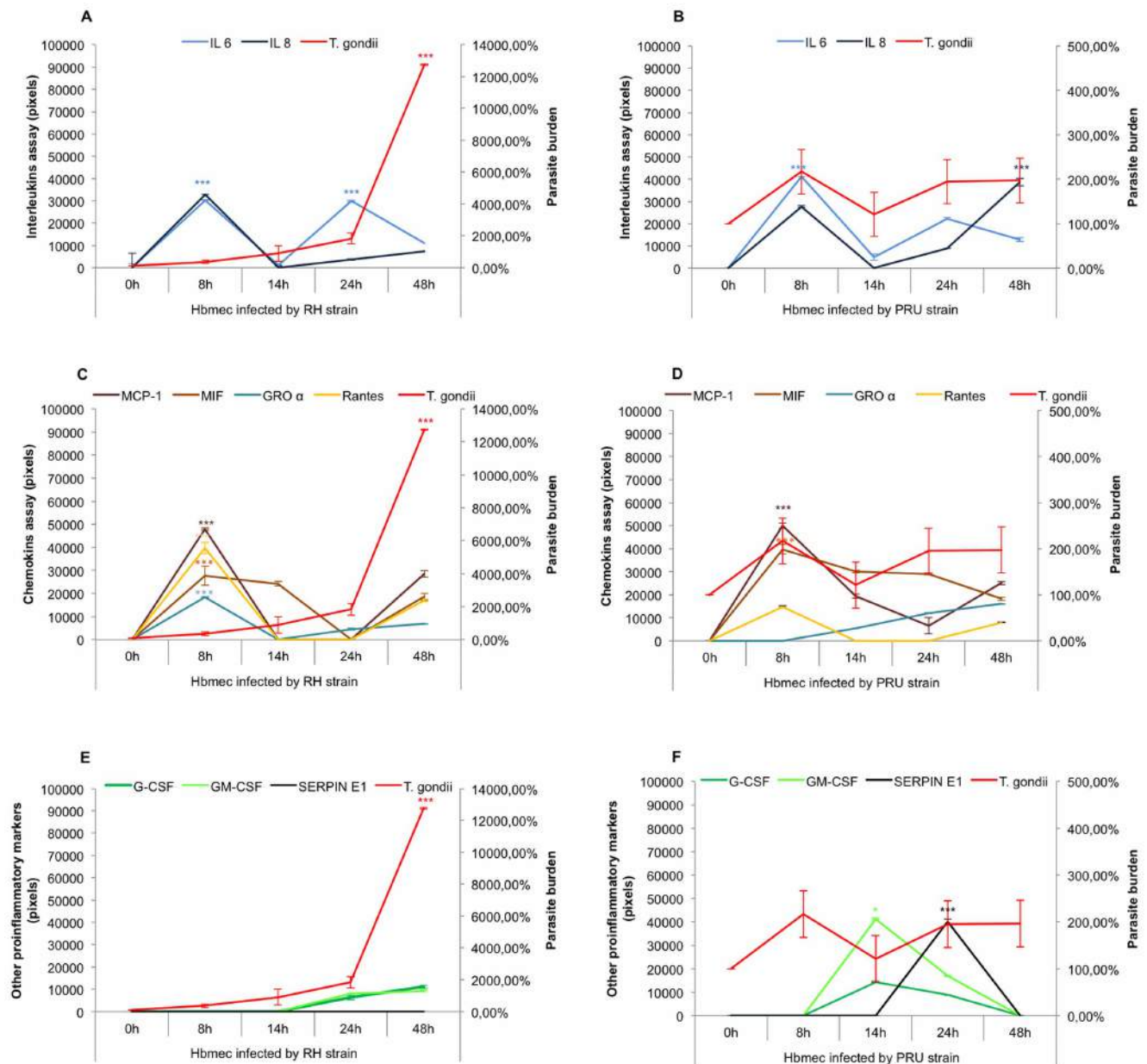


Figure 1. Kinetics of pro-inflammatory proteins synthesized by infected Hbmc. A and B: cytokine expression profiles; C and D: chemokine expression profiles; E and F: growth factor and SERPIN E1 expression profiles were determined after 8 h, 14 h, 24 h and 48 h infection by two strains of *T. gondii* RH (Figure 1A, 1C and 1E) and PRU (Figure 1B, 1D and 1F). A basal expression level for each pro-inflammatory protein *T. gondii* burden was determined at T_0 . Concentrations of immune mediators were calculated using values of corrected pixels obtained from uninfected cells (negative control) subtracted from pixel values of infected cells. *T. gondii* burdens were evaluated by the percentage of *Toxoplasma* multiplication, knowing that the parasite burden at T_0 is 100%. The parasite burden scale was multiplied 100 times (Only in Hbmc infected by RH strain). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0098491.g001

then increased non significantly (NS) at 48 h post infection (Figure 1C). G-CSF and GM-CSF production increased slightly from 14 h to 48 h post infection (NS) (Figure 1E). In the period when all protein levels declined, the RH parasite burden rose sharply in endothelial cells (Figure 1A, 2C).

At 8 h post infection with PRU (Figure 1B, 1D, 1F), IL-6, IL-8, MIF, MCP-1 synthesis and parasite levels peaked (Figure 1B, 1D), when GRO α and Rantes synthesis remained low (Figure 1D). From 8 h to 14 h post infection, all immune mediators decreased significantly except GRO α and the parasite burden increased

slightly (NS) (Figure 1B, 1D). Between 14 h and 48 h post infection, IL-6, IL-8, MCP-1, GRO α (NS), Rantes (NS) synthesis and the parasite burden (NS) increased (Figure 1B, 1D). On the other hand, G-CSF (NS) and GM-CSF expression profiles reached peaks at 14 h (Figure 1F). SERPIN E1 increased significantly between 14 h and 24 h of infection whereas the parasite burden was constant (Figure 1F).

2. Kinetics of pro-inflammatory proteins and *T. gondii* burden in infected human microglial cells (CMH5)

CMH5 infected with RH showed a basal expression level for interleukins, chemokines and other inflammatory proteins in microglial cells at T_0 (Figure 2A, 2C, 2E). The expression levels of interleukins (IL-6 and IL-8), chemokines (MCP-1, MIF and GRO α) and growth factors (G-CSF and GM-CSF) increased steadily from 8 h until 24 h post infection whereas the parasite burden decreased erratically until 24 h post infection (Figure 2A, 2C, 2E). At 48 h post infection, all protein levels decreased except SERPIN E1 synthesis, which increased (NS) (Figure 2E). The parasite burden reached a peak at 48 h post infection, but this increase was not statistically significant.

After infection of CMH5 with PRU, at 8 h post infection, we observed a non-significant synthesis for interleukins (IL-6 and IL-8), chemokines (MCP-1, MIF and GRO α), growth factors (G-CSF and GM-CSF) and SERPIN E1. The parasite burden reached peaks at 8 h post infection (Figure 2B, 2D, 2F). At 14 h post infection, MCP-1 and growth factor levels slumped (Figure 2D, 2F) and the parasite burden decreased slightly (NS) until 24 h post infection. At this time post infection, all protein levels reached their peaks. At 48 h post infection, all protein levels decreased except SERPIN E1 (NS) and the parasite burden levels increased (NS) (Figure 2F).

3. Kinetics of pro-inflammatory proteins and *T. gondii* burden in an infected human neuroblastoma cell line (SH SY5Y)

As shown in Figure 3A, 3C, 3E, SH SY5Y infected with RH showed a basal expression level for interleukins, chemokines and other inflammatory proteins in neurons at T_0 . Expression of IL-6 and IL-8 in neurons reached peak levels significantly and the parasite burden fell (NS) from 8 h post infection. The level of IL-6 and IL-8 dropped at 14 h post infection, when the parasite burden was also significantly lower compared to the parasite burden at 8 h post infection. At 24 h post infection, interleukin synthesis increased significantly and the parasite burden dropped sharply. At 48 h post infection, interleukin synthesis declined while the parasite burden rose gradually (NS) (Figure 3A). Among the chemokines (MCP-1, MIF and GRO α) (Figure 3C), only GRO α synthesis was significant at 24 h post infection and the parasite burden decreased between 8 h and 24 h post infection (NS) (Figure 3C). At 48 h post infection, all chemokines and parasite burden increased (NS) (Figure 3C). In addition, a low level of G-CSF was produced significantly at 24 h post infection (Figure 3E). SERPIN E1 was expressed from 8 h to 48 h (Figure 3E).

For PRU infection (Figure 3B, 3D, 3F), IL-6 and IL-8 synthesis increased significantly between 8 h to 24 h post infection, whereas the parasite burden reached a peak significantly at 14 h and then decreased sharply until 48 h. After 24 h post infection, both synthesis of interleukins and parasite burden fell compared to 24 h post infection (Figure 3B). Expression of MCP-1 and GRO α , as well of G-CSF, GM-CSF and SERPIN E1 showed similar profiles (Figure 3D, 3F). Growth factors and SERPIN E1 synthesized proteins decreased significantly after 24 h post infection compared to 14 h post infection, when the parasite burden reached its lowest level.

4. Comparison of pro-inflammatory protein expression profiles in human microglial cells (CMH5), human endothelial cells (Hbmec) and human neuroblastoma cell line (SH SY5Y) infected by RH and PRU strains

To compare these results, a statistical analysis was performed. MCP-1 synthesis at 24 h post infection was significantly higher in

CMH5 (Figure 2C, 2D) compared to Hbmec ($p < 0.004$) (Figure 1C, 1D) and SH SY5Y ($p < 0.0001$) (Figure 3C, 3D). GRO α and IL-6 were less produced by Hbmec (Figure 1A, 1B, 1C, 1D) compared to CMH5 ($p < 0.0001$) (Figure 2A, 2B, 2C, 2D) and SH SY5Y ($p < 0.0001$) (Figure 3A, 3B, 3C, 3D). Synthesis at 24 h post infection was significantly higher compared to other infection times ($p < 0.0001$). Furthermore, MIF was significantly produced only by CMH5 and Hbmec cells. Which was present in higher amount in CMH5 at 24 h post infection ($p < 0.0001$) (Figure 2C, 2D) and very low in SH SY5Y ($p < 0.001$) (Figure 3C, 3D). Hbmec infected with *Toxoplasma* produced Rantes ($p < 0.0001$) (Figure 1C, 1D) and sICAM-1 ($p < 0.0001$) (data not shown).

Rantes synthesis was high in Hbmec infected by RH at 8 h post infection (Figure 1C). IL-8 expression was high in CMH5 infected by RH ($p < 0.0001$) at 24 h post infection compared to 14 h ($p < 0.0001$) and 48 h ($p < 0.0001$) (Figure 2A). In the presence of PRU, all cells expressed high level of G-CSF ($p < 0.002$) and GM-CSF ($p < 0.0001$) (Figure 1F, 2F, 3F). G-CSF and GM-CSF expression was significantly increased at 24 h post infection in CMH5 ($p < 0.0001$) (Figure 2F). Compared to the RH strain, the PRU strain stimulates Hbmec to produce SERPIN E1 ($p < 0.001$) (Figure 1F).

Discussion

Different experimental approaches were used to analyze expression of immune mediators during *T. gondii* infection in brain cells. For example, regarding human brain cells, Xiao *et al*, used a human neuroepithelioma cell line (neural cells, line SK-N-MC) infected with 3 canonical *T. gondii* strains to show differences in a wide range of biological functions such as the immune response [47]. They noticed a modulation of the expression of pro-inflammatory gene like IL-8 depending of the strain type.

The originality of our work resides in the comparison of the different protein levels of cytokines, chemokines and other immune factors in three human nervous cells infected *in vitro* by RH (type I) and PRU (type II) *Toxoplasma* strains during the 48 first hours post-infection by tachyzoites. Proteome Profiler Arrays allowed analyzing simultaneously a broad spectrum of pro-inflammatory proteins.

In immunocompetent mice and *in vitro* models, tachyzoites can infect astrocytes [25] [14] [26], microglial cells [24] [14] and neurons [16] [26] leading to cyst formation [14]. In addition, astrocytes, microglial cells and neurons are suitable for the persistence of cysts in chronically infected rats [27].

In this study, we identified many pro-inflammatory factors like cytokines, chemokines, and growth factors secreted by different human nervous cells after *Toxoplasma* infection. All these factors have roles in the host immune response to parasite challenge: chemokines and their receptors are important in the control of parasite replication and CNS inflammation, and trigger pro-inflammatory responses to many microbial pathogens [15]. Among the pro-inflammatory proteins, were chemokines (MCP1, GRO α , MIF and Rantes) designed to recruit immune cells and cytokines (IL-6 and IL-8) able to activate immune responses. Growth factors (G-CSF and GM-CSF) are not only hematopoietic colony-stimulating factor but also neuronal growth factors with strong anti-apoptotic actions on neurons. In parallel to this pro-inflammatory protein synthesis, we observed a repeatable decrease in parasitic burden for each *T. gondii* strain at 24 h post infection in microglial cells and neurons. This suggests that this decrease may be due to production of various immune mediators involved in the early control of *T. gondii* multiplication in human nervous cells. At 48 h post infection, parasite burden increased in a large part of infected cells, in RH-infected cells whatever the cell

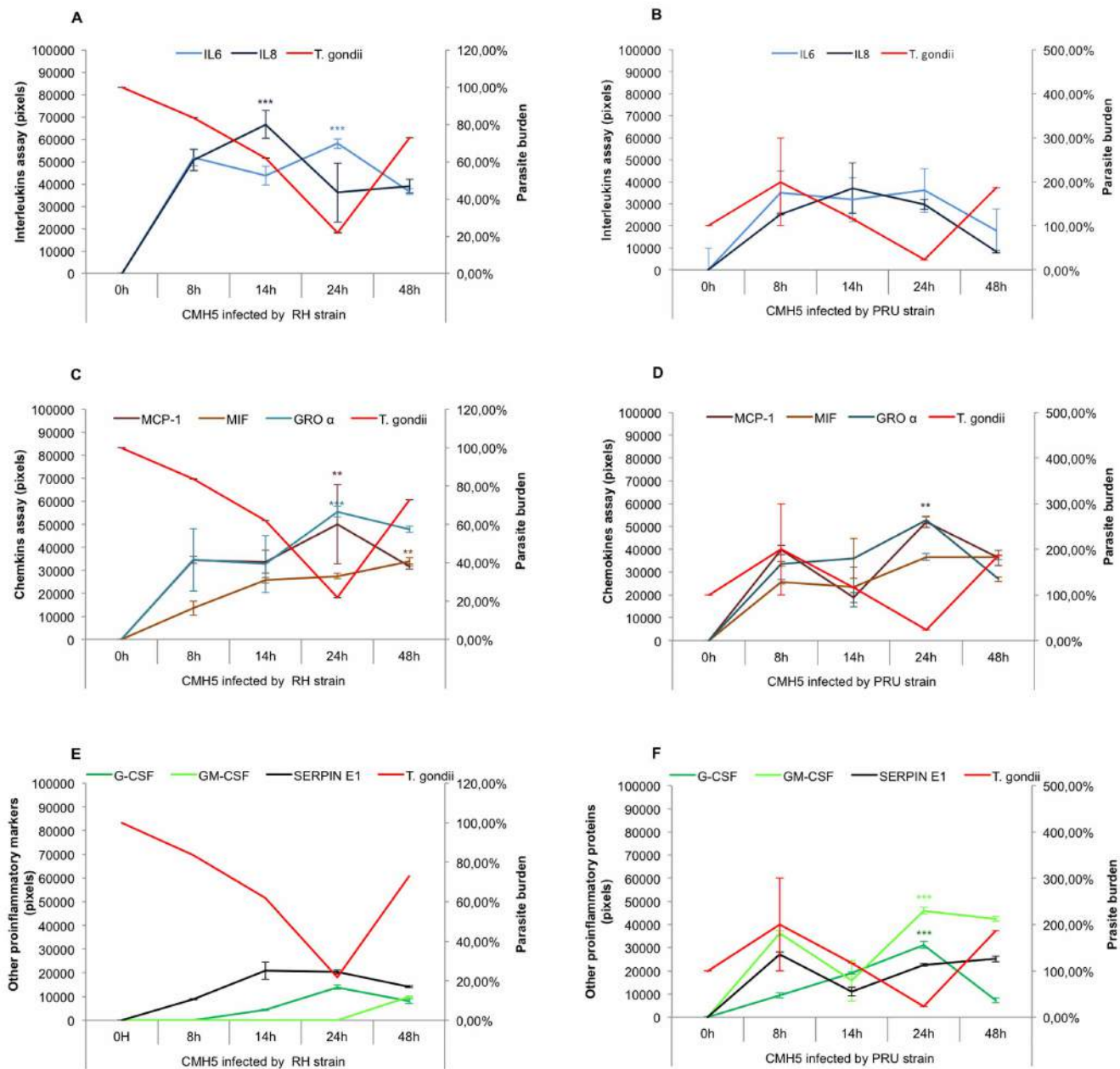


Figure 2. Kinetics of pro-inflammatory proteins synthesized by infected CMH5. A and B: cytokine expression profiles; C and D: chemokine expression profiles; E and F: growth factor and SERPIN E1 expression profiles were determined after 8 h, 14 h, 24 h and 48 h infection by two strains of *T. gondii* RH (Figure 2A, 2C and 2E) and PRU (Figure 2B, 2D and 2F). A basal expression level for each pro-inflammatory protein *T. gondii* burden was determined at T_0 . Concentrations of immune mediators were calculated using values of corrected pixels obtained from uninfected cells (negative control) subtracted from pixel values of infected cells. *T. gondii* burdens were evaluated by the percentage of *Toxoplasma* multiplication, knowing that the parasite burden at T_0 is 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0098491.g002

type. We also observed a lysis of cells, which could explain the decrease of immune response.

Endothelial cells constitute the blood-brain barrier through which the tachyzoites pass into the CNS. Our results show that these cells are stimulated with *Toxoplasma* to produce immune mediators mainly at 8 h post infection. This reaction rapidly decreases between 14 h and 48 h post infection, when parasite burden increased. This suggests that these cells do not react strongly against *Toxoplasma* infection compared to neurons and microglial cells. The production of interleukins and chemokines in

the early hours of the infection might activate the immune response. In these cells, PRU strain induces more inflammatory response than RH strain, as shown by a higher secretion of chemokines and growth factors between 14 h and 48 h. Endothelial cells specifically express sICAM-1 in the presence of PRU strain, but not after infection with RH strain (data not shown). Barragan *et al.* demonstrated that this soluble form of ICAM, sICAM-1, has an inhibitory effect on transmigration of *T. gondii* across BeWo (human placenta), Caco2 (human intestine) and MDCK (canine kidney) cells, whereas it did not significantly affect

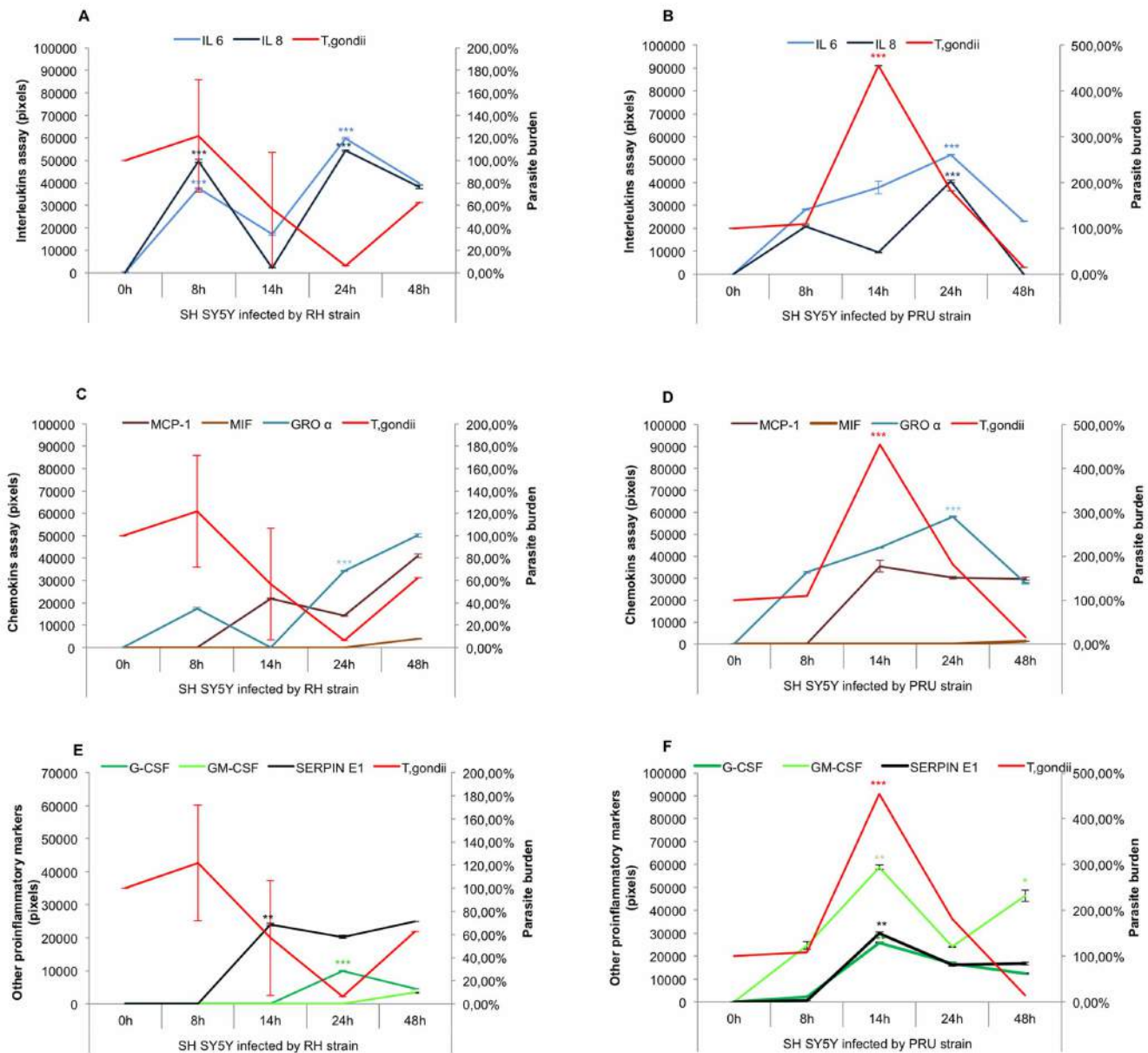


Figure 3. Kinetics of pro-inflammatory proteins synthesized by infected SH SY5Y. A and B: cytokine expression profiles; C and D: chemokine expression profiles; E and F: growth factor and SERPIN E1 expression profiles were determined after 8 h, 14 h, 24 h and 48 h infection by two strains of *T. gondii* RH (Figure 3A, 3C and 3E) and PRU (Figure 3B, 3D and 3F). A basal expression level for each pro-inflammatory protein *T. gondii* burden was determined at T_0 . Concentrations of immune mediators were calculated using values of corrected pixels that were obtained from pixel values of uninfected cells (negative control) subtracted from pixel values of infected cells. *T. gondii* burdens were evaluated by the percentage of *Toxoplasma* multiplication, knowing that the parasite burden at T_0 is 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0098491.g003

host cell invasion by the parasite [19]. According to these results, in our model, sICAM-1 could inhibit the transmigration process of type II strain through brain endothelial cells.

After infection by both *T. gondii* strains, all cells (microglial cells, endothelial cells, and neurons) synthesized mainly IL-6, IL-8, MCP-1 and $GRO\alpha$. In CMH5 and SH SY5Y, the expression of cytokines, chemokines and growth factors was variable but significantly higher at 24 h post infection, the time when parasite burden (RH and PRU) declined. At 24 h post infection, microglial cells infected by both strains produced high levels of MCP-1. This chemokine can participate in the control of *T. gondii* infection as described in human fibroblastic cells (MRC5) [48] and human

astrocyte cells [49]. *In vivo*, it increases inflammation, promoting recruitment of monocytes and lymphocytes. The immune responses could be amplified in these cells by secretion of $GRO\alpha$. Synthesis of $GRO\alpha$ was also significantly higher at 24 h post infection in microglial cells compared to other cells. This chemokine has a major role in neutrophil activation. Kikumura *et al.* [50] showed that $GRO\alpha$ was up-regulated in the retina and brain of infected mice and involved in neutrophil infiltration. Thus, microglial cells seems to be major cerebral immune cells, able to amplify immune reactions against the parasite, promoting production of the main chemokines.

IL-6 and IL-8 production was predominant in microglial cells and neurons compared to endothelial cells, especially at 24 h post infection, which might suggest that these two interleukins have a role in controlling proliferation of RH and PRU strains in microglial cells and neurons. IL-6 is known to control parasite burden and inflammatory activity, in the brain together with other cytokines (such as IL-10) [14]. IL-6 is also a mediator responsible for the production of acute phase proteins and increases cytotoxic activity of NK cells. For the first time, we demonstrated a local production for IL-8 in human nervous cells that appeared to have a crucial role in neutrophil recruitment to the brain as described in patients with retinochoroiditis. IL-8 has a role in the inflammatory mechanisms of acute toxoplasmic retinochoroiditis [51]. It is noteworthy that mice lacking CXCR2, the high affinity receptor of IL-8, show a significant increase in tachyzoite proliferation and a large number of cysts in the brain [52].

Besides the previously described chemokines and interleukins, infected microglial cells produced high levels of MIF compared to other cells; this production can boost the control of parasite proliferation in these cells. MIF has an essential role in controlling *T. gondii* type II proliferation and the severity of inflammation in a mouse model [53].

G-CSF and GM-CSF were produced by all cells, especially those infected by PRU strain. In addition to their role in growth, differentiation and maturation of macrophages, monocytes and dendritic cells, they have the capacity to inhibit *in vivo* neutrophil apoptosis, and the ability to lyse tachyzoites *in vitro* in the presence of specific antibodies [54]. G-CSF and GM-CSF may thus extend the inflammatory process in the brain by enhancing phagocytosis [55] and cytotoxic activities [56]. Infected astrocytes and endothelial cells also become activated to produce GM-CSF [57]. Studies using *T. gondii* infection in mice, which can cause CNS inflammation, reported a detrimental role for GM-CSF by increasing parasitic burden in peritoneal macrophages [58]. Therefore, GM-CSF is a potent pro-inflammatory cytokine that plays a pathogenic role in the CNS inflammatory disease, experimental autoimmune encephalomyelitis [59], suggesting that G-CSF and GM-CSF may amplify the pro-inflammatory immune reaction during PRU infection in brain.

For the first time, we showed the up-regulation of serine protease inhibitor (SERPIN E1) in infected human nervous cells. It occurred particularly in neurons and microglial cells a few hours post infection. Many members of the serine protease inhibitor

superfamily play an important role in physiological and pathological processes, and can be regarded as protease inhibitors, which are involved in coagulation reactions, fiber dissolution, angiogenesis, complement activation, and immune and inflammatory reactions. It has been suggested that SERPINs (SERPIN B3, B4) could inhibit host cell apoptosis that may inhibit replication and decrease *T. gondii* viability. Therefore, the persistence of up-regulated SERPIN E1 in microglial cells and neurons could also be involved in limiting the growth of *T. gondii* and preventing death of infected human nervous cells. In addition, SERPIN E1, plasminogen activator inhibitor 1, inhibits the uPA/uPAR pathway which promotes active MMP-9 forms secreted by *Toxoplasma* infected macrophages [60], which could limit the invasion of immune cells infected by *T. gondii* into the brain.

In addition to several studies which have shown that murine and rat microglial cells contribute *in vitro* to the inhibition of *T. gondii* replication [27], our results suggest that both human microglial cells and neurons can react against *Toxoplasma* by producing IL-6, IL-8, MCP-1, GRO α and SERPIN E1 [20] [17] [18]. These immune mediators may play a role in the control of *Toxoplasma* multiplication at 24 h post infection in the human brain, as shown by the decrease in parasitic burden at this time of cell infection. G-CSF and GM-CSF were specifically produced in all cells infected with PRU, suggesting a pro-inflammatory effect of this strain in human nervous cells compared to RH strain. In this work we did not detect a production of IFN- γ in infected human nervous cells. This could be explained by the lack of interaction between the effector immune cells. For this reason, this work will be complemented by a study of IFN- γ effect on immune mediators and on parasite multiplication rate in each infected cells.

Acknowledgments

The authors thank H. Riahi, R. Mouzet, M. Gatet and J. Cook-Moreau for technical and scientific assistance, Pr. M.O. Jauberteau-Marchan, for SH SY5Y and The Biological Resource Centre (BRC) of Limoges for providing *Toxoplasma gondii* strains.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NM BC. Performed the experiments: NM MAH. Analyzed the data: NM BC. Contributed reagents/materials/analysis tools: NM PV. Wrote the paper: NM BC MLD.

References

- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG (2010) *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107: 253–260.
- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, et al. (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5844–5849.
- Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Banuls AL, et al. (2010) Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e876.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML (2002) Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32: 27–38.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, et al. (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34: 1185–1196.
- Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, et al. (2011) Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol* 11: 1378–1387.
- Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Lore K, Barragan A (2009) The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun* 77: 1679–1688.
- Petersen E, Kijlstra A, Stanford M (2012) Epidemiology of ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm* 20: 68–75.
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, et al. (2009) Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 199: 1155–1167.
- Denkers EY, Butcher BA, Del Rio L, Bennouna S (2004) Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* 34: 411–421.
- Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, et al. (2008) Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29: 306–317.
- Del Rio L, Bennouna S, Salinas J, Denkers EY (2001) CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167: 6503–6509.
- Lieberman LA, Hunter CA (2002) The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int Rev Immunol* 21: 373–403.
- Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Hadding U (1997) Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur J Immunol* 27: 1539–1548.
- Denney CF, Eckmann L, Reed SL (1999) Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 67: 1547–1552.
- Schluter D, Deckert M, Hof H, Frei K (2001) *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. *Infect Immun* 69: 7889–7893.

17. Clahsen T, Schaper F (2008) Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol* 84: 1521–1529.
18. Aviles H, Stiles J, O'Donnell P, Orshal J, Leid J, et al. (2008) Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine *Toxoplasma* infection. *J Parasitol* 94: 1282–1288.
19. Barragan A, Brossier F, Sibley LD (2005) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 7: 561–568.
20. Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD (2005) Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 201: 1761–1769.
21. Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O (2011) Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232: 119–130.
22. Rahman A, Fazal F (2009) Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal* 11: 823–839.
23. Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, et al. (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 19: 713–724.
24. Freund YR, Zaveri NT, Javitz HS (2001) In vitro investigation of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in microglia of BALB/c and CBA/Ca mice. *Infect Immun* 69: 765–772.
25. Halonen SK, Weiss LM, Chiu FC (1998) Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *in vitro*. *Int J Parasitol* 28: 815–823.
26. Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC (1996) Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1150–1156.
27. Luder CG, Giraldo-Velasquez M, Sendtner M, Gross U (1999) *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol* 93: 23–32.
28. Fagard R, Van Tan H, Creuzet C, Pelloux H (1999) Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. *Parasitol Today* 15: 504–507.
29. Hulinska D, Sykora J, Zastera M (1990) Effect of cortisone on *Toxoplasma gondii* infection studied by electron microscopy. *Folia Parasitol (Praha)* 37: 207–212.
30. Haroon F, Handel U, Angenstein F, Goldschmidt J, Kreutzmann P, et al. (2012) *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS One* 7: e35516.
31. Yarovinsky F (2014) Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 14: 109–121.
32. Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJ, Bluethmann H, Alexander J (1998) A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 20: 231–239.
33. Suzuki Y, Rani S, Liesenfeld O, Kojima T, Lim S, et al. (1997) Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 65: 2339–2345.
34. Herrmann DC, Barwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, et al. (2012) *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet Res* 43: 39.
35. Blewett DA, Miller JK, Harding J (1983) Simple technique for the direct isolation of toxoplasma tissue cysts from fetal ovine brain. *Vet Rec* 112: 98–100.
36. Janabi N, Peudenier S, Heron B, Ng KH, Tardieu M (1995) Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci Lett* 195: 105–108.
37. de Gannes FM, Merle M, Canioni P, Voisin PJ (1998) Metabolic and cellular characterization of immortalized human microglial cells under heat stress. *Neurochem Int* 33: 61–73.
38. Schweitzer CM, van der Schoot CE, Drager AM, van der Valk P, Zevenbergen A, et al. (1995) Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells. *Exp Hematol* 23: 41–48.
39. Schweitzer KM, Vicart P, Delouis C, Paulin D, Drager AM, et al. (1997) Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. *Lab Invest* 76: 25–36.
40. Liu ZY, Ganju RK, Wang JF, Schweitzer K, Weksler B, et al. (1997) Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood* 90: 2253–2259.
41. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71: 741–747.
42. Agholme L, Nath S, Domert J, Marcusson J, Kagedal K, et al. (2013) Proteasome inhibition induces stress kinase dependent transport deficits - Implications for Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*.
43. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B, Toxoplasmosis ESGF (2006) Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect* 12: 131–136.
44. Cassaing S, Bessieres MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, et al. (2006) Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 44: 720–724.
45. Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, Heesemann J (1995) Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol* 16: 1221–1230.
46. Roos DS, Donald RG, Morrisette NS, Moulton AL (1994) Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol* 45: 27–63.
47. Xiao J, Jones-Brando L, Talbot CC Jr, Yolken RH (2011) Differential effects of three canonical *Toxoplasma* strains on gene expression in human neuroepithelial cells. *Infect Immun* 79: 1363–1373.
48. Brenier-Pinchart MP, Vigan I, Jouvin-Marche E, Marche PN, Pelet E, et al. (2002) Monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression after *Toxoplasma gondii* infection *in vitro* depend on the stage of the parasite. *FEMS Microbiol Lett* 214: 45–49.
49. Brenier-Pinchart MP, Blanc-Gonnet E, Marche PN, Berger F, Durand F, et al. (2004) Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression *in vitro*. *Acta Neuropathol* 107: 245–249.
50. Kikumura A, Ishikawa T, Norose K (2012) Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 96: 1259–1267.
51. Goncalves RM, Rodrigues DH, Camargos da Costa AM, Teixeira MM, Ribeiro Campos W, et al. (2007) Increased serum levels of CXCL8 chemokine in acute toxoplasmic retinochoroiditis. *Acta Ophthalmol Scand* 85: 871–876.
52. Knight BC, Kissane S, Falciani F, Salmon M, Stanford MR, et al. (2006) Expression analysis of immune response genes of Muller cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J Neuroimmunol* 179: 126–131.
53. Flores M, Saavedra R, Bautista R, Viedma R, Tenorio EP, et al. (2008) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J* 22: 3661–3671.
54. Erbe DV, Pfefferkorn ER, Fanger MW (1991) Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 146: 3145–3151.
55. Channon JY, Miselis KA, Minns LA, Dutta C, Kasper LH (2002) *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 70: 6048–6057.
56. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F (1992) Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80: 2920–2924.
57. Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ (2000) *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* 68: 407–410.
58. Coleman DL, Chodakewitz JA, Bartiss AH, Mellors JW (1988) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood* 72: 573–578.
59. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, et al. (2007) GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178: 39–48.
60. Schuindt SH, Oliveira BC, Pimentel PM, Resende TL, Retamal CA, et al. (2012) Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet Parasitol* 186: 207–215.

V.3 Article 2: Effect of interferon gamma on immune mediators produced in human nervous cells infected by two strains of *Toxoplasma gondii*

**Effect of interferon gamma on immune mediators produced
in human nervous cells infected by two strains of *Toxoplasma gondii***

Nour Mammari^{a*}, Philippe Vignoles^a, Mohamad Adnan Halabi^b,

Marie-Laure Dardé^{a,c}, Bertrand Courtioux^a

^aINSERM UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Limoges, and CNRS, FR 3503 GEIST, University of Limoges, France. 2 street Docteur Marcland, 87025 Limoges, France.

^bUMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, France. 2 street Docteur Marcland, 87025 Limoges, France.

^cDepartment of Parasitology and Biological Resource Centre for *Toxoplasma*, University Hospital, Limoges, France. 2 avenue Martin Luther King 87042 Limoges, France.

*Corresponding author: Nour MAMMARI

Address: INSERM UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Faculties of Medicine and Pharmacy, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France.

Phone: 00 33 5 55 43 58 29. E-mail: nour.mammari@unilim.fr

.

Abstract

Interferon gamma (IFN- γ) is the major immune mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. It prevents toxoplasmic encephalitis in murine models. In immunocompromised patients, the low level of CD4⁺ cells in these patients leads to a lack of IFN- γ secretion and causes reactivation of latent *T. gondii* infection that may confer a risk for severe toxoplasmic encephalitis. In this study, we analyze the immune mediator production and parasite multiplication in Human nervous cells stimulated by IFN- γ and infected by tachyzoites of two *T. gondii* strains (RH and PRU). IFN- γ has a significant effect on the synthesis of some pro-inflammatory proteins; It decreased the synthesis of MCP-1, G-CSF, GM-CSF, Serpin E1 in all cells. It decreased IL-6, MIF and GRO α only in endothelial cells, while IFN- γ increased sICAM and Serpin E1 synthesis only in nervous cells. The PRU strain burden increased in all nervous cells and in contrast, RH strain replication was controlled in IFN- γ -stimulated microglial and endothelial cells but not in IFN- γ -stimulated neurons.

Keywords: Human Nervous Cells, IFN- γ , Immunity , *Toxoplasma gondii*.

1. Introduction

Toxoplasmosis, due to the coccidian parasite *Toxoplasma gondii*, is one of the most common human infections in the world. *Toxoplasma gondii* induces a potent cellular immune response that is essential for controlling infection. In immunocompromised hosts, the low level of CD4⁺ cells in these patients leads to a lack of IFN- γ secretion and causes reactivation of latent *T. gondii* infection that may confer a risk for severe toxoplasmic encephalitis. In addition, the severity of primary infection may depend also on the virulence profile of the *Toxoplasma* strain types. On the basis of lethality in mice, strains of the three main clonal lineages were classified as virulent (type I) and avirulent strains (types II and III) (Saeij et al. 2006).

