HAL
open science

Subversion de la réponse immune de l'hôte par Toxoplasma gondii

Gabrielle Gay

To cite this version:

Gabrielle Gay. Subversion de la réponse immune de l'hôte par Toxoplasma gondii. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV029 . tel-02006607

HAL Id: tel-02006607

https://theses.hal.science/tel-02006607

Submitted on 4 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Gabrielle GAY

Thèse dirigée par **Mohamed-Ali HAKIMI, DR, Inserm**
codirigée par **Laurence BRAUN, CR, CNRS**

préparée au sein du **groupe « Interaction hôte-pathogène et immunité des infections », IAB, UMR 5309**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Subversion de la réponse immune de l'hôte par *Toxoplasma gondii*

Thèse soutenue publiquement le **14 novembre 2018**,
devant le jury composé de :

Dr. Isabelle TARDIEUX
Directrice de recherche à l'INSERM, Grenoble, Présidente du jury
Dr. Dominique SOLDATI-FAVRE
Professeure à l'Université de Genève, Rapportrice
Dr. Stéphanie HUGUES
Assistante-professeure à l'Université de Genève, Rapportrice
Dr. Thomas HENRY
Directeur de recherche à l'INSERM, Lyon, Examinateur
Dr. Mohamed-Ali HAKIMI
Directeur de recherche à l'INSERM, Grenoble, Directeur de thèse

A mes deux grand-mères, ma grande-tante, et ma marraine

qui n'ont pas pu me voir finir cette thèse.

Mais parce qu'il ne faut pas vivre dans le passé,

et parce que les enfants sont notre avenir,

je dédie cette thèse à ma filleule, ma petite Célia.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier chaleureusement, Isabelle Tardieux, Dominique Soldati-Favre, Stéphanie Hugues, et Thomas Henry, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Vous compter dans mon jury de thèse est un véritable honneur.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon comité de thèse, Thierry Lagrange, et Rogerio Amino, qui m'ont prodigué de nombreux conseils au cours de ces années.

Ce travail de thèse porte mon nom mais rien n'aurait été possible seule. Ainsi, je voudrais exprimer toute ma gratitude à l'ensemble de l'équipe de Mohamed-Ali Hakimi pour son soutien à mon égard. Chacun des membres a joué un rôle dans mon développement professionnel et personnel. J'inclus évidemment ici l'équipe d'Isabelle Tardieux, qui a également été présente durant ces années. J'ai une attention particulière pour Isabelle, qui a toujours été très disponible, et toujours souriante. Je suis très fière que tu aies accepté la présidence de mon jury.

Je souhaite plus particulièrement remercier Laurence, Alexandre et Dominique, que je n'ai cessé de harceler avec mes questions, et qui ont toujours pris le temps de me répondre, en particulier Laurence pendant ma première année. Quelle abnégation ! Un grand merci également à Marie-Pierre, dont la bienveillance et la gentillesse ont su m'épauler dans les moments difficiles. Dans le même bureau, je remercie également Valéria et Christopher, qui ont été d'un grand soutien pour la fin, toujours le sourire aux lèvres !

Merci également à Céline, toujours d'humeur égale, toujours bienveillante, toujours prompte à me soutenir. Cette fin d'année fut éprouvante pour nous deux, et nos discussions entre deux paragraphes ont été d'un grand secours! Dans la même veine, je remercie particulièrement Dayana, qui a été d'une aide incommensurable depuis ma deuxième année, merci, mille fois.

Je finirai le tour du labo avec mon directeur de thèse, Ali. Un vrai gentil sous ses airs de méchant ! Plus sérieusement, merci de m'avoir donné la chance de travailler dans ce labo, j'ai appris bien plus que ce à quoi je m'attendais. Tu m'as donné quelque chose d'unique et de précieux : en me donnant ta confiance, tu m'as donné à nouveau une confiance en moi, perdue depuis longtemps. Merci également pour ta patience, ta grande bienveillance et ton empathie à mon égard et durant les moments difficiles. Et puis du coup, un grand merci à Fabien et

Souad, qui m'ont littéralement poussé à passer la porte pour postuler ! Sans eux, je ne sais pas si j'aurais osé, malgré mon intérêt pour cette équipe !

La vie ne s'arrête pas au labo, et je voudrais donc remercier ma famille et mes amis, ceux qui sont présents à ma soutenance, et ceux qui n'ont pas pu venir. Je pense notamment à ma « presque belle-famille », Chantal, Joël, et Emile, qui est un vrai grand-père de substitution pour moi. J'inclus également Enrick, mon « presque beauf' » ; à vous tous qui m'avez soutenu depuis le début, merci.

Ma famille n'est pas grande, mais elle est précieuse. Aussi je voudrais remercier Sylvianne, Gilles, Pierrick, Jacques, Marianne. Je souhaite aussi remercier mes parents, pour qui j'ai une affection immense. Merci de m'avoir soutenue toutes ces années, avec leurs hauts et leurs bas, de m'avoir supportée, moi et mon caractère. Le petit pot de poivre a finalement réussi !

A qui pouvais-je dédier le mot de la fin sinon à toi, mon Christopher ? Voilà plus de 4 ans que tu es présent chaque jour à mes côtés, et ton soutien m'a permis de traverser toutes les épreuves. Dans ce milieu, tu es le premier à avoir eu confiance en moi, le premier à avoir cru que je pouvais le faire. Ton soutien durant ces 3 ans a été total, et surtout pendant ma première année de thèse, qui a démarré à toute allure ! J'ai la chance de t'avoir eu à mes côtés, toi et ton esprit scientifique, à discuter de science des heures durant, ce qui m'a permis d'avancer d'avantage. Ensemble, nous allons plus loin jours après jours.

Et bien sûr….. CHAMPIONS DU MOOOONDE !!!!!!!!!!

TABLE DES MATIERES

Résumés 10
Liste des abréviations : 12
INTRODUCTION 15
1. Les agents infectieux 15
1.1. Notions et importance des pathogènes 15
1.2. Stratégies de survie 16
1.3. Co-évolution hôte-pathogène 17
2. *Toxoplasma gondii* 18
2.1. Découverte et présentation générale 18
2.2. Cycle biologique 19
2.3. La toxoplasmose 21
2.4. Diversité génétique et structure des populations 25
2.5. Biologie de *Toxoplasma gondii* 31
3. Réponse immune à *Toxoplasma gondii* 35
3.1. Site d'infection 35
3.2. Contrôle de l'inflammation au point d'infection 42
3.3. Dissémination du parasite 45
3.4. Surveillance immunitaire durant la phase chronique 46
4. Déterminants pathogéniques du parasite 47
4.1. Les différents modèles d'étude 47
4.2. Les effecteurs du parasite 49
4.3. Sécrétion des protéines effectrices 57
5. Ciblage de la voie STAT1 par *Toxoplasma gondii* 60
5.1. Fonctionnement de la voie 60
5.2. Blocage de la voie par *Toxoplasma gondii* 64
RESULTATS 67
1. Introduction au papier 67
2. Résumé de l'article 68
3. Contribution aux travaux 69
4. Article 69
5. Résultats complémentaires sur TgIST 90
5.1. L'export de TgIST nécessite la protéine MYR1 90
5.2. TgIST instaure la résistance à l'IFNγ chez *Neospora caninum* 91

5.3. Dissection fonctionnelle de TgIST 93
5.4. Le NLS de TgIST semble jouer un rôle dans l'export au noyau 94
5.5. La répression d'*IRF1* semble nécessiter la forme TgIST C755 95
5.6. Mécanisme de répression dépendant de TgIST 97
5.7. Effet de TgIST dans le contexte génétique de la COUG 99
DISCUSSION 111
1. Le contrôle de l'IFNγ, une étape nécessaire à l'interaction équilibrée entre l'hôte et le pathogène 111
2. Les effecteurs, divers modes d'action pour contrôler l'hôte 122
3. TgIST, un mode d'action unique 124
MATERIEL ET METHODE 135
1. Souches parasitaires et lignées cellulaires 135
1.1. Les parasites 135
1.2. Les cellules hôtes 135
2. Construction des souches 136
2.1. Les vecteurs 136
2.2. Transfection transitoire 141
2.3. Transfection stable 142
3. Les techniques 143
3.1. Extraction d'ADN génomique 143
3.2. Traitement aux HDACi 143
3.3. Immunofluorescence 144
3.4. Quantification de fluorescence 144
3.5. Les RTqPCR 145
Bibliographie 148
Annexes 174

Résumés

Une caractéristique majeure de l'infection par *Toxoplasma gondii* est le contrôle rapide de la population parasitaire par une réponse immunitaire engageant des cellules résidentes et recrutées ainsi que des cytokines pro- et anti-inflammatoire. Dans ce contexte, l'IFNγ active une multitude d'activité anti- *T. gondii* des cellules immunes et non-immunes, mais peut aussi contribuer à l'immunopathologie. *T. gondii* a élaboré des mécanismes pour contrer les défenses de l'hôte en interférant avec la transcription des gènes stimulés par l'IFNγ. Nous avons identifié TgIST (*T. gondii* inhibitor of STAT1 transcriptional activity) comme un interrupteur moléculaire exporté par les parasites intracellulaires et qui est localisé dans le noyau des cellules hôtes, où il inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires dépendants de STAT1. Nous avons montré que TgIST séquestre STAT1 à des sites spécifiques, et promeut la formation de chromatine non permissive grâce à sa capacité à recruter le remodeleur chromatinien NuRD. Nous avons montré que durant l'infection aiguë en souris, les parasites déficients pour TgIST sont rapidement éliminés par les monocytes pro-inflammatoires GR1+, ce qui montre le rôle protecteur de TgIST contre les défenses médiées par l'IFNγ. En révélant les fonctions de TgIST, cette étude montre de nouvelles évidences sur la façon dont *T.gondii* a élaboré une arme moléculaire de choix pour prendre le contrôle sur la réponse immune, de façon à promouvoir le parasitisme à long terme

An early hallmark of *Toxoplasma gondii* infection is the rapid control of the parasite population by a potent multifaceted innate immune response that engages resident and homing immune cells along with pro- and counter-inflammatory cytokines. In this context, IFN-γ activates a variety of *T. gondii*–targeting activities in immune and nonimmune cells but can also con- tribute to host immune pathology. *T. gondii* has evolved mechanisms to timely counteract the host IFN-γ defenses by interfering with the transcription of IFN-γ–stimulated genes. We now have identified TgIST (*T. gondii* inhibitor of STAT1 transcriptional activity) as a critical molecular switch that is secreted by intracellular parasites and traffics to the host cell nucleus where it inhibits STAT1-dependent proinflammatory gene expression. We show that TgIST not only sequesters STAT1 on dedicated loci but also promotes shaping of a nonpermissive chromatin through its capacity to recruit the nucleosome remodeling deacetylase (NuRD) transcriptional repressor. We found that during mice acute infection, TgIST-deficient parasites are rapidly eliminated by the homing Gr1+ inflammatory monocytes, thus highlighting the protective role of TgIST against IFN-γ–mediated killing. By uncovering TgIST functions, this study brings novel evidence on how *T. gondii* has devised a molecular weapon of choice to take control over a ubiquitous immune gene expression mechanism in metazoans, as a way to promote long-term parasitism.