Interferon gamma (IFN- γ) is one of the most important cytokine for immune control of *Toxoplasma* infection in mice. In infected mice, this cytokine could control tachyzoite proliferation, thus maintaining latency of chronic infection in the brain and preventing toxoplasmic encephalitis (Suzuki et al. 1988). During acute *Toxoplasma* infection, natural killer (NK) cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells are the major sources of IFN- γ and this cytokine might stimulate all effector cells to activate a protective immune response against *T. gondii* infection (Combe et al. 2005). In the murine central nervous system (CNS), IFN- γ activates neuronal cells to control tachyzoite multiplication (Suzuki et al. 2005). The stimulation of murine microglial cells with IFN- γ and TNF α inhibited the penetration of PLK tachyzoites (avirulent type II *Toxoplasma* strain) whereas treatment with either cytokine alone did not reduce the percentage of *T. gondii* in these cells (Freund et al. 2001). Similarly, after treatment with IFN- γ and Lipopolysaccharide (LPS), Human microglial cells become activated *in vitro* and inhibit the entry of tachyzoites belonging to the PRU strain (type II). Intracellular tachyzoite proliferation is inhibited by the pretreatment with IFN- γ of both murine and human astrocyte cells (Peterson et al. 1995) (Halonen et al. 1998). In addition, it

was demonstrated that IFN- γ is involved in *Toxoplasma* cyst formation in murine astrocytes and neurons (Fischer et al. 1997) (Lüder et al. 1999).

Most of these data were obtained in murine models. To further study the role of IFN- γ in the control of *Toxoplasma* infection in human nervous cells *in vitro*. We have stimulated *in vitro* human microglial cells, endothelial cells and neurons with IFN- γ . These stimulated cells were then infected with RH (type I) or PRU (type II) *T. gondii* strains. In a previous paper, we recently reported the production of cytokines and chemokines by infected human nervous cells in absence of IFN- γ (Mammari et al. 2014). In this study, we report the effect of IFN- γ on the activation of infected human nervous cells and the control of intracellular multiplication of each *T. gondii* strain.

2. Materials and methods

2.1. Parasite production

One type I strain (RH) and one type II strain (PRU) of *T. gondii* were used in the present study. Tachyzoites for each strain were grown and purified in human fibroblastic cell cultures (MRC5) as previously described (Mammari et al. 2014). All protocols involving animals were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Limousin, France (Permit no. 3-07-2012).

2.2. Human nervous cell cultures

2.2.1. Human microglial cells (CMH5)

These microglial cells (kindly provided by Pr. P. Vincendeau, Bordeaux, France) (Janabi et al. 1995), were grown on the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) inactivated at 56°C for 1 h, 0.2 mM sterilized L-cysteine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 2 mM L-

glutamine (Gibco), 2 mM sodium pyruvate (Gibco), 100 UI/m streptomycin-penicillin (Gibco), 2 mM HEPES (Gibco) and 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). The CMH5 cells were seeded in culture flasks (25 cm²) at a density of 5×10^6 cells/mL. Separation of confluent cells was performed by trypsinization in DMEM.

2.2.2. Endothelial cells (Hbmec)

Human bone marrow endothelial cells (Hbmec) were obtained from the cell line established by D. Paulin (University of Paris 7, France) (Schweitzer et al. 1997). The properties of these cells are similar to those of endothelial brain cells, with respect to endothelial adhesion molecules, cell surface markers, and morphologic characteristics. The Hbmec cells were grown on DMEM supplemented with 10% FBS inactivated at 56°C for 1 h, 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 100 UI/mL of streptomycin-penicillin, 10 mM HEPES buffer, 4.5 g/mL glucose (Gibco), 3500 UI/mL heparin and 0.15 mg/mL gentamicin (Gibco). These cells were seeded in culture flasks (25 cm²) pre-treated with 2% gelatin at a density of 4×10^6 cells/mL. Confluent cells were trypsinized in PBS.

2.2.3. Human neuroblastoma cells (SH SY5Y)

This cell line (kindly provided by Pr. M.O. Jauberteau-Marchan, Limoges, France), was used in most research on Alzheimer's disease (Ross et al. 1983). These cells were grown on the RPMI 1640 medium (Gibco), supplemented with 10% FBS inactivated at 56°C for 1 h, 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate and 100 UI/mL streptomycin-penicillin. These cells were seeded in culture flasks (25 cm²) at a density of 4×10^6 cells/mL. The confluent cells were detached from each other using Versen 1X (Gibco).

2.3. Treatment and infection of human nervous cells

Each type of cell culture was treated with IFN- γ (100 ng/mL) (Sigma-Aldrich) for 24 h. A total of 10^6 human nervous cells (confluent cells) were then infected separately for 24 h by tachyzoites either from the RH strain (type I), or from the PRU strain (type II) with a ratio of 1 cell: 2 tachyzoites. Control cells were uninfected and non-stimulated cells, and uninfected stimulated cells. Each experiment was performed in triplicate at separate times to ensure reproducibility of results.

2.4. Cytokine, chemokine and growth factor analysis

The pro-inflammatory proteins were analysed in co-culture supernatants using the Proteome Profiler Array technique (R&D, Lille, France). Each nitrocellulose membrane contained duplicated spots of 36 different antibodies against cytokines, chemokines, growth factors and adhesion proteins. The kit was used according to manufacturer's instructions. Each membrane was incubated with a mixture chemiluminescent substrate A&B (Promega, Lyon, France) and exposed to G-BOX (Syngene, Versailles, France). The image was captured using GeneSnap software (Syngene). Results appeared as dark spots and protein expression levels were determined by quantifying the intensity of coloration, expressed as pixel units, with GeneTools software (Syngene). The negative control quantification value was subtracted from the quantification value of each spot.

2.5. Quantification of parasite burden

The viable parasite burden was quantified in the pellet of trypsinized cell culture by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers for *T. gondii* 529 gene repeat. The qRT-PCR was performed using One Step SYBR Green

RT-PCR Kit (Qiagen, Paris, France). Each RNA sample (≤ 100 ng) was added to PCR tubes containing SYBR master mix (12.5 μ L), RT Mix (0.25 μ L) and specific primers (0.6 μ M) [sense: 5'-AGGCGAGGTGAGGATGA-3'; anti-sense: 5'-TCGTCTCGTCTGGATCGAAT-3'] (Sigma-Aldrich) (Cassaing et al. 2006). Quantification was performed using a dose of tachyzoites ranging from 5×10^4 to 1 *Toxoplasma* amplified by primers for the 529 pb repeat gene.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of pro-inflammatory protein profiles and comparison of parasite burden quantification were carried out using Scheirer-Ray-Hare test. All interactions between the different factors were performed using Steel-Dwass and Siegel-Castellan tests with 95% family-wise confidence levels. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Among the 36 immune mediators tested, two interleukins (IL-6 and IL-8), three chemokines (MCP-1, MIF, GRO α) and five other markers (G-CSF, GM-CSF, Serpin E1 and sICAM) were previously shown as significantly expressed in non-stimulated CMH5, Hbmec and SH SY5Y infected cells (Mammari et al. 2014). The same mediators were also detected in IFN- γ stimulated infected cells.

Compared to immune mediator expression in infected non-stimulated cells (Mammari et al. 2014), stimulation by IFN- γ leads to a decrease IL-6 and GRO α levels in RH and PRU-infected endothelial cells ($p < 0.001$) (Table 1) and MCP-1, G-CSF, GM-CSF and Serpin E1 synthesis in three cell types (Table 1). However, MCP-1 synthesis is decreased in IFN- γ -stimulated and PRU- infected microglial cells (CMH5) and endothelial cells (Hbmec) ($p < 0.03$) ($p < 0.001$) (Table 1). In neurons (SH SY5Y), MCP-1 level decreased only in RH-

infected and stimulated cells ($p < 0.05$) (Table 1). In presence of IFN- γ , G-CSF synthesis (Table 1) decreased significantly in endothelial ($p < 0.004$) than in microglial ($p < 0.01$) RH – PRU- infected cells and only in PRU-infected neurons (NS) (Table 1). The GM-CSF production was significantly decreased in PRU-infected microglial cells ($p < 0.01$) and neurons ($p < 0.05$) and in RH-infected endothelial cells ($p < 0.05$) (Table 1). In presence of IFN- γ , we noted also that sICAM, adhesion protein decreased synthesis in PRU-infected microglial ($p < 0.001$) and -endothelial cells ($p < 0.001$) (Table 1) but increased in RH and PRU infected neurons ($p < 0.004$) (Table 1). IFN- γ had also a significant effect on Serpin E1 protein production; it decreased her synthesis in PRU-infected microglial ($p < 0.05$) and endothelial cells ($p < 0.004$) and in PRU- and RH- infected neurons ($p < 0.01$). In contrast, IFN- γ did not have a significant effect on IL-8.

At 24 h post-infection, the parasite burden was significantly different in cells infected with RH or PRU strains (Fig. 1). Parasite burden of RH strain was significantly decreased in IFN- γ -stimulated microglial and endothelial cells ($p < 0.01$) (Fig. 1), but not in IFN- γ -stimulated neurons ($p < 0.01$). In contrast, PRU burden rate remained high in each type of IFN- γ -stimulated cells ($p < 0.001$) (Fig. 1).

4. Discussion

Results showed that IFN- γ had a significant effect on some immune protein expression, decreasing their production mainly in PRU-infected cells.

In PRU-infected microglial cells, IFN- γ caused a decrease of MCP-1, growth factors, Serpin E1 and sICAM. The chemokine MCP-1 is known for initiating monocyte/macrophage activation which can promote pro-inflammatory immune response against *T. gondii* and it can also participate in the control of *Toxoplasma* infection, as described in human MRC5

fibroblasts (Brenier-Pinchart et al. 2002) and human astrocytes (Brenier-Pinchart et al. 2004). The decrease of this production under IFN- γ treatment suggests that this cytokine may control a pro-inflammatory immune reaction during this infection. This process was confirmed by a decrease of G-CSF and GM-CSF. These two growth factors are involved in dendritic cell activation, granulocyte survival and enhancement of macrophage/microglial function so that the decrease of their production might limit immune cell activation. In addition, these two growth factors were reported to inhibit neutrophil apoptosis during *Toxoplasma* infection (Channon et al. 2002). The decrease of growth factor production during PRU infection could promote neutrophil apoptosis and thus reduces pro inflammatory reaction induced by this strain. The production of Serpin E1 decreased also after IFN- γ pretreatment.. Serpin E1 was reported to inhibit uPA/uPAR pathway which promotes the secretion of MMP-9 active forms by *Toxoplasma*-infected macrophages (Schuindt et al. 2012). After stimulation by IFN- γ , the diminution of Serpin E1 production might promote parasite invasion in the three types of cells tested.

In PRU-infected endothelial cells we noted decreasing of IL-6, chemokines “MCP-1, MIF and GRO α ”, growth factors, Serpin E1 and sICAM. Interleukin-6 contributes to the intracellular control of types I and II parasite strains in mouse neurons (Jebbari et al. 1998). The decrease of IL-6 might be involved in loss of PRU multiplication in these cells. In addition, the diminution of chemokine production could be control locale inflammatory reaction and promote parasite multiplication. MIF is considered as an important protein. It has been described that MIF had a role in controlling *Toxoplasma* parasite burdens via a strong immune inflammation response responsible for intestinal tissue damages. MIF-deficient mice were susceptible to *T. gondii* infection and presented a high parasite burden (Flores et al. 2008). In our case, the high parasite burden noted in PRU- infected endothelial cells is facilitated via Serpin E1 and sICAM reducing.

In RH-infected endothelial cells, results showed also that IFN- γ caused a decrease of the same proteins except MCP-1, MIF, Serpin E1 and sICAM. These data indicate that RH strain could be less pro-inflammatory strain than PRU strain and the normal expression of Serpin E1 and sICAM suggests role of these proteins in the control of RH strain multiplication.

In PRU-infected neurons, IFN- γ decreased only growth factors and Serpin E1, but increased sICAM production. The decrease of growth factor production during PRU infection could control pro-inflammatory reaction and promote neutrophil apoptosis of neurons infected by PRU. Diminution of Serpin E1 promotes parasite invasion and multiplication, which could be explained by the high parasite burden in PRU-infected neurons. For sICAM, this protein was known to have an inhibitory effect on *T. gondii* transmigration across BeWo (human placenta), Caco2 (human intestine) and MDCK (canine kidney) cells which can control parasite infiltration (Barragan et al. 2005). It has been reported that this protein expressed significantly in patients *Toxoplasma* IgM+. This result might conclude that sICAM could be involved in maintaining infection chronicity and *Toxoplasma* cyst formation (el-Shazly et al. 2001)

In neurons stimulated by IFN- γ , both RH and PRU multiplication rates remained high, suggesting that this cytokine alone is not sufficient for the control of parasite multiplication in neurons. In contrast, RH multiplication rate was decreased in human microglial and endothelial cells stimulated by IFN- γ . This finding suggests the implication of IFN- γ in the control of RH multiplication in these two types of human cells. *In vivo*, this effect could be promoted via IFN γ -activated lymphocytes which had a major role in parasite proliferation control. These cells can activate Th1 immune response and NK cells to limit parasite proliferation in murine model (Denkers et al. 1993). Unexpectedly, this control of multiplication by IFN- γ in human microglial and endothelial cells was not observed for the type II strain PRU, suggesting that the control of PRU proliferation could need other immune

mediators such as TNF α , which interact with IFN- γ action, as described in murine microglia (Freund et al. 2001) .

In conclusion, IFN- γ is implicated in the decrease of pro-inflammatory reaction in PRU-microglial and endothelial cells, which promote parasite persistence. In contrast, IFN- γ may have a role in controlling RH multiplication in human microglial and endothelial cells but not in human neurons. Contrary to what has been demonstrated in *in vivo* studies, our results show that the PRU strain proliferates in all stimulated and non-stimulated cells, as the result of a specific effect of this strain on host cell responses or of absence of the immune protein and cellular interaction that takes place *in vivo*.

5. Acknowledgments

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, and “3IS, Infection et immunité sous immunosuppression” from FR 3503 Genomics Institute, Environment, Immunity, Health and Therapeutics (GEIST), Limoges, France. The authors gratefully thank J. Cook-Moreau, H. Riahi, R. Mouzet and M. Gatet for their technical and scientific assistance.

6. References

Barragan A, Brossier F, Sibley LD (2005) Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol* 7:561–568. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x

Brenier-Pinchart M-P, Blanc-Gonnet E, Marche PN, et al. (2004) Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression *in vitro*. *Acta Neuropathol (Berl)* 107:245–249.

Brenier-Pinchart M-P, Vigan I, Jouvin-Marche E, et al. (2002) Monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression after *Toxoplasma gondii* infection *in vitro* depend on the stage of the parasite. *FEMS Microbiol Lett* 214:45–49.

Cassaing S, Bessières MH, Berry A, et al. (2006) Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 44:720–724. doi: 10.1128/JCM.44.3.720-724.2006.

Channon JY, Miselis KA, Minns LA, et al. (2002) *Toxoplasma gondii* Induces Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Secretion by Human Fibroblasts: Implications for Neutrophil Apoptosis. *Infect Immun* 70:6048–6057. doi: 10.1128/IAI.70.11.6048-6057.2002

Combe CL, Curiel TJ, Moretto MM, Khan IA (2005) NK Cells Help To Induce CD8⁺-T-Cell Immunity against *Toxoplasma gondii* in the Absence of CD4⁺ T Cells. *Infect Immun* 73:4913–4921.

Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A (1993) Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J Exp Med* 178:1465–1472.

el-Shazly AM, Soliman M, el-Kalla MR, et al. (2001) Evaluation of soluble adhesion molecules in the diagnosis of amoebiasis, giardiasis and toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol* 31:691–700.

Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, et al. (1997) Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res* 83:637–641.

Flores M, Saavedra R, Bautista R, et al. (2008) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J* 22:3661–3671.

Freund YR, Zaveri NT, Javitz HS (2001) *In Vitro* Investigation of Host Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection in Microglia of BALB/c and CBA/Ca Mice. *Infect Immun* 69:765–772.

Halonen SK, Chiu F, Weiss LM (1998) Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect Immun* 66:4989–4993.

Janabi N, Peudenier S, Héron B, et al. (1995) Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci Lett* 195:105–108.

Jebbari, Roberts, Ferguson, et al. (1998) A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 20:231–239.

Lüder CGK, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U (1999) *Toxoplasma gondii* in Primary Rat CNS Cells: Differential Contribution of Neurons, Astrocytes, and Microglial Cells for the Intracerebral Development and Stage Differentiation. *Exp Parasitol* 93:23–32.

Mammari N, Vignoles P, Halabi MA, et al. (2014) *In Vitro* Infection of Human Nervous Cells by Two Strains of *Toxoplasma gondii*: A Kinetic Analysis of Immune Mediators and Parasite Multiplication. *PloS One* 9:e98491.

Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC (1995) Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Infect Dis* 171:516–518.

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741–747.

Saeij JPJ, Boyle JP, Collier S, et al. (2006) Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis. *Science* 314:1780–1783.

Schuindt SHS, Oliveira BC de L, Pimentel PM de O, et al. (2012) Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet Parasitol* 186:207–215.

Schweitzer KM, Vicart P, Delouis C, et al. (1997) Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 76:25–36.

Suzuki Y, Claflin J, Wang X, et al. (2005) Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 35:83–90.

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

| Cells | | CMH5 | | Hbmec | | SH SY5Y | |
|----------------|--------------|------|-----|-------|-----|---------|-----|
| | Strains | RH | PRU | RH | PRU | RH | PRU |
| | Proteins | | | | | | |
| Interleukines | IL-6 | - | - | ⬇ | ⬇ | - | - |
| | IL-8 | - | - | - | - | - | - |
| Chemokines | MIF | - | - | - | ⬇ | - | - |
| | MCP-1 | - | ⬇⬇ | - | ⬇⬇ | ⬇ | - |
| | GRO α | - | - | - | ⬇ | - | - |
| Growth factors | G-CSF | ⬇⬇ | ⬇⬇ | ⬇⬇ | ⬇⬇ | ↗ | ⬇ |
| | GM-CSF | - | ⬇⬇ | ⬇ | - | - | ⬇ |
| Other | sICAM | - | ⬇⬇ | - | ⬇⬇ | ↗↗ | ↗↗ |
| | Serpin E1 | - | ⬇⬇ | - | ⬇⬇ | ↗↗ | ↗↗ |

Table 1 cell types, parasite strains and IFN- γ effects on pro-inflammatory protein expressions. Pro-inflammatory proteins were analyzed in supernatants of cultivated RH- or PRU-infected cells using Proteome Profiler Array. All spots were quantified as pixel units by GeneTools. Values correspond to the pixel values of uninfected cells (negative control) subtracted from pixel values of infected cells. The effect level was determined using Scheirer-Ray-Hare test and Steel-Dwass and/or Siegel-Castellan post-hoc tests. ⬇ expression decrease which $p < 0.05$; ⬇⬇ expression decrease which $p < 0.001$. ↗ expression increase which $p < 0.05$; ↗↗ expression increase which $p < 0.001$.

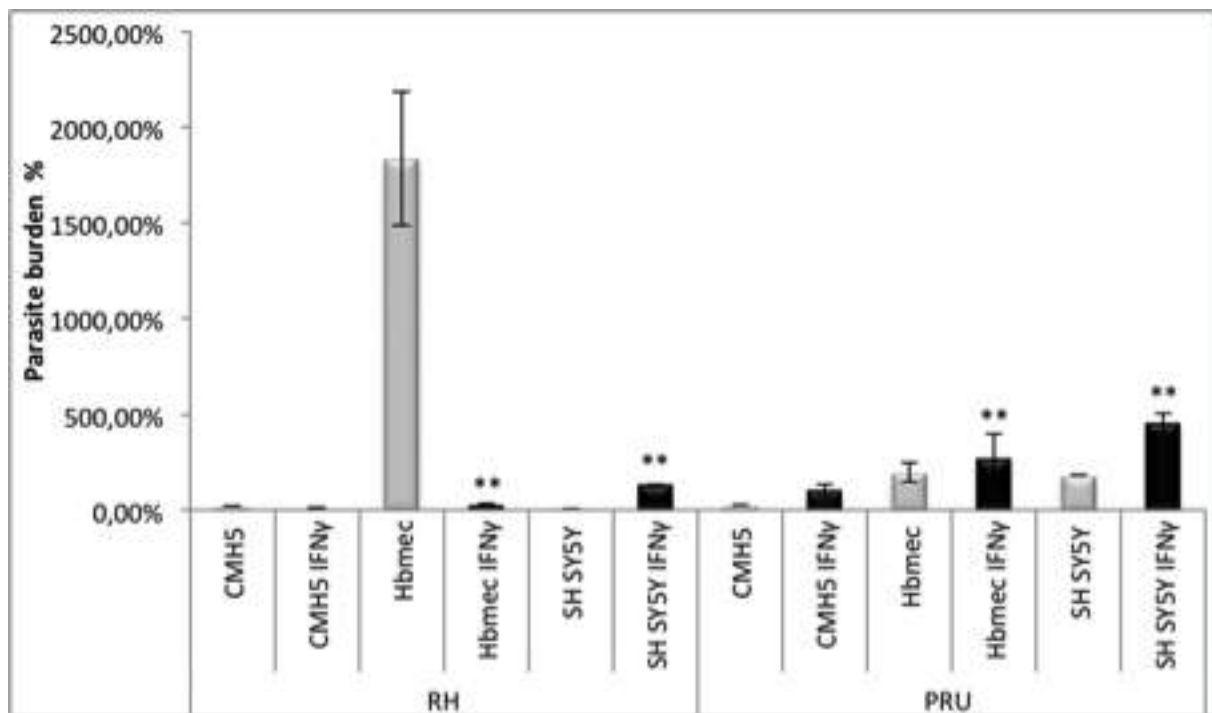


Figure 1 effect of IFN- γ on parasite multiplication. Microglial cells, endothelial cells and neurons were stimulated by IFN- γ before being infected with the RH or PRU strain of *T. gondii* for 24 h. Parasite burden was quantified by semi-quantitative RT-PCR in stimulated and infected cells (black) and in non-stimulated and infected cells (stripes). These parasite burden were evaluated as follows: final number of tachyzoites/initial number of tachyzoites. Comparison was performed using Scheirer-Ray-Hare test. ** $p < 0.01$.

VI. Chapitre II : Etude des mécanismes apoptotiques

VI.1 Généralités

L'apoptose est un processus contrôlé par lequel les cellules activent des voies responsables de leur auto-destruction en réponse à un large éventail de stimuli, dont les dommages de l'ADN et les signaux provenant des cellules immunitaires. Ces voies aboutissent à la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires et les cellules voisines, empêchant ainsi la fuite du contenu des cellules dans le milieu extracellulaire. Ceci s'oppose au phénomène de nécrose, durant lequel les cellules gonflent et éclatent, conduisant à l'activation d'une réponse inflammatoire locale. Les cellules apoptotiques présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques, y compris la condensation des chromosomes, la fragmentation de l'ADN sous forme de leader, le bourgeonnement de la membrane, l'affaiblissement du potentiel de la membrane mitochondriale et la perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires. Les différentes voies d'induction de l'apoptose sont activées en fonction de la nature des stimuli apoptotiques.

VI.1.2 Les principales voies de l'apoptose

VI.1.2.1 La voie intrinsèque

Certains stress intracellulaires induisent la libération de l'oxygène. L'oxygène libéré va ensuite affecter l'intégrité des mitochondries et donc favoriser leur perméabilité. Le cytochrome C est ensuite libéré de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytosol (Liu et al., 1996). Le cytochrome C va se fixer à la protéase qui active le facteur apoptotique-1 (Apaf1), la procaspase 9 et au dATP pour former un complexe pro-apoptotique appelé «apoptosome» (Figure 20). La caspase 9 activée est libérée par l'apoptosome pour activer les autres caspases (Zou et al., 1999).

VI.1.2.1.1 Les caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine dont le rôle dans l'apoptose a été largement étudié. Elles peuvent être clivées par un grand nombre de protéines cellulaires en réponse à des stimuli apoptotiques. Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs «procaspases», qui nécessitent une activation allostérique ou un clivage protéolytique (Ayala et al., 1994; Saikumar et al., 2007). Les caspases 8 et 9 sont activées notamment par la voie de la mort des récepteurs et les voies de l'apoptose mitochondriale, respectivement (Figure 20).

Ces caspases sont souvent appelées « caspases initiatrices » car, une fois activées, elles sont clivées et activées en aval de la cascade des caspases. Cette cascade aboutit à l'activation d'autres caspases effectrices comme les caspases 3 et 7 (Figure 20): ces dernières représentent un point de convergence entre la voie mitochondriale et les voies des récepteurs de mort. Les caspases clivent un éventail de protéines cibles en aval, y compris les lamines nucléaires et les protéines du cytosquelette ; ce clivage provoque des changements morphologiques associés au phénomène apoptotique. En outre, les caspases ont la capacité de cliver et d'inactiver un certain nombre de protéines de signalisation cellulaire, y compris la protéine STAT1 (King and Goodbourn, 1998), IκB (Barkett et al., 1997), NF-κB (Kang et al., 2001) et la BCL anti-apoptotique 2, membres de la famille des Bcl2 (Cheng et al., 1997) et Bcl XL (Clem et al., 1998). En revanche, le clivage de la protéine Bid par la caspase 8 augmente ses propriétés pro-apoptotiques, ce qui aboutit à la transduction du signal apoptotique du cytoplasme vers les mitochondries (Figure 20) (Li et al., 1998).

VI.1.2.1.2 Les protéines Bcl2

L'apoptosome est régulé par la famille des protéines Bcl2 (protéines des cellules B du lymphome 2). Il existe plus de 20 protéines différentes Bcl2, contenant chacune un domaine conservé (BH). Ce domaine peut avoir des propriétés pro ou anti-apoptotiques. Les membres de la famille anti-apoptotique sont : Bcl2 proprement dite, Bcl XL, Bcl W, A1 et Mcl1. Les protéines Bcl2 anti-apoptotiques sont associées à des protéines des membranes intracellulaires, y compris celles de la mitochondrie, du noyau et du reticulum endoplasmique (RE). Bcl2 est une protéine membranaire intégrale (Janiak et al., 1994), alors que Bcl W et Bcl XL s'associent uniquement avec la membrane en réponse à des signaux apoptotiques (Cory and Adams, 2002).

VI.1.2.1.3 Les protéines Bax

Au cours du processus apoptotique, Bax est présent comme un monomère dans le cytosol, il s'insère dans la membrane mitochondriale externe, où il va ensuite s'oligomériser (Nechushtan et al., 2001). Dans les cellules au repos, Bak existe dans la membrane mitochondriale comme un oligomère, mais au cours de l'apoptose, il change de conformation (Griffiths et al., 1999). Ces oligomères de Bax et Bak affectent la perméabilité de la membrane mitochondriale et promeuvent la libération du cytochrome C (Pastorino et al., 1998). Ceci pourrait se produire de deux façons (Antonsson et al., 2001), soit en formant eux-

mêmes (Bax-Bax ou Bak-Bak) les pores ou en interagissant (Bax-Bak) pour élargir les pores de transition de la perméabilité mitochondriale existante (Figure 20) (Tsujimoto and Shimizu, 2000).

VI.1.2.2 La voie extrinsèque

En réponse à la liaison du ligand, les récepteurs de mort (TNFR, Fas et TRAILR) recrutent les protéines adaptatrices spécifiques pour former le DISC (Death Inducing Signaling Complex) (FADD plus procaspase 8) par l'intermédiaire de leurs domaines intracellulaires (Figure 20). Le DISC clive la procaspase 8 en caspase 8 active. Cette dernière active en aval les différentes caspases. La caspase 8 peut également activer la voie mitochondriale de l'apoptose via le clivage de la protéine Bid en tBid (Figure 20). tBid activée va ensuite transloquer dans la mitochondrie et interagit avec Bax et Bad, qui vont à leur tour stimuler la mitochondrie à libérer le cytochrome C et Apaf-1 (Figure 20). Ces protéines forment un complexe qui active la procaspase 9 et la cascade des autres caspases (Figure 20). Ces voies sont régulées négativement au niveau du DISC par cIAP et cFLIP et au niveau mitochondrial par Bcl2 et Bcl XL. Ces protéines inhibitrices sont régulées par des protéines mitochondriales telles que la Smac / Diablo (Figure 20) (Schutze et al., 2008).

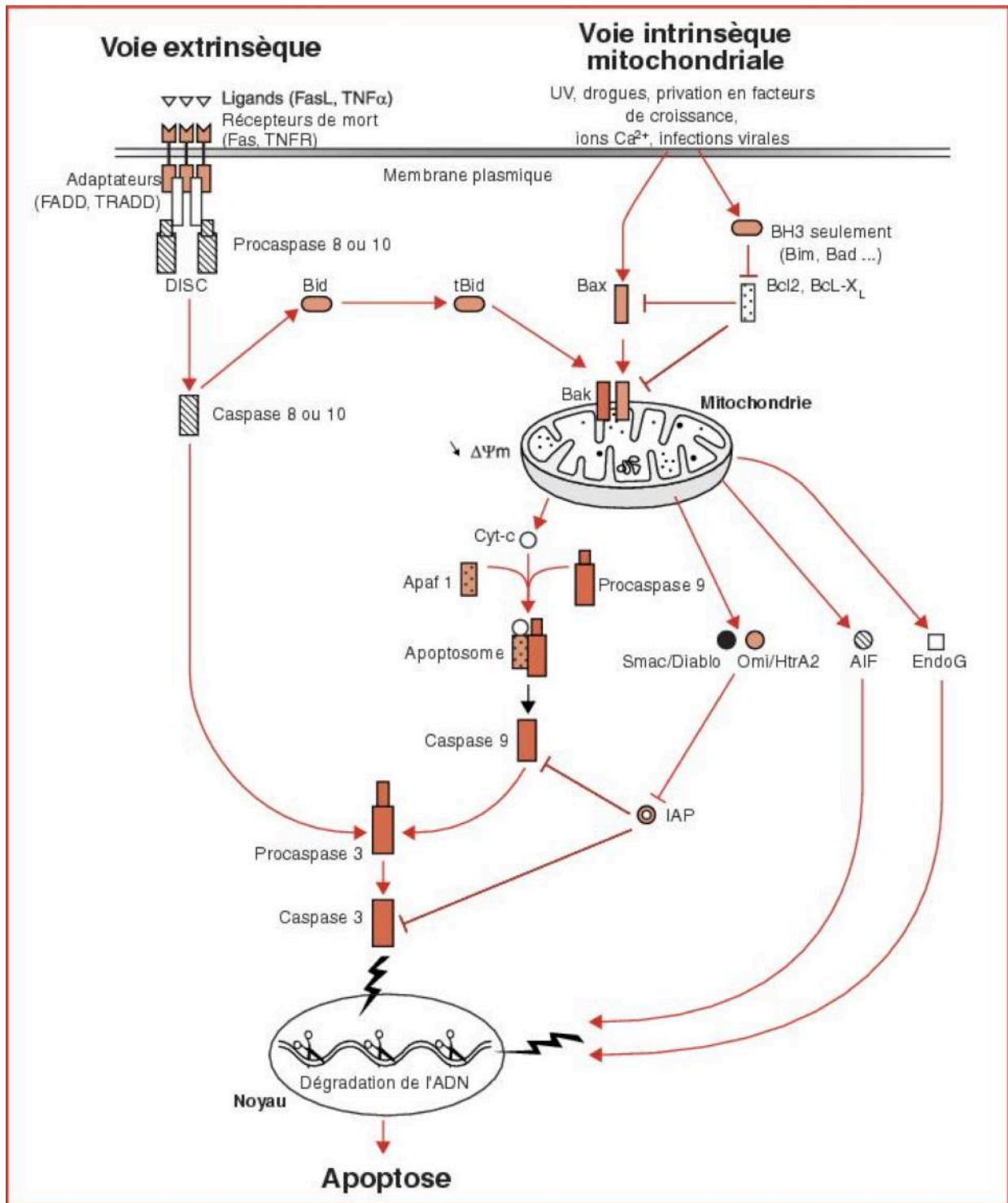


Figure 20: Les principales voies apoptotiques

(http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/04/17/FC/article.phtml?fichier=images.htm).

VI.1.2.3 L'apoptose endoplasmique médiée par le reticulum

La présence des membres de la famille Bcl2 dans les membranes du RE (Krajewski et al., 1993) pourrait moduler la libération de Ca^{2+} du RE (Figure 21) (Lim et al., 2008). Les ions calcium représentent un second messager polyvalent qui intervient à la fois dans la survie cellulaire et dans la mort cellulaire (Rong and Distelhorst, 2008). Les signaux pro-apoptotiques du Ca^{2+} sont renforcés par Bax, Bak et les protéines BH3 seulement. Les protéines Bax et Bak stimulent les réserves de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (Figure 21) (Nutt et al., 2002). Les BH3 seulement et Bik activent la libération de Ca^{2+} du RE (Mathai et al., 2005). En revanche, Bid augmente l'absorption de Ca^{2+} par les mitochondries (Csordas et al., 2002). Les protéines Bcl2 anti-apoptotiques inhibent la libération du Ca^{2+} à partir du RE (Figure 21) (Distelhorst et al., 1996) via leur interaction avec les récepteurs canaux calciques IP3 afin d'empêcher leur ouverture (Figure 21) (Chen et al., 2004). La protéine Bcl2 inhibe également l'absorption du Ca^{2+} par le noyau, ce qui suggère que le noyau a un rôle inducteur de l'apoptose (Figure 21) (Marin et al., 1996).

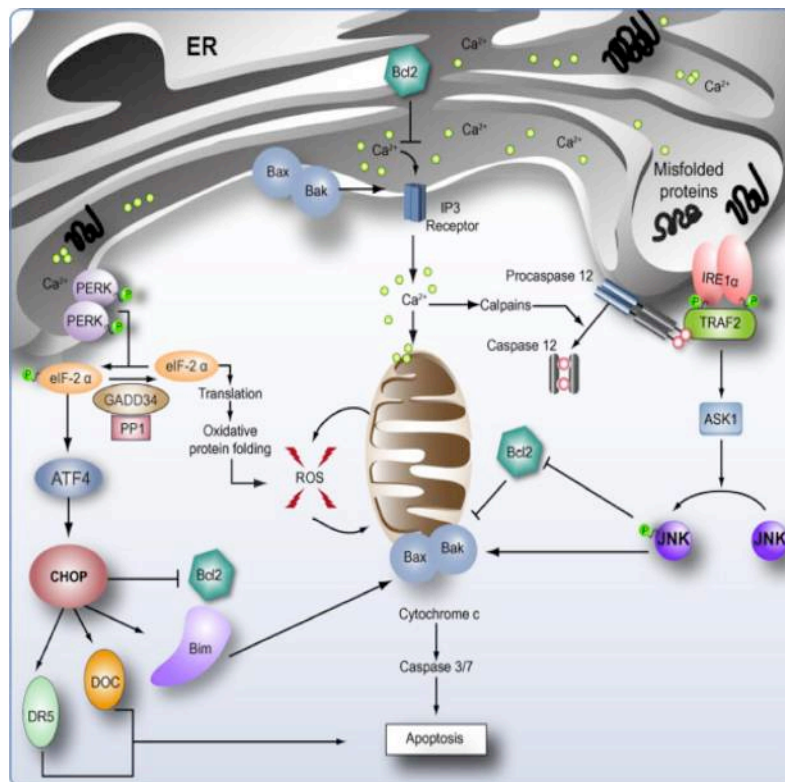


Figure 21 : Voies apoptotiques du réticulum endoplasmique

(<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/7UnfoldedProtResp/1UnfoldedProtResp.htm>).

VI.2. Apoptose et *Toxoplasma gondii* (revue en préparation)

Update on apoptosis during *Toxoplasma* infection

Nour Mammari^{a*}, Mohamad Adnan Halabi^b, Marie-Laure Dardé^{a,c}, Bertrand Courtieux^a

^aINSERM UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Limoges, and CNRS, FR 3503 GEIST, University of Limoges, France.

^bUMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, France.

^cDepartment of Parasitology and Biological Resource Centre for *Toxoplasma*, University Hospital, Limoges, France.

*Corresponding author: Nour MAMMARI

Address: INSERM UMR 1094, Tropical Neuroepidemiology Institute, Faculties of Medicine and Pharmacy, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France.

Phone: 00 33 5 55 43 58 29. E-mail: nour.mammari@unilim.fr

Abstract

Infection with *Toxoplasma gondii* has a major implication in public health. One of the particularities of this parasite is its invasion and persistence in the host. The mechanisms are poorly studied in Humans. In mouse models, many aspects of the interaction between the parasite and the cells are being studied. Apoptosis is one of these mechanisms which could be modulated by *Toxoplasma*, to persist in host cells. The impact of the parasite virulence on the viability of cells remains to be clearly demonstrated. This review provides a general overview of the paths of the invasion by *T. gondii* and the effect of the latter on the different apoptotic pathways of the infected host cell.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, infection, host cells, apoptosis.

Résumé:

Les infections par *Toxoplasma gondii* ont un impact majeur en santé publique. Une des particularités de ce parasite tient à ses capacités d'invasion et de persistance dans l'hôte. Les mécanismes par lesquels *T. gondii* se dissémine et persiste sont peu étudiés chez l'Homme. Dans le modèle murin, différents types d'interactions entre le parasite et les cellules hôtes ont été étudiés. L'apoptose est un des mécanismes que *Toxoplasma* pourrait moduler pour persister dans la cellule hôte. L'étude de l'apoptose et de la viabilité tant dans le modèle murin que chez l'homme doit tenir compte de l'influence du type de la souche parasitaire. Cette revue a pour objectif de synthétiser les données sur les effets de *T. gondii* sur les différentes voies apoptotiques de la cellule hôte infectée.