Liste des abréviations :

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

CCR2 : C-C chemokine receptor type 2

CD: cluster de différenciation

ChIP: chromatin immunoprecipitation

CMHII : complexe majeur d'histocompatibilité II

DAMPs: damages-associated molecular pattern

DC : cellules dendritiques

DMSO: dimethyl solfoxide

GAS : gamma activted sequence

GBP : guanylate binding protein

GDP : Guanosine diphosphate

GRA: dense granule protein

GTP :guanosine triphosphate

HAUSP : Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease

HDAC: histone deacetylase

HDACi: inhibiteurs d'histone deacetylase

HFF: human foreskin fibroblast

IDO : indoleamine 2,3 dioxygenase

IFNβ: interferon bêta

IFNγ : interféron gamma

IL: interleukine

IMC: complexe membranaire interne

IRF: interferon regulatory factor

iNOS: inducible Nitric oxide synthase

IRG : immunity related GTPases

LPS : lipopolyssacharide

LRV1 : *Leishmania* RNA virus 1

LT : lymphocytes T

MAIT : Mucosal-Associated Invariant T

Mb : mégabases

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1

MEF: mouse ear fibroblast

Myd88: myeloid differenciation primary response 88

NET : neutrophil extracellular traps

NFAT4 : nuclear factor of activated T cells 4

NK : cellules Natural Killer

NLS : nuclear localisation signal

NO: nitric oxide

PAMPs : pathogen-associated molecular pattern

PCR : polymerase chain reaction

PIAS: protein inhibitor of activated STAT

PVM: membrane de la vacuole parasitophore

QTL : quantitative trait locus

RFLP : restricted fragment length polymorphism

RON: rhoptry neck protein

ROP: rhoptry protein

ROS : reactive oxygen species

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SH2: Src homology domain 2

SNP: spolymorphismes nucléotidiques

SOCS: suppressor of cytokine signaling

STAT: signal transducer and activator of transcription

TEXEL: *Toxoplasma* export element

TLR: toll like receptor

Treg : lymphocytes T régulateur

TSA: trichostastin

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

1. Les agents infectieux

1.1. Notions et importance des pathogènes

Chaque année, les maladies infectieuses sont responsables d'une grande mortalité dans le monde, notamment à cause de la résistance microbienne aux thérapies existantes (Martens and Demain, 2017; 2014). Si cette mortalité tend à baisser dans les pays occidentaux où l'accès au soin est élevé, la mortalité dans les pays moins aisés est très élevée, notamment chez les enfants (mathers et al 2008). En France, les mesures d'hygiène et les avancées dans la vaccination ont permis de fortement réduire l'impact des maladies infectieuses. Malgré cela, elles sont encore la troisième cause de mortalité en France. Les agents infectieux qui en sont responsables appartiennent à divers groupes : les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons par exemple.

Tous les règnes possèdent des micro-organismes pathogènes. Par exemple, il y existe des parasites de plantes appelés phytopathogènes, ayant des impacts économiques importants sur l'agriculture. Les plantes ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif, qui existe uniquement chez les vertébrés. En revanche un système immunitaire inné existe et se base sur la perception des pathogènes via leurs motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (Bent and Mackey, 2007; Boller and Felix, 2009), tout comme chez les animaux. Certains phytopathogènes possèdent un arsenal de protéines qui sont injectées dans les cellules eucaryotes de l'hôte afin d'influencer l'expression des gènes de l'hôte, et ainsi favoriser sa colonisation et sa susceptibilité, permettant l'infection (Canonne and Rivas, 2012; Doyle et al., 2013; Scholze and Boch, 2011).

Il existe également des pathogènes de micro-organismes, avec par exemple certaines souches du parasite de la leishmaniose qui sont infectées par un virus, *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) (Tarr et al., 1988). Ce virus est présent chez certaines espèces de *Leishmania* d'Amérique du sud, et arbore une diversité génétique importante. De plus, une étude récente a démontré que la présence du virus dans le pathogène du genre *Leishmania* a un impact sur sa virulence (Tirera et al., 2017).

Un autre exemple venant du monde procaryote peut être donné, avec certains virus appelés phages ou bactériophages, capables d'envahir et d'infecter les bactéries. Le phage T4 est parmi les phages les plus étudiés à l'heure actuelle (Miller et al., 2003). Il se réplique spécifiquement dans la bactérie *Escherichia coli.* De par leur capacité de lyse de bactéries spécifiques, les phages sont de plus en plus étudiés comme thérapies potentielles, et des essais thérapeutiques chez l'Homme sont en cours dans divers pays du monde.

Les interactions de micro-organismes avec leurs hôtes sont parfois bénéfiques pour ceux-ci. Un des exemples de cela est la flore commensale microbienne présente au niveau de divers organes, notamment dans l'intestin. Une grande diversité de micro-organismes est présente à ce niveau, avec des virus, des bactéries et des protistes. L'aspect bénéfique de cette interaction réside dans l'aide à la digestion de certains composés par la flore. Afin de ne pas induire de colonisation délétère et d'infection, la flore microbienne présente doit être tolérée par l'hôte, mais également contrôlée. Le contrôle de cette flore microbienne s'effectue en partie grâce à la présence dans les muqueuses des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T), une catégorie de lymphocytes T non-conventionnels capables de reconnaitre les dérivés vitaminiques produits par le microbiote intestinal (Meermeier et al., 2018).

La diversité de pathogènes existants est considérable, et nous allons donc nous concentrer sur les pathogènes humains dans la suite de cette introduction.

1.2. Stratégies de survie

D'un point de vue évolutif, le but d'un pathogène est d'assurer la survie de son espèce. Pour cela, ceux-ci vont devoir contrecarrer le système immunitaire, afin de pouvoir établir une infection, puis selon les cycles biologiques divers, élaborer des stratégies pour une transmission entre hôtes.

Concernant les micro-organismes intracellulaires, plusieurs stratégies sont employées. La plupart des bactéries intracellulaires se répliquent dans les cellules phagocytaires, comme *Francisella tularensis*, un des micro-organismes les plus virulents connus à ce jour, qui est capable d'échapper à la destruction par les macrophages par évasion du phagosome. Ces bactéries se divisent ensuite dans le compartiment cytosolique. Cette étape d'évasion est primordiale pour la pathogénicité et la virulence de ces bactéries, responsables de la tularémie (Chong et al., 2008). Cet exemple illustre la nécessité pour les pathogènes de rejoindre leur niche réplicative (reconnaissance et phagocytose de la bactérie), mais aussi l'échappement à la destruction par la réponse immunitaire. Récemment, une étude a démontré que le pathogène *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie à croissance extracellulaire, peut survivre à sa phagocytose par les macrophages. Dans la vacuole phagocytaire, la présence de lysozyme permet la digestion du peptidoglycane des bactéries, qui se retrouvent alors sous forme dite L. Malgré cette déplétion, la bactérie est capable de survivre dans le phagolysosome, de se multiplier, puis de lyser le phagocyte, entrainant un relargage important de bactéries. Celles-ci sont donc résistantes à la phagocytose, mais aussi résistantes aux antibiotiques sous leur forme L (Kawai et al., 2018), à cause de l'absence du peptidoglycane de ces bactéries. *In vivo*, il a été suggéré que ce mécanisme permettait à la bactérie de

disposer d'un réservoir, et de provoquer une septicémie (Ercoli et al., 2018), malgré la présence d'antibiotiques.

Une autre stratégie cruciale pour la survie du pathogène est sa persistance sous forme chronique. La bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose chez l'Homme, est capable d'éviter l'élimination totale par le système immunitaire, et de rester dans l'hôte pour de potentielles transmissions pendant plusieurs années (Nathan, 2009). Cette stratégie est employée par divers pathogènes, et entre autres par le parasite *Toxoplasma gondii*, responsable de la toxoplasmose, qui est capable de persister lors de l'infection chronique des décennies dans son hôte, tout en gardant son potentiel infectieux.

Pour réussir à établir l'infection chronique, les pathogènes doivent être capables de se répliquer et augmenter en nombre. Ils doivent cependant aussi permettre au système immunitaire de contrôler l'infection, afin d'éviter la mort de l'hôte aussi bien par réplication accrue du pathogène que par immunopathologie, due à des lésions provoquées par l'emballement du système immunitaire.

Cette balance entre l'hôte et le pathogène est assurée par une évolution réciproque, dans une éternelle « course à l'armement ». L'idée derrière cette expression est que le pathogène va perpétuellement évoluer et acquérir de nouveaux outils pour améliorer son interaction avec l'hôte dans le but de survivre, et que l'hôte va faire de même pour résister à l'infection.

1.3. Co-évolution hôte-pathogène

Le terme co-évolution décrit les cas où l'évolution d'une espèce affecte l'évolution d'une ou plusieurs autres espèces. Ceci concerne les espèces qui ont des interactions étroites les unes avec les autres. Les agents infectieux sont en contact permanent avec leurs hôtes, et à ce titre, ils font partie des acteurs qui entretiennent l'équilibre dynamique des écosystèmes, qui co-évoluent depuis des millions d'années pour la plupart.

Le parasite *Toxoplasma gondii* possède un cycle hétéroxène, ce qui implique un cycle de réplication sexuée dans son hôte définitif, le chat, et un cycle de réplication asexuée dans son hôte intermédiaire, tout animal à sang chaud. Basé sur des techniques de datation, l'apparition du parasite *Toxoplasma gondii* est estimée à 11 millions d'années (Morrison, 2005). Cette apparition correspond à l'émergence des félins actuels, qui ont divergé de leurs ancêtres il y a environ 11 millions d'années (Driscoll et al., 2007). Depuis son apparition, ce parasite est parvenu à une adaptation très forte avec ses hôtes, avec une faible virulence mais une capacité de persistance très élevée, lui permettant un très grand taux de prévalence (environ 30% de la population humaine est infectée chroniquement).