Mots Clés: *Toxoplasma gondii*, infection, cellules hôtes, apoptose

I. Introduction

Toxoplasma gondii is a ubiquitous parasite, which affects approximately one-third of all humans worldwide (Montoya et al., 2001) making *Toxoplasma* amongst the most successful human parasites (Murat et al., 2013). This parasite is also able to theoretically infect all warm-blooded animals from birds to mammals. Cats, or more generally *Felidae*, are the only animals that allow the sexual reproduction leading to oocyst excretion in their feces. Infection occurs by ingestion of cysts contained in parasitized meat or oocysts present in vegetables contaminated by cat feces. After an initial stage of tachyzoite proliferation and dissemination, the infection usually persists in a chronic form, following the formation of tissue-cysts containing bradyzoites, especially in the brain (Sullivan et al., 2013).

Clinical forms of toxoplasmosis in humans range from asymptomatic to lethal depending on the host's immune response. Since its entry into the host, *Toxoplasma gondii* triggers an immune response focused on the interferon-gamma (IFN- γ) secreted by T lymphocytes. Paradoxically, parasite uses it to establish and persist in the hosts.

Usually, immune response in the case of immunocompetent host leads to the acquisition of protective immunity, preventing any reinfection. In case of immune deficiency, in particular in AIDS patients, the bradyzoites released following cyst rupture are converted into tachyzoites, the proliferation of which is not effectively controlled by the immune response of the host, leading to severe brain damage (Kamerkar and Davis, 2012).

Most protozoan parasites have the ability to modulate the host cell response. Apoptosis, is one of the mechanisms targeted by these parasites. Apoptosis or programmed cell death is the process by which cells trigger their destruction. It was firstly described by Kerr et al (Kerr et al., 1972). Apoptosis is an essential pathway for development and tissue homeostasis.

Unlike necrosis, during apoptosis processes no inflammatory reaction is involved and a membrane integrity is preserved. This phenomenon is tightly regulated and any imbalance can cause diseases. Thus, excessive apoptosis can lead to degenerative diseases. Conversely, a defect in apoptosis can lead to the development of autoimmune diseases or participate in carcinogenesis.

Apoptosis can be induced by many stimuli (growth factor deprivation, exposure to ultraviolet or exogenous factors such as cancer). According to these signals, we can distinguish two signaling pathways: the death receptor and the mitochondrial pathways.

Most pro-apoptotic stimuli are associated with a permeabilization of the outer mitochondrial membrane. This process is regulated by pro-and anti-apoptotic B- cell lymphoma 2 (Bcl-2) and leads to the release of cytochrome c into the cytosol. Cytochrome c promotes activation of caspases, the proteases responsible of the apoptotic mechanism's (Danial and Korsmeyer, 2004).

Toxoplasma gondii has been shown to modulate apoptosis response of host cells in order to survive in infected cells. This differs depending of cell types. *Toxoplasma gondii* protects different cell types from apoptosis induced by a variety of pro-apoptotic treatments. Blocking apoptosis helps the parasite to avoid rapid clearance by infected cells, which are activated by signals emitted by apoptotic cells. In contrast, *T. gondii* is able to initiate apoptosis in some cells and during specific stages of infection.

II. *Toxoplasma gondii* modulates pathways to invade host cells

Different studies performed in mice and in human cells showed that *T. gondii* modulates pathways during host invasion in a way that could have an impact on host cell apoptosis. In mice, tachyzoite proteins can react directly by disrupting the host cell immune process or indirectly by affecting the regulation of the transcriptomic process *in vitro* (Howard et al., 2011; Hunter and Sibley, 2012). It has been demonstrated in Human promyelocytic leukemia cells (HL-60) and human histiocytic lymphoma cells (U937) that *Toxoplasma* which resides within the host cell in a parasitophorous vacuole can inhibit or initiate apoptosis (Luder et al., 2001). A notable feature of *T. gondii* is the ability of parasite to egress and maintain host cell viability at any time during its intracellular residence (Tomita et al., 2009). In fact, it is known that pro-apoptotic molecules such as NO or TNF α are produced by macrophages in response to *T. gondii* invasion (Albina et al., 1991) (Higuchi and Aggarwal, 1994). Exogenous NO could induce egress of *T. gondii* tachyzoites from mice peritoneal macrophages (Ji et al., 2013) and IFN- γ can promote tachyzoites egress in murine astrocyte via IGTP-dependent manner at 3 h post infection (Melzer et al., 2008).

In mice, the majority of tachyzoite's molecules are secreted during invasion (Hunter and Sibley, 2012). A molecule secreted by the rhoptries of the parasite, ROP16, can perform a

tyrosine phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription STAT3 and STAT6 protein (Butcher et al., 2011; Saeij et al., 2007). Additional effectors secreted by other parasitic organelles, the dense granules, GRA15 and GRA16, are released and traffic to host cell (Bougdour et al., 2013), positively regulating genes responsible of cell cycle and p53 tumor suppressor pathway (Bougdour et al., 2013).

To resist to the parasite, a strong type 1 response (Th1) and IL-12 activation is needed (Goldszmid et al., 2012), which stimulates NK and T cells to produce IFN- γ to activate the IRGs (IFN-regulated GTPases) to kill the parasite in the murine model (Howard et al., 2011). ROP16 stimulates the secretion of a STAT3/6-dependent macrophage response that reduces IL-12p70 synthesis (Butcher et al., 2011). Another signaling pathway responsible of reducing IL-12p70 synthesis is the MAPKinase pathway. A series of kinases activate each other (MAP4K, MAP3K, MAP2K), and ends with the phosphorylation of a specific MAPK that regulates the expression of genes by activating transcription factors. It has been reported that *Toxoplasma* is dependent of MKK (MAP Kinase kinase) to induce autophosphorylation of the p38- α MAPK and to produce IL-12p70 (Im et al., 2005). A novel dense granule molecule GRA24 has been identified. It is exported beyond the parasitophorous vacuole (PV) to the nucleus of the host cell. GRA24 interacts directly with p38 α and leads to unusual phosphorylation of the host kinase (Braun et al., 2013). In addition to the phosphorylation process, a recent proteomic study indicates that several proteins (GAP45 and MTIP) in the *Toxoplasma* motor complex are palmitoylated, and can regulate their cellular localization and function (Jones et al., 2012). GAP45, one of proteins that constitute the myosin XI motor complex required for motility of *T. gondii* is phosphorylated at several sites. The transient phosphorylation of TgGAP45 at S163 and S167 appears to be important for glideosome assembly, and a TgGAP45 mutant in which these phosphorylation sites were mutated failed to interact with GAP50 (Gilk et al., 2009). A recent study shows that TgROP17, recombinant antigen of RH strain could be a kinase protein and have an anti-apoptotic role in infected HEK 293T cells (Human Embryonic Kidney) (Wang et al., 2014a).

III. *Toxoplasma gondii* modulates host cells apoptosis

III. 1 Apoptosis pathways targeted by *T. gondii*

Different studies in mice and human cells have demonstrated that *T. gondii* modulates the apoptosis response of host cells. It is able to down-regulate (Nash et al., 1998) or up-regulate

host-cell apoptosis (Hisaeda et al., 1997). The specific pathways, which are targeted by the parasite, may differ depending on infection stage (acute or chronic), on the virulence of the parasite strain, and on the affected cell type. Hisaeda et al., have shown that RH virulent strain can induce apoptosis in a culture of mouse peritoneal macrophages and in a mouse macrophage derived cell line (J774A.1) (Hisaeda et al., 1997). In this case, *T. gondii* may inhibit HSP65 process to enhance apoptosis of these infected cells (Hisaeda et al., 1997). So, a high level of apoptosis and an increased mortality rate have been shown to be associated with *T. gondii* infection caused by this highly mouse virulent strain at an acute stage of infection (Hisaeda et al., 1997) (Gavrilescu and Denkers, 2001). This process was associated to increased levels of Th1 cytokines, such as IFN- γ , TNF- α and IL-12, which might promote cell death during acute infection with virulent strains (Mordue et al., 2001). Khan et al., demonstrated that the ME49 avirulent strain promotes apoptosis of mice CD4⁺ splenocytes via Fas–FasL interaction at 7 days post infection (Khan et al., 1996). Comparing these studies, we can note that the virulent profile of *T. gondii* strain is not a major factor that influenced the apoptotic process. This could be confirmed by the infection of murine astrocytes by RH strain, which decreased expression of the anti-apoptotic proteins Survivin, PUMA, and Bcl-2 and increased pro-apoptotic proteins Noxa in the early stage of infection (Contreras-Ochoa et al., 2013). In infected mice brain, neuron apoptosis noted in Toxoplasmic encephalitis (TE) could be a result from the primary injury by a parasite burden or from the secondary response to microglia activation, which promotes neuron cell damage (Handel et al., 2012). This hypothesis was confirmed by the study of Luo and al., in which they found that infected microglia secreted pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and iNOS). Inflammation generated is responsible for neuronal lesions in the brain of infected mice with reactivated TE (Luo et al., 2014).

In other hand, *T. gondii* has been an ability to inhibit apoptosis in several murine and human host cells treated with a broad spectrum of pro-apoptotic stimuli (Goebel et al., 2001; Goebel et al., 1999; Nash et al., 1998; Payne et al., 2003). *Toxoplasma gondii* interferes with different process to inhibit apoptosis for maintaining chronic *Toxoplasma* infection.

III.1.1 Blocking activation of pro-apoptotic proteins

In vitro studies have shown that mitochondrial cytochrome c released was inhibited by RH tachyzoites in MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) fibroblastic cells (Carmen et al., 2006; Goebel et al., 1999) and by NTE (type II) avirulent *Toxoplasma* strain tachyzoites in human promyelocytic leukemia cells (HL-60) (Keller et al., 2006) via a direct inhibition of caspase 3 and 9 (Goebel et al., 1999). *Toxoplasma gondii* affects other apoptotic pathways. In the type I human B lymphoblastoid cell line (SKW6.4), RH strain induces alteration of apoptosis triggered by Fas/CD95 path by degrading the pro-caspase 8 (Vutova et al., 2007) (Figure 1). *Toxoplasma gondii* has the ability also to down-regulate TNFR1 or TNFR2 expressions (Derouich-Guergour et al., 2002) in RH infected Human embryonic lung MRC5 diploid fibroblasts (Derouich-Guergour et al., 2002). In addition to the major apoptotic pathways, smart *T. gondii* parasite has a capacity to affect other cell death pathways such as CTL activities. Infected Murine T lymphoblasts (MLR) and RH-infected murine CD8⁺ T cells (M12-neo-1 cells) seem to be resistant to perforin and granzyme-mediated apoptosis (Figure 1). This is induced by inhibiting the apoptotic activity of Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) (Nash et al., 1998; Vutova et al., 2007; Yamada et al., 2011). It has been suggested a direct link between the inhibition of apoptosis and the association between the *T. gondii* vacuolar membrane and host cell mitochondria (Sinai and Joiner, 2001; Sinai et al., 1997). In addition, *Toxoplasma* reached the apoptotic system further and targets the stage of DNA degradation. *Toxoplasma gondii* affects PARP expression in murine macrophage (RAW264.7 cells) infected by NTE strain (Figure 1), decreasing PARP expression within 10 min and suppressing it after 1 h post infection (Gais et al., 2008). In addition, TgCtwh3, atypical *Toxoplasma* strain showed that activates phosphorylation of STAT3 in infected human macrophage. This activation induces an overexpression of miR-17-92-miRNAs that inhibited Bim, pro-apoptotic protein, leading to the survival of infected macrophage by this atypical strain (Cai et al., 2014). The polymorphism of ROP16 produced by this strain is the similar to the type I strain, so authors suggested that this ROP16 activated macrophage mechanisms could be the same that target by type I *Toxoplasma* strain (Cai et al., 2014).

The growth factors G-CSF and GM-CSF also seem to be implicated in apoptosis mechanism. Channon et al., demonstrated that both G-CSF and GM-CSF secreted by fibroblastic cells infected by PLK avirulent strain inhibited apoptosis of human neutrophils, which promotes their survival (Channon et al., 2002). Recently, Wang et al., have

demonstrated that RH strain induces apoptosis in neural stem cells via endoplasmic reticulum pathway. This finding was confirmed by a high expression of C/EBP homologue protein (CHOP), caspase 12 and activation of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) pathway (Wang et al., 2014b).

III.1.2 Up-regulating anti-apoptotic proteins

Up-regulation of anti-apoptotic proteins includes expression of anti-apoptotic Bcl-2s family (Hwang et al., 2010; Payne et al., 2003), down-regulation of pro-apoptotic Bax (Carmen et al., 2006) (Figure 1), and the prevention of Bax/Bak activation by BH3-only family members (Hippe et al., 2009). In addition, HSP70 family, an endogenous pleiotropic inhibitor of apoptotic cell death, have been reported also to regulate apoptosis by influencing the apoptosis promoting activity of mitochondria (Didelot et al., 2006; Yenari and Sapolsky, 2005). HSP70 derived from *T. gondii*-infected cells has been reported to be important for control of the host immune response. Indeed, injection with *T. gondii* HSP70 caused an important reduction of parasite burden in various organs of B6 and BALB/c mice during both acute and chronic phases of toxoplasmosis (Mohamed et al., 2003). Bcl-2 and HSP70 expressed by *Toxoplasma* human monocyte infected cells (TH1), inhibited the mitochondrial permeability transition pore, blocked release of both cytochrome c and apoptosis inducing factor protein (AIF) from mitochondria and inhibited ATP-mediated pro-caspase 3/9 (Hwang et al., 2010) (Figure 1).

The Serpin B3 and B4 were expressed in *T. gondii* infected macrophages (Ahn et al., 2009). It has been shown that *T. gondii* modulates the expression of Serpin B3 and B4 in RH-infected human acute monocytic leukemia cells (TH1), which may function as cellular factors involved in the regulation of apoptosis pathway (Song et al., 2012).

III.2 Apoptosis signaling pathway targeted by *T. gondii*

III.2.1 NF- κ B pathway

It has been described that *T. gondii* regulates apoptosis paths by A1-a, an anti-apoptosis member of the Bcl-2 family. This process may be an important pro-inflammatory event in acute host responses. It leads to an increase of parasite burden in the non-apoptotic cells (Orlofsky et al., 2002). *Toxoplasma* RH strain up-regulates also the expression of Mcl-1

(Figure 1) (another anti-apoptotic Bcl-2 family member) and inhibitors of apoptosis (IAP) (Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003). Many of the cellular IAPs are known to be under NF- κ B regulation (Stehlik et al., 1998; Wang and Frazier, 1998), which promotes the host pro-survival machinery and pro-inflammatory expression proteins in mouse NIH 3T3 Balb/c fibroblasts (Payne et al., 2003). This pathway plays a crucial role in modulating both innate and adaptive immune responses. NF- κ B activation is extensively considered to play an anti-apoptotic function in cellular responses to diverse injurious stimuli (Karin and Lin, 2002). In bone marrow-derived murine macrophages infected by the RH strain, p50, p65 and RelB were observed in response to parasite challenge in *in vitro* and *in vivo* studies (Caamano et al., 1999; Shapira et al., 2002). The importance of NF- κ B pathway for regulating immune response to survive acute *Toxoplasma* infection (Caamano et al., 1998) was confirmed by a lack of Bcl-3, a protein involved in the regulation of NF- κ B (Franzoso et al., 1997). Using DNA arrays, expression of Bfl-1, IAP2, and TNFR1 was elevated over three fold in wild-type cells compared to mice deficient p65 (Molestina et al., 2003). The parasite-mediated induction of Bfl-1 might prevent host cell death primarily through regulation of mitochondrial events such as membrane depolarization, cytochrome c release, and caspase-9 activation (Chen et al., 2000; Lee et al., 1999) (Figure 1). IAP activation (1 and 2) enhance T cells activation (Giardino Torchia et al., 2013). A lack of NF- κ B activity could have important effect in enhancing the expression level of survival genes (Molestina et al., 2003). In addition, *T. gondii* infected mouse spleen cell promotes activation of anti-apoptotic Bcl-2 family members but not pro-apoptotic pathways. The resistance of *T. gondii* in infected mouse spleen cells to apoptosis was attributed to prevention of caspase-3 activity and PARP activation. This apoptosis inhibition was regulated by the activation of NF- κ B that promotes transcription of anti-apoptotic genes (Figure 1). In this case, expression of NF- κ B is correlated with anti-apoptotic protein expression after *T. gondii* infection (Kim et al., 2006a).

III. 2. 2 MAPKinase (Mitogen-activated protein kinase) pathways

In addition to NF- κ B pathway, MAPKinase paths were also involved in activation of both innate and acquired immune response during infection by *T. gondii* (Kim et al., 2006b). *Toxoplasma gondii* induces P38 MAPKinase autophosphorylation in mouse macrophage promoting IL-12 production (Kim and Boothroyd, 2005; Mason et al., 2004) (Figure 1). *Toxoplasma gondii* response (Tg-MAPK) has an important role in regulation of immune response and virulence of *T. gondii* strain (Brumlik et al., 2013). The Tg-MAPK controls

IFN- γ -mediated iNOS expression and NO production, and promotes activation of host cell p38 MAPK activation, thereby limiting host iNOS production (Brumlik et al., 2013) (Figure 1). The inhibition of apoptosis observed in BeWo cells after infection with RH strain is associated with the increased phosphorylation of the anti-apoptotic ERK1/2 protein (Angeloni et al., 2013).

III.2. 3 JNKinase (c-Jun N-terminal kinases) pathways

The JNKinase pathway is also involved in activation and/or inhibition of apoptosis mechanisms during infection by *T. gondii*. The role of JNK, as either a pro-apoptotic or pro survival mediator, is dependent upon the magnitude and duration of JNK activation, and appears to be cell-type specific (Johnson et al., 2007). The transcription factor NF- κ B has recently been shown to negatively regulate the JNK activation (Bubici et al., 2006; Tang et al., 2001). But, Carmen et al., (Carmen et al., 2008) showed that the JNK pathway does not involve NF- κ B signaling pathway in Hela infected *Toxoplasma* cells. In infected mouse bone marrow-derived macrophages and human peripheral blood monocytes, *Toxoplasma* induced B7-2 protein, which initiates T cells proliferation. B7-2 production is mediated via JNK signaling pathway. The effective role of JNK signaling pathway is not yet clear during *Toxoplasma* infection (Morgado et al., 2011).

III. 2. 4 PI3K/PKB/Akt pathways

The phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) pathway and the immediate downstream effector protein kinase B (PKB/Akt) play important roles in cell survival and apoptosis inhibition. It was reported that *Toxoplasma* infection of mouse macrophages activates PKB/Akt *in vivo* and *in vitro*. This pathway promotes inhibition of apoptosis challenge via host G_i-protein-dependent PI 3-kinase signaling (Kim and Denkers, 2006). In addition, *T. gondii* inhibits apoptosis mechanism also via this signalling pathway in THP-1 cells and splenocytes. The phosphorylation of AKT protein promotes phosphorylation of Bad protein which can prevent apoptosis activation by blocking Bax translocation, cytochrome c release and caspase 3/9 activation (Quan et al., 2013) (Figure 1).

III.3 Conclusion

Toxoplasma gondii manipulates many signaling pathways intended for the host defense toward its persistence into host cells. Among the host signaling pathways is the apoptotic pathway. This response induces in most cases to a local inflammatory reaction as in the case of TE. The majority of studies on this subject are described in the mouse model. It would be important to determine the different of *T. gondii* strains effect on inhibition pro-apoptotic pathways and activation of anti-apoptotic pathways in human co-cultures. These cell models allow us to study the interaction of different host cells in the presence of parasite. Thus, the apoptotic pathway depending caspase has been well studied. Further research of the effect of *T. gondii* virulence proteins could be focused on no depending caspase pathway. New molecular biology and proteomic technics will permit to identify activation, inhibition and interaction of several proteins responsible for the signaling pathways involved in the persistence of *T. gondii* in host cells.

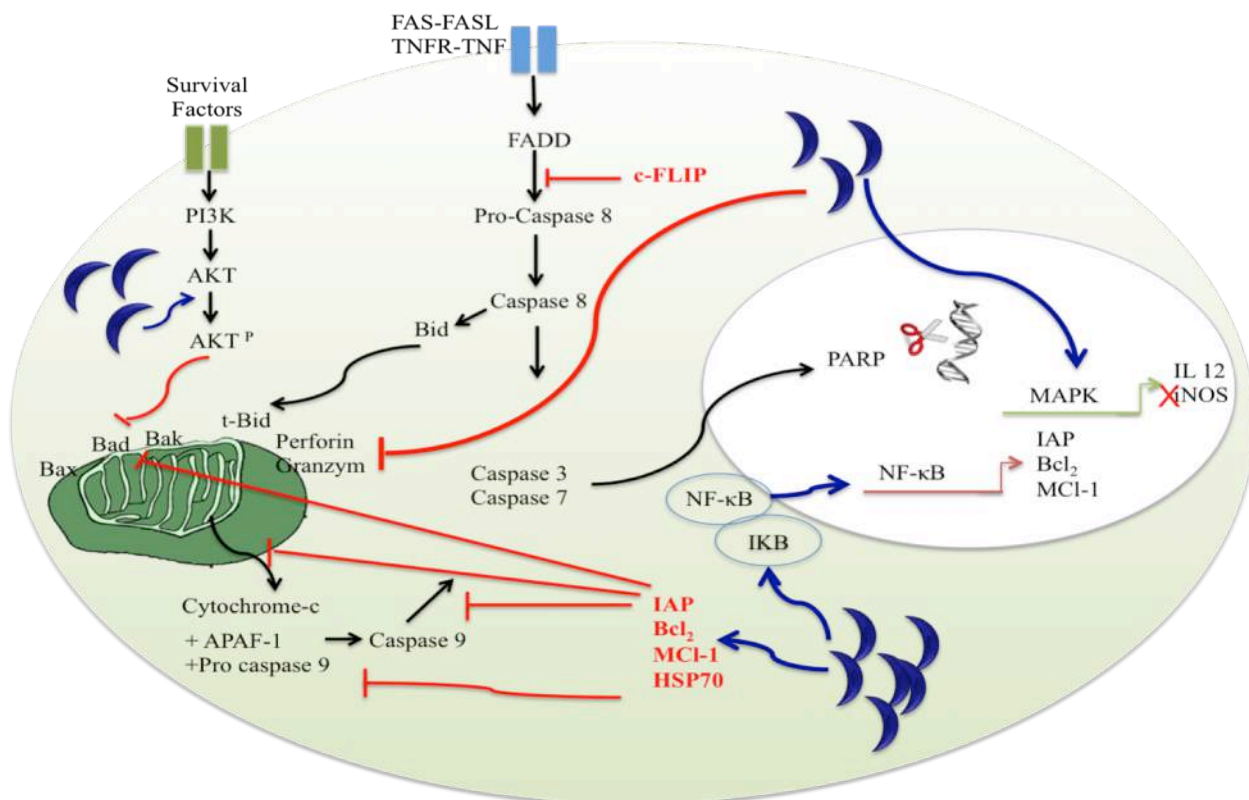


Figure 1: *Toxoplasma gondii* modulates mechanisms and signalling pathways of apoptosis.

IV. References

- Ahn, H.J., J.Y. Kim, K.J. Ryu, and H.W. Nam. 2009. STAT6 activation by *Toxoplasma gondii* infection induces the expression of Th2 C-C chemokine ligands and B clade serine protease inhibitors in macrophage. *Parasitology research*. 105:1445-1453.
- Albina, J.E., J.A. Abate, and W.L. Henry, Jr. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *Journal of immunology*. 147:144-148.
- Angeloni, M.B., P.M. Guirelli, P.S. Franco, B.F. Barbosa, A.O. Gomes, A.S. Castro, N.M. Silva, O.A. Martins-Filho, T.W. Mineo, D.A. Silva, J.R. Mineo, and E.A. Ferro. 2013. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. *Placenta*. 34:973-982.
- Bougdour, A., E. Durandau, M.P. Brenier-Pinchart, P. Ortet, M. Barakat, S. Kieffer, A. Curt-Varesano, R.L. Curt-Bertini, O. Bastien, Y. Coute, H. Pelloux, and M.A. Hakimi. 2013. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell host & microbe*. 13:489-500.
- Braun, L., M.P. Brenier-Pinchart, M. Yogavel, A. Curt-Varesano, R.L. Curt-Bertini, T. Hussain, S. Kieffer-Jaquinod, Y. Coute, H. Pelloux, I. Tardieux, A. Sharma, H. Belrhali, A. Bougdour, and M.A. Hakimi. 2013. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *The Journal of experimental medicine*. 210:2071-2086.
- Brumlik, M.J., S. Pandeswara, S.M. Ludwig, D.P. Jeansonne, M.R. Lacey, K. Murthy, B.J. Daniel, R.F. Wang, S.R. Thibodeaux, K.M. Church, V. Hurez, M.J. Kious, B. Zhang, A. Alagbala, X. Xia, and T.J. Curiel. 2013. TgMAPK1 is a *Toxoplasma gondii* MAP kinase that hijacks host MKK3 signals to regulate virulence and interferon-gamma-mediated nitric oxide production. *Experimental parasitology*. 134:389-399.

- Bubici, C., S. Papa, C.G. Pham, F. Zazzeroni, and G. Franzoso. 2006. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histology and histopathology*. 21:69-80.
- Butcher, B.A., B.A. Fox, L.M. Rommereim, S.G. Kim, K.J. Maurer, F. Yarovinsky, D.R. Herbert, D.J. Bzik, and E.Y. Denkers. 2011. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS pathogens*. 7:e1002236.
- Caamano, J., J. Alexander, L. Craig, R. Bravo, and C.A. Hunter. 1999. The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 163:4453-4461.
- Caamano, J.H., C.A. Rizzo, S.K. Durham, D.S. Barton, C. Raventos-Suarez, C.M. Snapper, and R. Bravo. 1998. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *The Journal of experimental medicine*. 187:185-196.
- Cai, Y., H. Chen, X. Mo, Y. Tang, X. Xu, A. Zhang, Z. Lun, F. Lu, Y. Wang, and J. Shen. 2014. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. *Cellular signalling*. 26:1204-1212.
- Carmen, J.C., L. Hardi, and A.P. Sinai. 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cellular microbiology*. 8:301-315.
- Carmen, J.C., R.C. Southard, and A.P. Sinai. 2008. The complexity of signaling in host-pathogen interactions revealed by the *Toxoplasma gondii*-dependent modulation of JNK phosphorylation. *Experimental cell research*. 314:3724-3736.
- Channon, J.Y., K.A. Miselis, L.A. Minns, C. Dutta, and L.H. Kasper. 2002. *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. *Infection and immunity*. 70:6048-6057.

- Chen, M., F. Aosai, H.S. Mun, K. Norose, H. Hata, and A. Yano. 2000. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Infection and immunity*. 68:4893-4899.
- Contreras-Ochoa, C.O., A. Lagunas-Martinez, J. Belkind-Gerson, J. Diaz-Chavez, and D. Correa. 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Experimental parasitology*. 134:256-265.
- Danial, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-219.
- Derouich-Guergour, D., D. Aldebert, I. Vigan, E. Jouvin-Marche, P.N. Marche, D. Aubert, P. Ambroise-Thomas, and H. Pelloux. 2002. *Toxoplasma gondii* infection can regulate the expression of tumour necrosis factor-alpha receptors on human cells *in vitro*. *Parasite immunology*. 24:271-279.
- Didelot, C., E. Schmitt, M. Brunet, L. Maingret, A. Parcellier, and C. Garrido. 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handbook of experimental pharmacology*:171-198.
- Franzoso, G., L. Carlson, T. Scharton-Kersten, E.W. Shores, S. Epstein, A. Grinberg, T. Tran, E. Shacter, A. Leonardi, M. Anver, P. Love, A. Sher, and U. Siebenlist. 1997. Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity*. 6:479-490.
- Gais, A., N. Beinert, U. Gross, and C.G. Luder. 2008. Transient inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase expression and activity by *Toxoplasma gondii* is dispensable for parasite-mediated blockade of host cell apoptosis and intracellular parasite replication. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 10:358-366.
- Gavrilescu, L.C., and E.Y. Denkers. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 167:902-909.
- Giardino Torchia, M.L., D.B. Conze, and J.D. Ashwell. 2013. c-IAP1 and c-IAP2 redundancy differs between T and B cells. *PloS one*. 8:e66161.

- Gilk, S.D., E. Gaskins, G.E. Ward, and C.J. Beckers. 2009. GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma* myosin XIV complex. *Eukaryotic cell*. 8:190-196.
- Goebel, S., U. Gross, and C.G. Luder. 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Journal of cell science*. 114:3495-3505.
- Goebel, S., C.G. Luder, and U. Gross. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Medical microbiology and immunology*. 187:221-226.
- Goldszmid, R.S., P. Caspar, A. Rivollier, S. White, A. Dzutsev, S. Hieny, B. Kelsall, G. Trinchieri, and A. Sher. 2012. NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity*. 36:1047-1059.
- Handel, U., A. Brunn, K. Drogemuller, W. Muller, M. Deckert, and D. Schluter. 2012. Neuronal gp130 expression is crucial to prevent neuronal loss, hyperinflammation, and lethal course of murine *Toxoplasma* encephalitis. *The American journal of pathology*. 181:163-173.
- Higuchi, M., and B.B. Aggarwal. 1994. Differential roles of two types of the TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation, and differentiation. *Journal of immunology*. 152:4017-4025.
- Hippe, D., A. Gais, U. Gross, and C.G. Luder. 2009. Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*. *Methods in molecular biology*. 470:275-288.
- Hisaeda, H., T. Sakai, H. Ishikawa, Y. Maekawa, K. Yasutomo, R.A. Good, and K. Himeno. 1997. Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 159:2375-2381.
- Howard, J.C., J.P. Hunn, and T. Steinfeldt. 2011. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in microbiology*. 14:414-421.

- Hunter, C.A., and L.D. Sibley. 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews. Microbiology*. 10:766-778.
- Hwang, I.Y., J.H. Quan, M.H. Ahn, H.A. Ahmed, G.H. Cha, D.W. Shin, and Y.H. Lee. 2010. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitology research*. 107:1313-1321.
- Im, W., H. Kim, D. Yun, S.Y. Seo, S.H. Park, R.M. Locksley, and S. Hong. 2005. Cytokine reporter mouse system for screening novel IL12/23 p40-inducing compounds. *Molecules and cells*. 20:288-296.
- Ji, Y.S., X.M. Sun, X.Y. Liu, and X. Suo. 2013. *Toxoplasma gondii*: effects of exogenous nitric oxide on egress of tachyzoites from infected macrophages. *Experimental parasitology*. 133:70-74.
- Johnson, T.M., Z. Rajfur, K. Jacobson, and C.J. Beckers. 2007. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Molecular biology of the cell*. 18:3039-3046.
- Jones, M.L., M.O. Collins, D. Goulding, J.S. Choudhary, and J.C. Rayner. 2012. Analysis of protein palmitoylation reveals a pervasive role in Plasmodium development and pathogenesis. *Cell host & microbe*. 12:246-258.
- Kamerkar, S., and P.H. Davis. 2012. *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. *Journal of parasitology research*. 2012:589295.
- Karin, M., and A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*. 3:221-227.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 26:239-257.
- Khan, I.A., T. Matsuura, and L.H. Kasper. 1996. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International immunology*. 8:887-896.
- Kim, J.Y., M.H. Ahn, H.S. Jun, J.W. Jung, J.S. Ryu, and D.Y. Min. 2006a. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation. *Yonsei medical journal*. 47:862-869.

- Kim, J.Y., M.H. Ahn, H.O. Song, J.H. Choi, J.S. Ryu, D.Y. Min, and M.H. Cho. 2006b. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology*. 44:197-207.
- Kim, L., and E.Y. Denkers. 2006. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *Journal of cell science*. 119:2119-2126.
- Kim, S.K., and J.C. Boothroyd. 2005. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *Journal of immunology*. 174:8038-8048.
- Lee, Y.H., J.Y. Channon, T. Matsuura, J.D. Schwartzman, D.W. Shin, and L.H. Kasper. 1999. Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Experimental parasitology*. 91:212-221.
- Luder, C.G., U. Gross, and M.F. Lopes. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in parasitology*. 17:480-486.
- Luo, Q., L. Sun, Q.Q. Tian, H. Ren, H. Liu, C.J. Yang, and X. Li. 2014. [Effect of culture supernatant of *Toxoplasma gondii* on the proliferation and apoptosis of BGC-823 cells]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 32:123-127.
- Mason, N.J., J. Fiore, T. Kobayashi, K.S. Masek, Y. Choi, and C.A. Hunter. 2004. TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. 72:5662-5667.
- Melzer, T., A. Duffy, L.M. Weiss, and S.K. Halonen. 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for *Toxoplasma* vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infection and immunity*. 76:4883-4894.
- Mohamed, R.M., F. Aosai, M. Chen, H.S. Mun, K. Norose, U.S. Belal, L.X. Piao, and A. Yano. 2003. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*. 21:2852-2861.

- Molestina, R.E., T.M. Payne, I. Coppens, and A.P. Sinai. 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of cell science*. 116:4359-4371.
- Montoya, J.G., L.F. Giraldo, B. Efron, E.B. Stinson, P. Gamberg, S. Hunt, N. Giannetti, J. Miller, and J.S. Remington. 2001. Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 33:629-640.
- Mordue, D.G., F. Monroy, M. La Regina, C.A. Dinarello, and L.D. Sibley. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal of immunology*. 167:4574-4584.
- Morgado, P., Y.C. Ong, J.C. Boothroyd, and M.B. Lodoen. 2011. *Toxoplasma gondii* induces B7-2 expression through activation of JNK signal transduction. *Infection and immunity*. 79:4401-4412.
- Murat, J.B., H.F. Hidalgo, M.P. Brenier-Pinchart, and H. Pelloux. 2013. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert review of anti-infective therapy*. 11:943-956.
- Nash, P.B., M.B. Purner, R.P. Leon, P. Clarke, R.C. Duke, and T.J. Curiel. 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of immunology*. 160:1824-1830.
- Orlofsky, A., L.M. Weiss, N. Kawachi, and M.B. Prystowsky. 2002. Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *Journal of immunology*. 168:1840-1846.
- Payne, T.M., R.E. Molestina, and A.P. Sinai. 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *Journal of cell science*. 116:4345-4358.
- Quan, J.H., G.H. Cha, W. Zhou, J.Q. Chu, Y. Nishikawa, and Y.H. Lee. 2013. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Experimental parasitology*. 133:462-471.

- Saeij, J.P., S. Coller, J.P. Boyle, M.E. Jerome, M.W. White, and J.C. Boothroyd. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. 445:324-327.
- Shapira, S., K. Speirs, A. Gerstein, J. Caamano, and C.A. Hunter. 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases*. 185 Suppl 1:S66-72.
- Sinai, A.P., and K.A. Joiner. 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology*. 154:95-108.
- Sinai, A.P., P. Webster, and K.A. Joiner. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of cell science*. 110 (Pt 17):2117-2128.
- Song, K.J., H.J. Ahn, and H.W. Nam. 2012. Anti-apoptotic effects of SERPIN B3 and B4 via STAT6 activation in macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology*. 50:1-6.
- Stehlik, C., R. de Martin, B.R. Binder, and J. Lipp. 1998. Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF-kappa B. *Biochemical and biophysical research communications*. 243:827-832.
- Sullivan, A.M., X. Zhao, Y. Suzuki, E. Ochiai, S. Crutcher, and M.A. Gilchrist. 2013. Evidence for finely-regulated asynchronous growth of *Toxoplasma gondii* cysts based on data-driven model selection. *PLoS computational biology*. 9:e1003283.
- Tang, G., Y. Minemoto, B. Dibling, N.H. Purcell, Z. Li, M. Karin, and A. Lin. 2001. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*. 414:313-317.
- Tomita, T., T. Yamada, L.M. Weiss, and A. Orlofsky. 2009. Externally triggered egress is the major fate of *Toxoplasma gondii* during acute infection. *Journal of immunology*. 183:6667-6680.
- Vutova, P., M. Wirth, D. Hippe, U. Gross, K. Schulze-Osthoff, I. Schmitz, and C.G. Luder. 2007. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cellular microbiology*. 9:1556-1570.

- Wang, H.L., L.T. Yin, T.E. Zhang, L. Guan, X.L. Meng, H.L. Liu, and G.R. Yin. 2014a. [Construction, expression and kinase function analysis of an eukaryocyte vector of rhoptry protein 17 in *Toxoplasma gondii*]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi* = *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 32:29-33.
- Wang, T., J. Zhou, X. Gan, H. Wang, X. Ding, L. Chen, Y. Wang, J. Du, J. Shen, and L. Yu. 2014b. *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Parasitology*. 141:988-995.
- Wang, X.Q., and W.A. Frazier. 1998. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell*. 9:865-874.
- Yamada, T., T. Tomita, L.M. Weiss, and A. Orlofsky. 2011. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. *International journal for parasitology*. 41:595-607.
- Yenari, M.A., and R.M. Sapolsky. 2005. Gene therapy in neurological disease. *Methods in molecular medicine*. 104:75-88.

VI.3 Matériels et Méthodes

VI.3.1 Culture et infection cellulaire

Les cellules microgliales (CMH5), endothéliales (Hbmec) et les neurones (SH SY5Y) sont cultivés et infectés par les deux souches de *T. gondii* (RH et PRU) durant 24 h et 48 h selon le protocole décrit dans le chapitre « Matériel biologique utilisé ».

VI.3.2 Analyse de l'apoptose

VI.3.2.1 La cytométrie en flux

Les culots secs des cellules nerveuses humaines non infectées (contrôles) et infectées sont mis en suspension dans 300 μL de PBS (phosphate buffer salin 1X). Après numération des cellules, 5×10^5 cellules sont mélangées dans 100 μL de PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ et 5 μL d'Annexine-V (BD Phamingen, Le Pont de Claix, France). Les tubes sont incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min, temps nécessaire à l'Annexine-V pour se fixer sur les phosphatidylsérines membranaires accessibles. Juste avant le passage des cellules dans le cytomètre, 10 μL d'iodure de propidium (BD Pharmigen) sont ajoutés dans chacun des tubes. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur, BDBiosciences, France). Les événements ont été acquis, et les données ont été analysées avec le logiciel Flowjo (Tree star, USA).

VI.3.2.2 L'ELISA Cell Death

Le kit Cell Death Detection ELISA PLUS® (Laboratoires Roche®, France) a été utilisé pour quantifier les nucléosomes solubles qui résultent de l'apoptose activée dans les cellules nerveuses humaines infectées par *T. gondii*. Quatre cent microlitres de Lysis-Buffer ont été ajoutés aux culots secs des cellules infectées. La lyse des cellules est effectuée pendant 30 min d'incubation à température ambiante pendant 10 min à 200 g. Après une centrifugation, un volume de 20 μL du surnageant est disposé dans les 96 puits de la plaque d'Elisa Cell Death. Vingt microlitres de tampon d'incubation sont ajoutés dans le puits du blanc et 20 μL du témoin positif dans le puits témoin positif. Ensuite, un volume de 80 μL d'Anticorps Anti-histone et Anti-ADN est ajouté dans chacun des puits. L'incubation est de 2 h. Quatre lavages sont réalisés avec 200 μL du tampon d'incubation et 100 μL d'ABTS (2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acid)). La plaque est ensuite incubée pendant 15

min à température ambiante permettant à la réaction colorée de se développer. Cent microlitres de H₂SO₄ sont ajoutés afin de stopper la réaction. La lecture des DO (Densité Optique) a été faite à 405 et 492 nm. Un témoin négatif a été effectué pour chaque type cellulaire et sert à déterminer le bruit de fond. La DO corrigée est ainsi calculée en faisant la différence entre la DO obtenue avec le surnageant expérimental et la DO du bruit de fond.

VI.3.2.3 La méthode TUNEL

La méthode TUNEL a été réalisée en suivant les recommandations du kit DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System des laboratoires Promega (Promega, Lyon, France). Les cellules ont été cultivées sur des lab-Tek (Sartedt, Marnay, France), divisées en 4 petites chambres de culture cellulaire. Après avoir fixé les cellules, elles sont immergées dans du formol à 10 % pendant 25 min puis plongées 2 fois dans du PBS froid, 5 min à chaque fois. La lame est ensuite immergée dans du PBS à 20% de Triton ® X-10 (Sigma- Aldrich) pendant 5 min, afin d'être perméabilisée, puis plongée 2 fois dans du PBS, 5 min à chaque fois. Cent microlitres du tampon d'équilibrage sont ajoutés puis la lame est incubée à température ambiante pendant 5 à 10 min. Cent microlitres du mélange réactionnel TdT sont ajoutés et la lame est directement recouverte d'une lamelle en plastique afin éviter le séchage. La lame est incubée 1 heure à 37°C dans une atmosphère humide. Afin d'arrêter la réaction, la lamelle est ensuite retirée et la lame est immergée dans du SSC 2X pendant 15 min. Un lavage est effectué en plongeant 3 fois la lame dans du PBS froid, 5 min à chaque fois, puis elle est immergée dans 0,3% de peroxyde d'hydrogène pendant 3 à 5 min pour bloquer la réaction. La lame est plongée 3 fois dans du PBS glacé, 5 min à chaque fois, puis un volume de 100 µL de Streptavidine HRP (dilué 1/500 dans du PBS) est ajouté. La lame est incubée 30 min à température ambiante. Puis elle est lavée 3 fois dans du PBS glacé, 5 min à chaque fois. Un volume de 100 µL DAB (préparée immédiatement avant utilisation) est ajouté afin de permettre la coloration des cellules. Un dernier lavage est réalisé dans de l'eau dé-ionisée pour enlever l'excès de colorant. L'observation est réalisée par microscopie optique (Nikon Eclipse TS 100).

VI.3.2.4 Extraction des protéines

Des extraits de protéines totales ont été obtenus selon le protocole suivant: 5 x 10⁶ cellules infectées par une souche de parasite et non infectées ont été mises en suspension séparément dans 40 µL de Pierce RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Lysis and extraction Buffer (Thermo Scientific, Strasbourg, France). Le tout est ensuite incubé 20 min

dans la glace. Les extraits cytoplasmiques ont été récupérés après une centrifugation de 11200 tours/minute pendant 20 min à 4°C.

Le dosage des protéines extraites a été réalisé à l'aide d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma- Aldrich). Cette gamme a été réalisée à partir de 10 mg/ml de BSA, et selon la procédure décrite dans le tableau 2. Ensuite, dans une plaque Nunc-MaxiSorp de 96 puits (EBioscience, Paris, France), 2 µL d'eau sont ajoutés dans le puits du blanc, 2 µL de chacun des points de la gamme sont ajoutés dans chaque puit destiné à la gamme et 0,4 µL d'extrait protéique et 2 µL d'eau sont ajoutés dans les autres puits. Un volume de 200 µL de Bradford (Sigma- Aldrich) dilué à 1/5 est ajouté dans chaque puits. La concentration des protéines est évaluée par le dosage de la DO à 595 nm (Multiskan, Thermo Scientific) par une soustraction du blanc.

Tableau 2 : Préparation de la gamme BSA, solution mère de BSA (SM)= 10 mg /mL

| Les points de la gamme | Volume d'eau ajoutée (µL) | Volume de la solution à diluer (µL) | Concentration finale (mg/ mL) |
|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| S6 | 800 | 200 SM | 2 |
| S5 | 850 | 150 SM | 1,5 |
| S4 | 900 | 100 SM | 1 |
| S3 | 300 | 300 S5 | 0,75 |
| S2 | 300 | 300 S4 | 0,5 |
| S1 | 200 | 200 S2 | 0,25 |

VI.3.2.5 Western Blot

La détection de l'expression des caspases a été effectuée par la technique de Western Blot en utilisant les anticorps anti-caspase 8 (Caspase-8 « 1C12 » Mouse mAb) (Cell Signaling, Danvers, USA) et anti-procaspase 3 (Caspase-3 « 3G2 » Mouse mAb) (Cell Signaling). Quarante milligrammes de protéines ont été nécessaires pour chaque Western Blot. Cinq microlitres de bleu de charge LDS Sample Buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 2 µL de Sample Reducing Agent (Invitrogen) sont ajoutés à 40 mg d'extrait protéique. Le tout est ajusté avec de l'eau distillée à 20 µL de volume final. Le mélange est incubé à 95°C pendant 5 min. Ensuite, les protéines préparées ont été déposées dans les puits d'un gel de polyacrylamide Bolt à 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen), 5 µL de marqueur de taille SeeBlue Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) est déposé dans le dernier puits du gel. La migration est réalisée à un voltage de 165 V et 100 mA pendant 35 min. Les protéines sont

ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose par un transfert semi-sec réalisé dans un appareil iBlot Dry Blotting System (Invitrogen) pendant 8 min. Après l'étape du transfert, la membrane est saturée dans de la BSA 5% (Sigma- Aldrich) pendant 1 h sous agitation. Dix microlitres d'anticorps primaires dilués à 1/1000 de caspase 8 ou de procaspase 3 sont mis en contact avec la membrane, pour une incubation toute la nuit à 4°C sous agitation. Puis, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec du TBS Tween 80 (lavage de 25 min). Les anticorps primaires fixés sur les protéines sont marqués par un anticorps secondaire Polyclonal de lapin Anti-souris Immunoglobuline/HRP (Dako, Glostrup, Denmark) dilué à 1/1000 pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages de TBS Tween 80 pendant 10 min (lavage 25 min). Les protéines sont ensuite révélées par la G-BOX (Syngene, Yvelines, France) sous l'effet d'un mélange de Chimiluminescence de substance A et B (Millipore, Molsheim France).

VI.3.2.6 Elisa Pro et active caspase 3

La quantification de la caspase 3 est réalisée à l'aide de la pro & active caspase 3 Human duplex Elisa Kit (Abcam, Cambridge, UK). Dans un premier temps, les protéines sont extraites à partir des culots des cellules infectées par un tampon d'extraction Buffer 1X fourni avec le Kit. L'extraction est réalisée en suivant le même protocole décrit dans la partie extraction des protéines. Chacune des deux formes de la caspase 3 est quantifiée par une gamme spécifique. La procaspase 3 est quantifiée par la gamme de HeLa-Vehicule Standards (VEH) et la caspase 3 activée par la gamme de HeLa-Staurosporine Standard (STS) en suivant les étapes du tableau 3. Un volume de 50 µL de chaque échantillon (tampon d'incubation pour le blanc, les points des deux gammes et les extraits protéiques) est ajouté dans les puits de la plaque Elisa (en duplicate). La plaque est ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages par un tampon de lavage 1X, un volume de 50 µL du mélange d'anticorps de détection de la caspase 3 est ajouté dans tous les puits. Ce mélange comporte un anticorps anti Procaspase 3-marqué à la phosphatase alcaline et un anticorps anti-Active-Caspase 3-HRP. La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Après incubation, les puits sont lavés 3 fois avec le tampon d'incubation puis un volume de 100 µL de solution de développement, constitué de substrat fluorescent 1X et de peroxyde d'hydrogène 1X est ajouté dans tous les puits juste avant la lecture.

La lecture de la pro-caspase 3 est effectuée par la détection de la phosphatase alcaline (AP), à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et d'émission de 450 nm (Multiskan,

Thermo Scientific). La lecture de la caspase 3 active est effectuée par Horse Radish Peroxidase (HRP), à une longueur d'onde d'excitation de 555 nm et d'émission de 595 nm (Multiskan, Thermo Scientific). Pour les deux formes de protéines, une lecture en cinétique est réalisée : 3 lectures pendant 5 min à un intervalle de 80 sec sous agitation. Ensuite, le rapport de la longueur d'onde d'excitation sur la longueur d'onde d'émission est utilisé pour interpréter les résultats.

Tableau 3: Préparation des gammes VEH and STS

| Les points de gamme | Echantillon à diluer | Volume nécessaire pour la dilution (µL) | Volume de l'incubation Buffer 1X (µL) | Concentration initiale (µg/mL) | Concentration finale (µg/mL) |
|---------------------|----------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 1-VEH /STS | Stock | - | 500 | - | 800 |
| 2-VEH /STS | 1VEH /STS | 150 | 150 | 800 | 400 |
| 3-VEH /STS | 2VEH /STS | 150 | 150 | 400 | 200 |
| 4-VEH /STS | 3VEH /STS | 150 | 150 | 200 | 100 |
| 5-VEH /STS | 4VEH /STS | 150 | 150 | 100 | 50 |
| 6-VEH /STS | 5VEH /STS | 150 | 150 | 50 | 25 |

VI.3.2.7 Elisa caspase 8

La quantification de la caspase 8 est réalisée par le kit Caspase-8 Human ELISA (Abcam) en suivant les instructions du fournisseur. Avant le dépôt des échantillons, la plaque ELISA est lavée avec le tampon de lavage 1X. Une gamme de dilution de 10 ng/mL jusqu'à 0,16 ng/mL est déposée dans chaque puits destiné à un point de la gamme (en duplicate) (tableau 4). Cent microlitres de diluant de l'échantillon sont ajoutés dans les puits du blanc (en duplicate). Un volume de 50 µL de chaque échantillon (surnageant de co-culture) est ajouté aux puits (en duplicate). Ensuite, 50 µL d'anticorps de détection (1/1000) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 2 h à une température ambiante sous agitation. Après le temps d'incubation prévu, les puits sont lavés 3 fois avec du tampon de lavage 1X, puis 100 µL de IgG anti-lapin marqués à l'HRP (1/2000) sont ajoutés dans tous les puits, le marquage nécessite 1 h d'incubation à une température ambiante sous agitation. La plaque est ensuite lavée 3 fois afin d'éliminer les excès du marquage, puis un volume de 100 µL de solution de substrat TMB (Tetraethyl-Benzidine) est ajouté dans chaque puits. Ceci est suivi par une incubation de 15 min à température ambiante à l'obscurité. Après l'incubation la réaction est immédiatement stoppée en ajoutant 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits. L'absorbance de chaque puits est lue à une longueur d'onde de 450 nm. La DO de chaque échantillon est calculée en suivant les instructions du fournisseur.

Tableau 4 : Préparation de la gamme pour l'ELISA caspase 8

| Les points de gamme | Volume de Sample Diluent (µL) | Volume de chaque point de gamme à diluer (µL) | Concentration finale ng/mL |
|---------------------|-------------------------------|---|----------------------------|
| S1 | 100 | 100 | 10 |
| S2 | 100 | 100 S1 | 5 |
| S3 | 100 | 100 S2 | 2.5 |
| S4 | 100 | 100 S3 | 1.25 |
| S5 | 100 | 100 S4 | 0.63 |
| S6 | 100 | 100 S5 | 0.31 |
| S7 | 100 | 100 S6 | 0.16 |
| | 100 | 100 à jeter | |

VI.3.2.8 Analyse statistique

Les comparaisons des résultats ont été réalisées avec des tests d'analyses multifactorielles non paramétriques (test de Scheirer-Ray-Hare) pour rechercher les effets factoriels et leurs interactions éventuelles et des tests a posteriori (test de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan) pour préciser les différences deux à deux lorsque l'effet factoriel a été mis en évidence. Par convention, les résultats seront présentés avec * lorsque le seuil de signification est inférieur à 5%, ** pour un seuil inférieur à 1% et *** lorsque le seuil est inférieur à 0,1%. Nous considérons les comparaisons comme non significatives lorsque le seuil est supérieur à 5%.

VI.4 Résultats

VI.4.1 Cytométrie en Flux

Afin de déterminer le taux d'apoptose activée dans les cellules nerveuses humaines infectées par les souches RH et PRU, les culots des co-cultures ont été récupérés et analysés dans un premier temps par la cytométrie en Flux en faisant un double marquage Annexin-v (FL1-H) et IP (FL3-H). Les mesures ont été réalisées en triplicate à 24 h et à 48 h post infection. Le résultat d'une seule acquisition est présenté dans les figures 22, 23 et 24. Les analyses statistiques et la construction des graphiques intègrent la totalité des résultats des trois expériences. Pour chaque échantillon l'acquisition a été faite pour 10 000 évènements sur un diagramme qui sépare les cellules selon leurs tailles (FSC-H) et leurs structures (SSC-H). Les cellules d'intérêt correspondent aux cellules délimitées en population P1 (Figure 22, 23 et 24, cadres gauches). Les figures 22, 23 et 24 présentent les résultats de l'analyse. Les cadres de gauche représentent la population de cellules analysées, le cadre de droite montre le résultat du double marquage :

Q1 : cellules Annexin-v négatives et IP positives

Q2 : cellules Annexin-v positives et IP positives

Q3 : cellules Annexin-v négatives et IP négatives

Q4 : cellules Annexin-v positives et IP négatives

Pour chaque acquisition, les tableaux de contingence récapitulent la répartition du pourcentage des sous-populations cellulaires (Figure 22, 23 et 24).

La population des cellules microgliales est bien individualisée à 24 h post infection, elle représente 95,9 % des cellules vivantes et 3,9 % des cellules apoptotiques (Figure 22B). En revanche, le nuage de ces cellules perd son homogénéité à 48 h post infection (Figure 22C). La viabilité des cellules s'effondre à 54,2 % et le taux d'apoptose augmente à 39,6 % (Figure 22C). En comparant ces résultats avec le résultat du contrôle (cellules microgliales non infectées) (Figure 22A), on note que le taux d'apoptose des cellules augmente à 48 h post infection par la souche RH (Figure 22C).

Dans les cellules infectées par la souche PRU, le résultat de l'acquisition montre une population P1 bien individualisée dans les deux temps de l'infection. La viabilité des cellules microgliales est de 94,2 % à 24 h post infection et de 98,4 % à 48 h post infection avec un taux d'apoptose très faible (5% à 24 h et 1% à 48 h) (Figure 22D et E). Les analyses

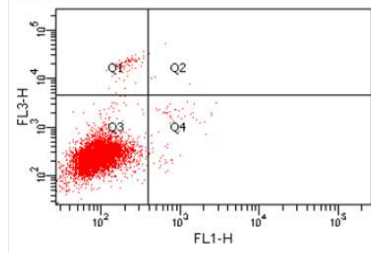
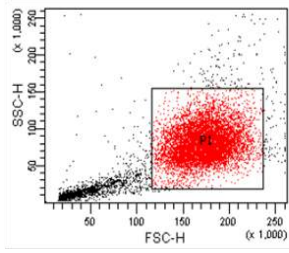
statistiques ne montrent pas un effet temps significatif. Les graphiques ont été conçus en utilisant la moyenne des pourcentages du taux d'apoptose à 24 h et à 48 h. La figure 25 montre que le taux d'apoptose diminue dans les cellules infectées par la souche PRU par rapport à celui induit par la souche RH ($p < 0,01$) et à celui du contrôle.

En ce qui concerne les cellules endothéliales, la population de cellules P1 apparaît moins individualisée à 24 h post infection par la souche RH. Les taux de la viabilité et de l'apoptose des cellules ne changent pas par rapport aux cellules contrôles (viabilité : 96,7 %) (apoptose: environ 3 %) (Figure 23A et B). A 48 h post infection la population des cellules P1 infectées est plus restreinte, le taux de viabilité des cellules est légèrement diminué (84,5 %) et le taux d'apoptose a augmenté (15,2 %) (Figure 23C). En revanche, l'infection par la souche PRU provoque une diminution de viabilité des cellules (47,3 %) à 24 h post infection et (55,4 %) à 48 h post infection (Figure 23D et E). Le taux d'apoptose augmente à 24 h post infection (45 %) et à 48 h post infection (45,6 %) (Figure 23D et E). Les analyses statistiques montrent un effet de souche significatif. Le taux d'apoptose est significativement augmenté dans les cellules endothéliales infectées par la souche PRU par rapport aux cellules infectées par la souche RH ($p < 0,001$) et les cellules contrôles. En outre, la souche PRU induit un taux d'apoptose significativement plus fort dans les cellules endothéliales par rapport aux cellules microgliales ($p < 0,001$).

Dans les neurones infectés par la souche RH à 24 h et à 48 h la viabilité de la population de cellules P1 ne change pas par rapport aux cellules non infectées (contrôle). Elle est de 81,7 % dans les cellules contrôles, de 87,3 % à 24 h post infection et de 89,1 % à 48 h post infection (Figure 24A, B et C). Suite à l'infection par la souche PRU, la viabilité des cellules augmente à 93,7 % à 24 h post infection et à 96,1 % à 48 h post infection (Figure 24D et E). Le pourcentage d'apoptose reste très faible. Les analyses statistiques montrent que le taux d'apoptose dans les neurones infectés par la souche PRU est significativement plus faible que celui activé par la souche RH ($p < 0,001$).

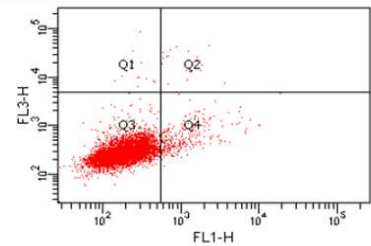
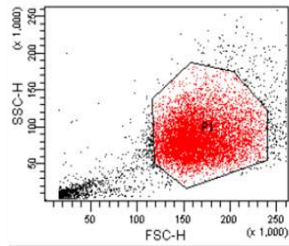
L'étude de l'interaction entre les cellules montre que le taux d'apoptose des cellules endothéliales infectées par la souche PRU est significativement plus fort que celui activé dans les neurones infectés par la même souche ($p < 0,001$) (Figure 25)

A
Contrôle



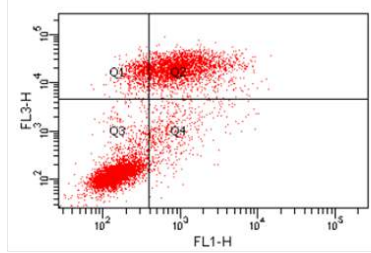
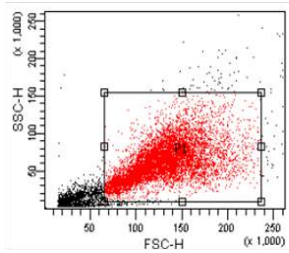
| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 8,080 | 80.8 | 80.8 |
| Q1 | 76 | 0.9 | 0.8 |
| Q2 | 5 | 0.1 | 0.0 |
| Q3 | 7,933 | 98.2 | 79.3 |
| Q4 | 66 | 0.8 | 0.7 |
| P2 | 662 | 6.6 | 6.6 |

B
RH
24 h



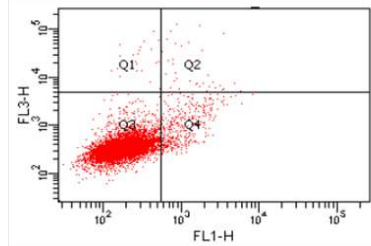
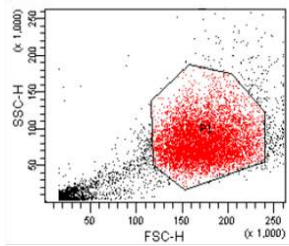
| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 8,310 | 83.1 | 83.1 |
| Q1 | 12 | 0.1 | 0.1 |
| Q2 | 19 | 0.2 | 0.2 |
| Q3 | 7,969 | 95.9 | 79.7 |
| Q4 | 310 | 3.7 | 3.1 |
| P2 | 1,134 | 11.3 | 11.3 |

C
RH
48 h



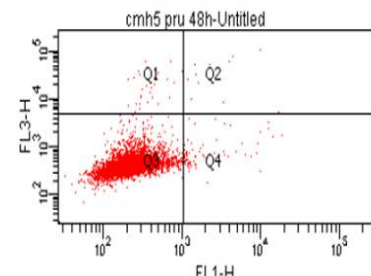
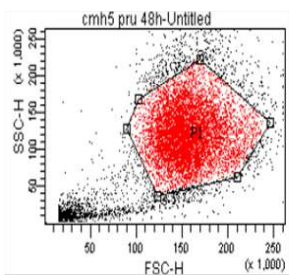
| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 8,063 | 80.6 | 80.6 |
| Q1 | 493 | 6.1 | 4.9 |
| Q2 | 2,705 | 33.5 | 27.0 |
| Q3 | 4,372 | 54.2 | 43.7 |
| Q4 | 493 | 6.1 | 4.9 |
| P2 | 3,891 | 38.9 | 38.9 |

D
PRU
24h



| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 7,958 | 79.6 | 79.6 |
| Q1 | 23 | 0.3 | 0.2 |
| Q2 | 34 | 0.4 | 0.3 |
| Q3 | 7,495 | 94.2 | 75.0 |
| Q4 | 406 | 5.1 | 4.1 |
| P2 | 1,306 | 13.1 | 13.1 |

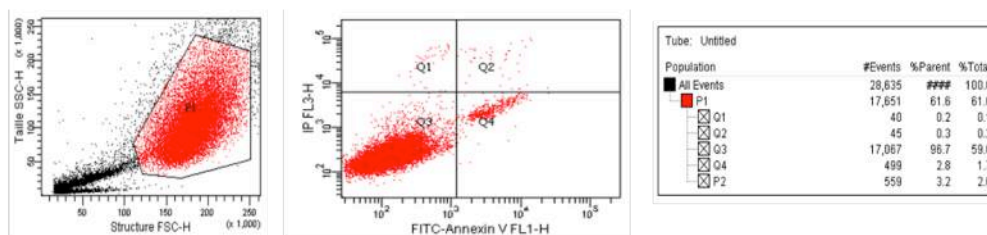
E
PRU
48h



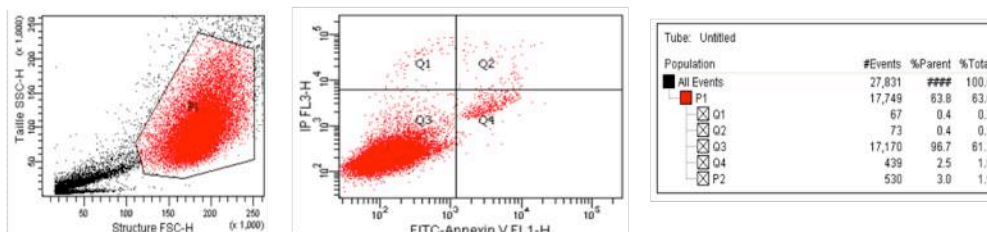
| Population | #Events | %Parent | %Total |
|------------|---------|---------|--------|
| All Events | 10,000 | ### | 100.0 |
| P1 | 7,767 | 77.7 | 77.7 |
| Q1 | 27 | 0.3 | 0.3 |
| Q2 | 11 | 0.1 | 0.1 |
| Q3 | 7,645 | 98.4 | 76.4 |
| Q4 | 84 | 1.1 | 0.8 |
| P2 | 96 | 1.2 | 1.0 |

Figure 22 : Résultat de l'analyse par cytométrie en flux des cellules microgliales (CMH5). A. Cellules contrôles non infectées. B. Cellules infectées par la souche RH à 24 h post infection. C. Cellules infectées par la souche RH à 48 h post infection. D. Cellules infectées par la souche PRU à 24 h post infection. E. Cellules infectées par la souche PRU à 48 h post infection. Les cadres de gauche représentent la population de cellules analysées. Les cadres de droite montrent le résultat du double marquage Annexin-v (FL1-H) et IP (FL3-H). Les tableaux de contingence récapitulent la répartition du pourcentage des sous-populations cellulaires.

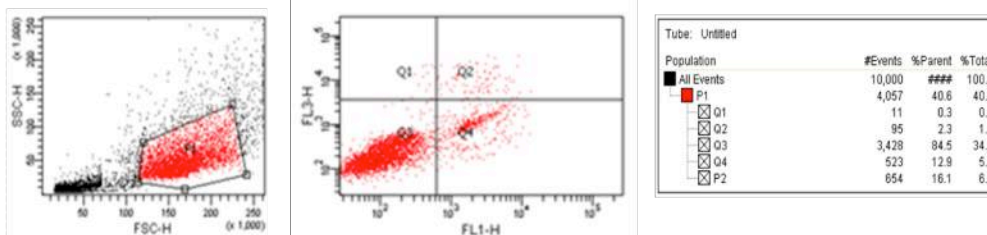
A
Contrôle



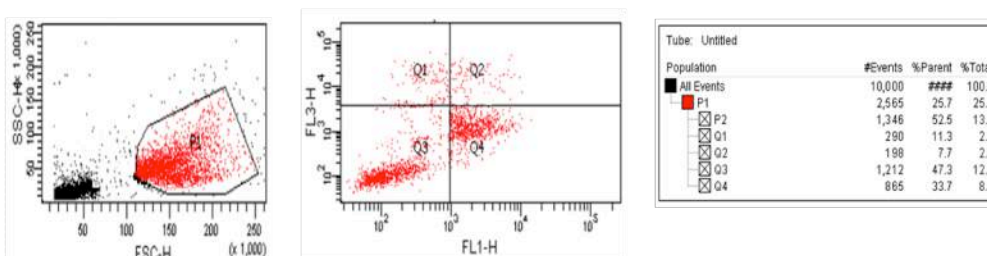
B
RH
24 h



C
RH
48 h



D
PRU
24h



E
PRU
48h

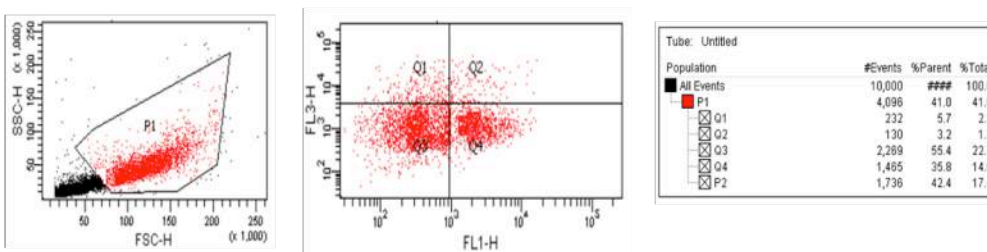


Figure 23 : Résultat de l'analyse par cytométrie en flux des cellules endothéliales (Hbmec). A. Cellules contrôles non infectées. B. Cellules infectées par la souche RH à 24 h post infection. C. Cellules infectées par la souche RH à 48 h post infection. D. Cellules infectées par la souche PRU à 24 h post infection. E. Cellules infectées par la souche PRU à 48 h post infection. Les cadres de gauche représentent la population de cellules analysées. Les cadres de droite montrent le résultat du double marquage Annexin-v (FL1-H) et IP (FL3-H). Les tableaux de contingence récapitulent la répartition du pourcentage des sous-populations cellulaires.

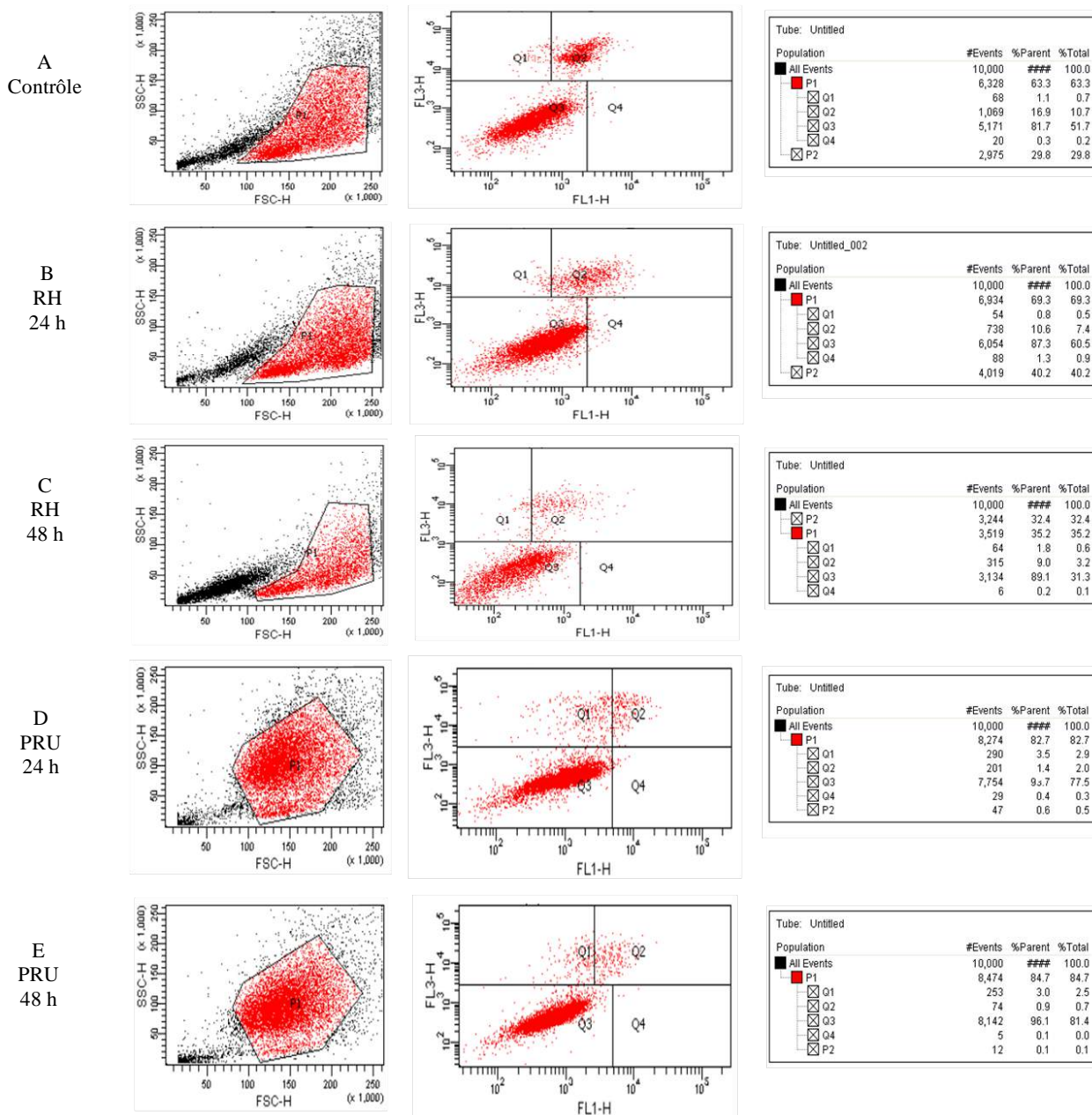


Figure 24 : Résultat de l'analyse par cytométrie en flux des neurones (SH SY5Y). A. Cellules contrôles non infectées. B. Cellules infectées par la souche RH à 24 h post infection. C. Cellules infectées par la souche RH à 48 h post infection. D. Cellules infectées par la souche PRU à 24 h post infection. E. Cellules infectées par la souche PRU à 48 h post infection. Les cadres de gauche représentent la population de cellules analysées. Les cadres de droite montrent le résultat du double marquage Annexin-v (FL1-H) et IP (FL3-H). Les tableaux de contingence récapitulent la répartition du pourcentage des sous-populations cellulaires.

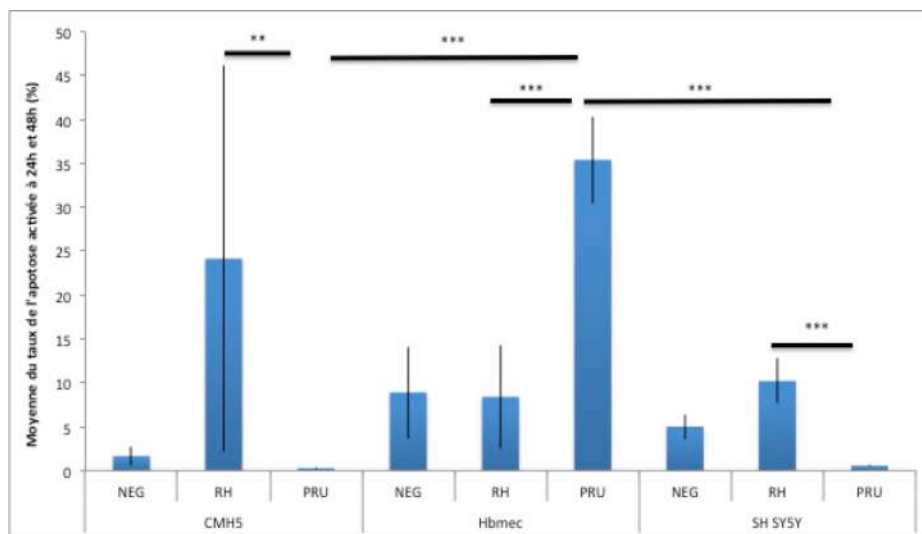


Figure 25 : Résultats de taux d'apoptose activée dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

VI.4.2 Quantification des nucléosomes solubles (Elisa Cell Death)

Les nucléosomes solubles qui résultent de l'activation de l'apoptose dans les cellules nerveuses humaines infectées par les deux souches de *T. gondii* ont été quantifiés par le Kit ELISA Cell Death. La quantification est réalisée en triplicate et chaque mesure a été réalisée en duplicate. Les analyses statistiques ne montrent pas un effet de temps significatif. Les graphiques ont été conçus en utilisant la moyenne de toutes les mesures à 24 h et à 48 h.

Contrairement à ce qui a été observé dans les résultats de la cytométrie en flux, le taux des nucléosomes solubles est plus élevé dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU ($p < 0,001$) que dans les cellules contrôles et les cellules infectées par la souche RH (Figure 26).

En ce qui concerne les neurones et les cellules endothéliales, les résultats de la cytométrie en flux sont confirmés par la quantification des nucléosomes solubles. Le taux des nucléosomes solubles dans les neurones infectés par la souche RH est significativement plus élevé que ceux présentés lors de l'infection par la souche PRU ($p < 0,001$) et dans le contrôle ($p < 0,001$) (Figure 26). Dans les cellules endothéliales, l'infection par la souche PRU induit

une augmentation du taux des nucléosomes solubles par rapport à l'infection par la souche RH et par rapport au contrôle ($p < 0,0001$) (Figure 26).

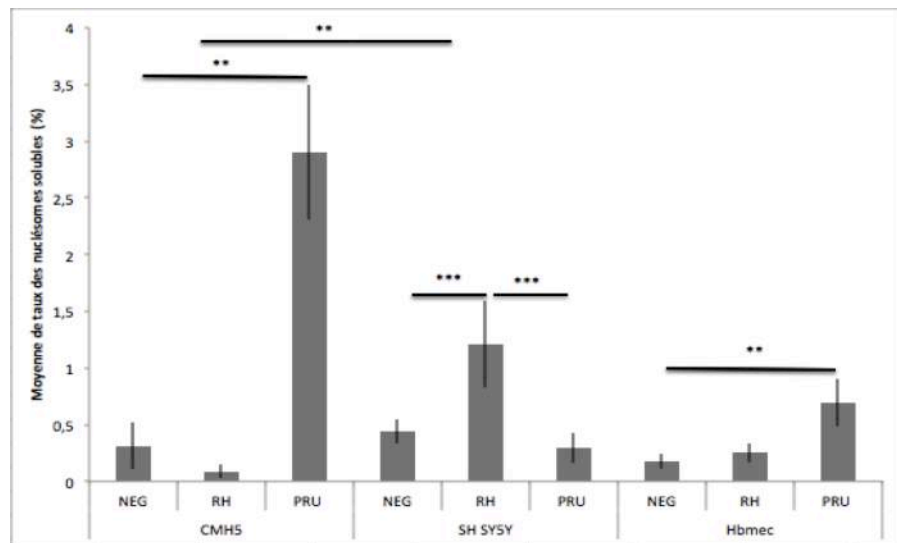


Figure 26 : Quantification des nucléosomes solubles du taux d'apoptose activée dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

VI.4.3 Quantification d'ADN fragmenté (Tunel)

Comme les résultats des deux techniques étaient divergents pour les cellules microgliales, la technique Tunel a été utilisée pour confirmer l'activation de l'apoptose dans les cellules nerveuses humaines infectées. Dans les cellules microgliales, les résultats montrent que la souche PRU induit un taux d'apoptose plus important que la souche RH ($p < 0,001$) (Figure 27). Dans les neurones, c'est la souche RH qui induit un taux d'apoptose plus élevé que la souche PRU ($p < 0,001$) (Figure 27). Dans les cellules endothéliales, c'est la souche PRU qui induit un taux apoptotique élevé par rapport à la souche RH ($p < 0,001$) (Figure 27).