2. *Toxoplasma gondii*

2.1. Découverte et présentation générale

Toxoplasma gondii a été découvert accidentellement par Nicolle et Manceaux en 1908 dans les tissus d'un rongeur, *Ctenodactylus gundi*, alors qu'ils menaient des recherches sur la leishmaniose à l'Institut Pasteur de Tunis. Ce nouveau parasite a été nommé *Toxoplasma gondii* pour sa morphologie arquée (en grec, *Toxo* signifie arc, et *plasma* signifie forme) et l'hôte dans lequel il a été découvert (le gundi).

Toxoplasma gondii est un parasite eucaryote unicellulaire largement répandu à travers le monde, et capable d'infecter la plupart des animaux à sang chaud (Dubey, 2010). Ce parasite fait partie de l'embranchement des Apicomplexa, un groupe comprenant plus de 5 000 espèces d'organismes intracellulaire obligatoires pour la plupart (Bartošová-Sojková et al., 2015). La majorité de ces organismes sont des pathogènes de l'humain ou d'autres animaux. Ces infections ont des conséquences économiques et de santé publique dramatiques.

Les parasites Apicomplexa présentent un pôle basal et un pôle apical, comprenant différents éléments structuraux (Figure 4). Notamment, la structure apicale comprend le conoïde au pôle apical, qui permet l'organisation du cytosquelette, ainsi que plusieurs types d'organites sécrétoires, les micronèmes, et les rhoptries, décrites plus amplement ci-après. Enfin, ces parasites possèdent des granules denses de sécrétion, ainsi qu'un plaste non-photosynthétique d'origine végétale, appelé apicoplaste, un organite essentiel pour la synthèse des lipides du parasite. En plus de ces composants spécifiques, *Toxoplasma gondii* possède comme tout eucaryote un noyau, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, et une mitochondrie (Figure 4). Le génome de *Toxoplasma gondii* a été séquencé pour la plupart des souches cultivées, et contient environ 65 Mb (mégabases), organisées en 14 chromosomes pour environ 8 000 gènes (Gajria et al., 2008; Khan et al., 2005).

Les parasites du genre *Toxoplasma* appartiennent tous à une seule espèce *gondii*, capable d'infecter un large panel d'hôtes. Au contraire, le genre *Sarcocystis*, proche du genre *Toxoplasma*, comprend une multitude d'espèces. Dans ce cas, chaque espèce possède une gamme d'hôtes précis et spécifiques, où les parasites d'une espèce ne peuvent pas infecter tous les hôtes infectés par les autres espèces du genre *Sarcocystis* (Dubey, 2010; Fayer et al., 2015).

2.2. Cycle biologique

2.2.1. Hôte définitif

Malgré la découverte du parasite en 1908, ce n'est qu'en 1970 que le cycle biologique complet a été élucidé. *Toxoplasma gondii* possède un cycle de transmission impliquant un hôte définitif permettant la reproduction sexuée, et donc le brassage génétique. Les hôtes définitifs de ce parasite sont les félidés, dont le chat domestique (Frenkel, 1970). Après ingestion, les bradyzoïtes contenus dans les kystes ou les sporozoïtes contenus dans les oocystes sont relâchés par les acides et enzymes lytiques de l'estomac de l'hôte définitif (Figure 1). Les parasites envahissent rapidement l'épithélium intestinal, où ils se différencient en schizontes, puis en mérozoïtes, le premier stade sexué. Ceux-ci se divisent ensuite pour se différencier à nouveau en microgamètes et macrogamètes. Ces cellules fusionnent ensemble pour produire des zygotes diploïdes, qui développent une paroi imperméable de protection, le tout formant les oocystes. A l'heure actuelle, seuls les félidés ont montré la capacité à permettre le stade sexué du parasite, et les conditions particulières nécessaires à cette différenciation sont encore inconnues.

Ces oocystes sont ensuite relâchés dans la lumière de l'intestin du félin, et sont dispersés dans l'environnement par les fèces. Les chats infectés relâchent entre 2 et 20 millions d'oocystes par jour dans leurs fèces, du jour 3 au jour 10 après l'infection initiale. Une fois dans l'environnement, les oocystes entrent en processus de sporulation : après une méiose et une mitose successives, les oocystes contiennent 8 sporozoïtes haploïdes. Les oocystes sont très résistants aux conditions environnementales, et peuvent rester infectieux plus de 18 mois (Lindsay and Dubey, 2009).

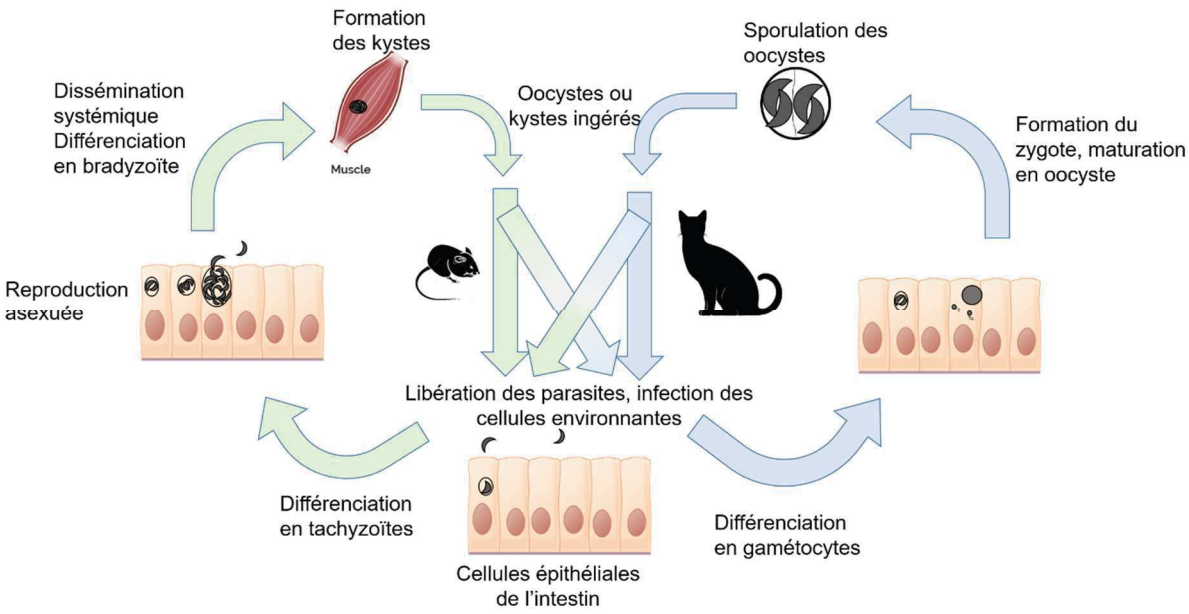


Figure 1 : Cycle biologique de *Toxoplasma gondii*
Les oocystes sont ingérés par les hôtes intermédiaires, dans lesquels se libèrent les parasites. Après une différenciation en tachyzoïtes, les parasites se répliquent massivement et disséminent dans l'organisme hôte. Les parasites se différencient en bradyzoïtes, et persistent sous forme semi-dormante dans des kystes dans les cellules musculaires profondes et les cellules du cerveau. Le cycle se termine par l'ingestion de tissus contaminés par l'hôte définitif. Là, les parasites se différencient successivement pour aboutir à la formation de microgamètes et macrogamètes. La reproduction sexuée résulte en la formation de zygotes, qui maturent une fois relâchés dans l'environnement en oocystes.

2.2.2. Hôte intermédiaire

Les oocystes matures disséminés dans l'environnement peuvent être ingérés par divers animaux, dont les rongeurs ou les troupeaux (Dubey and Frenkel, 1973). Dans l'hôte intermédiaire, le parasite entre en phase asexuée, ce qui consiste en une expansion clonale majeure sans diversification génétique. Les hôtes intermédiaires de *Toxoplasma gondii* sont très nombreux, et comprennent globalement tous les animaux à sang chaud (Dubey, 2010).

Dans l'estomac, les acides et enzymes digestives vont permettre la digestion des oocystes et la libération des sporozoïtes, qui envahissent les cellules épithéliales de l'intestin dans les 2 heures après l'ingestion (Speer and Dubey, 1998). Une fois dans les cellules, les sporozoïtes se différencient en tachyzoïtes, une forme de division rapide du parasite.

Les tachyzoïtes sont capables d'infecter tous les types de cellules nucléées de l'hôte, et de disséminer dans tout l'organisme (Dubey, 1997), ce qui se traduit par la phase aiguë de

l'infection. Les parasites vont au cours de cette infection se différencier en une forme de division lente, les bradyzoïtes, qui restent semi-dormants dans des kystes résidant dans des cellules à longue durée de vie comme les neurones ou les cellules musculaires (Dubey, 1997). Lors de l'élimination des tachyzoïtes par le système immunitaire de l'hôte infecté, les bradyzoïtes contenus dans les kystes parasitaires persistent dans ces cellules et évitent ainsi l'éradication, ce qui constitue la phase chronique de l'infection. Lors de la prédation, l'hôte définitif peut être à son tour infecté par l'ingestion de kystes contenus dans un hôte intermédiaire infecté, ce qui complète le cycle (Figure 1).

Le cycle biologique classique implique l'alternance de passages dans l'hôte définitif et dans l'hôte intermédiaire. Certains parasites sont restreints à une telle alternance, et ne peuvent en aucun cas se transmettre entre hôtes intermédiaires, c'est le cas du parasite *Hammondia hammondi*, qui cycle exclusivement entre hôte définitif et hôte intermédiaire (Frenkel and Dubey, 2000).

Au contraire, *Toxoplasma gondii* possède un cycle hétéroxène où la transmission peut arriver entre hôtes intermédiaires par carnivorisme d'hôte infecté, ou alors par ingestion d'oocystes par un hôte définitif.

Concernant le cycle de *Toxoplasma gondii*, l'infection de l'Homme apparait comme une impasse biologique. En effet, l'homme n'étant pas ou très rarement un objet de prédation pour les félidés, les cas de transmission des kystes contenus dans les tissus infectés humains à l'hôte définitif sont extrêmement rares. En revanche, des cas de transmission entre individus ont été décrits et sont évoqués dans le point suivant.

2.3. La toxoplasmose

2.3.1. Prévalence

Toxoplasma gondii est un des parasites les plus répandus dans le monde, avec environ 30% de la population humaine infectée. Le taux de prévalence de l'infection varie grandement selon les pays, allant de 5 à 80% (Pappas et al., 2009). Cette variation est attribuée à des différences alimentaires (consommation de viande crue ou non) et aux conditions environnementales favorisant ou non la stabilité des oocystes dans les sols et l'eau. De façon surprenante, alors que la prévalence aux États-Unis est plus faible que dans la plupart des pays européens (Pappas et al., 2009), *Toxoplasma gondii* est considéré comme le deuxième agent pathogène causant le plus de décès issus du secteur alimentaire (Scallan et al., 2011). La grande distribution de l'infection par *Toxoplasma gondii* à travers le monde est attribuée à la capacité du parasite d'être infectieux dans les formes sexuée (oocystes) et asexuée (kystes), à

l'établissement d'une infection chronique chez tous les animaux à sang chaud, et à la capacité des kystes à rester infectieux durant toute la vie de l'hôte.