La comparaison entre les trois types cellulaires montre que le taux d'apoptose induit par la souche RH dans les neurones est plus important que celui induit dans les cellules microgliales ($p < 0,001$) et dans les cellules endothéliales ($p < 0,0001$) (Figure 27).

En comparant les résultats des trois techniques, on note que les résultats sont concordants pour les neurones et les cellules endothéliales (Figure 25, 26 et 27). En revanche, pour les cellules microgliales, seuls les résultats de la technique d'ELISA Cell death et de la technique TUNEL sont concordants (Figure 25, 26 et 27).

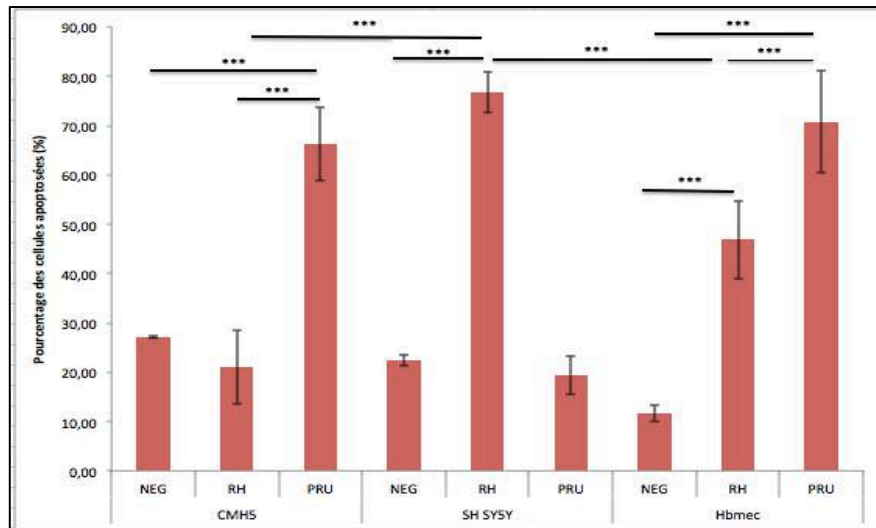


Figure 27 : Quantification du taux d'ADN fragmenté dans les cellules microgliales, endothéliales et neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

VI.4.4 Détermination de l'expression des caspases 3 et 8 (Western Blot)

D'après les résultats décrits, on note que chacune des souches RH et PRU induit l'apoptose dans les cellules nerveuses humaines testées. En revanche, le taux de l'apoptose est différent selon les types cellulaires et les souches parasitaires. En résumé, la souche PRU induit un taux d'apoptose plus important dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales par rapport à la souche RH. Cette dernière induit un taux d'apoptose plus important dans les neurones que la souche PRU.

Afin de déterminer les voies d'apoptose activées dans les cellules nerveuses humaines infectées par chacune des deux souches de *T. gondii*, un Western Blot a été réalisé afin de détecter l'expression de la caspase 3 et la caspase 8. Les caspases ont été choisies selon les voies d'apoptose qu'elles induisent ; la caspase 3 pour la voie mitochondriale et la caspase 8 pour la voie des récepteurs de mort.

En effet, dans les cellules microgliales, la souche RH induit une diminution de l'expression de la caspase 8 par rapport aux contrôles. En revanche, le niveau de l'expression de cette caspase est inchangé dans les cellules infectées par la souche PRU par rapport aux contrôles (Figure 28A). La pro-caspase 3 n'est exprimée ni dans les cellules microgliales infectées ni dans les cellules contrôles.

Dans les cellules endothéliales, la souche RH induit une expression de la caspase 8 dans toutes les cellules (infectées et contrôles). Le niveau de l'expression de cette protéine semble être plus intense dans les cellules infectées, essentiellement à 48 h post infection (Figure 28B). La souche RH induit une diminution de l'expression de la pro-caspase 3 durant les deux temps de l'infection, mais la diminution est plus faible à 48 h post infection (Figure 28B). La diminution de l'expression de la pro-caspase 3 reflète une activation de cette dernière en caspase 3. Dans les mêmes cellules, la souche PRU induit une forte expression de la caspase 8 et une diminution de l'expression de la pro-caspase 3 à 24 h et à 48 h post infection par rapport aux contrôles (Figure 28B).

Dans les neurones, la souche RH induit une expression de la caspase 8 à 24 h et à 48 h post infection par rapport aux contrôles. Cette expression est accompagnée par une diminution très claire de l'expression de la procaspase 3, ce qui indique l'activation de cette dernière (Figure 28C). Dans l'infection des neurones par la souche PRU, on note une faible expression de la caspase 8 à 24 h post infection par rapport aux contrôles. Cette expression est inhibée à 48 h post infection. Ces résultats concordent avec la forte expression de la pro-caspase 3 à 48 h post infection (Figure 28C).

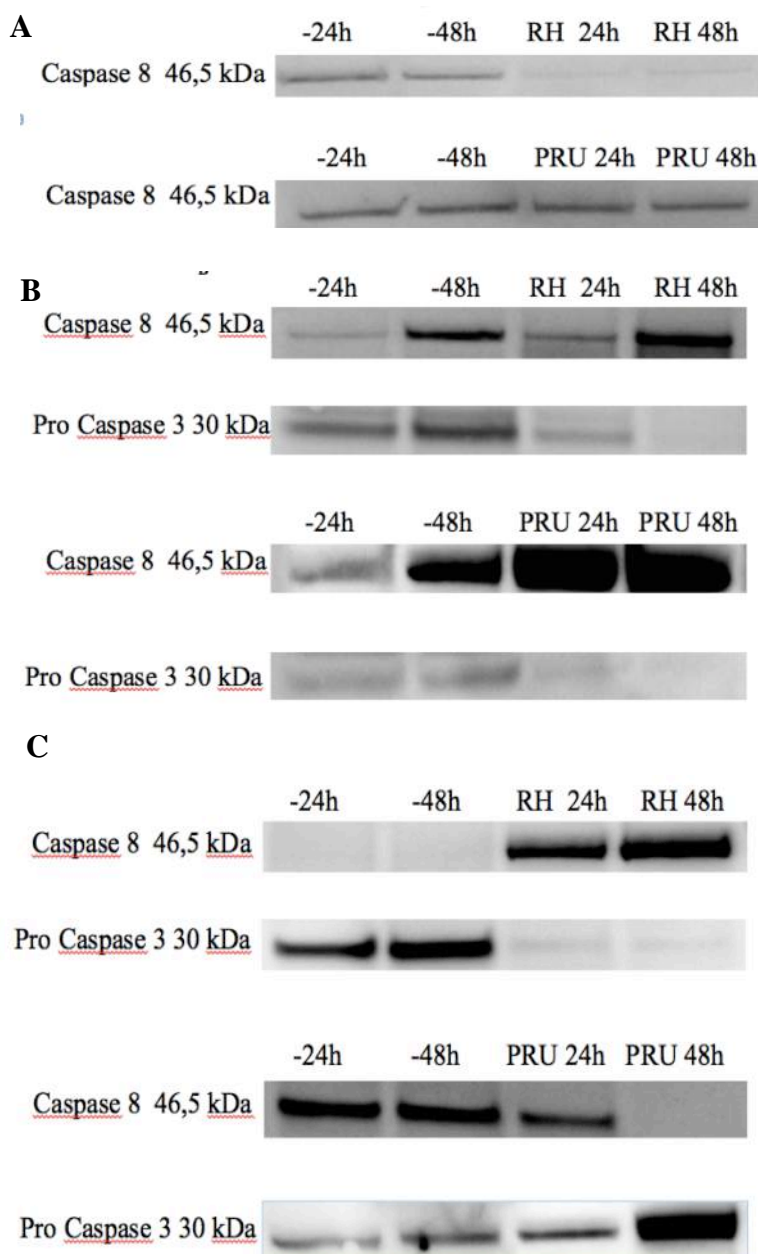


Figure 28 : Expression de la caspase 8 et de la procaspase 3. Analyse par Western Blot de l'expression de la caspase 8 par un anticorps anti-caspase 8 (Caspase-8 « 1C12 » Mouse mAb) et de l'expression de la pro-caspase 3 par un anticorps anti-procaspase 3 (Caspase-3 « 3G2 » Mouse mAb) dans les cellules nerveuses humaines infectées par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. A. Les cellules microgliales (CMH5). B. Les cellules endothéliales. C. Les neurones (SH SY5Y).

VI.4.5 Quantification de la procaspase 3, la caspase 3 et la caspase 8

Les niveaux d'expression de la procaspase 3, de la caspase 3 active et de la caspase 8 active ont été quantifiés au moyen de la technique ELISA. Les résultats de la quantification des caspases montrent que les cellules microgliales infectées par chacune des souches de *T. gondii* n'expriment pas les caspases analysées (Figures 29, 30 et 31). Ceci concorde avec les résultats décrits dans la technique du Western Blot (Figure 28). Dans les neurones infectés par la souche RH, la quantité de la caspase 3 exprimée est significativement plus élevée par rapport aux neurones infectés par la souche PRU ($p < 0,001$) et par rapport aux contrôles ($p < 0,001$) (Figure 29). Ceci est confirmé par les résultats de la quantification de la procaspase 3 qui montrent un profil inverse de celui de la quantification de la caspase 3 active (Figure 30). Dans les cellules endothéliales, l'infection par la souche PRU induit une production élevée de la caspase 3 active par rapport à l'infection par la souche RH et par rapport aux contrôles ($p < 0,01$). Les résultats de la quantification de la procaspase 3 présentent un profil inverse de celui de la caspase 3 active (Figure 30).

La quantité de production de la caspase 8 dans les cellules microgliales infectées et non infectées est très faible par rapport aux autres cellules testées ($p < 0,001$) (Figure 31). Le profil de quantification de la caspase 8 est similaire au profil de la caspase 3 (Figures 29 et 31). En effet, dans les neurones, c'est l'infection par la souche RH qui induit une forte production significative de la caspase 8 par rapport à l'infection par la souche PRU ($p < 0,001$) (Figure 31). En revanche, dans les cellules endothéliales, c'est l'infection par la souche PRU qui induit une forte production de la caspase 8 par rapport à l'infection par la souche RH ($p < 0,001$) (Figure 31).

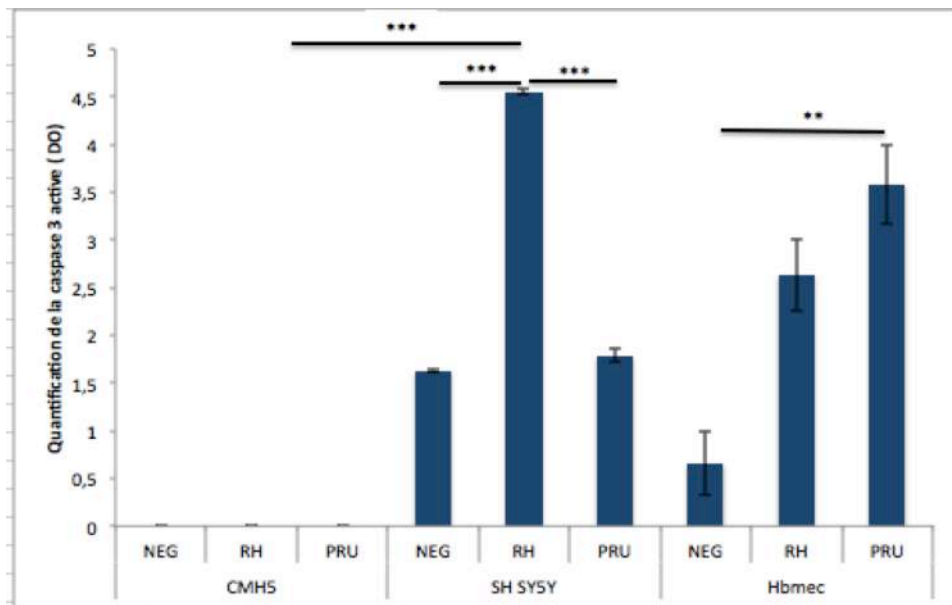


Figure 29 : Résultats de quantification de la caspase 3 active dans les cellules microgliales, endothéliales et les neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

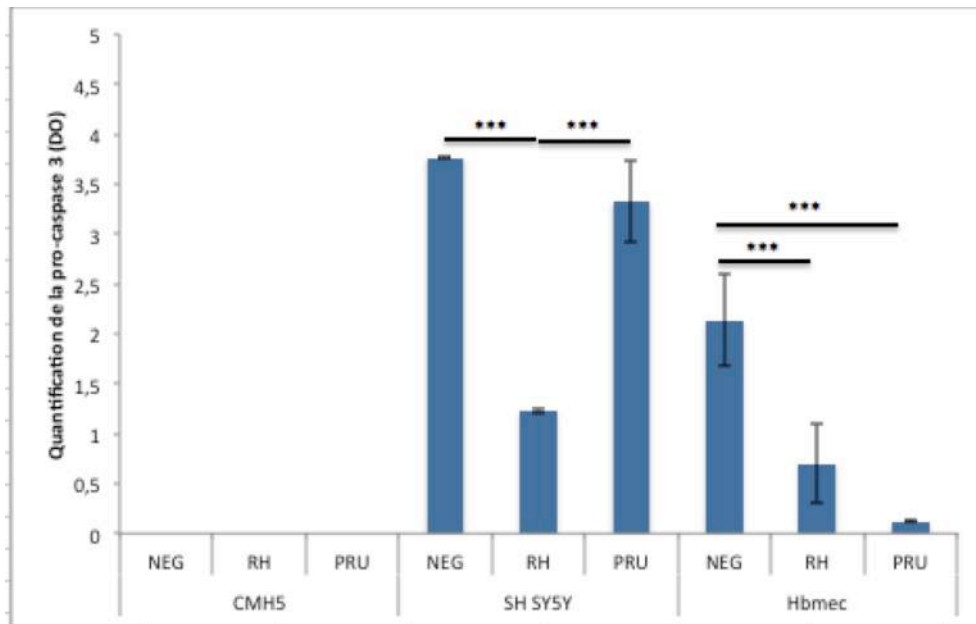


Figure 30 : Résultats de quantification de la procaspase 3 dans les cellules microgliales, endothéliales et les neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

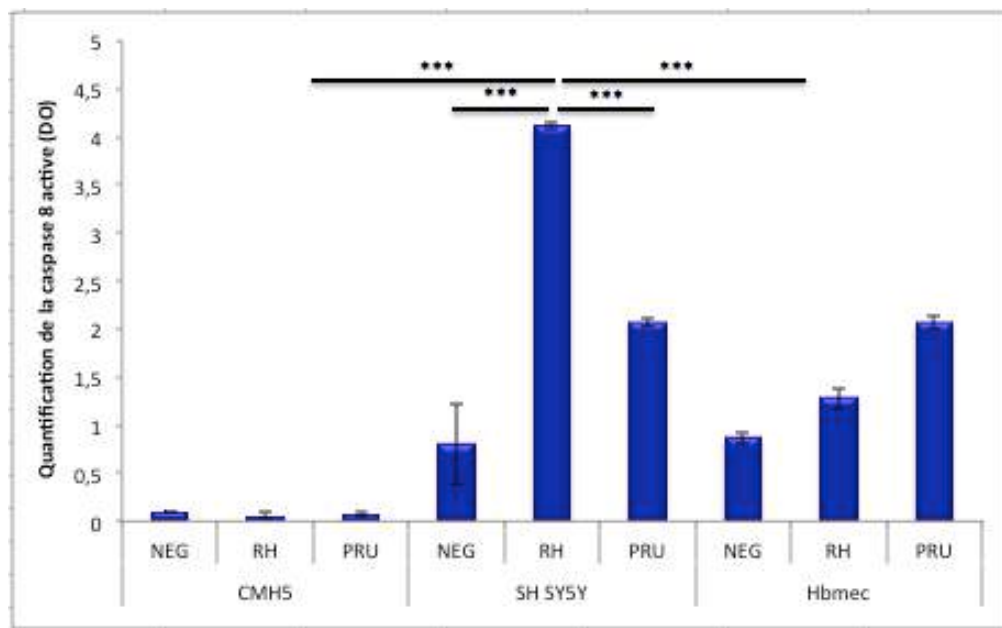


Figure 31 : Résultats de quantification de la caspase 8 active dans les cellules microgliales, endothéliales et les neurones infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h post infection. L'analyse statistique multifactorielle n'a pas montré un effet de temps significatif. Par conséquent, l'effet temps n'est pas pris en compte lors de la construction des graphiques. Ces derniers sont conçus en utilisant la moyenne des infections à 24 h et à 48 h. L'analyse multifactorielle est réalisée au moyen du test de Scheirer- Ray-Hare. Les interactions ont été mises en évidence à l'aide des tests de Steel-Dwass ou Siegel-Castellan. * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$ et *** $p > 0,001$.

VI.5 Synthèse des résultats et discussion

Ce chapitre porte sur l'étude des mécanismes apoptotiques mis en jeu lors de l'infection des cellules nerveuses humaines par deux souches de *T. gondii*, RH et PRU. L'étude a été réalisée à 24 h et 48 h, post infection. Afin d'analyser les mécanismes mis en jeu, nous avons réalisé différentes techniques qui permettent de déterminer le taux d'apoptose dans les cellules nerveuses humaines infectées. La cytométrie en flux permet de déterminer le taux des cellules apoptotiques via un marquage par l'Annexin-v. Quand la cellule entre en apoptose, la membrane plasmique perd son homogénéité et les phosphatidylsérines membranaires deviennent accessibles à la fixation de l'Annexin-v. Dans un deuxième temps, la technique ELISA Cell Death a été réalisée pour quantifier les nucléosomes solubles qui résultent de la dégradation de l'ADN après apoptose. Enfin la technique TUNEL a permis de quantifier les fragments d'ADN qui résultent de l'apoptose à l'aide des dUTP fluorescents ajoutés par la désoxynucléotide Terminale Transférase (TdT).

Les résultats des trois techniques sont concordants pour les cellules endothéliales (Hbmec) et les neurones (SH SY5Y) mais pas pour les cellules microgliales (CMH5).

- ✓ Dans les cellules endothéliales, la souche PRU induit un taux d'apoptose élevé par rapport à la souche RH.
- ✓ L'apoptose induite dans les cellules endothéliales infectées par la souche PRU est confirmée par la forte production de caspase 8 et de caspase 3.
- ✓ Pour les neurones, la souche RH induit un taux d'apoptose élevé par rapport à la souche PRU. Cette dernière induit une diminution de l'apoptose par rapport au contrôle. Ce qui suggère que la souche PRU pourrait avoir un effet anti-apoptotique sur les neurones.
- ✓ L'apoptose induite dans les neurones infectés par la souche RH est confirmée par la forte production de caspase 8 et de caspase 3. La diminution de l'apoptose dans les neurones infectés par la souche PRU n'induit aucun effet significatif sur la quantification des caspases par rapport aux contrôles. Par contre, la technique de Western Blot montre que l'expression de la caspase 8 est diminuée à 24 h post

infection et qu'elle est inhibée à 48 h post infection. Cette technique montre également que l'expression de la procaspase 3 est augmentée à 48 h post infection.

- ✓ En ce qui concerne les cellules microgliales, les résultats de la cytométrie en flux montrent que la souche RH n'a pas d'effet pro-apoptotique significatif sur ces cellules, contrairement à la souche PRU qui induit un faible taux d'apoptose. En revanche, les résultats des deux techniques ELISA Cell Death et TUNEL montrent que c'est la souche PRU qui induit un taux d'apoptose élevé par rapport à la souche RH. La discordance de ces résultats pourrait être expliquée par le fait que la technique de cytométrie en flux explore la première phase de l'apoptose (apoptose précoce) au cours de laquelle l'activité de la flippase membranaire s'effondre ; la méthode ELISA Cell Death quantifie les fragments d'ADN qui résultent de l'étape finale de l'apoptose. Ceci traduit le fait que la souche PRU stimule les voies apoptotiques plus tardivement que la souche RH lors de l'infection des cellules microgliales. Ces résultats ont été confirmés par l'expression et la quantification de la procaspase 3, de la caspase 3 active et de la caspase 8 active.
- ✓ Dans les cellules microgliales, aucune des cellules testées n'induit une expression significative des trois caspases quantifiées. Ceci suggère que l'apoptose induite dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU n'est pas caspase dépendante.

Plusieurs études antérieures ont montré que l'infection par *T. gondii* module le programme apoptotique de la cellule hôte grâce à l'interaction avec des stimuli pro et anti-apoptotiques (Debierre-Grockiego et al., 2007b). Les mécanismes par lesquels *T. gondii* interfère avec les différentes voies d'apoptose sont mal élucidés. Ce parasite a la capacité d'activer et d'inhiber l'apoptose dans la cellule hôte (Hisaeda et al., 1997) (Nash et al., 1998). Des équipes de recherche ont mis en évidence que les voies apoptotiques activées diffèrent selon le stade de l'infection et le profil de virulence de la souche (Hisaeda et al., 1997).

Les études des mécanismes apoptotiques des cellules cérébrales infectées par *T. gondii* sont rares sur des cellules humaines et peu concluantes dans le modèle murin. Chez la souris, l'infection par la souche RH induit une expression de la protéine pro-apoptotique Bax, mais ceci n'est pas associé à une activation significative de l'apoptose (el-Sagaff et al., 2005). Cependant, notre étude est la première qui met en lumière des résultats sur l'activation de l'apoptose dans des cellules nerveuses humaines microgliales, endothéliales et

neuronales infectées par deux souches « RH et PRU » de *T. gondii*. L'induction de l'apoptose par la souche PRU dans les cellules endothéliales et les cellules microgliales pourrait confirmer l'étude d'Angeloni et al. (2009) dans laquelle ils montrent que les cellules humaines BeWo (cellule du placenta) et Hela (lignée cellulaire immortalisée d'origine de cellules cancéreuse de métastase d'un cancer de col de l'utérus) infectées par la souche avirulente ME49 (type II) induit un taux d'apoptose plus élevé par rapport à la souche RH (Angeloni et al., 2009).

Dans un modèle murin de toxoplasmose congénitale due à la souche ME49, une apoptose des neurones a été décrite entre 10 et 14 jours après la gestation, mais ceci n'est pas associée à l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Takahashi et al., 2001). De même, Shen et al. (2001) ont montré que la souche ME49 induit l'apoptose dans des cellules cérébrales de souris, mais le type de cellules touchées n'a pas été déterminé et aucun changement significatif dans le taux de l'expression des deux protéines Bcl2 ou Bax n'a été observé (Shen et al., 2001). Ceci suggère que l'apoptose activée dans les cellules cérébrales murines n'induit pas l'activation de la voie d'apoptose mitochondriale. Nos résultats indiquent que la souche PRU induit une expression significative des caspases 8 et 3 dans les cellules endothéliales, suggérant ainsi que la voie apoptotique responsable pourrait être liée aux récepteurs de mort. En revanche, l'apoptose activée dans les cellules microgliales n'induit pas d'expression significative de chacune des deux caspases. Ceci indique que la voie apoptotique mise en jeu n'est pas caspase dépendante mais peut être activée soit via la sécrétion de la protéine AIF soit via la production de la protéine Endo G. Il a été décrit que la protéine AIF intervient dans le processus apoptotique lors de l'infection toxoplasmique des macrophages humains TH1 par la souche RH (Hwang et al., 2010).

L'apoptose induite dans les neurones par la souche RH est caspase dépendante. Elle induit clairement une activation des caspases 8 et 3. Il a été décrit que les niveaux élevés d'apoptose observés après une infection des cellules NK, T CD4⁺ et T CD8⁺ avec la souche RH ne semblent pas être directement liés à l'apoptose induite par le parasite, mais peuvent au contraire être activés par des niveaux élevés de médiateurs pro-inflammatoires induits par cette souche (Gavrilescu and Denkers, 2003). La souche PRU induit une diminution du mécanisme apoptotique dans les neurones via l'inhibition d'activation des caspases 8 et 3. Ce résultat pourrait être comparé à l'étude d'Hippe et al. (2008) qui montra que l'infection par la souche NTE (type II) réduit significativement le taux d'apoptose dans les cellules HeLa en inhibant l'activation des caspases initiateuses 8 et 9 et des caspases effectrices 3/7 (Hippe et

al., 2008). La relation entre la production des médiateurs immuns, la prolifération parasitaire et le processus apoptotique dans les cellules nerveuses humaines infectées par les deux souches de *T. gondii* est présentée dans la discussion générale des deux chapitres de la thèse.

VII. Discussion générale, conclusions & perspectives

VII.1 Discussion générale & conclusions

Cette étude a été réalisée dans le but de comprendre les mécanismes immunitaires mis en jeu durant une infection des cellules nerveuses humaines par deux types de souches de *T. gondii*. Pour mettre en évidence ces mécanismes, nous avons divisé notre travail en deux parties. La première avait pour objectif principal, l'étude de la cinétique précoce des médiateurs immuns exprimés dans trois types de cellules nerveuses humaines infectées par deux types de souche de *T. gondii* (type I et II) durant 8 h, 14 h, 24 h et 48 h. Pour comprendre l'effet de l'expression de ces médiateurs immuns sur la multiplication parasitaire dans ces cellules infectées, une cinétique de la charge parasitaire a été réalisée en parallèle du dosage des médiateurs immuns. N'ayant pu détecter l'expression de l'IFN- γ , nous avons essayé de déterminer l'effet de cette cytokine sur la production des médiateurs immuns et sur le devenir des tachyzoïtes dans les cellules nerveuses humaines stimulées par l'IFN- γ . Dans la deuxième partie, nous avons voulu mettre en évidence l'effet des deux types de souches de *T. gondii* sur les mécanismes apoptotiques activés dans les cellules nerveuses humaines infectées pendant 24 h et 48 h.

A l'heure actuelle, les réactions immunitaires cérébrales mises en jeu au cours d'une infection toxoplasmique sont bien décrites dans le modèle murin, mais mal élucidées chez l'homme. Comprendre comment le toxoplasme arrive à persister dans le cerveau humain est un aspect sous étudié dans la toxoplasmose.

L'étude que nous avons réalisée nous a permis d'effectuer un large screening de 36 cytokines, chémokines et autres facteurs immunitaires. Ces médiateurs ont été produits par trois types de cellules présentes dans le système nerveux central, des cellules endothéliales (Schweitzer et al., 1995) (Schweitzer et al., 1997) (Liu et al., 1997), microgliales (Janabi et al., 1995) et neuronales (Ross et al., 1983). Ces cellules ont été infectées par deux types de souches de *T. gondii*, RH (type I, virulente chez la souris) et PRU (type II, avirulente chez la souris) (Herrmann et al., 2012). Cependant, seules les protéines immunitaires dont l'expression était statistiquement significatives ($p < 0,05$) ont été choisies dans la présentation des résultats.

L'infection des trois lignées de cellules nerveuses humaines endothéliales, microgliales et neurones a montré que les cellules endothéliales sont moins réactives face à l'infection toxoplasmique par rapport aux cellules microgliales et aux neurones. Nos résultats

montrent que les cellules endothéliales infectées par les tachyzoïtes de la souche RH (type I) développent une réaction immunitaire à 8 h post infection. Cette réaction se traduit par une production significative d'IL-6, IL-8, MCP-1, MIF, GRO α , Rantes ; entre 14 h et 24 h post infection cette réaction immunitaire diminue et la charge parasitaire augmente. Les cellules endothéliales réagissent de la même façon contre la souche PRU, mais la réaction immunitaire diminue moins entre 14 h et 48 h. De plus, on note une augmentation de l'expression des facteurs de croissance immunitaires (G-CSF et GM-CSF) et de la Serpin E1. En présence de ces médiateurs immuns, la multiplication de la souche PRU semble être contrôlée par rapport à la souche RH, suggérant un rôle possible de G-CSF, GM-CSF et de la Serpin E1 dans le contrôle de la souche PRU.

Les cellules microgliales et les neurones réagissent mieux contre la souche RH. Cette réaction se traduit par une production variable mais croissante des médiateurs immunitaires entre 8 h et 24 h post infection. Les principaux médiateurs immuns produits sont l'IL-6, IL-8, MCP-1, GRO α , G-CSF et la Serpin E1. Les cellules microgliales expriment en plus, la chémokine MIF. Cette activation de la réaction immunitaire est associée à une diminution de la prolifération de la souche RH jusqu'à 24 h post infection. Dans l'infection par la souche PRU, les deux types cellulaires microgliales et neuronales activent une réaction immunitaire entre 8 h et 24 h post infection. On retrouve les mêmes interleukines et chémokines exprimées. Mais cette souche stimule plus les cellules à produire les facteurs de croissance immunitaires (G-CSF et GM-CSF). Le niveau de l'expression de la Serpin E1 ne change pas entre les deux souches. On note une diminution de la prolifération de PRU jusqu'à 24 h post infection dans les cellules microgliales mais dans les neurones la diminution continue jusqu'à 48 h post infection.

Au cours des infections expérimentales *in vivo*, *Toxoplasma* traverse les barrières épithéliales afin d'aller infecter d'autres tissus tels que le cerveau, le placenta et la rétine. Les tachyzoïtes de souches de type I (virulentes) se caractérisent par une capacité de migration supérieure à celle des tachyzoïtes de souches avirulentes de type II et de type III (Barragan and Hitziger, 2008). Cette différence de capacité de migration dépend des profils de virulence de chaque souche. Ceci confirme la capacité de migration et de multiplication de la souche RH dans les cellules endothéliales par rapport à la souche PRU. Les cellules endothéliales produisent les médiateurs immuns à 8 h post infection afin de contrôler la prolifération parasitaire. L'IL-6 fait partie des médiateurs pro-inflammatoires qui induisent l'altération de

la fonction de la barrière hématoencéphalique, favorisant ainsi la migration des cellules immunitaires infectées via les intégrines (de Vries et al., 1996) (Clahsen and Schaper, 2008). L'IL-6 pourrait être impliquée dans une grande partie du contrôle de la prolifération parasitaire ; ceci a été confirmé dans des souris déficientes en gp130, récepteur de transduction du signal de la famille de l'IL-6. Ces souris ont perdu le contrôle de la multiplication parasitaire et présentent des foyers de nécrose cérébrale (Handel et al., 2012).

Nous avons aussi démontré une production locale d'IL-8 dans ces cellules. Il a été rapporté chez les patients atteints de rétinohoroïdite que cette interleukine a un rôle crucial dans le recrutement des neutrophiles dans le cerveau. L'IL-8 joue un rôle dans les mécanismes inflammatoires de la chorioretinite toxoplasmique aiguë (Goncalves et al., 2007). Les cellules endothéliales produisent aussi MCP-1. Le rôle de cette chémokine a été décrit essentiellement dans les cellules de glioblastome et les astrocytes humains durant une infection toxoplasmique. Cette chémokine est impliquée dans le contrôle de l'invasion et la multiplication parasitaire dans ces cellules (Brenier-Pinchart et al., 2004). En effet, l'invasion des cellules infectées pourrait être renforcée par la production de GRO α . Cette chémokine favorise l'infiltration des neutrophiles dans le cerveau et la rétine des souris infectées par le toxoplasme (Kikumura et al., 2012) (Denney et al., 1999). Lors d'une infection systémique par *T. gondii*, les productions d'IFN- γ et du TNF- α sont médiées par la chémokine MIF. Les souris déficientes en MIF sont plus sensibles à la présentation de l'infection et à l'augmentation de la charge parasitaire (Flores et al., 2008) ; (Cavalcanti et al., 2011). Chez la souris, la chémokine Rantes a un rôle dans la migration des macrophages aux sites de l'infection (Ibrahim et al., 2014). Chez une souris infectée et déficiente en MyD88, l'expression de plusieurs chémokines, dont Rantes, est diminuée. La diminution de l'expression de Rantes provoque une diminution de l'infiltration des cellules T et des cellules dendritiques dans le cerveau (Torres et al., 2013). Cependant, l'augmentation de la réaction pro-inflammatoire à 8 h va altérer la fonction des cellules endothéliales, ce qui va favoriser l'infiltration des tachyzoïtes via ces cellules. La forte multiplication des tachyzoïtes entre 14 h et 48 h a fait diminuer la réponse des cellules hôtes. Contrairement aux tachyzoïtes de la souche PRU qui apparaissent plus ou moins contrôlés dans les cellules endothéliales, malgré la diminution de la production des médiateurs immuns après 14 h post infection. Dans cette période d'infection, on note une production de la Serpin E1 et de la GM-CSF. La Serpin E1 est une protéine qui appartient à la famille des Serpin's, protéines favorisant la prolifération cellulaire. La Serpin E1 est aussi un inhibiteur de la voie uPA/uPAR qui permet l'activation

des métalloprotéinases-9 (MMP-9) nécessaires à l'invasion du parasite. Ceci pourrait éventuellement diminuer l'invasion des tachyzoïtes dans les cellules hôtes. La production de GM-CSF, un facteur de croissance des macrophages et des cellules microgliales, pourrait aussi renforcer le mécanisme de la prolifération cellulaire. GM-CSF est une protéine pro-inflammatoire puissante ; elle joue un rôle pathogène dans différentes maladies inflammatoires du système nerveux central, essentiellement au cours de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Ponomarev et al., 2007). Cette protéine pourrait être impliquée dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative destinée au contrôle de la multiplication parasitaire (Fischer et al., 1993), mais responsable d'une réaction inflammatoire locale qui peut être délétère (El-Behi et al., 2011).

Les cellules microgliales et les neurones semblent être les cellules les plus appropriées pour contrôler la multiplication parasitaire de la souche RH. Ces deux types cellulaires augmentent la production des médiateurs immunitaires de 8 h jusqu'à 24 h. Pendant cette période, la multiplication parasitaire diminue fortement et atteint son minimum à 24 h post infection. Dans la plupart des cellules infectées, les résultats montrent une diminution de la production des médiateurs immuns et une augmentation de la charge parasitaire à 48 h post infection. A ce stade de l'infection, la majorité de l'expression des protéines immunitaires n'est pas significative, ceci pourrait être dû à l'état des cellules. Elles peuvent être lysées après une multiplication parasitaire importante ou bien le milieu de culture est devenu trop toxique.

Dans les cellules microgliales et les neurones infectés par la souche PRU, on note la même cinétique des médiateurs immuns et de la prolifération parasitaire. En outre, cette souche stimule ces cellules à produire les facteurs de croissances (G-CSF et GM-CSF). La souche PRU semble avoir un effet plus inflammatoire que la souche RH. La charge parasitaire dans les cellules microgliales augmente à 48 h en raison de la diminution de la réaction immunitaire. En revanche les neurones semblent bien contrôler la multiplication de la souche PRU. Le rôle immunitaire de la microglie semble être logique car ces cellules sont l'équivalent des macrophages pour le système nerveux central. Il a été rapporté dans le modèle murin que ces cellules inhibent la multiplication parasitaire via des mécanismes dépendant ou non de l'oxyde nitrique (NO) (Freund et al., 2001) (Luder et al., 1999) (Chao et al., 1993a). Les cellules microgliales peuvent également s'activer suite à une infection neuronale ou des dommages neuronaux qui résultent généralement de la production des

cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance des cellules immunitaires, des facteurs du complément et du NO (Jung et al., 2012). Les neurones sont les cellules qui hébergent le plus les kystes de *T. gondii* dans le système nerveux central (Ferguson and Hutchison, 1987). Les neurones peuvent contribuer à la réaction immunitaire de *T. gondii* en sécrétant des médiateurs solubles, telles que IL-1, IL-6, IL-10, MIP-1 α , MIP-1 β (Schluter et al., 2001). Il a été décrit que ces cellules ont la capacité d'exprimer le récepteur TLR11 qui initie la réaction immunitaire adaptative ; ceci indique que ces cellules ont la capacité de réagir contre le toxoplasme (Atmaca et al., 2014).

L'IFN- γ est la cytokine majeure de la résistance à l'infection toxoplasmique dans le modèle murin (Suzuki et al., 1988). *In vivo*, cette cytokine est produite par les cellules T et les cellules NK pendant la réaction immunitaire adaptative activée contre l'infection toxoplasmique (Johnson et al., 1993) (Suzuki et al., 1988) (Ge et al., 2014). Dans le système nerveux central murin, l'IFN- γ active les macrophages et les cellules microgliales pour contrôler la multiplication des tachyzoïtes (Suzuki et al., 2005). En outre, il a été démontré que cette cytokine est impliquée dans la formation des kystes de *Toxoplasma* dans les astrocytes et les neurones murins (Fischer et al., 1997a).