2.3.2. Infection chez l'immunocompétent

Comme dit précédemment, le cycle de *Toxoplasma gondii* est hétéroxène, permettant ainsi des infections chez les différents hôtes soit par oocystes, soit par kystes tissulaires.

En France, le mode de contamination le plus classique pour l'homme se fait par l'ingestion de kystes contenus dans les tissus d'animaux infectés, lors de la consommation de viande crue ou peu cuite (Hill and Dubey, 2002). Le fort taux de prévalence de *Toxoplasma gondii* dans la population de France et d'Allemagne pourrait d'ailleurs être expliqué par des raisons culturelles. En effet, l'Europe et particulièrement ces 2 pays présentent une consommation élevée de viande crue, contrairement à des pays comme le Japon ou le Vietnam où leur consommation est quasi-absente, et où on observe un très faible taux de prévalence du parasite.

Un bon moyen d'éviter ce mode de contamination consiste à manger les aliments bien cuits, ou à congeler durant au moins 24 heures les aliments à risques en dessous de -12°C (Jones et al., 2007), car aussi bien la chaleur que la congélation détruisent les parasites.

Un autre mode de contamination classique se fait par l'ingestion d'oocystes retrouvés sur les végétaux. Les végétaux contaminés doivent alors être lavés très soigneusement, et consommés cuits, afin de les éliminer. Ces modes de contamination ne provoquent pas en général d'épidémie.

Au niveau clinique, l'infection par *Toxoplasma gondii* est dans plus de 80% des cas asymptomatique, pouvant entrainer parfois des symptômes ressemblant à une infection par le virus de la grippe, tels que de la fièvre et l'asthénie musculaire. Ces symptômes peuvent être ressentis lors de la phase aiguë d'une primo-infection. Alors que le système immunitaire est capable de lutter très efficacement contre l'infection et de quasiment éradiquer les parasites, ceux-ci disséminent dans l'organisme et atteignent les tissus profonds, tels que l'encéphale, et persistent sous forme de kystes semi-dormants contenant des bradyzoïtes. Les bradyzoïtes contenus dans les kystes tissulaires sont capables d'entrer en processus de réactivation, et de se différencier à nouveau en tachyzoïtes. Cette réactivation ne provoque pas de dégâts majeurs chez l'hôte immunocompétent compte tenu de la surveillance immunitaire présente pendant la phase chronique de l'infection. La surveillance de la phase chronique est assurée par les cellules de l'immunité innée en particulier les cellules dendritiques (DC) et les cellules

natural killer (NK), ainsi que par les cellules infectées (astrocytes et cellules gliales) activées par l'interféron gamma (IFNγ) (Hauser et al., 1982).

Alors que l'infection chronique par *Toxoplasma gondii* chez l'hôte immunocompétent apparaissait jusqu'alors comme bénigne, de plus en plus d'études tendent à lier la présence de kystes chez l'hôte à divers risques. Il a été démontré que les rongeurs infectés chroniquement par le parasite perdent leur répulsion naturelle pour l'urine des félins, et présentent une plus grande témérité à leur égard (Vyas et al., 2007). Ceci pourrait favoriser la prédation par les félins de ces individus au comportement altéré, et ainsi favoriser le cycle parasitaire. Il est régulièrement évoqué que la présence de *Toxoplasma gondii* pourrait être associée à des perturbations hormonales et à des altérations comportementales chez l'humain (Flegr, 2013), mais aussi à des désordres mentaux plus importants tels que la schizophrénie, l'autisme, et les troubles bipolaires (Sutterland et al., 2015; Taboas et al., 2012).

2.3.3. Toxoplasmose chez l'immunodéprimé

Toxoplasma gondii est considéré comme un pathogène opportuniste, et a été longtemps responsable de la majorité des décès des personnes infectées par le virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Luft and Remington, 1992), et pose un problème plus généralement dans tous les cas de système immunitaire défaillant. Cette mortalité a largement baissé depuis la mise en place des thérapies antirétrovirales, qui permettent de limiter la sévérité du SIDA. Dans la plupart des cas, la toxoplasmose chez l'hôte immunodéprimé ne provient pas d'une primo-infection, mais plutôt d'une réactivation des kystes, alors non contrôlée à cause du système immunitaire défaillant (Odaert et al., 1996). En effet, ces réactivations majeures sont observées après la chute des lymphocytes T (LT) en dessous d'un certain seuil (Pereira-Chioccola et al., 2009), montrant un rôle primordial de ces cellules dans la surveillance immunitaire.

La réactivation des parasites dans l'hôte immunodéprimé peut également survenir lors de greffes d'organes. En effet, les kystes sont également impliqués dans la transmission par transplantation d'organe d'un donneur séropositif pour la toxoplasmose, vers un receveur négatif avant la greffe. Dans un tel cas, les traitements d'immunosuppression prescrits pour limiter le rejet du greffon installent un terrain favorable pour la réactivation non contrôlée des kystes parasitaires. Dans ce cas, les dégâts causés par la toxoplasmose résultante dépendent de la zone affectée. Ainsi, une greffe d'un poumon infecté pourra causer des dommages tissulaires à ce niveau.

Les lésions engendrées sont le plus fréquemment localisées au niveau cérébral, avec le tableau clinique d'un abcès, puis localisées dans le fond de l'œil, avec le plus souvent une

baisse de l'acuité visuelle et des rougeurs oculaires, traduisant une choriorétinite toxoplasmique (Frenkel and Escajadillo, 1987; Montoya and Liesenfeld, 2004)

Enfin, le parasite peut être transmis par transfusion d'une poche de sang contaminée, prélevée sur un donneur en cours de séroconversion, en pic de phase aiguë de l'infection. En pratique, ce mode de transmission est extrêmement rare, et les cas de toxoplasmose acquise réfèrent plutôt aux situations décrites précédemment.

En France, le traitement de référence consiste en l'utilisation d'une combinaison de pyriméthamine, sulfadiazine et acide folinique, adaptée selon les cas d'infection (Butler et al., 2013). Concernant les cas de toxoplasmose oculaire, un traitement corticoïde local peut être délivré avec le traitement précédemment décrit. Bien que dans la plupart des cas, ces traitements soient prescrits dans le cas d'infections chez l'immunodéprimé, cette trithérapie est également délivrée en cas de toxoplasmose sévère d'individus immunocompétents infectés par des souches très virulentes.

Ces traitements permettent d'éliminer la forme tachyzoïte du parasite. En revanche, il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle pour les bradyzoïtes résidant dans les kystes.

2.3.4. Toxoplasmose congénitale

L'incidence mondiale globale annuelle de la toxoplasmose congénitale a été estimée à environ 200 000 cas par an (Torgerson and Mastroiacovo, 2013). L'infection par *Toxoplasma gondii* d'une femme durant sa grossesse est peu sévère chez la mère possédant un système immunitaire fonctionnel. En revanche, le parasite est capable de traverser la barrière placentaire et d'atteindre le fœtus à tous ses stades de développement. La sévérité de l'infection sur le fœtus est inversement proportionnelle à la facilité d'accès. En effet, le premier trimestre est dédié au développement primaire de l'embryon et à la mise en place des structures complexes. L'embryon est implanté dans la paroi de l'utérus, et la structure placentaire n'est pas encore formée. Le parasite devra alors pour atteindre l'embryon traverser la paroi utérine ; les risques d'infection à ce stade sont donc assez faibles (15%), mais les conséquences d'une telle infection peuvent aller de malformations (microcéphalies, hydrocéphalies), à la mort *in utéro* (Montoya and Liesenfeld, 2004). En revanche, avec le développement du placenta et des artères et veines placentaires, reliant directement le fœtus au système sanguin de la mère, le parasite atteint plus facilement le fœtus, avec des risques de transmission plus élevés (60%), mais avec des conséquences moins sévères: l'enfant naît la plupart du temps en bonne santé, puis reçoit un traitement contre l'infection.

Cette toxoplasmose congénitale latente peut induire dans la vie adulte une toxoplasmose oculaire, qui se traduit par un endommagement des cellules tapissant l'intérieur de l'œil. Selon la localisation des lésions, le patient peut présenter des troubles de la vue plus ou moins sévères.

Par contraste, les femmes enceintes ayant déjà subi une infection avant leur grossesse possèdent l'arsenal immunitaire nécessaire pour affronter une seconde infection. En effet, une fois la première infection résolue, plus de 90% des lymphocytes T disparaissent par apoptose. Les 5% restants persistent dans l'organisme et constituent les lymphocytes T mémoire (Dianzani et al., 1990), qui peuvent agir rapidement en cas de réinfection. Les lymphocytes T effecteurs mémoire sont retrouvés dans les tissus périphériques, et plus particulièrement sur le site de la première infection (Blander et al., 2003). Cette localisation favorise la rencontre précoce entre les lymphocytes et les antigènes, et permet ainsi le contrôle précoce de l'infection. Ce contrôle très précoce permet l'éradication du parasite avant sa dissémination, protégeant ainsi le fœtus.

2.4. Diversité génétique et structure des populations

2.4.1. Généralités et techniques

Le parasite de la toxoplasmose possède une très grande diversité épidémiologique, ce qui a rapidement suggéré qu'il possédait une grande diversité génétique (Dardé, 1996). L'étude de cette diversité génétique et de l'évolution de *Toxoplasma gondii* représente un enjeu majeur dans la compréhension du parasite. En effet, ceci permet de relier les différentes souches de parasites à des réservoirs et des hôtes particuliers, et de mieux comprendre les modes de transmission pour mieux les prévenir. Depuis une vingtaine d'années, une large gamme de marqueurs génétiques a été développée pour distinguer les différentes souches, dans divers hôtes et diverses zones géographiques.

Des marqueurs génétiques ont été développés dans le but de différencier les souches de *Toxoplasma gondii* grâce à différentes techniques, dont la PCR-RFLP (restricted fragment length polymorphism) (Cristina et al., 1995), parmi les plus utilisées. Cette méthode utilise des endonucléases reconnaissant des polymorphismes nucléotidiques (SNP). Les SNP représentent la variation d'une paire de base du génome entre individus d'une même espèce, et sont le fruit principalement d'erreurs lors de la réplication ou de réparation d'ADN. Le taux de mutation pour les SNP chez *Toxoplasma gondii* n'est pas connu, mais il est estimé à 10^{-9} à 10^{-10} par nucléotide, comme pour la réplication chez les eucaryotes en général (Schlötterer, 2000). Les marqueurs PCR-RFLP ont été utilisés pour cartographier les marqueurs génétiques impliqués dans les différences de virulence entre les souches de *Toxoplasma* (Sibley and

Boothroyd, 1992). En analysant 28 souches parasitaires provenant de différents continents, l'équipe de chercheurs a démontré que les souches virulentes avaient un génotype similaire, et que les souches non-virulentes étaient modérément polymorphiques, suggérant que les souches virulentes avaient pour origine un lignage commun.

2.4.2. Lignées clonales d'Europe et d'Amérique du Nord

La diversité génétique et la structure d'une population est fortement influencée par la fréquence de recombinaison sexuée et la sélection évolutive des parasites recombinants. Une reproduction sans recombinaison génétique mène à une population clonale. La structure clonale des parasites présents en Europe et Amérique du Nord reflète les faibles évènements de reproductions sexuées de ces souches, qui se contentent de transmissions entre hôtes intermédiaires (Figure 2).

En analysant plus de 100 souches de *Toxoplasma gondii* isolées de différents hôtes d'Amérique du Nord et d'Europe, et en utilisant la technique des marqueurs PCR-RFLP, une équipe de chercheurs a révélé une dominance de trois lignages clonaux, les types 1, 2 et 3 (Howe and Sibley, 1995). Un quatrième type a été trouvé en Amérique du Nord, le type 12. L'émergence de ces lignages est estimée à environ 10 000 ans, ce qui correspond à la domestication des animaux (Su et al., 2003).

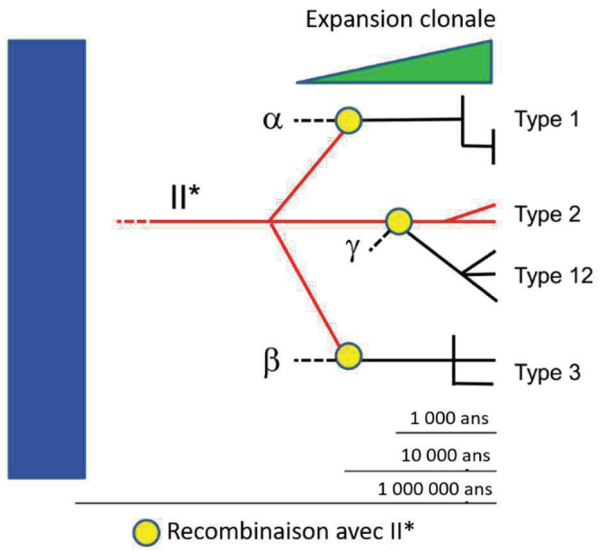


Figure 2 : Structure de la population en Amérique du Nord et en Europe
Adapté de Khan et al 2011.
Les types 1, 2, 3 et 12 sont majoritaires en Amérique du Nord et en Europe et arborent une structure clonale. 3 croisements indépendants entre la souche ancestrale II*, et les types ancestraux α, β et γ ont ensuite donné lieu aux types 1, 3 et 12 respectivement.

Ces 3 types se distinguent par leurs différences de virulence en souris, qui reflètent l'intensité du pouvoir pathogène d'un micro-organisme. Ici, nous évoquerons la virulence comme étant la capacité de *Toxoplasma gondii* à induire une infection létale en souris. Le type 1 est rarement identifié dans les infections humaines, mais se distingue par une grande virulence dans la souris. Le type 2 quant à lui représente la majorité des infections humaines en Amérique du Nord et en Europe, avec plus de 90% des cas de toxoplasmoses congénitales humaines causées par ce type en France (Ajzenberg et al., 2002). Enfin, le type 3 est retrouvé dans la plupart des infections animales, et rarement chez l'humain (Howe and Sibley, 1995), et est considéré comme non-virulent en souris, avec des symptômes neurologiques pouvant apparaitre quelques mois après l'inoculation. En plus de ces trois types assez proches, d'autres qualifiés d'atypiques ont été identifiés dans différentes zones géographiques.

L'apparition des souches clonales a été datée à environ 10 000 ans, ce qui correspond à l'établissement de l'agriculture et de la domestication animale, tandis que celles des souches atypiques est estimée à environ 1 million d'années (Khan et al., 2007; Su et al., 2003).

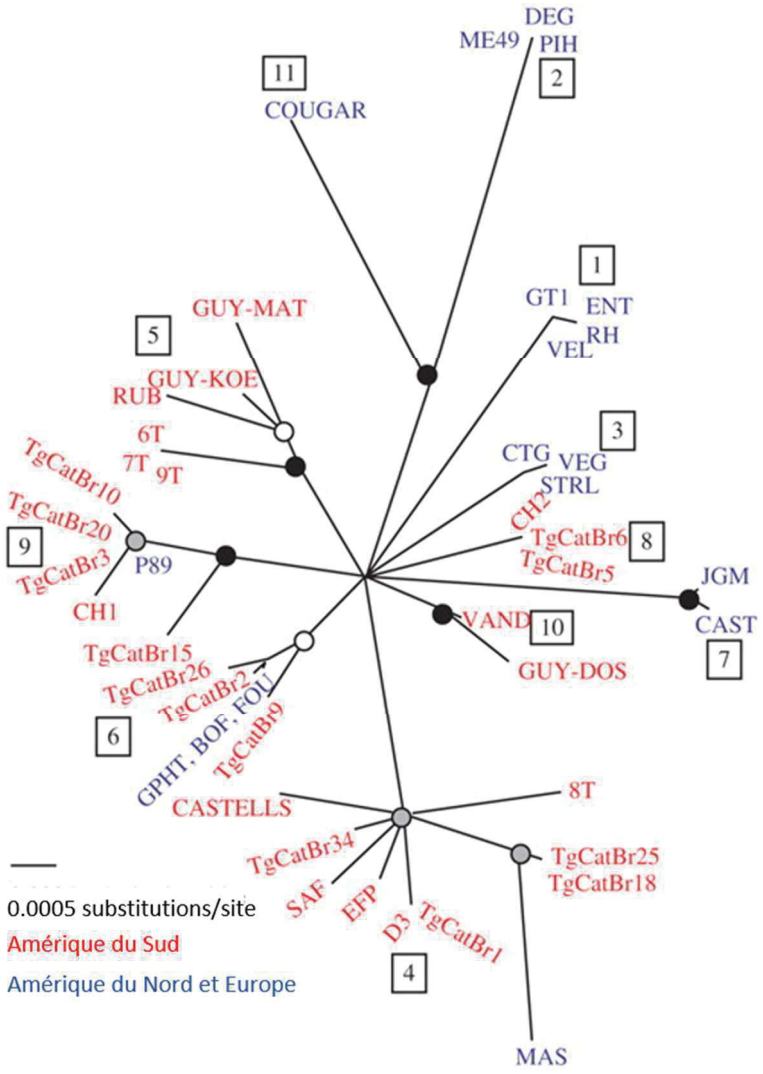


Figure 3 : Diversité des souches d'Europe et d'Amérique
Adapté de Khan et al 2007
Analyses phylogénétiques des souches de *Toxoplasma gondii* basées sur des séquences d'introns. 11 haplogroupes distincts ont été identifiés en Amérique du Nord et Europe (en bleu), et en Amérique du Sud (en rouge).

2.4.3. Souches atypiques

Alors qu'en Europe et Amérique du Nord, la structure de la population de *Toxoplasma gondii* est clonale, cela ne semble pas être le cas en Amérique du Sud. En effet, des études ont révélé une plus grande diversité génétique des souches présentes (Ajzenberg et al., 2004; Brandão et al., 2006; Khan et al., 2006). Aucun lignage clonal n'a pu être déterminé au sein de cette population. Les souches retrouvées chez les animaux domestiques et chez l'Homme sont différentes des souches trouvées au niveau de la faune sauvage, amenant à parler de

l'existence d'un cycle domestique et d'un cycle sylvatique, respectivement (Vitaliano et al., 2014). Des cas de toxoplasmose aiguë chez des patients immunocompétents sont régulièrement reportés en Amérique du Sud. Ces infections sévères sont dues à des souches atypiques très virulentes (Bossi and Bricaire, 2004; Delhaes et al., 2010), et sont probablement le résultat d'une interaction entre ces 2 cycles domestique et sylvatique (Mercier et al., 2011).

Pour les parasites qui cyclent entre les hôtes, le but est de réussir la transmission d'un hôte à l'autre, et donc dans le cas de l'hôte intermédiaire d'établir une infection chronique, permettant une persistance du parasite dans cet hôte. Il est communément admis que la souche de type 3 est adaptée à son hôte intermédiaire, la souris, puisqu'elle provoque une infection chronique latente. Au contraire, la souche de type 1 est très virulente en souris, et n'arrive pas à établir d'infection chronique. Concernant le type 2, il provoque la mort des souris à haute dose, alors que l'infection chronique peut s'établir à plus faible dose. Cette différence reflète très probablement une coévolution de l'hôte et de son parasite.

Alors que les souches de type 1, 2 et 3 présentes en Europe et en Amérique du Nord sont adaptées à une faune de type chat domestique, rongeurs et bétail, les souches atypiques, présentes majoritairement en Amérique du Sud, sont probablement adaptées à une faune sauvage. En effet, contrairement à l'Europe, de grands félidés sauvages sont présents dans ces zones géographiques dont la Guyane française, et font office d'hôtes définitifs. De même, les hôtes intermédiaires sont représentés par d'autres animaux comme les tapirs. Alors que les souches de *Toxoplasma gondii* qui cyclent entre ces hôtes y sont probablement adaptées, des problèmes peuvent survenir lors du passage chez l'Homme. En effet, ces parasites se retrouvent dans un environnement immunitaire auquel ils ne sont pas adaptés, ce qui peut provoquer une pathogénicité plus importante, y compris chez des hôtes immunocompétents (Bossi and Bricaire, 2004; Delhaes et al., 2010).

2.4.4. La souche atypique COUG

La souche COUG a été responsable de la plus grande épidémie de toxoplasmose humaine, elle a eu lieu en 1995 en Colombie Britannique, en Amérique du Nord. Cette année-là, entre janvier et septembre, 110 cas d'infection de toxoplasmose aiguë ont été identifiés, dont des personnes immunocompétentes présentant des choriorétinites et des lymphadénopathies (Aramini et al., 1998; Stephen et al., 1996). Les patients infectés faisaient tous partie de la même zone de distribution d'eau potable, dans l'aire de Great Victoria. En conséquence, les recherches ont rapidement pointé une implication de ce réseau d'eau. En effet, des oocystes ont été retrouvés au niveau du point d'eau desservant la ville, ainsi que dans des intestins de cougars, pour la première fois.