La stimulation des trois cellules nerveuses de notre travail par l'IFN- γ induit une diminution de MCP-1, de la Serpin E1 et des facteurs de croissance dans toutes les cellules. Ceci pourrait se traduire *in vivo* par une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires. La diminution de la Serpin E1 pourrait d'une part, diminuer la régulation de la prolifération cellulaire et d'autre part, activer l'expression des MMP-9 et donc faciliter l'invasion des tachyzoïtes. Par ailleurs, l'IFN- γ augmente l'expression de sICAM dans les cellules endothéliales et les neurones. Il induit aussi l'expression de C5 /C5a dans les neurones infectés par la souche RH. Cet effet va diminuer *in vivo* l'invasion des cellules infectées via les cellules endothéliales et augmenter l'infiltration des cellules immunitaires dans les neurones infectés par la souche RH. La quantification de la charge parasitaire dans les cellules stimulées a montré que la présence de l'IFN- γ induit une diminution de la prolifération parasitaire seulement dans les cellules microgliales et les cellules endothéliales ; ceci a déjà été décrit dans le modèle murin (Dimier et al., 1992) (Suzuki et al., 2005). En revanche, cette cytokine ne semble pas être impliquée dans le contrôle de la prolifération parasitaire dans les neurones infectés par la souche RH et dans les trois types de cellules infectées par la souche PRU ; ceci pourrait donc nécessiter l'interaction d'autres protéines immunitaires comme le

TNF α . Il a été démontré que le traitement des souris par l'IFN- γ et le TNF α séparément n'induit pas un contrôle de la prolifération parasitaire de la souche PLK (type II). En revanche, le traitement des souris avec les deux cytokines en même temps permet de contrôler la prolifération parasitaire (Freund et al., 2001).

Toxoplasma gondii est capable d'emprunter différentes voies afin de persister dans la cellule hôte. Le mécanisme apoptotique, est la voie la plus proche de la réaction immunitaire que *T. gondii* peut moduler. En effet, ce parasite favorise l'apoptose des cellules hôtes pendant la phase aiguë de l'infection afin d'éliminer les cellules immunitaires et ainsi disséminer dans d'autres tissus. Mais il inhibe aussi ce mécanisme pendant la phase chronique de l'infection afin de se multiplier et de persister essentiellement dans les cellules du système nerveux central (Nash et al., 1998) (Payne et al., 2003) (Begum-Haque et al., 2009).

Dans cette partie d'analyse de la réponse inflammatoire, nous avons mis en évidence dans toutes les cellules humaines infectées une production significative de la Serpin E1. Des travaux avaient déjà mis en évidence la synthèse des protéines de la famille des Serpin's (Serpin B3 et B4) impliquées dans les processus d'apoptose. La nature et le rôle de la Serpin E1 sont moins bien définis dans le processus apoptotique. C'est pour cette raison que nous avons commencé à nous intéresser aux voies de signalisation apoptotiques impliquées dans l'infection parasitaire à *T. gondii*.

Pour cela, nous avons repris notre modèle *in vitro* des trois types de cellules nerveuses humaines (endothéliales, microgliales et neurones) infectés par les souches RH et PRU de *T. gondii* pendant 24 h et 48 h. Afin de déterminer le taux d'apoptose des cellules, on a choisi dans un premier temps la technique de la cytométrie en flux par un double marquage Annexin-v et IP. Les résultats de la cytométrie en flux montrent que la souche PRU induit un taux d'apoptose élevé dans les cellules endothéliales, tandis que la souche RH n'a pas d'effet significatif sur ce processus (Tableau 5). Dans les cellules microgliales, les résultats montrent que chacune des souches n'induit pas un effet pro-apoptotique significatif. Dans les neurones, c'est la souche RH qui induit un taux d'apoptose élevé, alors que la souche PRU induit une diminution du taux d'apoptose par rapport à la souche RH et aux contrôles (Tableau 5). Ces résultats ont été confirmés par deux autres techniques : l'ELISA Cell Death qui permet de quantifier les nucléosomes solubles résultant de la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose, et le TUNEL qui permet de quantifier les cellules ayant l'ADN fragmenté. Ces deux

techniques ont bien confirmé les résultats de la technique de la cytométrie en flux pour les cellules endothéliales et les neurones. En revanche, pour les cellules microgliales les techniques d'ELISA Cell Death et de Tunel montrent que la souche PRU induit un taux élevé d'apoptose et la souche RH n'a pas d'effet sur ce processus (Tableau 5). Ce résultat n'est pas concordant avec celui de la cytométrie en flux. En effet, dans les cellules microgliales infectées par la souche RH, on note qu'à 24 h post infection le nuage des cellules tend vers Annexin-v positif IP négatif puis à 48 h post infection, on distingue une apparition d'un nuage en Annexin-v positif et IP positif. Les techniques de quantification des fragments d'ADN dégradés n'ayant pas montré une quantification significative de nucléosomes solubles ou d'ADN dégradé dans l'infection par RH, ceci suggère que les cellules microgliales infectées par la souche RH pourraient être mortes par un phénomène de nécrose à 48 h post infection. Ce phénomène a été démontré dans des macrophages murins infectés par la souche RH. En effet, sous l'effet du NO, la sortie des tachyzoïtes induit la mort des macrophages par nécrose (Ji et al., 2013). Dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU, la cytométrie en flux n'a pas montré un effet pro-apoptotique mais les deux techniques utilisées ont montré un taux d'apoptose significatif. Ceci suggère que l'apoptose induite dans les cellules microgliales par la souche PRU atteint sa phase finale. Les résultats sur les cellules endothéliales et les neurones ont été concordants avec les résultats de la cytométrie en flux (Tableau 5).

Tableau 5 : Effets sur l'apoptose de l'infection de trois types de cellules du système nerveux central par les souches RH et PRU.

| Cellules / souches | RH | PRU |
|--------------------|-----|-----|
| CMH5 | - | ↗↗↗ |
| Hbmec | ↗ | ↗↗↗ |
| SH SY5Y | ↗↗↗ | ↗↗ |

Afin d'identifier les voies principales responsables de l'activation de l'apoptose dans les cellules nerveuses humaines infectées par les souches RH ou PRU, nous avons déterminé l'expression et la quantification des caspases 8 et 3 par les techniques de Western blot et d'ELISA. L'expression de la caspase 8 semble être inhibée dans les cellules microgliales infectées par la souche RH par rapport aux cellules contrôles. Pour la souche PRU, le niveau de l'expression de la caspase 8 ne change pas par rapport aux cellules contrôles. En revanche,

la caspase 3 n'est pas du tout exprimée dans ces cellules. Ceci indique que la voie de l'apoptose activée dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU n'est pas dépendante des caspases. Ceci pourrait être possible car des études ont déjà décrit que *T. gondii* induit l'apoptose via la voie du RE dans des cellules nerveuses infectées par la souche RH (Wang et al., 2014a). Egalement, dans une lignée de macrophages humains (TH1), la souche RH a induit l'expression de AIF (apoptosis inducing factor), qui est une protéine responsable de la dégradation de l'ADN et de la condensation de la chromatine sans l'indépendance des caspases (Hwang et al., 2010). Ceci pourrait expliquer le taux élevé des nucléosomes solubles et des fragments d'ADN dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU.

Dans les cellules endothéliales, l'infection par les deux souches induit une expression des caspases 8 et 3. L'expression des deux caspases est trop forte dans l'infection par la souche PRU. Nos résultats montrent que la souche PRU induit un taux élevé d'apoptose dans les cellules endothéliales et microgliales mais cette dernière semble être activée par des voies différentes. Dans les cellules microgliales, la voie de l'apoptose activée est indépendante des caspases. Dans les cellules endothéliales la voie activée est dépendante des caspases ; la forte expression de la caspase 8 pourrait suggérer l'implication de la voie des récepteurs de mort. L'induction de l'apoptose par la souche PRU dans les cellules endothéliales et les cellules microgliales pourrait être confirmée par l'étude d'Angeloni et al. (2009) dans laquelle ils montrent que dans les cellules humaines BeWo (cellule de placenta) et HeLa que la souche avirulente ME49 (type II) induit un taux d'apoptose plus élevé par rapport à la souche RH (Angeloni et al., 2009).

Dans les neurones, les deux caspases 8 et 3 sont significativement exprimées dans l'infection par la souche RH. Cette expression diminue significativement dans l'infection par la souche PRU. En effet, dans l'infection de la souche PRU l'augmentation de l'expression de la procaspase 3 confirme la diminution de l'expression de la caspase 3 activée. Ceci montre que la souche RH a un effet pro-apoptotique dans les neurones par rapport à la souche PRU. Ce résultat est en accord avec ceux de Hippe et al. (2008) montrant que l'infection par la souche NTE (type II) réduit significativement le taux d'apoptose dans les cellules HeLa en inhibant l'activation des caspases initiateuses 8 et 9 et des caspases effectrices 3/7 (Hippe et al., 2008).

La détection et la quantification de l'apoptose induite dans les cellules nerveuses humaines activées en réponse à l'infection par les deux souches de *T. gondii* sont des outils utiles pour la compréhension de l'homéostasie du système immunitaire au niveau cérébral.

Dans les cellules endothéliales, la réaction immunitaire est activée à 8 h post infection, puis diminue entre 14 h et 48 h post infection (Figure 32), alors que la multiplication de la souche RH augmente. Ce phénomène induit une mort cellulaire par apoptose qui se traduit par une activation des caspases 8 et 3 (Figure 32). Ces résultats peuvent être confirmés par les résultats de l'étude de Knight et al., montrant que les cellules endothéliales de la rétine induisent une forte production des chémokines et des cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1, GRO α et Rantes..) à 2 h post infection ; ce panel de médiateurs immuns a tendance à diminuer entre 16 h et 24 h post infection (Knight et al., 2005). Ceci pourrait suggérer l'effet des protéines de virulence de la souche RH sur la régulation de l'expression des médiateurs immuns et sur les gènes qui codent pour les protéines apoptotiques. La diminution de la charge parasitaire de la souche RH suite au traitement des cellules endothéliales par l'IFN- γ est confirmée par l'étude de Brunton et al. montrant que cette cytokine contrôle la multiplication de cette souche dans les cellules endothéliales de la rétine (Brunton et al., 2000).

Dans l'infection des cellules endothéliales par la souche PRU, la réaction immunitaire est forte à 8 h post infection, puis diminue entre 14 h et 24 h post infection. Contrairement à la souche RH, la souche PRU induit une forte expression des facteurs de croissance et de la Serpin E1 à 24 h, qui pourrait favoriser la prolifération cellulaire, mais entre 24 h et 48 h post infection, on note une production significative d'IL-8 (Figure 32). Cette chémokine pourrait donc être impliquée dans l'induction de l'apoptose et la régulation de l'expression des caspases 8 et 3. Nous n'avons pas connaissance d'étude montrant ce phénomène au cours de l'infection toxoplasmique, mais notre hypothèse pourrait être confortée par les résultats de l'étude de Gallelli et al. montrant que l'IL-8 favorise l'activation de l'apoptose des cellules endothéliales des poumons suite à une stimulation de ces cellules par le TNF α (Gallelli et al., 2010). Ceci montre l'implication de la voie des récepteurs de mort et confirme l'expression de la caspase 8 dans les cellules endothéliales infectées. Pour déterminer le rôle de la famille des Serpin's dans le processus apoptotique, on a réalisé une RT-PCR de Serpin E1, Serpin B3 et Serpin B4. Ces deux dernières protéines ont été décrites comme étant anti-apoptotiques dans des monocytes humains (TH1) infectés par des tachyzoïtes de la souche RH (Song et al., 2012). Les résultats de RT-PCR montrent une expression des trois Serpin dans les cellules endothéliales infectées par la souche RH, suggérant le rôle de ces protéines dans la diminution

de l'apoptose dans ces cellules. La RT-PCR dans les cellules infectées par la souche PRU reste à faire.

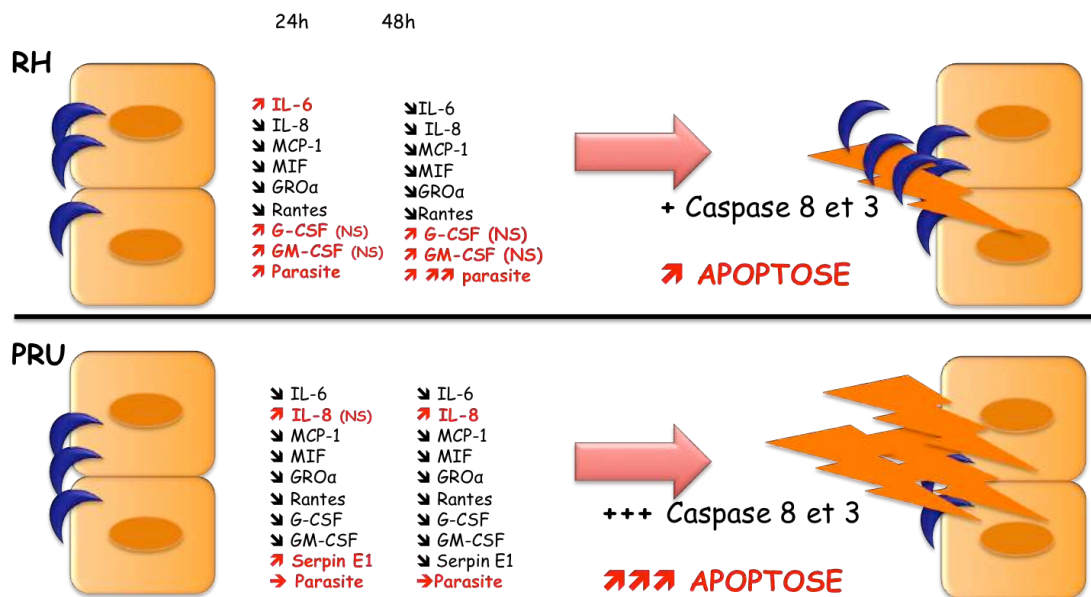


Figure 32 : Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les cellules endothéliales (HbmeC) infectées par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h.

Dans les cellules microgliales infectées par la souche RH, la réaction immunitaire pro-inflammatoire augmente jusqu'à 24 h post infection et diminue après (Figure 33). En effet, la seule chémokine qui est produite jusqu'à 48 h post infection est MIF (Figure 33). Cette chémokine joue un rôle essentiel dans le diagnostic des infections dépendantes d'une réponse immunitaire innée fonctionnelle essentielle pour une résistance totale à l'agent pathogène : *Leishmania major* (Satoskar et al., 2001), *Trypanosoma cruzi* (Reyes et al., 2006), *Crassiceps Taenia* (Rodriguez-Sosa et al., 2003) et *Schistosoma japonicum* (Stavitsky et al., 2003). Récemment, une étude a démontré que MIF pourrait être un bon marqueur de diagnostic des infections causées par *T. gondii*. Les souris déficientes en MIF sont sensibles à l'infection toxoplasmique. La sensibilité accrue à l'infection en l'absence de MIF a été associée à une mauvaise induction d'IL-12, du TNF- α et d'IL-1 β , ainsi qu'à une augmentation de la charge parasitaire dans le cerveau (Flores et al., 2008). Cependant le rôle de MIF durant l'infection des souris par *T. gondii* réside dans l'activité effectrice antimicrobienne précoce qui se manifeste soit par la médiation d'un recrutement rapide des cellules effectrices, favorisant ainsi la maturation des cellules dendritiques, soit via une fonction antimicrobienne directe (Terrazas et al., 2010). Dans les cellules microgliales infectées par la souche RH, les deux

caspases n'étaient pas exprimées et l'apoptose n'était pas activée (Figure 33) ; mais la cytométrie en flux montre un nuage de cellules qui pourrait être purement nécrosées. Cette nécrose pourrait être associée à la production de MIF. Il a été démontré que cette chémokine stimule les cellules microgliales afin de produire des médiateurs pro-inflammatoires durant la sclérose en plaque. La chémokine MIF augmente la neuro inflammation durant des encéphalomyélites auto-immunes (Cox et al., 2013). Cette réaction inflammatoire due à MIF pourrait donc induire la nécrose des cellules. Dans l'infection par la souche PRU, la réaction immunitaire est activée jusqu'à 24 h post infection et est accompagnée par une production des facteurs de croissance G-CSF et GM-CSF (Figure 33). Cette production a tendance à diminuer à 48 h post infection en raison de l'état des cellules. Malgré la production des facteurs de croissance G-CSF et GM-CSF (Giulian and Ingeman, 1988) , les cellules rentrent en apoptose. La RT-PCR des Serpin E1, B3 et B4 montre seulement une faible expression d'ARN codant pour la Serpin E1 dans les cellules microgliales infectées par la souche RH, suggérant le rôle de cette protéine dans le contrôle de l'activation de l'apoptose mais ceci reste à confirmer pour l'activation de la nécrose. L'absence d'expression des Serpin B3 et B4 pourrait être expliquée soit par le fait que ces protéines sont non impliquées dans le processus apoptotique des cellules microgliales ou que leurs expressions sont contrôlées durant cette infection.

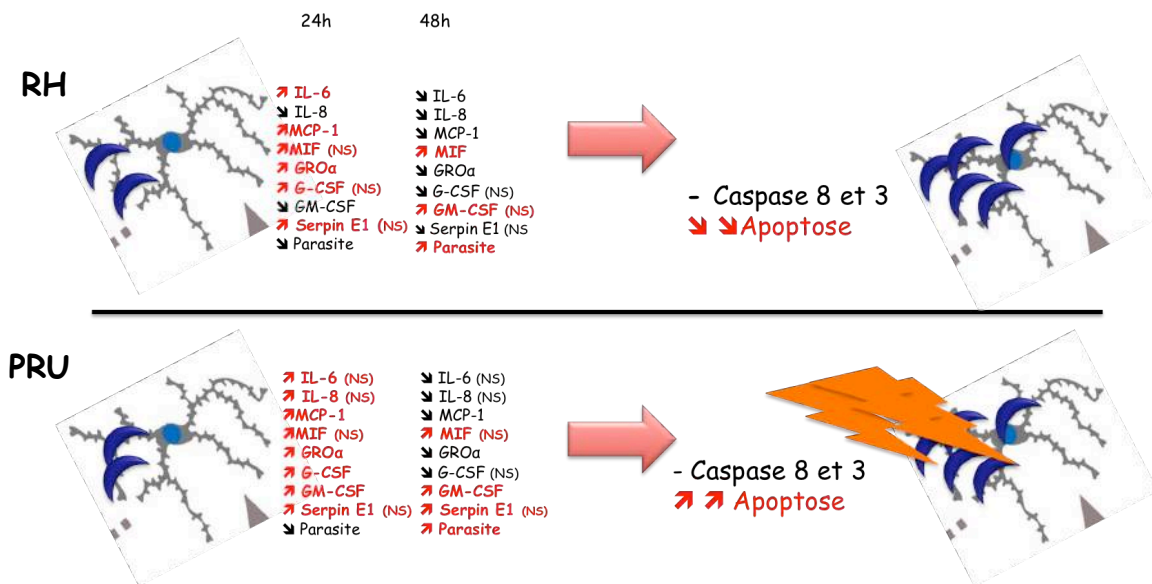


Figure 33: Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les cellules microgliales (CMH5) infectées par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h.

Dans les neurones, la souche RH induit une réaction immunitaire qui s'étend jusqu'à 24 h pour les interleukines et jusqu'à 48 h pour les chémokines (Figure 34). Dans ces cellules infectées, l'apoptose est fortement activée (Figure 34) ; elle se traduit par une production des caspases pendant les deux temps de l'infection. Deux protéines sont significativement produites durant 24 h et 48 h post infection ; elles pourraient donc avoir un rôle dans l'initiation de l'apoptose. Le rôle direct de la protéine GRO α (CXCL1) sur l'apoptose dans les neurones n'est pas décrit *in vitro* mais *in vivo*. Cette chémokine pourrait éventuellement activer l'infiltration des neutrophiles pendant une infection des souris par le cytomégalovirus qui active l'apoptose via l'expression de Trail (Stacey et al., 2014). La RT-PCR des Serpin E1, B3 et B4 montre seulement une expression de la Serpin E1. Dans ces neurones, l'apoptose est fortement activée ce qui suggère que la Serpin E1 n'a pas un rôle anti-apoptotique dans les neurones infectés par la souche RH.

Dans l'infection par la souche PRU, la réaction immunitaire s'étend à 24 h post infection (Figure 34) ; elle est caractérisée par une forte expression des facteurs de croissance et de la Serpin E1 (Figure 34). Ceci est accompagné par un contrôle de la prolifération des parasites et une inhibition de l'apoptose (Figure 34) suggérant le rôle anti-apoptotique de ces protéines dans les neurones infectés par la souche PRU. L'expression de la Serpin E1 et des Serpin B3 et B4 reste à être confirmée dans l'infection par la souche PRU.

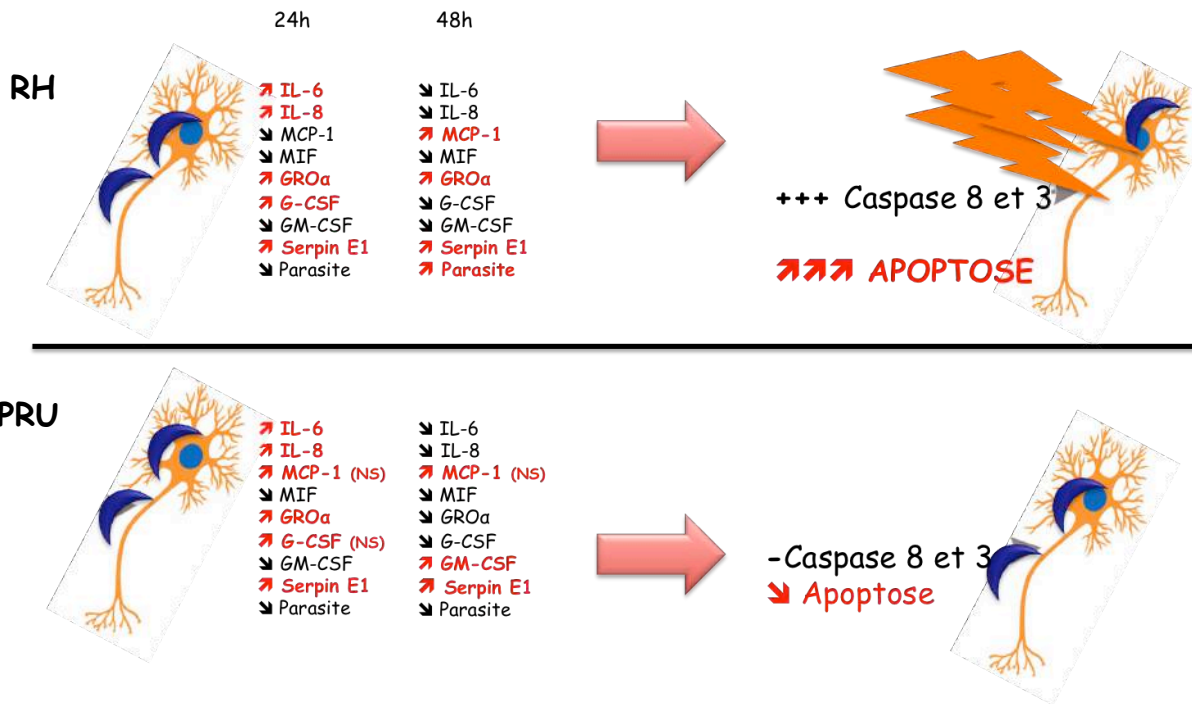


Figure 34 : Résultats des réactions immunitaires et apoptotiques dans les neurones (SH SY5Y) infectés par les souches RH et PRU à 24 h et à 48 h.

VII.2 Perspectives

Notre étude s'est basée sur les cellules endothéliales humaines, microgliales humaines et sur les neurones humains. Dans le système nerveux central, les astrocytes ont un rôle majeur dans le processus de défense cérébral ; il serait très intéressant de réaliser la même étude sur les astrocytes humains et de déterminer comment ces cellules réagissent contre l'infection par les deux souches RH et PRU.

En outre, notre étude est limitée par le fait que nos cellules étaient cultivées séparément dans des flasques de culture cellulaire. La co-culture des cellules nerveuses humaines serait intéressante pour déterminer l'effet de l'interaction des cellules contre l'infection toxoplasmique.

Dans ces travaux nous avons réalisé des infections par une souche de type I et une souche de type II qui diffèrent selon leurs profils de virulence. Afin de déterminer l'effet des souches de *T. gondii* il faudra réaliser d'autres études basées sur des infections des cellules nerveuses humaines par une souche de type III et des souches d'autres haplotypes.

Il est important de déterminer l'effet de chaque protéine immunitaire exprimée sur le devenir des cellules infectées et des parasites intracellulaires. Ce procédé pourra être réalisé en neutralisant ou en sur-exprimant chaque protéine dans des cultures cellulaires séparées. Un effet pro-inflammatoire d'une protéine immunitaire donnée pourrait être un projet de recherche intéressant afin de déterminer une cible thérapeutique limitant ainsi l'inflammation cérébrale locale. Ceci doit être confirmé par le dosage des protéines immunitaires à effet inflammatoire significatif dans le liquide CéphaloRachidien humain (LCR) des patients ayant la toxoplasmose cérébrale. Pour identifier l'effet de l'absence ou de la sur-expression de la protéine, il faut déterminer l'expression des protéines :

- Du système immunitaire
- Des voies de signalisation favorisant la prolifération cellulaire : NF-KB et MAPK.
- Des voies de signalisation favorisant la mort cellulaire.

En outre, il a été décrit que l'IL-17 a un rôle important dans l'inflammation toxoplasmique au cours d'une infection oculaire et cérébrale murine (Kuiper et al., 2013; Sauer et al., 2012; Stumhofer et al., 2006). Nos résultats n'ont pas montré une expression

d'IL-17 dans les cellules nerveuses humaines testées. Il est intéressant de stimuler ces cellules par cette cytokine et de déterminer son effet sur la production des protéines pro-inflammatoires, sur la prolifération parasitaire et sur les mécanismes de mort cellulaire.

Mécanismes apoptotiques :

Dans cette partie de nos travaux, nous avons choisi de déterminer et de quantifier l'expression des caspases 8 et 3. Il serait intéressant de déterminer l'expression d'autres protéines pro-apoptotiques afin de définir les voies de l'apoptose activées.

Pour la voie intrinsèque, il faudra réaliser des Western blots des protéines pro-apoptotiques responsables de la formation des pores membranaires (Bax et Bak) ou du Cytochrome c. Pour la voie extrinsèque, en plus de la caspase 8, il faut ajouter la protéine Bid déphosphorylée (forme active de la protéine).

Cependant, nos résultats montrent que dans les cellules microgliales infectées par la souche PRU l'apoptose activée n'est pas dépendante des caspases. Pour identifier la voie par laquelle l'apoptose est activée, il est important de déterminer l'expression des protéines ATF-4, CHOP ou Bim mis en jeu dans la voie apoptotique du RE. Pour identifier d'autres voies apoptotiques il faut déterminer l'expression de la protéine AIF ou EndoG. Dans les cellules microgliales infectées par la souche RH, le taux d'apoptose n'est pas significatif. En revanche, la cytométrie en flux montre que ces cellules sont nécrosées. Il serait important de vérifier l'expression des marqueurs de nécrose cellulaire. En outre, il a été décrit que *T. gondii* a la capacité d'induire la mort des cellules hôtes par un mécanisme d'autophagie (Ghosh et al., 2012). Ceci reste à définir pour les cellules nerveuses humaines infectées. L'effet anti-apoptotique de la souche PRU sur les neurones infectés doit être confirmé par un Western blot des protéines anti-apoptotiques, la protéine Bcl2 pour la voie intrinsèque et la protéine C-Flip pour la voie extrinsèque.

VIII. Bibliographie

Abdollahi, S.H., F. Ayoobi, H. Khorramdelazad, G. Hassanshahi, B.N. Ahmadabadi, M. Rezayati, A. Ravary, A. Shamsizadeh, and M.K. Arababadi. 2013. Interleukin-10 Serum levels after vaccination with *in vivo* prepared *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. Oman medical journal. 28:112-115.

Abgrall, S., C. Rabaud, and D. Costagliola. 2001. Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 33:1747-1755.

Abi Abdallah, D.S., C. Lin, C.J. Ball, M.R. King, G.E. Duhamel, and E.Y. Denkers. 2012. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. Infection and immunity. 80:768-777.

Afzali, B., G. Lombardi, R.I. Lechler, and G.M. Lord. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clinical and experimental immunology. 148:32-46.

Agholme, L., S. Nath, J. Domert, J. Marcusson, K. Kagedal, and M. Hallbeck. 2014. Proteasome inhibition induces stress kinase dependent transport deficits-implications for Alzheimer's disease. Molecular and cellular neurosciences. 58:29-39.

Agholme, L., T. Lindstrom, K. Kagedal, J. Marcusson, and M. Hallbeck. 2010. An *In vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 20:1069-1082.

Ahn, H.J., J.Y. Kim, K.J. Ryu, and H.W. Nam. 2009. STAT6 activation by *Toxoplasma gondii* infection induces the expression of Th2 C-C chemokine ligands and B clade serine protease inhibitors in macrophage. Parasitology research. 105:1445-1453.

Ajioka, J.W., J.C. Boothroyd, B.P. Brunk, A. Hehl, L. Hillier, I.D. Manger, M. Marra, G.C. Overton, D.S. Roos, K.L. Wan, R. Waterston, and L.D. Sibley. 1998. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome research*. 8:18-28.

Ajzenberg, D. 2010. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future microbiology*. 5:841-843.

Ajzenberg, D., A.L. Banuls, C. Su, A. Dumetre, M. Demar, B. Carme, and M.L. Darde. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 34:1185-1196.

Ajzenberg, D., A.L. Banuls, M. Tibayrenc, and M.L. Darde. 2002a. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International journal for parasitology*. 32:27-38.

Ajzenberg, D., F. Collinet, A. Mercier, P. Vignoles, and M.L. Darde. 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 48:4641-4645.

Ajzenberg, D., H. Yera, P. Marty, L. Paris, F. Dalle, J. Menotti, D. Aubert, J. Franck, M.H. Bessieres, D. Quinio, H. Pelloux, L. Delhaes, N. Desbois, P. Thulliez, F. Robert-Gangneux, C. Kauffmann-Lacroix, S. Pujol, M. Rabodonirina, M.E. Bougnoux, B. Cuisenier, C. Duhamel, T.H. Duong, D. Filisetti, P. Flori, F. Gay-Andrieu, F. Pratlong, G. Nevez, A. Totet, B. Carme, H. Bonnabau, M.L. Darde, and I. Villena. 2009. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases*. 199:1155-1167.

Ajzenberg, D., N. Cogne, L. Paris, M.H. Bessieres, P. Thulliez, D. Filisetti, H. Pelloux, P. Marty, and M.L. Darde. 2002b. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases*. 186:684-689.

Albina, J.E., J.A. Abate, and W.L. Henry, Jr. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *Journal of immunology*. 147:144-148.

Aldebert, D., F. Durand, C. Mercier, M.P. Brenier-Pinchart, M.F. Cesbron-Delauw, and H. Pelloux. 2007. *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. *Cytokine*. 37:206-211.

Alexander, J., T.M. Scharton-Kersten, G. Yap, C.W. Roberts, F.Y. Liew, and A. Sher. 1997. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 352:1355-1359.

Alexander, J., T.M. Scharton-Kersten, G. Yap, C.W. Roberts, F.Y. Liew, and A. Sher. 1997. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 352:1355-1359.

Aliberti, J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature reviews. Immunology*. 5:162-170.

Aliberti, J., C. Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G.B. Huffnagle, and A. Sher. 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature immunology*. 1:83-87.

Aliberti, J., C. Serhan, and A. Sher. 2002b. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of experimental medicine*. 196:1253-1262.

Aliberti, J., D. Jankovic, and A. Sher. 2004. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunological reviews*. 201:26-34.

Aliberti, J., D. Jankovic, and A. Sher. 2004. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunological reviews*. 201:26-34.

Aliberti, J., J.G. Valenzuela, V.B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, C. Reis e Sousa, A. Fairlamb, J.M. Ribeiro, and A. Sher. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nature immunology*. 4:485-490.

Aliberti, J., S. Hieny, C. Reis e Sousa, C.N. Serhan, and A. Sher. 2002a. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nature immunology*. 3:76-82.

Andrade, W.A., C. Souza Mdo, E. Ramos-Martinez, K. Nagpal, M.S. Dutra, M.B. Melo, D.C. Bartholomeu, S. Ghosh, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2013. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell host & microbe*. 13:42-53.

Angeloni, M.B., N.M. Silva, A.S. Castro, A.O. Gomes, D.A. Silva, J.R. Mineo, and E.A. Ferro. 2009. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta*. 30:785-791.

Angeloni, M.B., P.M. Guirelli, P.S. Franco, B.F. Barbosa, A.O. Gomes, A.S. Castro, N.M. Silva, O.A. Martins-Filho, T.W. Mineo, D.A. Silva, J.R. Mineo, and E.A. Ferro. 2013. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. *Placenta*. 34:973-982.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, and J.C. Martinou. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry*. 276:11615-11623.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, and J.C. Martinou. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry*. 276:11615-11623.

Arnold, S.J., M.C. Kinney, M.S. McCormick, S. Dummer, and M.A. Scott. 1997. Disseminated toxoplasmosis. Unusual presentations in the immunocompromised host. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 121:869-873.

- Atmaca, H.T., O. Kul, E. Karakus, O.S. Terzi, S. Canpolat, and T. Antepioglu. 2014. Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience*. 269:184-191
- Aviles, H., J. Stiles, P. O'Donnell, J. Orshal, J. Leid, G. Sonnenfeld, and F. Monroy. 2008. Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine *Toxoplasma* infection. *The Journal of parasitology*. 94:1282-1288.
- Ayala, J.M., T.T. Yamin, L.A. Egger, J. Chin, M.J. Kostura, and D.K. Miller. 1994. IL-1 beta-converting enzyme is present in monocytic cells as an inactive 45-kDa precursor. *Journal of immunology*. 153:2592-2599.
- Balachandran, S., P.C. Roberts, T. Kipperman, K.N. Bhalla, R.W. Compans, D.R. Archer, and G.N. Barber. 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *Journal of virology*. 74:1513-1523.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 18:767-811.
- Barkett, M., D. Xue, H.R. Horvitz, and T.D. Gilmore. 1997. Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 *In vitro*. *The Journal of biological chemistry*. 272:29419-29422.
- Barragan, A., and L.D. Sibley. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *The Journal of experimental medicine*. 195:1625-1633.
- Barragan, A., and N. Hitziger. 2008. Transepithelial migration by *Toxoplasma*. *Sub-cellular biochemistry*. 47:198-207.

Barragan, A., F. Brossier, and L.D. Sibley. 2005. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cellular microbiology*. 7:561-568.

Bashyam, H. 2007. Interleukin-12: A master regulator. *The Journal of experimental medicine*.

Begum-Haque, S., A. Haque, and L.H. Kasper. 2009. Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN γ in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential. *Microbial pathogenesis*. 47:281-288.

Begum-Haque, S., A. Haque, and L.H. Kasper. 2009. Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN γ in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential. *Microbial pathogenesis*. 47:281-288.

Benevides, L., C.M. Milanezi, L.M. Yamauchi, C.F. Benjamim, J.S. Silva, and N.M. Silva. 2008. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *The American journal of pathology*. 173:741-751.

Benn, T., C. Halfpenny, and N. Scolding. 2001. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. *Glia*. 36:200-211.

Besteiro, S., J.F. Dubremetz, and M. Lebrun. 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular microbiology*. 13:797-805.

Bhadra, R., D.A. Cobb, and I.A. Khan. 2013. Donor CD8 $^{+}$ T cells prevent *Toxoplasma gondii* de-encystation but fail to rescue the exhausted endogenous CD8 $^{+}$ T cell population. *Infection and immunity*. 81:3414-3425.

Black, M.W., and J.C. Boothroyd. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 64:607-623.

Blewett, D.A., J.K. Miller, and J. Harding. 1983. Simple technique for the direct isolation of *Toxoplasma* tissue cysts from fetal ovine brain. *The Veterinary record*. 112:98-100.

Bliss, S.K., A.J. Marshall, Y. Zhang, and E.Y. Denkers. 1999a. 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. *Journal of immunology*. 162:7369-7375.

Bliss, S.K., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *Journal of immunology*. 165:4515-4521.

Bliss, S.K., L.C. Gavrilescu, A. Alcaraz, and E.Y. Denkers. 2001. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infection and immunity*. 69:4898-4905.

Bliss, S.K., Y. Zhang, and E.Y. Denkers. 1999b. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *Journal of immunology*. 163:2081-2088.

Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences*. 27:19-26.

Bohne, W., U. Gross, D.J. Ferguson, and J. Heesemann. 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Molecular microbiology*. 16:1221-1230.

Boothroyd, J.C., and M.E. Grigg. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current opinion in microbiology*. 5:438-442.

Botterel, F., P. Ichai, C. Feray, P. Bouree, F. Saliba, R. Tur Raspa, D. Samuel, and S. Romand. 2002. Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*. 40:1648-1650.

Bougdour, A., E. Durandau, M.P. Brenier-Pinchart, P. Ortet, M. Barakat, S. Kieffer, A. Curt-Varesano, R.L. Curt-Bertini, O. Bastien, Y. Coute, H. Pelloux, and M.A. Hakimi. 2013. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell host & microbe*. 13:489-500.

Bourguin, I., M. Moser, D. Buzoni-Gatel, F. Tielemans, D. Bout, J. Urbain, and O. Leo. 1998. Murine dendritic cells pulsed *In vitro* with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity *in vivo*. *Infection and immunity*. 66:4867-4874.

Bout DT, Mevelec MN, Velge-Roussel F, Dimier-Poisson I, and Lebrun M. 2002. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2:227-34.

Brach, M.A., S. deVos, H.J. Gruss, and F. Herrmann. 1992. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 80:2920-2924.

Braun, L., M.P. Brenier-Pinchart, M. Yogavel, A. Curt-Varesano, R.L. Curt-Bertini, T. Hussain, S. Kieffer-Jaquinod, Y. Coute, H. Pelloux, I. Tardieux, A. Sharma, H. Belrhali, A. Bougdour, and M.A. Hakimi. 2013. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *The Journal of experimental medicine*. 210:2071-2086.