Cette souche appartient à l'haplotype 11 (Figure 3) (Khan et al., 2007). Si peu d'informations sont disponibles à ce jour sur cette souche, quelques études ont étudié la COUG en plus d'autres souches atypiques (Fux et al., 2007; Melo et al., 2013), révélant par exemple que contrairement à certaines souches atypiques, la souche COUG présente la capacité à former des kystes infectieux, et donc à permettre une transmission orale (Fux et al., 2007). En souris, elle entraine un fort taux de mortalité de 73%, quand des parasites de type 2 Me49 induisent un taux de 40% (Fux et al., 2007). La souche COUG présente la capacité unique à stimuler la production d'interféron bêta (IFNβ) dans des macrophages murins et dans des fibroblastes humains, via le récepteur cytoplasmique RIG-I (Melo et al., 2013). Si le mécanisme d'action précis est encore inconnu, une des hypothèses avancées est la destruction potentielle des parasites à l'intérieur des cellules, et la libération de leur matériel génétique. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'induction de l'IFNβ par la COUG est similaire à celle induite par la transfection de poly d(A) :d(T) en macrophages (Melo et al., 2013). De plus, le nombre de parasites par vacuole n'augmente pas significativement entre 2 heures et 48 heures après infection, et le nombre de vacuoles par champs de microscopie baisse au cours du temps. La production d'IFNβ par la souche COUG pourrait avoir un effet bénéfique pour l'hôte dans le contrôle parasitaire ; néanmoins, celle-ci présente une virulence plus élevée que les souches de type 2 en souris et chez l'Homme (Khan et al., 2009). La souche COUG diffère génétiquement des souches de type 2 (Minot et al., 2012) ; il est donc possible que la différence de virulence entre ces 2 souches ne soit pas reliée à l'IFNβ, mais à de potentiels effecteurs polymorphiques.

Concernant la souche COUG, certains effecteurs ont été identifiés, basés sur des comparaisons génétiques. Dans ce paragraphe, nous nous contenterons de passer en revue les effecteurs connus pour cette souche. Ceux-ci seront décrits plus amplement dans un paragraphe ultérieur. Cette souche possède une copie complète de l'effecteur GRA15, et présente la capacité d'induire la translocation de NF-κB dans le noyau des cellules hôtes infectées (Melo et al., 2013). De plus, *ROP16* en COUG présente une forte homologie avec la version allélique de type 2, puisque seulement 2 acides aminés les différencient. Contrairement au type 2, la souche COUG semble posséder la forme active de ROP16, puisque sa séquence contient le résidu critique leucine à la position 503, nécessaire à l'activité kinase de ROP16 (Yamamoto et al., 2009). Dans ce sens, il a été montré que son substrat STAT6 est phosphorylé et présent dans le noyau des cellules hôtes infectées, sans stimulation extérieure (Melo et al., 2013). Enfin, un des plus grands déterminants de la virulence en souris est la capacité à résister aux IRGs, un mécanisme de défense contre les pathogènes intracellulaires. Cette résistance est assurée par une association protéique composées de ROP5 et ROP18 principalement, dans leur version allélique de type 1. Dans le cas de la

souche COUG, la combinaison allélique de ces 2 effecteurs n'est pas très claire, mais semble correspondre à une sensibilité aux IRGs (Niedelman et al., 2012). Ce point est discuté dans ce manuscrit.

A l'heure actuelle, l'origine de la virulence de la souche COUG est inconnue.

2.5. Biologie de *Toxoplasma gondii*

2.5.1. Description générale des tachyzoïtes

Toxoplasma gondii est un organisme unicellulaire de forme arquée, d'environ 2 µm de large, et 7 µm de longueur (Figure 4), avec une polarité où le pôle antérieur ou apical correspond à la direction de la motilité.

Comme tous les parasites de l'embranchement Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* possède une structure apicale complexe, impliquée dans l'attachement du parasite à la surface de la cellule hôte et dans l'invasion (Blackman and Bannister, 2001). Le cytosquelette du parasite comprend plusieurs éléments. Tout d'abord, deux cercles apicaux sous la membrane plasmique, et le conoïde constitué d'un cône tronqué de protofilaments de tubuline en spirale (Hu et al., 2002). Deux cercles internes comprennent le conoïde, et servent d'ancrage au complexe membranaire interne (IMC). Enfin, 22 microtubules attachés aux cercles internes se prolongent sous l'IMC sur environ deux tiers de la longueur totale du parasite (Nichols and Chiappino, 1987). L'IMC est formée d'un ensemble de vésicules aplaties dérivées du système réticulum – Golgi (Vivier and Petitprez, 1969), et forme avec la membrane plasmique la pellicule.

En tant qu'eucaryote, ce parasite possède un noyau, un réticulum endoplasmique continu avec ce dernier (Hager et al., 1999), un appareil de Golgi, et une mitochondrie (Figure 4). Comme la plupart des parasites du groupe Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* possède un plaste d'origine végétale (Miranda et al., 2010) délimité par de multiples membranes, appelé apicoplaste. Cet organite a probablement pour origine une endosymbiose secondaire d'une algue rouge (McFadden and Roos, 1999). Alors que le parasite peut survivre temporairement sans apicoplaste, il est incapable de proliférer dans la cellule hôte envahie. L'apicoplaste est nécessaire pour la synthèse des acides gras, des isoprénoïdes, des hèmes, ainsi que dans celle des clusters fer-souffre.

Toxoplasma gondii possède également trois organites sécrétoires distincts, qui varient en nombre et en forme au cours des différents stades du parasite. Ces organites sont décrits plus amplement dans un autre point.

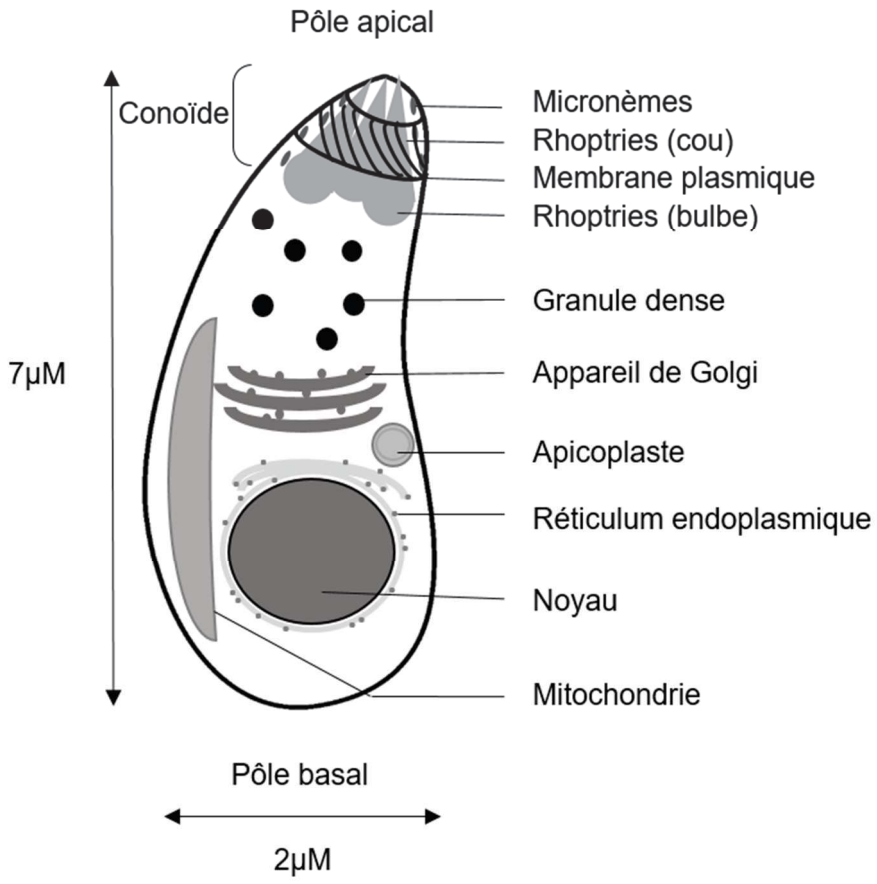


Figure 4 : Structure de *Toxoplasma gondii*
Les éléments mentionnés sont décrits dans le corps du chapitre. Le complexe membranaire interne (IMC) et le système microtubule ne sont pas représenté ici.

2.5.2. Cycle lytique

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, capable d'envahir toutes les cellules nucléées de l'organisme. L'étape d'invasion est donc primordiale pour la survie de ce parasite, qui s'attache à la cellule hôte par le biais de protéines spécifiques (Aikawa et al., 1978) (Figure 5). Une fois cette reconnaissance effectuée, une jonction serrée s'établit entre les deux protagonistes, et le parasite rentre dans la cellule hôte. Grâce à un système complexe basé sur un moteur actine/myosine et d'autres protéines, qui forment le glideosome (Opitz and Soldati, 2002), supporté par une structure de multiples sacs vésiculaires aplatis appelée l'IMC (Vivier and Petitprez, 1969), le parasite possède la motilité nécessaire lui permettant de se déplacer, et entre autres d'envahir la cellule de façon active, en quelques secondes

(Dobrowolski and Sibley, 1996). Le parasite lié à la cellule hôte force grâce à cela l'invagination de la membrane plasmique (Dubremetz and Torpier, 1978; Tardieux and Baum, 2016). Au niveau de la jonction serrée, le parasite est capable d'effectuer un tri sélectif dans les composants membranaires, en excluant des protéines de la membrane plasmique, et en délivrant ses propres composants protéiques et lipidiques. Une fois la vacuole refermée, le parasite est entièrement intracellulaire, et cette vacuole, appelée alors membrane parasitophore (PVM), contient les lipides neutres de l'hôte (Charron and Sibley, 2004; Mordue et al., 1999a), ainsi que des lipides et protéines issus des rhoptries (Håkansson et al., 2001). Ce mécanisme permet d'exclure les protéines de l'hôte de cette membrane, ce qui par conséquent lui confère l'incapacité à fusionner avec d'autres compartiments intracellulaires, notamment les lysosomes, et donc de survivre (Mordue et al., 1999a, 1999b).

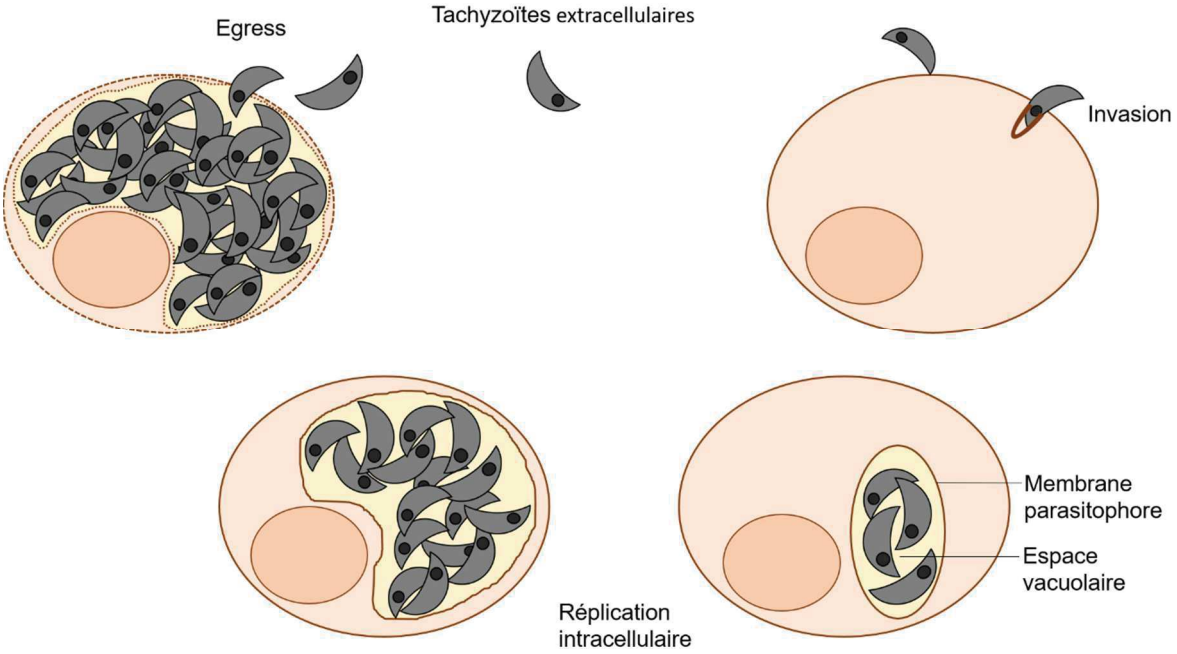


Figure 5 : Cycle lytique de *Toxoplasma gondii*
Les tachyzoïtes extracellulaires s'accrochent à la cellule hôte et établissent une interaction forte. Le parasite force l'invagination de la membrane plasmique, et envahit la cellule de façon active grâce à son moteur moléculaire actine/myosine. La PVM en cours de formation est dérivée de la membrane plasmique, dépourvue de protéines de l'hôte grâce à leur exclusion au niveau de la jonction serrée, et enrichie en lipides dérivés du parasite grâce à la sécrétion des rhoptries. Une fois dans la cellule hôte, le parasite se réplique dans sa vacuole parasitophore par endodyogénie. Une fois la cellule remplie de parasites, ceux-ci vont sortir de la cellule en la lysant, par processus d'egress. Les parasites alors extracellulaires vont initier un autre cycle lytique.

Dans cette niche, le parasite va se répliquer par endodyogénie, une forme de reproduction asexuée qui consiste en la production de 2 cellules filles à l'intérieur de la cellule mère, par duplication des organites (Blader et al., 2015). Dans les cellules hôtes, le temps de doublement est environ de 7 heures (Radke and White, 1998). Par divisions successives, les parasites vont remplir la cellule hôte, puis sortir dans un processus actif nommé « egress », provoquant la lyse de la cellule hôte. Le parasite sera alors sous forme extracellulaire de façon transitoire, et entamera l'invasion d'une autre cellule à proximité (Figure 5) (Sibley, 2010).

2.5.3. Organites sécrétoires spécifiques

Toxoplasma gondii possède 3 organites sécrétoires, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (Figure 4). Dans la chronologie, les protéines contenues dans les micronèmes sont les premières à être secrétées, suivies par les protéines RON (rhoptry neck proteins), ROP (rhoptry proteins), et enfin les protéines des granules denses GRA (Carruthers and Sibley, 1997).

Les micronèmes sont localisées au pôle apical du parasite, et permettent la sécrétion de protéines nécessaires au processus d'invasion actif. Leur sécrétion est également nécessaire pour le processus d'egress des parasites.

Les rhoptries sont des organites en forme de poire, avec une partie bombée appelée le bulbe, contenant les protéines ROP, et une partie plus longiforme appelée le cou, contenant les protéines RON (Nichols et al., 1983). Les protéines RON sont déchargées pendant l'invasion active, et insérées dans la membrane de l'hôte pour former un point d'ancrage pour la jonction serrée (Shen and Sibley, 2012). Les protéines ROP sont également sécrétées pendant l'invasion dans le cytoplasme de la cellule hôte, formant des petites vésicules appelées evacuoles (Håkansson et al., 2001). Celles-ci fusionnent par la suite avec la PVM en formation, et les protéines ROP sont alors exposées au cytoplasme de l'hôte (Figure 7) (Beckers et al., 1994).

Enfin, les granules denses sont de petites vésicules qui sont denses aux électrons lors de leur observation au microscope électronique, d'où elles tirent leur nom. La décharge des granules denses se produit une fois que le parasite est dans le cytoplasme de l'hôte, entouré de la PVM (Achbarou et al., 1991). Les granules denses contiennent de petites protéines pour la plupart, présentant une séquence hydrophobe en N terminal ayant les caractéristiques d'un peptide signal ou d'un segment transmembranaire. De par leur nature très déstructurée, la plupart des protéines GRA ne présentent aucune similarité avec d'autres protéines de fonction connues, et leurs potentielles activités ne sont pas prévisibles en regardant leur séquence. En revanche,

la plupart de ces protéines possèdent un peptide signal caractéristique en position N-terminal, leur permettant d'entrer dans la voie de sécrétion (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015).

Certaines protéines GRA participent à l'organisation de la vacuole, avec par exemple GRA17 et GRA23 qui sont impliquées dans la diffusion passive des petits éléments (nutriments) à travers la PVM (Figure 9) (Gold et al., 2015). D'autres protéines, comme GRA1, GRA2 et GRA5, sont retrouvées au niveau de la paroi des kystes tissulaires contenant les bradyzoïtes pendant la phase chronique de l'infection (Torpier et al., 1993). Enfin, d'autres protéines passent la PVM et atteignent la cellule hôte, au niveau cytoplasmique et nucléaire (Figure 8) (rassemblées dans (Hakimi et al., 2017). Ces protéines sont qualifiées d'effecteurs, de par leur action sur la cellule hôte, puisqu'elles sont capables de modifier la signalisation cellulaire, ce qui peut aboutir à l'expression ou la répression de certains gènes. Ce sujet est développé dans un prochain point de cet exposé.

3. Réponse immune à *Toxoplasma gondii*

3.1. Site d'infection

3.1.1. Détection du parasite

Une fois ingérés, les parasites envahissent les entérocytes et se propagent dans l'épithélium intestinal. Une fois que les parasites atteignent la lamina propria, ils sont capables d'envahir les leucocytes, et entrent dans la circulation lymphatique et systémique pour disséminer dans l'organisme, assez tôt dans l'infection, ce qui permet l'infection de tissus distants tels que les cellules gliales du système nerveux central (Courret et al., 2006; Mordue and Sibley, 2003).

Le système immunitaire inné possède de nombreux récepteurs qui reconnaissent des structures conservées parmi les espèces microbiennes ou relargués par les cellules infectées, appelées respectivement PAMPs ou DAMPs (pathogen-associated or damages-associated molecular pattern) (Takeuchi and Akira, 2010). Une classe de ces récepteurs, la famille des TLR (toll like receptor), a initialement été identifiée comme jouant un rôle majeur dans la reconnaissance immune des parasites, dont *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli and Denkers, 2006). Les TLR (Toll Like Recepteur) ont initialement été décrits chez la Drosophile : la protéine Toll est une protéine transmembranaire qui est nécessaire au bon développement embryonnaire (Hashimoto et al., 1988), et impliquée dans la défense contre les bactéries (Rutschmann et al., 2002). Chez la souris, le TLR 11/TLR 12 est capable de reconnaitre une protéine de *Toxoplasma gondii*, la profiline, une protéine liant l'actine (Andrade et al., 2013; Koblansky et al., 2013), secrétée par le parasite (Figure 6). Les souris déficientes pour *MyD88*, une protéine adaptatrice nécessaire à l'activation des TLR, à l'exception de TLR3 (Takeuchi and Akira, 2010), montrent une perte totale de résistance lors d'une infection systémique ou

orale par *Toxoplasma gondii*. Ce phénotype est probablement dû à un défaut de production d'interleukine 12 (Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008). La source majeure d'IL12 lors de l'infection systémique par *Toxoplasma gondii* en souris est les cellules dendritiques (Liu et al., 2006). En revanche, l'expression de *MyD88* dans les lymphocytes T est essentielle pour la résistance à *Toxoplasma gondii*, et l'injection d'IL12 en souris avec des lymphocytes T *MyD88* $^{-/-}$ ne restaure pas la susceptibilité (LaRosa et al., 2008). De la même façon, alors qu'une mortalité de 100% est observée dans des souris avec des DC *MyD88* $^{-/-}$, celles-ci meurent 3 semaines plus tard que les souris *MyD88* $^{-/-}$ après infection. De plus, aucune inactivation simple ou double des TLR testés ne présente une susceptibilité accrue à une infection péritonéale à *Toxoplasma gondii* (Melo et al., 2010). Ceci suggère que d'autres types cellulaires (autre que macrophages ou DCs), et des récepteurs associés à MyD88 (non-TLR) sont nécessaires pour la résistance de l'hôte à *Toxoplasma gondii*.

L'implication des membres de la famille de l'IL1 pourrait expliquer cela. La réponse IL1 nécessite l'activation d'une famille de récepteurs cytoplasmiques NLR (nod like receptors), qui reconnaissent différentes classes de DAMPs et PAMPs (revue dans (Schroder and Tschopp, 2010; Stutz et al., 2009). Certains membres de la famille NLR, dont NLRP1, NLRP3 et NLRC4 sont impliqués dans l'activation de la caspase 1 par la formation de larges complexes moléculaires, appelés inflammasomes (Schroder and Tschopp, 2010; Stutz et al., 2009). La caspase 1 clive les formes immatures de IL1β, IL18 et IL33 en cytokines actives (Sims and Smith, 2010). Les récepteurs de l'IL1β et IL18 utilisent MyD88 comme adaptateur, conduisant à l'activation de NF-κB et des MAPK, et donc la production d'IL12 par les cellules présentatrices d'antigène (Adachi et al., 1998). En présence d'IL12, l'IL1β et l'IL18 augmentent la production d'IFNγ par les cellules NK durant l'infection à *Toxoplasma gondii* (Cai et al., 2000; Hunter et al., 1995). Les souris *IL18* $^{-/-}$ montrent une morbidité et une pathologie intestinale plus faibles après infection (Vossenkämper et al., 2004), suggérant que l'IL18 induite par le parasite contribue à l'immunopathologie.