Brenier-Pinchart, M.P., E. Blanc-Gonnet, P.N. Marche, F. Berger, F. Durand, P. Ambroise-Thomas, and H. Pelloux. 2004. Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression *In vitro*. *Acta neuropathologica*. 107:245-249.

Brenier-Pinchart, M.P., I. Vigan, E. Jouvin-Marche, P.N. Marche, E. Pelet, U. Gross, P. Ambroise-Thomas, and H. Pelloux. 2002. Monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression after *Toxoplasma gondii* infection *In vitro* depend on the stage of the parasite. *FEMS microbiology letters*. 214:45-49.

Brumlik, M.J., S. Pandeswara, S.M. Ludwig, D.P. Jeansonne, M.R. Lacey, K. Murthy, B.J. Daniel, R.F. Wang, S.R. Thibodeaux, K.M. Church, V. Hurez, M.J. Kious, B. Zhang, A. Alagbala, X. Xia, and T.J. Curiel. 2013. TgMAPK1 is a *Toxoplasma gondii* MAP kinase that hijacks host MKK3 signals to regulate virulence and interferon-gamma-mediated nitric oxide production. *Experimental parasitology*. 134:389-399.

Brunton, C.L., G.R. Wallace, E. Graham, and M.R. Stanford. 2000. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *Journal of neuroimmunology*. 102:182-188.

Bubici, C., S. Papa, C.G. Pham, F. Zazzeroni, and G. Franzoso. 2006. The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histology and histopathology*. 21:69-80.

Burg, J.L., C.M. Grover, P. Pouletty, and J.C. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 27:1787-1792.

Butcher, B.A., B.A. Fox, L.M. Rommereim, S.G. Kim, K.J. Maurer, F. Yarovinsky, D.R. Herbert, D.J. Bzik, and E.Y. Denkers. 2011. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS pathogens*. 7:e1002236.

Butcher, B.A., R.I. Greene, S.C. Henry, K.L. Annecharico, J.B. Weinberg, E.Y. Denkers, A. Sher, and G.A. Taylor. 2005. p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infection and immunity*. 73:3278-3286.

Buzoni-Gatel, D., J. Schulthess, L.C. Menard, and L.H. Kasper. 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cellular microbiology*. 8:535-544.

Caamano, J., J. Alexander, L. Craig, R. Bravo, and C.A. Hunter. 1999. The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 163:4453-4461.

Caamano, J.H., C.A. Rizzo, S.K. Durham, D.S. Barton, C. Raventos-Suarez, C.M. Snapper, and R. Bravo. 1998. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *The Journal of experimental medicine*. 187:185-196.

Carne, B., F. Bissuel, D. Ajzenberg, R. Bouyne, C. Aznar, M. Demar, S. Bichat, D. Louvel, A.M. Bourbigot, C. Peneau, P. Neron, and M.L. Darde. 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *Journal of clinical microbiology*. 40:4037-4044.

Carne, B., M. Demar, D. Ajzenberg, and M.L. Darde. 2009. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging infectious diseases*. 15:656-658.

Carmen, J.C., L. Hardi, and A.P. Sinai. 2006. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cellular microbiology*. 8:301-315.

Carmen, J.C., R.C. Southard, and A.P. Sinai. 2008. The complexity of signaling in host-pathogen interactions revealed by the *Toxoplasma gondii*-dependent modulation of JNK phosphorylation. *Experimental cell research*. 314:3724-3736.

Carruthers, V., and J.C. Boothroyd. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology*. 10:83-89.

Carter, C.J. 2013. Toxoplasmosis and Polygenic Disease Susceptibility Genes: Extensive *Toxoplasma gondii* host/pathogen interactome enrichment in nine psychiatric or neurological disorders. *Journal of pathogens*. 2013:965046.

Cassaing, S., M.H. Bessieres, A. Berry, A. Berrebi, R. Fabre, and J.F. Magnaval. 2006. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 44:720-724.

Cassatella, M.A., S. Gasperini, F. Calzetti, P.P. McDonald, and G. Trinchieri. 1995. Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *The Biochemical journal*. 310 (Pt 3):751-755.

Cavaillès, P., V. Sergent, C. Bisanz, O. Papapietro, C. Colacios, M. Mas, J.F. Subra, D. Lagrange, M. Calise, S. Appolinaire, T. Faraut, P. Druet, A. Saoudi, M.H. Bessières, B. Pipy, M.F. Cesbron-Delauw, and G.J. Fournie. 2006. The rat *Tox1* locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:744-749.

Cavalcanti, M.G., J.S. Mesquita, K. Madi, D.F. Feijo, I. Assuncao-Miranda, H.S. Souza, and M.T. Bozza. 2011. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. *PloS one*. 6:e25259.

Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 288:2351-2354.

Chang, D.W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B.C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M.E. Peter, and X. Yang. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal*. 21:3704-3714.

Chang, Y.C., Y.S. Lee, T. Tejima, K. Tanaka, S. Omura, N.H. Heintz, Y. Mitsui, and J. Magae. 1998. mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 9:79-84.

Channon, J.Y., K.A. Miselis, L.A. Minns, C. Dutta, and L.H. Kasper. 2002. *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis. *Infection and immunity*. 70:6048-6057.

Channon, J.Y., R.M. Seguin, and L.H. Kasper. 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infection and immunity*. 68:4822-4826.

Chao, C.C., G. Gekker, S. Hu, and P.K. Peterson. 1994. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *Journal of Immunology*. 152:1246-1252.

Chao, C.C., S. Hu, G. Gekker, W.J. Novick, Jr., J.S. Remington, and P.K. Peterson. 1993b. Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells. *Journal of Immunology*. 150:3404-3410.

Chao, C.C., W.R. Anderson, S. Hu, G. Gekker, A. Martella, and P.K. Peterson. 1993. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clinical immunology and immunopathology*. 67:178-183.

Chavarria, A., and J. Alcocer-Varela. 2004. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity reviews*. 3:251-260.

Chen, F., B.M. Hersh, B. Conradt, Z. Zhou, D. Riemer, Y. Gruenbaum, and H.R. Horvitz. 2000. Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science*. 287:1485-1489.

Chen, M., F. Aosai, H.S. Mun, K. Norose, H. Hata, and A. Yano. 2000. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Infection and immunity*. 68:4893-4899.

Chen, R., I. Valencia, F. Zhong, K.S. McColl, H.L. Roderick, M.D. Bootman, M.J. Berridge, S.J. Conway, A.B. Holmes, G.A. Mignery, P. Velez, and C.W. Distelhorst. 2004. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *The Journal of cell biology*. 166:193-203.

Cheng, E.H., J. Nicholas, D.S. Bellows, G.S. Hayward, H.G. Guo, M.S. Reitz, and J.M. Hardwick. 1997. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human

herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:690-694.

Chtanova, T., M. Schaeffer, S.J. Han, G.G. van Dooren, M. Nollmann, P. Herzmark, S.W. Chan, H. Satija, K. Camfield, H. Aaron, B. Striepen, and E.A. Robey. 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*. 29:487-496.

Clahsen, T., and F. Schaper. 2008. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *Journal of leukocyte biology*. 84:1521-1529.

Clem, R.J., and L.K. Miller. 1993. Apoptosis reduces both the *In vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *Journal of virology*. 67:3730-3738.

Clem, R.J., E.H. Cheng, C.L. Karp, D.G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M.B. Kastan, D.E. Griffin, W.C. Earnshaw, M.A. Veluona, and J.M. Hardwick. 1998. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:554-559.

Cohen, S.B., K.J. Maurer, C.E. Egan, S. Oghumu, A.R. Satoskar, and E.Y. Denkers. 2013. CXCR3-dependent CD4(+) T cells are required to activate inflammatory monocytes for defense against intestinal infection. *PLoS pathogens*. 9:e1003706.

Coleman, D.L., J.A. Chodakewitz, A.H. Bartiss, and J.W. Mellors. 1988. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood*. 72:573-578.

Combe, C.L., T.J. Curiel, M.M. Moretto, and I.A. Khan. 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infection and immunity*. 73:4913-4921.

Contreras-Ochoa, C.O., A. Lagunas-Martinez, J. Belkind-Gerson, J. Diaz-Chavez, and D. Correa. 2013. *Toxoplasma gondii* invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules. *Experimental parasitology*. 134:256-265.

Coombes, J.L., B.A. Charsar, S.J. Han, J. Halkias, S.W. Chan, A.A. Koshy, B. Striepen, and E.A. Robey. 2013. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:E1913-1922.

Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*. 2:647-656.

Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, and I. Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 107:309-316.

Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, and I. Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 107:309-316.

Cowen, D., and A. Wolf. 1950. Experimental congenital toxoplasmosis. I. The vagina as a portal of entry of *Toxoplasma* in the mouse. *The Journal of experimental medicine*. 92:393-402.

Cowper, B., S. Matthews, and F. Tomley. 2012. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. *Molecular and biochemical parasitology*. 186:1-10.

Cox, G.M., A.P. Kithcart, D. Pitt, Z. Guan, J. Alexander, J.L. Williams, T. Shawler, N.M. Daga, P.G. Popovich, A.R. Satoskar, and C.C. Whitacre. 2013. Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation. *Journal of immunology*. 191:1043-1054.

Crome, S.Q., A.Y. Wang, and M.K. Levings. 2010. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical and experimental immunology*. 159:109-119.

Csordas, G., M. Madesh, B. Antonsson, and G. Hajnoczky. 2002. tcBid promotes Ca(2+) signal propagation to the mitochondria: control of Ca(2+) permeation through the outer mitochondrial membrane. *The EMBO journal*. 21:2198-2206.

Dalimi, A., and A. Abdoli. 2012. Latent toxoplasmosis and human. *Iranian journal of parasitology*. 7:1-17.

Danial, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-219.

Darde, M.L. 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Current topics in microbiology and immunology*. 219:27-41.

Darde, M.L. 2008. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite*. 15:366-371.

Darde, M.L., B. Bouteille, and M. Pestre-Alexandre. 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 39:551-558.

Darde, M.L., B. Bouteille, and M. Pestre-Alexandre. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *The Journal of parasitology*. 78:786-794.

Dawson, S.P., J.E. Arnold, N.J. Mayer, S.E. Reynolds, M.A. Billett, C. Gordon, L. Colleaux, P.M. Kloetzel, K. Tanaka, and R.J. Mayer. 1995. Developmental changes of the 26 S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death. *The Journal of biological chemistry*. 270:1850-1858.

de Araujo, E.G., G.M. da Silva, and A.A. Dos Santos. 2009. Neuronal cell survival: the role of interleukins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1153:57-64.

de Gannes, F.M., M. Merle, P. Canioni, and P.J. Voisin. 1998. Metabolic and cellular characterization of immortalized human microglial cells under heat stress. *Neurochemistry international*. 33:61-73.

de Vries, H.E., M.C. Blom-Roosemalen, M. van Oosten, A.G. de Boer, T.J. van Berkel, D.D. Breimer, and J. Kuiper. 1996. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier *In vitro*. *Journal of neuroimmunology*. 64:37-43.

Debiasi, R.L., M.K. Squier, B. Pike, M. Wynes, T.S. Dermody, J.J. Cohen, and K.L. Tyler. 1999. Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *Journal of virology*. 73:695-701.

Debierre-Grockiego F, Hippe D, Schwarz RT, Luder CG (2007) *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. *Apoptosis* 12: 781-790.

Debierre-Grockiego, F., D. Hippe, R.T. Schwarz, and C.G. Luder. 2007b. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols are not involved in *T. gondii*-induced host cell survival. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 12:781-790.

Debierre-Grockiego, F., M.A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, M.G. Resende, D.S. Mansur, R. Weingart, R.R. Schmidt, D.T. Golenbock, R.T. Gazzinelli, and R.T. Schwarz. 2007a. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 179:1129-1137.

Deckert-Schluter, M., H. Bluethmann, N. Kaefer, A. Rang, and D. Schluter. 1999. Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. *The American journal of pathology*. 154:1549-1561.

Deckert-Schluter, M., S. Albrecht, H. Hof, O.D. Wiestler, and D. Schluter. 1995. Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and -susceptible congenic strains of mice. *Immunology*. 85:408-418.

Del Rio, L., S. Bennouna, J. Salinas, and E.Y. Denkers. 2001. CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 167:6503-6509.

Delair, E., P. Latkany, A.G. Noble, P. Rabiah, R. McLeod, and A. Brezin. 2011. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocular immunology and inflammation*. 19:91-102.

Dellacasa-Lindberg, I., J.M. Fuks, R.B. Arrighi, H. Lambert, R.P. Wallin, B.J. Chambers, and A. Barragan. 2011. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. 79:3046-3052.

Demar, M., D. Ajzenberg, D. Maubon, F. Djossou, D. Panchoe, W. Punwasi, N. Valery, C. Peneau, J.L. Daigre, C. Aznar, B. Cottrelle, L. Terzan, M.L. Darde, and B. Carme. 2007. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 45:e88-95.

Denkers, E.Y., and R.T. Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical microbiology reviews*. 11:569-588.

Denkers, E.Y., B.A. Butcher, L. Del Rio, and S. Bennouna. 2004. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *International journal for parasitology*. 34:411-421.

Denkers, E.Y., G. Yap, T. Scharton-Kersten, H. Charest, B.A. Butcher, P. Caspar, S. Heiny, and A. Sher. 1997. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 159:1903-1908.

Denkers, E.Y., R.T. Gazzinelli, D. Martin, and A. Sher. 1993. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 178:1465-1472.

Denney, C.F., L. Eckmann, and S.L. Reed. 1999. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity*. 67:1547-1552.

Derouich-Guergour, D., D. Aldebert, I. Vigan, E. Jouvin-Marche, P.N. Marche, D. Aubert, P. Ambroise-Thomas, and H. Pelloux. 2002. *Toxoplasma gondii* infection can regulate the expression of tumour necrosis factor-alpha receptors on human cells *In vitro*. *Parasite immunology*. 24:271-279.

Derouin, F., and H. Pelloux. 2008. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 14:1089-1101.

Didelot, C., E. Schmitt, M. Brunet, L. Maingret, A. Parcellier, and C. Garrido. 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handbook of experimental pharmacology*:171-198.

Dimier, I.H., J.P. Woodman, and D.T. Bout. 1992. [Human endothelial cells activated by interferon gamma, by interleukin-1 and TNF inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*]. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research*. 23:329-330.

Dimier-Poisson, I., F. Aline, M.N. Mevelec, C. Beauvillain, D. Buzoni-Gatel, and D. Bout. 2003. Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infection and immunity*. 71:5254-5265.

Distelhorst, C.W., M. Lam, and T.S. McCormick. 1996. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion. *Oncogene*. 12:2051-2055.

Dobrowolski, J.M., and L.D. Sibley. 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 84:933-939.

Dominguez, P.M., and C. Ardavin. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological reviews*. 234:90-104.

Drexler, H.C. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:855-860.

Drogemuller, K., U. Helmuth, A. Brunn, M. Sakowicz-Burkiewicz, D.H. Gutmann, W. Mueller, M. Deckert, and D. Schluter. 2008. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis. *J Immunol*. 181:2683-2693.

Dubey, J.P., and J.L. Jones. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International journal for parasitology*. 38:1257-1278.

Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*. 11:267-299.

Dubremetz, J.F. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular microbiology*. 9:841-848.

Dunay, I.R., A. Fuchs, and L.D. Sibley. 2010. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and immunity*. 78:1564-1570.

Dunay, I.R., and L.D. Sibley. 2010. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in immunology*. 22:461-466.

Dunay, I.R., R.A. Damatta, B. Fux, R. Presti, S. Greco, M. Colonna, and L.D. Sibley. 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 29:306-317.

Dunn, D., M. Wallon, F. Peyron, E. Petersen, C. Peckham, and R. Gilbert. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 353:1829-1833.

Dziadek, B., J. Dziadek, and H. Dlugonska. 2007. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. *Experimental parasitology*. 115:277-282.

Dzierszynski, F., M. Pepper, J.S. Stumhofer, D.F. LaRosa, E.H. Wilson, L.A. Turka, S.K. Halonen, C.A. Hunter, and D.S. Roos. 2007. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. *Infection and immunity*. 75:5200-5209.

Edvinsson, B., M. Lappalainen, B. Evengard, and E.S.G.f. Toxoplasmosis. 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 12:131-136.

Egan, C.E., W. Sukhumavasi, A.L. Bierly, and E.Y. Denkers. 2008. Understanding the multiple functions of Gr-1(+) cell subpopulations during microbial infection. *Immunologic research*. 40:35-48.

El Hajj, H., M. Lebrun, S.T. Arold, H. Vial, G. Labesse, and J.F. Dubremetz. 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*. 3:e14.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G.X. Zhang, B.N. Dittel, and A. Rostami. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology*. 12:568-575.

el-Sagaff, S., H.S. Salem, W. Nichols, A.K. Tonkel, and N.Y. Abo-Zenadah. 2005. Cell death pattern in cerebellum neurons infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 35:809-818.

Erbe, D.V., E.R. Pfefferkorn, and M.W. Fanger. 1991. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 146:3145-3151.

Evengard, B., M. Forsgren, and A. Uggla. 1997. [Toxoplasmosis. The most common parasitic infection in Europe, but not fully understood and probably underdiagnosed]. *Lakartidningen*. 94:3249-3254.

Fagard, R., H. Van Tan, C. Creuzet, and H. Pelloux. 1999. Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. *Parasitol Today*. 15:504-507.

Fekkar, A., D. Ajzenberg, B. Bodaghi, F. Touafek, P. Le Hoang, J. Delmas, P.Y. Robert, M.L. Darde, D. Mazier, and L. Paris. 2011. Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *Journal of clinical microbiology*. 49:1513-1517.

Ferguson, D.J., and W.M. Hutchison. 1987. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*. 411:39-43.

Fischer, H.G., A.K. Bielinsky, B. Nitzgen, W. Daubener, and U. Hadding. 1993. Functional dichotomy of mouse microglia developed *In vitro*: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *Journal of neuroimmunology*. 45:193-201.

Fischer, H.G., B. Nitzgen, G. Reichmann, and U. Hadding. 1997b. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *European journal of immunology*. 27:1539-1548.

Fischer, H.G., B. Nitzgen, G. Reichmann, U. Gross, and U. Hadding. 1997a. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitology research*. 83:637-641.

Fischer, H.G., U. Bonifas, and G. Reichmann. 2000. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 164:4826-4834.

Flores, M., R. Saavedra, R. Bautista, R. Viedma, E.P. Tenorio, L. Leng, Y. Sanchez, I. Juarez, A.A. Satoskar, A.S. Shenoy, L.I. Terrazas, R. Bucala, J. Barbi, A.R. Satoskar, and M. Rodriguez-Sosa. 2008. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22:3661-3671.

Foudrinier, F., I. Villena, R. Jaussaud, D. Aubert, C. Chemla, F. Martinot, and J.M. Pinon. 2003. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*. 41:1681-1686.

Franzoso, G., L. Carlson, T. Scharon-Kersten, E.W. Shores, S. Epstein, A. Grinberg, T. Tran, E. Shacter, A. Leonardi, M. Anver, P. Love, A. Sher, and U. Siebenlist. 1997. Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity*. 6:479-490.

Freund, Y.R., N.T. Zaveri, and H.S. Javitz. 2001. *In vitro* investigation of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in microglia of BALB/c and CBA/Ca mice. *Infection and immunity*. 69:765-772.

Fuks, J.M., R.B. Arrighi, J.M. Weidner, S. Kumar Mendu, Z. Jin, R.P. Wallin, B. Rethi, B. Birnir, and A. Barragan. 2012. GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*. 8:e1003051.

Gais, A., N. Beinert, U. Gross, and C.G. Luder. 2008. Transient inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase expression and activity by *Toxoplasma gondii* is dispensable for parasite-mediated blockade of host cell apoptosis and intracellular parasite replication. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 10:358-366.

Gallelli, L., G. Pelaia, D. Fratto, V. Muto, D. Falcone, A. Vatrella, L.S. Curto, T. Renda, M.T. Busceti, M.C. Liberto, R. Savino, M. Cazzola, S.A. Marsico, and R. Maselli. 2010. Effects of budesonide on P38 MAPK activation, apoptosis and IL-8 secretion, induced by TNF-alpha and *Haemophilus influenzae* in human bronchial epithelial cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 23:471-479.

Gallelli, L., G. Pelaia, D. Fratto, V. Muto, D. Falcone, A. Vatrella, L.S. Curto, T. Renda, M.T. Busceti, M.C. Liberto, R. Savino, M. Cazzola, S.A. Marsico, and R. Maselli. 2010. Effects of budesonide on P38 MAPK activation, apoptosis and IL-8 secretion, induced by TNF-alpha and *Haemophilus influenzae* in human bronchial epithelial cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 23:471-479.

Gavrilescu LC, Denkers EY (2003) Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 71: 2577-2583.

Gavrilescu, L.C., and E.Y. Denkers. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of immunology*. 167:902-909.

Gavrilescu, L.C., and E.Y. Denkers. 2003. Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. 71:2577-2583.

Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever, and A. Sher. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 149:175-180.

Gazzinelli, R.T., M. Wysocka, S. Hayashi, E.Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, and A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 153:2533-2543.

Gazzinelli, R.T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 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. *Journal of immunology*. 157:798-805.

Gazzinelli, R.T., S. Bala, R. Stevens, M. Baseler, L. Wahl, J. Kovacs, and A. Sher. 1995. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. *Journal of immunology*. 155:1565-1574.

Gazzinelli, R.T., S. Hieny, T.A. Wynn, S. Wolf, and A. Sher. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:6115-6119.

Ge, Y., J. Chen, X. Qiu, J. Zhang, L. Cui, Y. Qi, X. Liu, J. Qiu, Z. Shi, Z. Lun, J. Shen, and Y. Wang. 2014. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN-gamma production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*.

Ghosh, D., J.L. Walton, P.D. Roepe, and A.P. Sinai. 2012. Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*. 14:589-607.

Giardino Torchia, M.L., D.B. Conze, and J.D. Ashwell. 2013. c-IAP1 and c-IAP2 redundancy differs between T and B cells. *PloS one*. 8:e66161.

Gilbert, R.E., K. Freeman, E.G. Lago, L.M. Bahia-Oliveira, H.K. Tan, M. Wallon, W. Buffolano, M.R. Stanford, E. Petersen, and T. European Multicentre Study on Congenital. 2008. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS neglected tropical diseases*. 2:e277.

Gilk, S.D., E. Gaskins, G.E. Ward, and C.J. Beckers. 2009. GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma* myosin XIV complex. *Eukaryotic cell*. 8:190-196.

Giulian, D., and J.E. Ingeman. 1988. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 8:4707-4717.

Goebel, S., C.G. Luder, and U. Gross. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Medical microbiology and immunology*. 187:221-226.

Goebel, S., U. Gross, and C.G. Luder. 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Journal of cell science*. 114:3495-3505.

Goldszmid, R.S., I. Coppens, A. Lev, P. Caspar, I. Mellman, and A. Sher. 2009. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 206:399-410.

Goldszmid, R.S., P. Caspar, A. Rivollier, S. White, A. Dzutsev, S. Hieny, B. Kelsall, G. Trinchieri, and A. Sher. 2012. NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity*. 36:1047-1059.

Goncalves, R.M., D.H. Rodrigues, A.M. Camargos da Costa, M.M. Teixeira, W. Ribeiro Campos, F. Orefice, and A.L. Teixeira. 2007. Increased serum levels of CXCL8 chemokine in acute toxoplasmic retinochoroiditis. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 85:871-876.

Goverman, J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*. 9:393-407.

Gras, L., R.E. Gilbert, M. Wallon, F. Peyron, and M. Cortina-Borja. 2004. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology and infection*. 132:541-548.

Gregg, B., B.C. Taylor, B. John, E.D. Tait-Wojno, N.M. Girgis, N. Miller, S. Wagage, D.S. Roos, and C.A. Hunter. 2013. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. *Infection and immunity*. 81:1635-1643.

Gregg, B., F. Dzierszynski, E. Tait, K.A. Jordan, C.A. Hunter, and D.S. Roos. 2011. Subcellular antigen location influences T-cell activation during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *PloS one*. 6:e22936.

Griffiths, G.J., L. Dubrez, C.P. Morgan, N.A. Jones, J. Whitehouse, B.M. Corfe, C. Dive, and J.A. Hickman. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *The Journal of cell biology*. 144:903-914.

Grigg, M.E., and Y. Suzuki. 2003. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5:685-690.

Grimm, L.M., A.L. Goldberg, G.G. Poirier, L.M. Schwartz, and B.A. Osborne. 1996. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *The EMBO journal*. 15:3835-3844.

Grimwood, J., and J.E. Smith. 1992. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Experimental parasitology*. 74:106-111.

Gross, U., and W. Bohne. 1994. *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 41:10S-11S.

Gross, U., M.C. Kempf, F. Seeber, C.G. Luder, R. Lugert, and W. Bohne. 1997. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite? *Behring Institute Mitteilungen*:97-106.

Guan, H., M. Moretto, D.J. Bzik, J. Gigley, and I.A. Khan. 2007. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *Journal of immunology*. 179:590-596.

Guiton, R., V. Vasseur, S. Charron, M.T. Arias, N. Van Langendonck, D. Buzoni-Gatel, B. Ryffel, and I. Dimier-Poisson. 2010. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *The Journal of infectious diseases*. 202:427-435.

Hager, K.M., and V.B. Carruthers. 2008. MARveling at parasite invasion. *Trends in parasitology*. 24:51-54.

Hall, A.O., D.P. Beiting, C. Tato, B. John, G. Oldenhove, C.G. Lombana, G.H. Pritchard, J.S. Silver, N. Bouladoux, J.S. Stumhofer, T.H. Harris, J. Grainger, E.D. Wojno, S. Wagage, D.S. Roos, P. Scott, L.A. Turka, S. Cherry, S.L. Reiner, D. Cua, Y. Belkaid, M.M. Elloso, and C.A. Hunter. 2012. The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity*. 37:511-523.

Halonen, S.K., F. Chiu, and L.M. Weiss. 1998a. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infection and immunity*. 66:4989-4993.

Halonen, S.K., G.A. Taylor, and L.M. Weiss. 2001. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infection and immunity*. 69:5573-5576.

Halonen, S.K., L.M. Weiss, and F.C. Chiu. 1998b. Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *In vitro*. *International journal for parasitology*. 28:815-823.

Halonen, S.K., W.D. Lyman, and F.C. Chiu. 1996. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 55:1150-1156.

Hammouda, N.A., E.A. Rashwan, E.D. Hussien, I. Abo el-Naga, and F.M. Fathy. 1995. Measurement of respiratory burst of TNF and IL-1 cytokine activated murine peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 25:683-691.

Han, J., L.A. Goldstein, B.R. Gastman, C.J. Froelich, X.M. Yin, and H. Rabinowich. 2004. Degradation of Mcl-1 by granzyme B: implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *The Journal of biological chemistry*. 279:22020-22029.

Handel, U., A. Brunn, K. Drogemuller, W. Muller, M. Deckert, and D. Schluter. 2012. Neuronal gp130 expression is crucial to prevent neuronal loss, hyperinflammation, and lethal course of murine *Toxoplasma* encephalitis. *The American journal of pathology*. 181:163-173.

Haroon, F., U. Handel, F. Angenstein, J. Goldschmidt, P. Kreutzmann, H. Lison, K.D.

Fischer, H. Scheich, W. Wetzel, D. Schluter, and E. Budinger. 2012. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. PloS One. 7:e35516.

Hermes, G., J.W. Ajioka, K.A. Kelly, E. Mui, F. Roberts, K. Kasza, T. Mayr, M.J. Kirisits, R. Wollmann, D.J. Ferguson, C.W. Roberts, J.H. Hwang, T. Trendler, R.P. Kennan, Y. Suzuki, C. Reardon, W.F. Hickey, L. Chen, and R. McLeod. 2008. Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. Journal of neuroinflammation. 5:48.

Herrmann, D.C., A. Barwald, A. Maksimov, N. Pantchev, M.G. Vrhovec, F.J. Conraths, and G. Schares. 2012. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. Veterinary research. 43:39.

Higuchi, M., and B.B. Aggarwal. 1994. Differential roles of two types of the TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation, and differentiation. Journal of immunology. 152:4017-4025.

Hippe D, Lytovchenko O, Schmitz I, Luder CG (2008) Fas/CD95-mediated apoptosis of type II cells is blocked by *Toxoplasma gondii* primarily via interference with the mitochondrial amplification loop. Infection and immunity 76: 2905-2912.

Hippe, D., A. Gais, U. Gross, and C.G. Luder. 2009. Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*. Methods in molecular biology. 470:275-288.

Hisaeda, H., T. Sakai, H. Ishikawa, Y. Maekawa, K. Yasutomo, R.A. Good, and K. Himeno. 1997. Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. Journal of immunology. 159:2375-2381.

Hofman, P., E. Bernard, J.F. Michiels, A. Thyss, Y. Le Fichoux, and R. Loubiere. 1993. Extracerebral toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Pathology, research and practice. 189:894-901.

Hotez, P.J. 2008. Neglected infections of poverty in the United States of America. PLoS neglected tropical diseases. 2:e256.

Howard, J.C., J.P. Hunn, and T. Steinfeldt. 2011. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. Current opinion in microbiology. 14:414-421.

Howe, D.K., and L.D. Sibley. 1994. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. Experimental parasitology. 78:242-245.

Howe, D.K., and L.D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. The Journal of infectious diseases. 172:1561-1566.

Howe, D.K., S. Honore, F. Derouin, and L.D. Sibley. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. Journal of clinical microbiology. 35:1411-1414.

Hulinska, D., J. Sykora, and M. Zastera. 1990. Effect of cortisone on *Toxoplasma gondii* infection studied by electron microscopy. Folia parasitologica. 37:207-212.

Hunter, C.A., and L.D. Sibley. 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nature reviews. Microbiology. 10:766-778.

Hunter, C.A., C.S. Subauste, V.H. Van Cleave, and J.S. Remington. 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infection and immunity. 62:2818-2824.

Hunter, C.A., C.W. Roberts, and J. Alexander. 1992. Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. European journal of immunology. 22:2317-2322.

Hunter, C.A., K.E. Gabriel, T. Radzanowski, L.E. Neyer, and J.S. Remington. 1997. Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells. *Immunology letters*. 59:1-5.

Hunter, C.A., R. Chizzonite, and J.S. Remington. 1995. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *Journal of immunology*. 155:4347-4354.

Hwang, I.Y., J.H. Quan, M.H. Ahn, H.A. Ahmed, G.H. Cha, D.W. Shin, and Y.H. Lee. 2010. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitology research*. 107:1313-1321.

Ibrahim, H.M., M. Nishimura, S. Tanaka, W. Awadin, H. Furuoka, X. Xuan, and Y. Nishikawa. 2014. Overproduction of *Toxoplasma gondii* cyclophilin-18 regulates host cell migration and enhances parasite dissemination in a CCR5-independent manner. *BMC microbiology*. 14:76.

Im, W., H. Kim, D. Yun, S.Y. Seo, S.H. Park, R.M. Locksley, and S. Hong. 2005. Cytokine reporter mouse system for screening novel IL12/23 p40-inducing compounds. *Molecules and cells*. 20:288-296.

Imamura, R., K. Konaka, N. Matsumoto, M. Hasegawa, M. Fukui, N. Mukaida, T. Kinoshita, and T. Suda. 2004. Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 279:46415-46423.

Israelski, D.M., and J.S. Remington. 1988. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infectious disease clinics of North America*. 2:429-445.

Itano, A.A., and M.K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology*. 4:733-739.

- Itano, A.A., S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, B.D. Ehst, E. Ingulli, A.Y. Rudensky, and M.K. Jenkins. 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*. 19:47-57.
- Jackson, M.H., and W.M. Hutchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Advances in parasitology*. 28:55-105.
- Jacobs, L., J.S. Remington, and M.L. Melton. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*. 46:11-21.
- Janabi, N., S. Peudenier, B. Heron, K.H. Ng, and M. Tardieu. 1995. Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neuroscience letters*. 195:105-108.
- Janiak, F., B. Leber, and D.W. Andrews. 1994. Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry*. 269:9842-9849.
- Jankovic, D., M.C. Kullberg, C.G. Feng, R.S. Goldszmid, C.M. Collazo, M. Wilson, T.A. Wynn, M. Kamanaka, R.A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of experimental medicine*. 204:273-283.
- Jebbari, H., C.W. Roberts, D.J. Ferguson, H. Bluethmann, and J. Alexander. 1998. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite immunology*. 20:231-239.
- Jenkins, M.K., A. Khoruts, E. Ingulli, D.L. Mueller, S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, A. Itano, and K.A. Pape. 2001. *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual review of immunology*. 19:23-45.
- Ji, Y.S., X.M. Sun, X.Y. Liu, and X. Suo. 2013. *Toxoplasma gondii*: effects of exogenous nitric oxide on egress of tachyzoites from infected macrophages. *Experimental parasitology*. 133:70-74.

- John, G.R., S.C. Lee, and C.F. Brosnan. 2003. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 9:10-22.
- Johnson, L.L., and P.C. Sayles. 2002. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infection and immunity*. 70:185-191.
- Johnson, L.L., F.P. VanderVegt, and E.A. Havell. 1993. Gamma interferon-dependent temporary resistance to acute *Toxoplasma gondii* infection independent of CD4+ or CD8+ lymphocytes. *Infection and immunity*. 61:5174-5180.
- Johnson, L.L., G.W. Gibson, and P.C. Sayles. 1996. CR3-dependent resistance to acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Infection and immunity*. 64:1998-2003.
- Johnson, T.M., Z. Rajfur, K. Jacobson, and C.J. Beckers. 2007. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Molecular biology of the cell*. 18:3039-3046.
- Jones, C.D., N. Okhravi, P. Adamson, S. Tasker, and S. Lightman. 2000. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science*. 41:634-644.
- Jones, J.L., and J.P. Dubey. 2010. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental parasitology*. 124:10-25.
- Jones, M.L., M.O. Collins, D. Goulding, J.S. Choudhary, and J.C. Rayner. 2012. Analysis of protein palmitoylation reveals a pervasive role in Plasmodium development and pathogenesis. *Cell host & microbe*. 12:246-258.
- Jones, T.C., K.A. Bienz, and P. Erb. 1986. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and immunity*. 51:147-156.
- Jordan, K.A., C.D. Dupont, E.D. Tait, H.C. Liou, and C.A. Hunter. 2010. Role of the NF-kappaB transcription factor c-Rel in the generation of CD8+ T-cell responses to *Toxoplasma gondii*. *International immunology*. 22:851-861.

Jung, B.K., K.H. Pyo, K.Y. Shin, Y.S. Hwang, H. Lim, S.J. Lee, J.H. Moon, S.H. Lee, Y.H. Suh, J.Y. Chai, and E.H. Shin. 2012. *Toxoplasma gondii* infection in the brain inhibits neuronal degeneration and learning and memory impairments in a murine model of Alzheimer's disease. *PloS One*. 7:e33312.

Kang, H., and Y. Suzuki. 2001. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Infection and immunity*. 69:2920-2927.

Kang, H., J.S. Remington, and Y. Suzuki. 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. *Journal of immunology*. 164:2629-2634.

Kang, K.H., K.H. Lee, M.Y. Kim, and K.H. Choi. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH2 terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 276:24638-24644.

Karin, M., and A. Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*. 3:221-227.

Kataoka, T., R.C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacovics, and J. Tschopp. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Current biology : CB*. 10:640-648.

Keller, P., F. Schaumburg, S.F. Fischer, G. Hacker, U. Gross, and C.G. Luder. 2006. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation *In vitro* by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS microbiology letters*. 258:312-319.

Kelly, M.N., J.K. Kolls, K. Happel, J.D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, M. Moretto, and I.A. Khan. 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity*. 73:617-621.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 26:239-257.

Kerschensteiner, M., E. Meinel, and R. Hohlfeld. 2009. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience*. 158:1122-1132.

Khan IA, Matsuura T, Kasper LH (1996) Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International immunology*. 8: 887-896.

Khan, A., S. Taylor, C. Su, A.J. Mackey, J. Boyle, R. Cole, D. Glover, K. Tang, I.T. Paulsen, M. Berriman, J.C. Boothroyd, E.R. Pfefferkorn, J.P. Dubey, J.W. Ajioka, D.S. Roos, J.C. Wootton, and L.D. Sibley. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic acids research*. 33:2980-2992.

Khan, I.A., S.Y. Thomas, M.M. Moretto, F.S. Lee, S.A. Islam, C. Combe, J.D. Schwartzman, and A.D. Luster. 2006. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS pathogens*. 2:e49.

Khan, I.A., T. Matsuura, and L.H. Kasper. 1996. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *International immunology*. 8:887-896.

Kikumura, A., T. Ishikawa, and K. Norose. 2012. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *The British journal of ophthalmology*. 96:1259-1267.

Kim, J.Y., M.H. Ahn, H.O. Song, J.H. Choi, J.S. Ryu, D.Y. Min, and M.H. Cho. 2006b. Involvement of MAPK activation in chemokine or COX-2 productions by *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology*. 44:197-207.

Kim, J.Y., M.H. Ahn, H.S. Jun, J.W. Jung, J.S. Ryu, and D.Y. Min. 2006a. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation. *Yonsei medical journal*. 47:862-869.

Kim, L., and E.Y. Denkers. 2006. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *Journal of cell science*. 119:2119-2126.

Kim, S.K., and J.C. Boothroyd. 2005. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *Journal of immunology*. 174:8038-8048.

King, P., and S. Goodbourn. 1998. STAT1 is inactivated by a caspase. *The Journal of biological chemistry*. 273:8699-8704.

Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, and A. Ashkenazi. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of biological chemistry*. 276:46639-46646.