Les TLR11 et 12 sont absent chez l'humain (Gazzinelli et al., 2014), où la reconnaissance du parasite et l'induction d'IL12 est assurée par les TLR 2,4, 7 et 9 (Morger et al., 2014). L'ARN et l'ADN provenant de la dégradation du parasite sont reconnus par les TLR 7 et 9 respectivement (Andrade et al., 2013), tandis que les TLR 2 et 4 reconnaissent les ancres de glycophosphatidylinositol (GPIs) présentes à la surface du parasite (Debierre-Grockiego et al., 2007). L'interaction avec les cellules de l'immunité innée entrainent donc la sécrétion d'IL12 par les DC CD8α (Mashayekhi et al., 2011; Reis e Sousa et al., 1997), les DC plasmacytoïdes (Bierly et al., 2008; Pepper et al., 2008), les macrophages (Robben et al., 2004) et les neutrophiles (Bliss et al., 2000).

3.1.2. Mécanismes effecteurs des cellules

3.1.2.1. Les cytokines

Durant l'infection initiale, le parasite dissémine rapidement à partir du site d'inoculation pour atteindre d'autres tissus de l'organisme (Dubey, 1998; Dubey et al., 1997). L'interaction avec les cellules de l'immunité innée entraine la production de l'IL12 par les DC CD8α (Mashayekhi et al., 2011; Reis e Sousa et al., 1997), les DC plasmacytoïdes (Bierly et al., 2008; Pepper et al., 2008), les macrophages (Robben et al., 2004), et les neutrophiles (Bliss et al., 2000). Une des voies majeures d'induction de l'IL12 est la détection de la profiline, une protéine liant l'actine, par les TLR11 et 12 (Andrade et al., 2013; Yarovinsky, 2005). Cette voie est très importante pour le contrôle de l'infection, comme démontré avec la susceptibilité des souris *MyD88* $^{-/-}$ (Scanga et al., 2002), qui sont dépourvues de l'adaptateur majeur de la signalisation via les TLR. L'Il12 induit la production d'IFNγ, initialement par les cellules NK (Gazzinelli et al., 1993a; Hunter et al., 1994a), et plus tard par les LT CD4 (Gazzinelli et al., 1994) et les LT CD8 (Wilson et al., 2008). L'axe IL12-IFNγ est critique pour le contrôle de l'infection, comme indiqué par la susceptibilité des souris déficientes pour l'IFNγ grâce à la neutralisation anticorps, ou par ablation génétique de l'IFNγ (Scharton-Kersten et al., 1996), les récepteurs IFNγ (Yap and Sher, 1999), ou l'IL12p40 (Yap et al., 2000). La signalisation IFNγ s'effectue via la phosphorylation et la relocalisation de STAT1 au noyau pour induire un lot de gènes induits par l'IFNγ (ISG) (Darnell et al., 1994; Schindler and Darnell, 1995). De façon attendue, STAT1 est également essentiel pour le contrôle de l'infection en souris (Gavrilescu et al., 2004; Lieberman et al., 2004). Quand l'infection précède le signal d'activation, *Toxoplasma gondii* est capable de bloquer la signalisation via STAT1, conduisant à la diminution de l'expression de *iNOS* (Lüder et al., 2003), et *CMHII* (Lüder et al., 2001), parmi d'autres gènes ISG (Lang et al., 2012). Le fonctionnement de cette voie, ainsi que l'effet du parasite sur celle-ci sont décrits plus amplement dans un autre paragraphe.

D'autres voies de l'immunité innée sont importantes pour le contrôle de l'infection chronique, mais ne sont pas essentielles durant l'infection aiguë, dont la voie du TNFα (Gazzinelli et al., 1993b), ses récepteurs (Deckert-Schlüter et al., 1998; Yap et al., 1998), et iNOS (Scharton-Kersten et al., 1997). Le type 1 IFNβ joue un rôle plus modeste dans le contrôle de l'infection de la souche de type 2 Me49 en souris (Han et al., 2014), et a montré la capacité à induire un contrôle modeste en macrophages humains (Schmitz et al., 1989). L'interféron de type 1 semble jouer un rôle plus important dans le contrôle de certaines souches atypiques *in vitro* (Melo et al., 2013). Collectivement, les interférons semblent induire une restriction de la croissance parasitaire via l'induction de iNOS, une augmentation du métabolisme oxydatif, la restriction des nutriments comme le fer, et l'augmentation de voies spécifiques ciblant les pathogènes intracellulaires (Sibley, 2011). L'activation de la réponse T_H1 peut également être

délétère à la survie de l'hôte, comme démontré par les expériences d'infection orale avec une souche de type 2 (Liesenfeld, 2002), ou durant une infection aiguë par les souches de type 1 (Gavrilescu and Denkers, 2001; Mordue et al., 2001), où les haut niveaux de cytokines pro-inflammatoires résultent en une pathologie. En accord avec cela, l'induction d'une réponse T_H1 forte est modulée par l'IL10, et son absence mène à une immunopathologie forte (Gazzinelli et al., 1996). L'IL27 promeut également les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui limitent la réponse cellulaire T_H1 pour diminuer l'inflammation (Hall et al., 2012).

3.1.2.2. Les IRGs

Les IRGs (pour Immunity Related GTPases) sont une famille de protéines impliquées dans l'immunité innée de la cellule, qui sont parmi les premières et les plus fortement induites par l'IFNγ (Taylor et al., 2000). Chez la souris, les IRGs sont responsables de la résistance à *Toxoplasma gondii*, et globalement de la résistance aux pathogènes intracellulaires (Collazo et al., 2001, 2002; Feng et al., 2008). Au niveau du mécanisme d'action, les IRGs possèdent une forme active liée au GTP, et une forme inactive liée au GDP (Papic et al., 2008). Dans les conditions physiologiques, ces protéines sont séquestrées par des protéines IrgM, présentes dans les membranes des organelles de la cellule, qui agissent comme stabilisateurs pour prévenir l'hydrolyse du GTP, ce qui permet le maintien des IRGs dans un stade inactif (Hunn et al., 2008). Lors d'une infection, la transcription des IRGs est fortement induite par l'IFNγ, et les IRGs vont reconnaitre la membrane des pathogènes intracellulaires par un mécanisme encore méconnu (Figure 6). Les hypothèses les plus couramment évoquées sont la reconnaissance de la membrane du pathogène à cause d'une absence de protéine IrgM (Haldar et al., 2013), ou alors d'une composition lipidique différente (Tiwari et al., 2009). Les IRGs vont pouvoir entrer en oligomérisation et être activées par l'hydrolyse du GTP, ce qui va permettre une vésiculation de la membrane (Zhao et al., 2009), et la mort des parasites intracellulaires (Martens et al., 2005).

Les humains ne possèdent que 2 gènes *IRG*, mais l'un ne s'exprime que dans le testis, et l'autre n'est pas inductible à l'IFNγ (Howard et al., 2011). Ce mécanisme antiparasitaire primordial en souris n'est donc pas présent chez l'humain.

3.1.2.3. Les GBPs

Une autre famille de protéines impliquée dans la reconnaissance intracellulaire du pathogène est la famille des GBPs (guanylate binding protein), induite également par l'IFNγ (Figure 6) (Kim et al., 2012). Contrairement aux IRGs, les GBPs ne semblent pas être recrutées directement à la PVM, mais se positionnent plutôt en clusters protéiques à proximité de celle-

ci (Selleck et al., 2013). L'inactivation de *GBP1* (Selleck et al., 2013), *GBP2* (Degrandi et al., 2013), ou d'un locus du chromosome 3 contenant 6 *GBPs* (Yamamoto et al., 2012), compromet le contrôle de *Toxoplasma gondii* dans les cellules traitées à l'IFNγ *in vitro* et augmente la susceptibilité des souris à l'infection. Des études récentes suggèrent que les GBPs pourraient être impliquées dans la seconde étape de ciblage du parasite, menant à sa destruction directe (Kravets et al., 2016). Tout comme pour les IRGs, les différentes souches de *Toxoplasma gondii* sont différemment susceptibles à la destruction par les GBPs (Selleck et al., 2013; Virreira Winter et al., 2011), et les mécanismes d'échappement des souches résistantes sont décrits plus loin dans cet exposé.

Alors que les cellules humaines expriment un large répertoire de GBPs (MacMicking, 2012), leur rôle dans le contrôle du parasite est encore discuté (Johnston et al., 2016; Ohshima et al., 2014). En revanche, malgré l'absence des TLR11 et 12, ainsi que du système de défense IRG, la voie de l'IFNγ reste critique pour le contrôle du parasite *in vitro* (Hunter and Sibley, 2012).

Le processus d'autophagie contribue à l'immunité innée en permettant la capture des pathogènes intracellulaires et les conduisant à la destruction par xénophagie (Huang and Brumell, 2014). Indépendamment de ce rôle, le recrutement des GBPs et des IRGs à la PVM contenant les parasites dépend de plusieurs protéines de l'autophagie, dont ATG7, 5, 16 et 12, mais sans les étapes d'activation précédentes ou la partie dégradation de la voie (Choi et al., 2014; Ohshima et al., 2014; Zhao et al., 2009). En absence de ces protéines, les IRGs et les GBPs forment des agrégats qui sont spontanément activés et ne peuvent pas être recrutés à la PVM (Selleck et al., 2013; Zhao et al., 2008). Il a été soulevé que ces protéines ATG sont nécessaires pour l'homéostase (Selleck et al., 2013), de façon à ce que les IRGs et les GBPs sont instables en absence de cette voie, de façon similaire au phénotype observé dans les cellules *IrgM* $^{-/-}$ (Hunn et al., 2008). Une autre hypothèse est que les protéines ATG pourraient être directement impliquées dans le recrutement des IRGs et GBPs à la PVM, comme suggéré par la délivrance de LC3 à une partie des vacuoles parasitaires (Choi et al., 2014). Quel que soit le mécanisme exact, la nécessité des protéines ATG durant la réponse IFNγ met en lumière un lien entre l'immunité innée et l'homéostase cellulaire dans la défense de l'hôte.