Knepper-Nicolai, B., J. Savill, and S.B. Brown. 1998. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *The Journal of biological chemistry*. 273:30530-30536.

Knight, B.C., C.L. Brunton, N.C. Modi, G.R. Wallace, and M.R. Stanford. 2005. The effect of *Toxoplasma gondii* infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells. *Journal of neuroimmunology*. 160:41-47.

Knight, B.C., S. Kissane, F. Falciani, M. Salmon, M.R. Stanford, and G.R. Wallace. 2006. Expression analysis of immune response genes of Muller cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of neuroimmunology*. 179:126-131.

Koblansky, A.A., D. Jankovic, H. Oh, S. Hieny, W. Sungnak, R. Mathur, M.S. Hayden, S. Akira, A. Sher, and S. Ghosh. 2013. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 38:119-130.

Konishi, E., and M. Nakao. 1992. Naturally occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 104 (Pt 3):427-432.

Koshy, A.A., A.E. Fouts, M.B. Lodoen, O. Alkan, H.M. Blau, and J.C. Boothroyd. 2010. *Toxoplasma* secreting Cre recombinase for analysis of host-parasite interactions. *Nature methods*. 7:307-309.

Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton, and J.C. Reed. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research*. 53:4701-4714.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Kramer, and S. Kirchhoff. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*. 276:20633-20640.

Kubbutat, M.H., and K.H. Vousden. 1997. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Molecular and cellular biology*. 17:460-468.

Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 75:263-274.

Kuiper, J.J., M.E. Emmelot, A. Rothova, and T. Mutis. 2013. Interleukin-17 production and T helper 17 cells in peripheral blood mononuclear cells in response to ocular lysate in patients with birdshot chorioretinopathy. *Molecular vision*. 19:2606-2614.

Kurdi, M., and G.W. Booz. 2007. Jak inhibition, but not Stat1 knockdown, blocks the synergistic effect of IFN-gamma on Fas-induced apoptosis of A549 human non-small cell lung cancer cells. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 27:23-31.

Lachenmaier, S.M., M.A. Deli, M. Meissner, and O. Liesenfeld. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology*. 232:119-130.

Laliberte, J., and V.B. Carruthers. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65:1900-1915.

Lambert, H., N. Hitziger, I. Dellacasa, M. Svensson, and A. Barragan. 2006. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular microbiology*. 8:1611-1623.

Lambert, H., P.P. Vutova, W.C. Adams, K. Lore, and A. Barragan. 2009. The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infection and immunity*. 77:1679-1688.

Lee, Y.H., J.Y. Channon, T. Matsuura, J.D. Schwartzman, D.W. Shin, and L.H. Kasper. 1999. Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Experimental parasitology*. 91:212-221.

Lehmann, T., C.R. Blackston, S.F. Parmley, J.S. Remington, and J.P. Dubey. 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *The Journal of parasitology*. 86:960-971.

Lejeune, M., J.M. Miro, E. De Lazzari, F. Garcia, X. Claramonte, E. Martinez, E. Ribera, J. Arrizabalaga, J.R. Arribas, P. Domingo, E. Ferrer, M. Plana, M.E. Valls, D. Podzamczar, T. Pumarola, A. Jacquet, J. Mallolas, J.M. Gatell, T. Gallart, and G. Spanish *Toxoplasma gondii* Study. 2011. Restoration of T cell responses to *Toxoplasma gondii* after successful combined antiretroviral therapy in patients with AIDS with previous toxoplasmic encephalitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 52:662-670.

Lekutis, C., D.J. Ferguson, M.E. Grigg, M. Camps, and J.C. Boothroyd. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International journal for parasitology*. 31:1285-1292.

Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501.

Li, W., X.M. Yuan, A.G. Olsson, and U.T. Brunk. 1998. Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 18:177-184.

Li, Z., Z.J. Zhao, X.Q. Zhu, Q.S. Ren, F.F. Nie, J.M. Gao, X.J. Gao, T.B. Yang, W.L. Zhou, J.L. Shen, Y. Wang, F.L. Lu, X.G. Chen, G. Hide, F.J. Ayala, and Z.R. Lun. 2012. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PloS One*. 7:e35834.

Lieberman, L.A., and C.A. Hunter. 2002. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *International reviews of immunology*. 21:373-403.

Liesenfeld, O., J. Kosek, J.S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine*. 184:597-607.

Lim, W.S., J.M. Timmins, T.A. Seimon, A. Sadler, F.D. Kolodgie, R. Virmani, and I. Tabas. 2008. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress *In vitro* and in advanced atherosclerotic lesions *in vivo*. *Circulation*. 117:940-951.

Lindsten, T., A.J. Ross, A. King, W.X. Zong, J.C. Rathmell, H.A. Shiels, E. Ulrich, K.G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V.M. Eng, D.M. Adelman, M.C. Simon, A. Ma, J.A. Golden, G. Evan, S.J. Korsmeyer, G.R. MacGregor, and C.B. Thompson. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell*. 6:1389-1399.

- Ling, Y.M., M.H. Shaw, C. Ayala, I. Coppens, G.A. Taylor, D.J. Ferguson, and G.S. Yap. 2006. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 203:2063-2071.
- Liu, C.H., Y.T. Fan, A. Dias, L. Esper, R.A. Corn, A. Bafica, F.S. Machado, and J. Aliberti. 2006. Cutting edge: dendritic cells are essential for *in vivo* IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of immunology*. 177:31-35.
- Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86:147-157.
- Liu, Z.Y., R.K. Ganju, J.F. Wang, K. Schweitzer, B. Weksler, S. Avraham, and J.E. Groopman. 1997. Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood*. 90:2253-2259.
- Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104:487-501.
- Luder, C.G., C. Lang, M. Giraldo-Velasquez, M. Algnier, J. Gerdes, and U. Gross. 2003. *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *Journal of neuroimmunology*. 134:12-24.
- Luder, C.G., M. Giraldo-Velasquez, M. Sendtner, and U. Gross. 1999. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Experimental parasitology*. 93:23-32.
- Luder, C.G., U. Gross, and M.F. Lopes. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in parasitology*. 17:480-486.
- Lutjen, S., S. Soltek, S. Virna, M. Deckert, and D. Schluter. 2006. Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. *Infection and immunity*. 74:5790-5801.

Machado, F.S., J.E. Johndrow, L. Esper, A. Dias, A. Bafica, C.N. Serhan, and J. Aliberti. 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nature medicine*. 12:330-334.

Manger, I.D., A. Hehl, S. Parmley, L.D. Sibley, M. Marra, L. Hillier, R. Waterston, and J.C. Boothroyd. 1998. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infection and immunity*. 66:1632-1637.

Marin, M.C., A. Fernandez, R.J. Bick, S. Brisbay, L.M. Buja, M. Snuggs, D.J. McConkey, A.C. von Eschenbach, M.J. Keating, and T.J. McDonnell. 1996. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene*. 12:2259-2266.

Martens, S., I. Parvanova, J. Zerrahn, G. Griffiths, G. Schell, G. Reichmann, and J.C. Howard. 2005. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS pathogens*. 1:e24.

Martina, M.N., C. Cervera, N. Esforzado, L. Linares, V. Torregrosa, G. Sanclemente, I. Hoyo, F. Cofan, F. Oppenheimer, J.M. Miro, J.M. Campistol, and A. Moreno. 2011. *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 24:e6-12.

Martrou, P. 1964. [the Hospitalization of Children in Rural Areas]. *Pediatric*. 19:643-648.

Mashayekhi, M., M.M. Sandau, I.R. Dunay, E.M. Frickel, A. Khan, R.S. Goldszmid, A. Sher, H.L. Ploegh, T.L. Murphy, L.D. Sibley, and K.M. Murphy. 2011. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity*. 35:249-259.

Masson, D., and J. Tschopp. 1985. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 260:9069-9072.

- Mathai, J.P., M. Germain, and G.C. Shore. 2005. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 280:23829-23836.
- Matzer, S.P., T. Baumann, N.W. Lukacs, M. Rollinghoff, and H.U. Beuscher. 2001. Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein. *J Immunol*. 167:4635-4643.
- Maubon, D., A. Bougdour, Y.S. Wong, M.P. Brenier-Pinchart, A. Curt, M.A. Hakimi, and H. Pelloux. 2010. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on *Toxoplasma gondii*: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54:4843-4850.
- McAuley, J.B. 2008. Toxoplasmosis in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 27:161-162.
- McGeehan, G.M., J.D. Becherer, R.C. Bast, Jr., C.M. Boyer, B. Champion, K.M. Connolly, J.G. Conway, P. Furdon, S. Karp, S. Kidao, and et al. 1994. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*. 370:558-561.
- Medema, J.P., R.E. Toes, C. Scaffidi, T.S. Zheng, R.A. Flavell, C.J. Melief, M.E. Peter, R. Offringa, and P.H. Krammer. 1997. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *European journal of immunology*. 27:3492-3498.
- Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-258.
- Melo, M.B., P. Kasperkovitz, A. Cerny, S. Konen-Waisman, E.A. Kurt-Jones, E. Lien, B. Beutler, J.C. Howard, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2010. UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*. 6:e1001071.
- Melzer, T., A. Duffy, L.M. Weiss, and S.K. Halonen. 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for *Toxoplasma* vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infection and immunity*. 76:4883-4894.

Mennechet, F.J., L.H. Kasper, N. Rachinel, L.A. Minns, S. Luangsay, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *European journal of immunology*. 34:1059-1067.

Mennechet, F.J., L.H. Kasper, N. Rachinel, W. Li, A. Vandewalle, and D. Buzoni-Gatel. 2002. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *Journal of immunology*. 168:2988-2996.

Mercier, A., D. Ajzenberg, S. Devillard, M.P. Demar, B. de Thoisy, H. Bonnabau, F. Collinet, R. Boukhari, D. Blanchet, S. Simon, B. Carne, and M.L. Darde. 2011. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 11:1378-1387.

Mercier, A., S. Devillard, B. Ngoubangoye, H. Bonnabau, A.L. Banuls, P. Durand, B. Salle, D. Ajzenberg, and M.L. Darde. 2010. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS neglected tropical diseases*. 4:e876.

Mercier, C., K.D. Adjogble, W. Daubener, and M.F. Delauw. 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International journal for parasitology*. 35:829-849.

Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 114:181-190.

Mineo, J.R., R. McLeod, D. Mack, J. Smith, I.A. Khan, K.H. Ely, and L.H. Kasper. 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *Journal of immunology*. 150:3951-3964.

- Mital, J., M. Meissner, D. Soldati, and G.E. Ward. 2005. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Molecular biology of the cell*. 16:4341-4349.
- Mohamed, R.M., F. Aosai, M. Chen, H.S. Mun, K. Norose, U.S. Belal, L.X. Piao, and A. Yano. 2003. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*. 21:2852-2861.
- Molestina, R.E., T.M. Payne, I. Coppens, and A.P. Sinai. 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of cell science*. 116:4359-4371.
- Montel, A.H., M.R. Bochan, J.A. Hobbs, D.H. Lynch, and Z. Brahmi. 1995. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cellular immunology*. 166:236-246.
- Montoya, J.G. 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*. 185 Suppl 1:S73-82.
- Montoya, J.G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet*. 363:1965-1976.
- Montoya, J.G., L.F. Giraldo, B. Efron, E.B. Stinson, P. Gamberg, S. Hunt, N. Giannetti, J. Miller, and J.S. Remington. 2001. Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 33:629-640.
- Mordue, D.G., and L.D. Sibley. 2003. A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *Journal of leukocyte biology*. 74:1015-1025.
- Mordue, D.G., F. Monroy, M. La Regina, C.A. Dinarello, and L.D. Sibley. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal of immunology*. 167:4574-4584.

Morgado, P., Y.C. Ong, J.C. Boothroyd, and M.B. Lodoen. 2011. *Toxoplasma gondii* induces B7-2 expression through activation of JNK signal transduction. *Infection and immunity*. 79:4401-4412.

Morisset, S., F. Peyron, J.R. Lobry, J. Garweg, J. Ferrandiz, K. Musset, J.E. Gomez-Marin, A. de la Torre, M. Demar, B. Carne, C. Mercier, J.F. Garin, and M.F. Cesbron-Delauw. 2008. Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 10:742-747.

Naginei, C.N., B. Detrick, and J.J. Hooks. 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infection and immunity*. 68:407-410.

Nakao, M., and E. Konishi. 1991. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils *In vitro*. *Parasitology*. 103 Pt 1:23-27.

Nascimento, F.S., L.A. Suzuki, and C.L. Rossi. 2008. Assessment of the value of detecting specific IgA antibodies for the diagnosis of a recently acquired primary *Toxoplasma* infection. *Prenatal diagnosis*. 28:749-752.

Nash, P.B., M.B. Purner, R.P. Leon, P. Clarke, R.C. Duke, and T.J. Curiel. 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of immunology*. 160:1824-1830.

Nechushtan, A., C.L. Smith, I. Lamensdorf, S.H. Yoon, and R.J. Youle. 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of cell biology*. 153:1265-1276.

Nutt, L.K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D.J. McConkey, and S.G. Swisher. 2002. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *The Journal of biological chemistry*. 277:9219-9225.

Orlofsky, A., L.M. Weiss, N. Kawachi, and M.B. Prystowsky. 2002. Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *Journal of immunology*. 168:1840-1846.

Pappas, G., N. Roussos, and M.E. Falagas. 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International journal for parasitology*. 39:1385-1394.

Parker, S.J., C.W. Roberts, and J. Alexander. 1991. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clinical and experimental immunology*. 84:207-212.

Pastorino, J.G., S.T. Chen, M. Tafani, J.W. Snyder, and J.L. Farber. 1998. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*. 273:7770-7775.

Payne, T.M., R.E. Molestina, and A.P. Sinai. 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *Journal of cell science*. 116:4345-4358.

Pelloux, H., G. Pernod, B. Polack, E. Coursange, J. Ricard, J.M. Verna, and P. Ambroise-Thomas. 1996. Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitology research*. 82:598-603.

Pepper, M., F. Dzierzinski, E. Wilson, E. Tait, Q. Fang, F. Yarovinsky, T.M. Laufer, D. Roos, and C.A. Hunter. 2008. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. *Journal of immunology*. 180:6229-6236.

Perona-Wright, G., K. Mohrs, F.M. Szaba, L.W. Kummer, R. Madan, C.L. Karp, L.L. Johnson, S.T. Smiley, and M. Mohrs. 2009. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell host & microbe*. 6:503-512.

Persson, C.M., H. Lambert, P.P. Vutova, I. Dellacasa-Lindberg, J. Nederby, H. Yagita, H.G. Ljunggren, A. Grandien, A. Barragan, and B.J. Chambers. 2009. Transmission of *Toxoplasma gondii* from infected dendritic cells to natural killer cells. *Infection and immunity*. 77:970-976.

Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*. 202:8-32.

Peter, M.E., and P.H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation*. 10:26-35.

Petersen, E. 2007. Toxoplasmosis. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 12:214-223.

Petersen, E., A. Kijlstra, and M. Stanford. 2012. Epidemiology of ocular toxoplasmosis. *Ocular immunology and inflammation*. 20:68-75.

Peterson, P.K., G. Gekker, S. Hu, and C.C. Chao. 1995. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *The Journal of infectious diseases*. 171:516-518.

Peyron, F., J.G. Garweg, M. Wallon, E. Descloux, M. Rolland, and J. Barth. 2011. Long-term impact of treated congenital toxoplasmosis on quality of life and visual performance. *The Pediatric infectious disease journal*. 30:597-600.

Pfaff, A.W., A. de-la-Torre, E. Rochet, J. Brunet, M. Sabou, A. Sauer, T. Bourcier, J.E. Gomez-Marin, and E. Candolfi. 2014. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International journal for parasitology*. 44:99-107.

Pifer, R., A. Benson, C.R. Sturge, and F. Yarovinsky. 2011. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry*. 286:3307-3314.

Ploix, C.C., S. Noor, J. Crane, K. Masek, W. Carter, D.D. Lo, E.H. Wilson, and M.J. Carson. 2011. CNS-derived CCL21 is both sufficient to drive homeostatic CD4+ T cell proliferation

and necessary for efficient CD4⁺ T cell migration into the CNS parenchyma following *Toxoplasma gondii* infection. *Brain, behavior, and immunity*. 25:883-896.

Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, K. Maresz, J. Pedras-Vasconcelos, D. Verthelyi, and B.N. Dittel. 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 178:39-48.

Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, K. Maresz, J. Pedras-Vasconcelos, D. Verthelyi, and B.N. Dittel. 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 178:39-48.

Portillo, J.A., G. Okenka, E. Reed, A. Subauste, J. Van Grol, K. Gentil, M. Komatsu, K. Tanaka, G. Landreth, B. Levine, and C.S. Subauste. 2010. The CD40-autophagy pathway is needed for host protection despite IFN-Gamma-dependent immunity and CD40 induces autophagy via control of P21 levels. *PloS One*. 5:e14472.

Quan, J.H., G.H. Cha, W. Zhou, J.Q. Chu, Y. Nishikawa, and Y.H. Lee. 2013. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in *Toxoplasma gondii*-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Experimental parasitology*. 133:462-471.

Quan, L.T., M. Tewari, K. O'Rourke, V. Dixit, S.J. Snipas, G.G. Poirier, C. Ray, D.J. Pickup, and G.S. Salvesen. 1996. Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:1972-1976.

Quinn, P.J., and B.M. McCraw. 1972. Current status of *Toxoplasma* and toxoplasmosis: a review. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. 13:247-262.

Rabaud, C., T. May, C. Amiel, C. Katlama, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, and P. Canton. 1994. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey. *Medicine*. 73:306-314.

Rabaud, C., T. May, J.C. Lucet, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, and P. Canton. 1996. Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 23:1249-1254.

Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, C. Dutta, F.J. Mennechet, S. Luangsay, L.A. Minns, M.E. Grigg, S. Tomavo, J.C. Boothroyd, and L.H. Kasper. 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 173:2725-2735.

Rahman, A., and F. Fazal. 2009. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxidants & redox signaling*. 11:823-839.

Reese, M.L., G.M. Zeiner, J.P. Saeij, J.C. Boothroyd, and J.P. Boyle. 2011. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:9625-9630.

Reyes, J.L., L.I. Terrazas, B. Espinoza, D. Cruz-Robles, V. Soto, I. Rivera-Montoya, L. Gomez-Garcia, H. Snider, A.R. Satoskar, and M. Rodriguez-Sosa. 2006. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*. 74:3170-3179.

Robben, P.M., M. LaRegina, W.A. Kuziel, and L.D. Sibley. 2005. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *The Journal of experimental medicine*. 201:1761-1769.

Robert-Gangneux, F., and M.L. Darde. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 25:264-296.

Robert-Gangneux, F., J.B. Murat, H. Fricker-Hidalgo, M.P. Brenier-Pinchart, J.P. Gangneux, and H. Pelloux. 2011. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends in parasitology*. 27:530-536.

Roberts, F., M.B. Mets, D.J. Ferguson, R. O'Grady, C. O'Grady, P. Thulliez, A.P. Brezin, and R. McLeod. 2001. Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Archives of ophthalmology*. 119:51-58.

Robinson, S.A., J.E. Smith, and P.A. Millner. 2004. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): *In vitro* analysis of host cell binding. *Parasitology*. 128:391-396.

Rodriguez-Sosa, M., L.E. Rosas, J.R. David, R. Bojalil, A.R. Satoskar, and L.I. Terrazas. 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and immunity*. 71:1247-1254.

Roemer, E., I.W. Blau, N. Basara, M.G. Kiehl, M. Bischoff, S. Gunzelmann, D. Kirsten, H. Sanchez, E.L. Wocker, and A.A. Fauser. 2001. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 32:E1-8.

Rogers, N.M., C.A. Peh, R. Faull, M. Pannell, J. Cooper, and G.R. Russ. 2008. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 10:71-74.

Romani, L., F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chemical immunology*. 68:110-135.

Rong, Y., and C.W. Distelhorst. 2008. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annual review of physiology*. 70:73-91.

Roos, D.S., R.G. Donald, N.S. Morrisette, and A.L. Moulton. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods in cell biology*. 45:27-63.

Ross, R.A., B.A. Spengler, and J.L. Biedler. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 71:741-747.

Sabin, A.B and H.A. Feldman. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 108:660-663.

Sabin, A.B. 1941. The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group: (Appendix to Section on Classification and Nomenclature). *Bacteriological reviews*. 5:331-335.

Saeij, J.P., J.P. Boyle, and J.C. Boothroyd. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in parasitology*. 21:476-481.

Saeij, J.P., J.P. Boyle, S. Coller, S. Taylor, L.D. Sibley, E.T. Brooke-Powell, J.W. Ajioka, and J.C. Boothroyd. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*. 314:1780-1783.

Saeij, J.P., S. Coller, J.P. Boyle, M.E. Jerome, M.W. White, and J.C. Boothroyd. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. 445:324-327.

Saffer, L.D., and J.D. Schwartzman. 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *The Journal of protozoology*. 38:454-460.

Saikumar, P., M. Mikhailova, and S.L. Pandeswara. 2007. Regulation of caspase-9 activity by differential binding to the apoptosome complex. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 12:3343-3354.

Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391:96-99.

Satoskar, A.R., M. Bozza, M. Rodriguez Sosa, G. Lin, and J.R. David. 2001. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infection and immunity*. 69:906-911.

Sauer, A., A.W. Pfaff, O. Villard, C. Creuzot-Garcher, F. Dalle, C. Chiquet, H. Pelloux, C. Speeg-Schatz, D. Gaucher, G. Prevost, T. Bourcier, and E. Candolfi. 2012. Interleukin 17A as

an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *The Journal of infectious diseases*. 206:1319-1329.

Sauer, A., A.W. Pfaff, O. Villard, C. Creuzot-Garcher, F. Dalle, C. Chiquet, H. Pelloux, C. Speeg-Schatz, D. Gaucher, G. Prevost, T. Bourcier, and E. Candolfi. 2012. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *The Journal of infectious diseases*. 206:1319-1329.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*. 17:1675-1687.

Scanga, C.A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E.Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *Journal of immunology*. 168:5997-6001.

Schaeffer, M., S.J. Han, T. Chtanova, G.G. van Dooren, P. Herzmark, Y. Chen, B. Roysam, B. Striepen, and E.A. Robey. 2009. Dynamic imaging of T cell-parasite interactions in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 182:6379-6393.

Scharton-Kersten, T.M., T.A. Wynn, E.Y. Denkers, S. Bala, E. Grunvald, S. Hieny, R.T. Gazzinelli, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of immunology*. 157:4045-4054.

Schluter, D., M. Deckert, H. Hof, and K. Frei. 2001. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. *Infection and immunity*. 69:7889-7893.

Schreiber, R.D., and H.A. Feldman. 1980. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *The Journal of infectious diseases*. 141:366-369.

Schroeder, J., H.A. McGachy, S. Woods, R. Plevin, and J. Alexander. 2013. T cell hyporesponsiveness against *Leishmania major* in MAP kinase phosphatase (MKP) 2 deficient C57BL/6 mice does not alter the healer disease phenotype. *PLoS neglected tropical diseases*. 7:e2064.

Schuindt, S.H., B.C. Oliveira, P.M. Pimentel, T.L. Resende, C.A. Retamal, R.A. DaMatta, D. Seipel, and A.C. Arnholdt. 2012. Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Veterinary parasitology*. 186:207-215.

Schulthess, J., B. Meresse, E. Ramiro-Puig, N. Montcuquet, S. Darche, B. Begue, F. Ruemmele, C. Combadiere, J.P. Di Santo, D. Buzoni-Gatel, and N. Cerf-Bensussan. 2012. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 37:108-121.

Schulz, O., A.D. Edwards, M. Schito, J. Aliberti, S. Manickasingham, A. Sher, and C. Reis e Sousa. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells *In vivo* requires a microbial priming signal. *Immunity*. 13:453-462.

Schutze, S., V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:655-662.

Schweitzer, C.M., C.E. van der Schoot, A.M. Drager, P. van der Valk, A. Zevenbergen, B. Hooibrink, A.H. Westra, and M.M. Langenhuijsen. 1995. Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells. *Experimental hematology*. 23:41-48.

Schweitzer, K.M., P. Vicart, C. Delouis, D. Paulin, A.M. Drager, M.M. Langenhuijsen, and B.B. Weksler. 1997. Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human

umbilical vein endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 76:25-36.

Sedger, L.M., D.M. Shows, R.A. Blanton, J.J. Peschon, R.G. Goodwin, D. Cosman, and S.R. Wiley. 1999. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *Journal of immunology.* 163:920-926.

Seguin, R., and L.H. Kasper. 1999. Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases.* 179:467-474.

Shapira, S., K. Speirs, A. Gerstein, J. Caamano, and C.A. Hunter. 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases.* 185 Suppl 1:S66-72.

Sharif-Askari, E., A. Alam, E. Rheaume, P.J. Beresford, C. Scotto, K. Sharma, D. Lee, W.E. DeWolf, M.E. Nuttall, J. Lieberman, and R.P. Sekaly. 2001. Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *The EMBO journal.* 20:3101-3113.

Sharma, P., and C.E. Chitnis. 2013. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Current opinion in microbiology.* 16:432-437.

Sharp, D.A., D.A. Lawrence, and A. Ashkenazi. 2005. Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry.* 280:19401-19409.

Shen DF, Matteson DM, Tuaille N, Suedekum BK, Buggage RR, et al. (2001) Involvement of apoptosis and interferon-gamma in murine toxoplasmosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2031-2036.

Shen, D.F., D.M. Matteson, N. Tuaille, B.K. Suedekum, R.R. Buggage, and C.C. Chan. 2001. Involvement of apoptosis and interferon-gamma in murine toxoplasmosis. *Investigative ophthalmology & visual science.* 42:2031-2036.

Shibuya, K., D. Robinson, F. Zonin, S.B. Hartley, S.E. Macatonia, C. Somoza, C.A. Hunter, K.M. Murphy, and A. O'Garra. 1998. IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J Immunol.* 160:1708-1716.

Sibley, L.D. 2010. How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current opinion in biotechnology.* 21:592-598.

Sibley, L.D., and J.C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359:82-85.

Sibley, L.D., and J.W. Ajioka. 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual review of microbiology.* 62:329-351.

Sibley, L.D., I.R. Niesman, S.F. Parmley, and M.F. Cesbron-Delauw. 1995. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science.* 108 (Pt 4):1669-1677.

Sinai, A.P., and K.A. Joiner. 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology.* 154:95-108.

Sinai, A.P., P. Webster, and K.A. Joiner. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of cell science.* 110 (Pt 17):2117-2128.

Skariah, S., M.K. McIntyre, and D.G. Mordue. 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology research.* 107:253-260.

Soete, M., D. Camus, and J.F. Dubremetz. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *In vitro*. *Experimental parasitology.* 78:361-370.

Song, K.J., H.J. Ahn, and H.W. Nam. 2012. Anti-apoptotic effects of SERPIN B3 and B4 via STAT6 activation in macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. The Korean journal of parasitology. 50:1-6.

Spector, M.S., S. Desnoyers, D.J. Hoepfner, and M.O. Hengartner. 1997. Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED-4. Nature. 385:653-656.

Sprick, M.R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M.A. Weigand, and H. Walczak. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. The EMBO journal. 21:4520-4530.

Squier, M.K., A.J. Sehnert, K.S. Sellins, A.M. Malkinson, E. Takano, and J.J. Cohen. 1999. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. Journal of cellular physiology. 178:311-319.

Stacey, M.A., M. Marsden, N.T. Pham, S. Clare, G. Dolton, G. Stack, E. Jones, P. Klenerman, A.M. Gallimore, P.R. Taylor, R.J. Snelgrove, T.D. Lawley, G. Dougan, C.A. Benedict, S.A. Jones, G.W. Wilkinson, and I.R. Humphreys. 2014. Neutrophils Recruited by IL-22 in Peripheral Tissues Function as TRAIL-Dependent Antiviral Effectors against MCMV. Cell host & microbe. 15:471-483.

Stavitsky, A.B., C. Metz, S. Liu, J. Xianli, and R. Bucala. 2003. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Schistosoma japonicum-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. Parasite immunology. 25:369-374.

Stehlik, C., R. de Martin, B.R. Binder, and J. Lipp. 1998. Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF-kappa B. Biochemical and biophysical research communications. 243:827-832.

Sternberg, E.M. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. Nature reviews. Immunology. 6:318-328.

Stoka, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.M. Yin, V.

Turk, and G.S. Salvesen. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *The Journal of biological chemistry*. 276:3149-3157.

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

Su, C., A. Khan, P. Zhou, D. Majumdar, D. Ajzenberg, M.L. Darde, X.Q. Zhu, J.W. Ajioka, B.M. Rosenthal, J.P. Dubey, and L.D. Sibley. 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:5844-5849.

Su, C., X. Zhang, and J.P. Dubey. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International journal for parasitology*. 36:841-848.

Subauste, C.S., and J.S. Remington. 1993. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in immunology*. 5:532-537.

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

Subauste, C.S., L. Dawson, and J.S. Remington. 1992. Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine*. 176:1511-1519.

Sullivan, W.J., Jr., and V. Jeffers. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS microbiology reviews*. 36:717-733.

Sumyuen, M.H., Y.J. Garin, and F. Derouin. 1995. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *The Journal of parasitology*. 81:327-329.

Sun, M., L. Song, Y. Li, T. Zhou, and R.S. Jope. 2008. Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell death and differentiation*. 15:1887-1900.

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

Suzuki, Y., and J.S. Remington. 1993. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Research in immunology*. 144:66-67.

Suzuki, Y., J. Claflin, X. Wang, A. Lengi, and T. Kikuchi. 2005. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 35:83-90.

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

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

Suzuki, Y., S. Rani, O. Liesenfeld, T. Kojima, S. Lim, T.A. Nguyen, S.A. Dalrymple, R. Murray, and J.S. Remington. 1997. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infection and immunity*. 65:2339-2345.

Tait, E.D., K.A. Jordan, C.D. Dupont, T.H. Harris, B. Gregg, E.H. Wilson, M. Pepper, F. Dzierszynski, D.S. Roos, and C.A. Hunter. 2010. Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 185:1502-1512.

Takahashi J, Fukuda T, Tanaka J, Minamitani M, Onouchi K, et al. (2001) Bax-induced apoptosis not demonstrated in the congenital toxoplasmosis in mice. *Brain Dev* 23: 50-53.

Takahashi, J., T. Fukuda, J. Tanaka, M. Minamitani, K. Onouchi, and A. Makioka. 2001. Bax-induced apoptosis not demonstrated in the congenital toxoplasmosis in mice. *Brain & development*. 23:50-53.

Tang, G., Y. Minemoto, B. Dibling, N.H. Purcell, Z. Li, M. Karin, and A. Lin. 2001. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*. 414:313-317.

Taylor, S., A. Barragan, C. Su, B. Fux, S.J. Fentress, K. Tang, W.L. Beatty, H.E. Hajj, M. Jerome, M.S. Behnke, M. White, J.C. Wootton, and L.D. Sibley. 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. 314:1776-1780.

Tenter, A.M., A.R. Heckeroth, and L.M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*. 30:1217-1258.

Terebuh, P.D., I.G. Otterness, R.M. Strieter, P.M. Lincoln, J.M. Danforth, S.L. Kunkel, and S.W. Chensue. 1992. Biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-6 expression *In vivo*. Constitutive and induced expression in murine polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. *The American journal of pathology*. 140:649-657.

Terrazas, C.A., I. Juarez, L.I. Terrazas, R. Saavedra, E.A. Calleja, and M. Rodriguez-Sosa. 2010. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. *Experimental parasitology*. 126:348-358.

Thyrell, L., S. Erickson, B. Zhivotovsky, K. Pokrovskaja, O. Sangfelt, J. Castro, S. Einhorn, and D. Grander. 2002. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene*. 21:1251-1262.

- Tomita, T., T. Yamada, L.M. Weiss, and A. Orlofsky. 2009. Externally triggered egress is the major fate of *Toxoplasma gondii* during acute infection. *Journal of immunology*. 183:6667-6680.
- Torres, M., R. Guiton, S. Lacroix-Lamande, B. Ryffel, S. Leman, and I. Dimier-Poisson. 2013. MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of neuroinflammation*. 10:19.
- Truckenmiller, M.E., M.F. Princiotta, C.C. Norbury, and R.H. Bonneau. 2005. Corticosterone impairs MHC class I antigen presentation by dendritic cells via reduction of peptide generation. *Journal of neuroimmunology*. 160:48-60.
- Tsujimoto, Y., and S. Shimizu. 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell death and differentiation*. 7:1174-1181.
- Venturi, G.M., L. Tu, T. Kadono, A.I. Khan, Y. Fujimoto, P. Oshel, C.B. Bock, A.S. Miller, R.M. Albrecht, P. Kubes, D.A. Steeber, and T.F. Tedder. 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*. 19:713-724.
- Vutova, P., M. Wirth, D. Hippe, U. Gross, K. Schulze-Osthoff, I. Schmitz, and C.G. Luder. 2007. *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cellular microbiology*. 9:1556-1570.
- Wagage, S., B. John, B.L. Krock, A.O. Hall, L.M. Randall, C.L. Karp, M.C. Simon, and C.A. Hunter. 2014. The Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Production by NK Cells. *Journal of immunology*. 192:1661-1670.
- Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.S. Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 281:1680-1683.
- Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F.K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J.M. Puck, S.E. Straus, and M.J. Lenardo. 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective

lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 98:47-58.

Wang, T., J. Zhou, X. Gan, H. Wang, X. Ding, L. Chen, Y. Wang, J. Du, J. Shen, and L. Yu. 2014. *Toxoplasma gondii* induce apoptosis of neural stem cells via endoplasmic reticulum stress pathway. *Parasitology*. 141:988-995.

Wang, X., and Y. Suzuki. 2007. Microglia produce IFN-gamma independently from T cells during acute toxoplasmosis in the brain. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 27:599-605

Wang, X., H. Kang, T. Kikuchi, and Y. Suzuki. 2004. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. *Infection and immunity*. 72:4432-4438.

Wang, X.Q., and W.A. Frazier. 1998. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell*. 9:865-874.

Wastling, J.M., S. Nicoll, and D. Buxton. 1993. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *Journal of medical microbiology*. 38:360-365.

Weight, C.M., and S.R. Carding. 2012. The protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1258:135-142.

Whitmarsh, R.J., C.M. Gray, B. Gregg, D.A. Christian, M.J. May, P.J. Murray, and C.A. Hunter. 2011. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell host & microbe*. 10:224-236.

- Wilson, E.H., U. Wille-Reece, F. Dzierszynski, and C.A. Hunter. 2005. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *Journal of neuroimmunology*. 165:63-74.
- Wolf, B.B., J.C. Goldstein, H.R. Stennicke, H. Beere, G.P. Amarante-Mendes, G.S. Salvesen, and D.R. Green. 1999. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*. 94:1683-1692.
- Wood, D.E., A. Thomas, L.A. Devi, Y. Berman, R.C. Beavis, J.C. Reed, and E.W. Newcomb. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 17:1069-1078.
- Wu, G.S., P. Saftig, C. Peters, and W.S. El-Deiry. 1998. Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene*. 16:2177-2183.
- Xiao, J., L. Jones-Brando, C.C. Talbot, Jr., and R.H. Yolken. 2011. Differential effects of three canonical *Toxoplasma* strains on gene expression in human neuroepithelial cells. *Infection and immunity*. 79:1363-1373.
- Yamada, T., T. Tomita, L.M. Weiss, and A. Orlofsky. 2011. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. *International journal for parasitology*. 41:595-607.
- Yamamoto, M., and K. Takeda. 2012. Inhibition of ATF6beta-dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence*. 3:77-80.
- Yap, G., M. Pesin, and A. Sher. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology*. 165:628-631.
- Yap, G.S., and A. Sher. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology*. 201:240-247.

Yarovinsky, F. 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Nature reviews. Immunology. 14:109-121.

Yarovinsky, F., D. Zhang, J.F. Andersen, G.L. Bannenberg, C.N. Serhan, M.S. Hayden, S. Hieny, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science. 308:1626-1629.

Yarovinsky, F., H. Kanzler, S. Hieny, R.L. Coffman, and A. Sher. 2006. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. Immunity. 25:655-664.

Ye, P., F.H. Rodriguez, S. Kanaly, K.L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J.E. Shellito, G.J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J.J. Peschon, and J.K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. The Journal of experimental medicine. 194:519-527.

Yenari, M.A., and R.M. Sapolsky. 2005. Gene therapy in neurological disease. Methods in molecular medicine. 104:75-88.

Zhang, M., L. Zhao, J. Song, Y. Li, Q. Zhao, S. He, and H. Cong. 2013. DNA vaccine encoding the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific surface antigens SAG2CDX protect BALB/c mice against type II parasite infection. Vaccine. 31:4536-4540.

Zhao, Y., D.J. Ferguson, D.C. Wilson, J.C. Howard, L.D. Sibley, and G.S. Yap. 2009. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. Journal of immunology. 182:3775-3781.

Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1:cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. The Journal of biological chemistry. 274:11549-11556.

Pages internet consultées et citées

ZooChat : <http://www.zoochat.com/160/common-gundi-ctenodactylus-gundi-229099/> .
22.01.2014.

http://www.phsource.us/PH/HELM/PH_Parasites/toxoplasmosis.htm. 22.01.2014.

<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/7UnfoldedProtResp/1UnfoldedProtResp.htm>; 25.02.2014.

B Blondel, A Autret, S Martin-Latil, L Mousson, I Pelletier, T Couderc, F Colbère-Garapin
(2009) Polivirus et apoptose.

http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/vir/edocs/00/04/17/FC/article.phtml?fichier=images.htm. 27.03.2014.

Livre consulté et cité

Afssa (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (Décembre 2005).

Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation.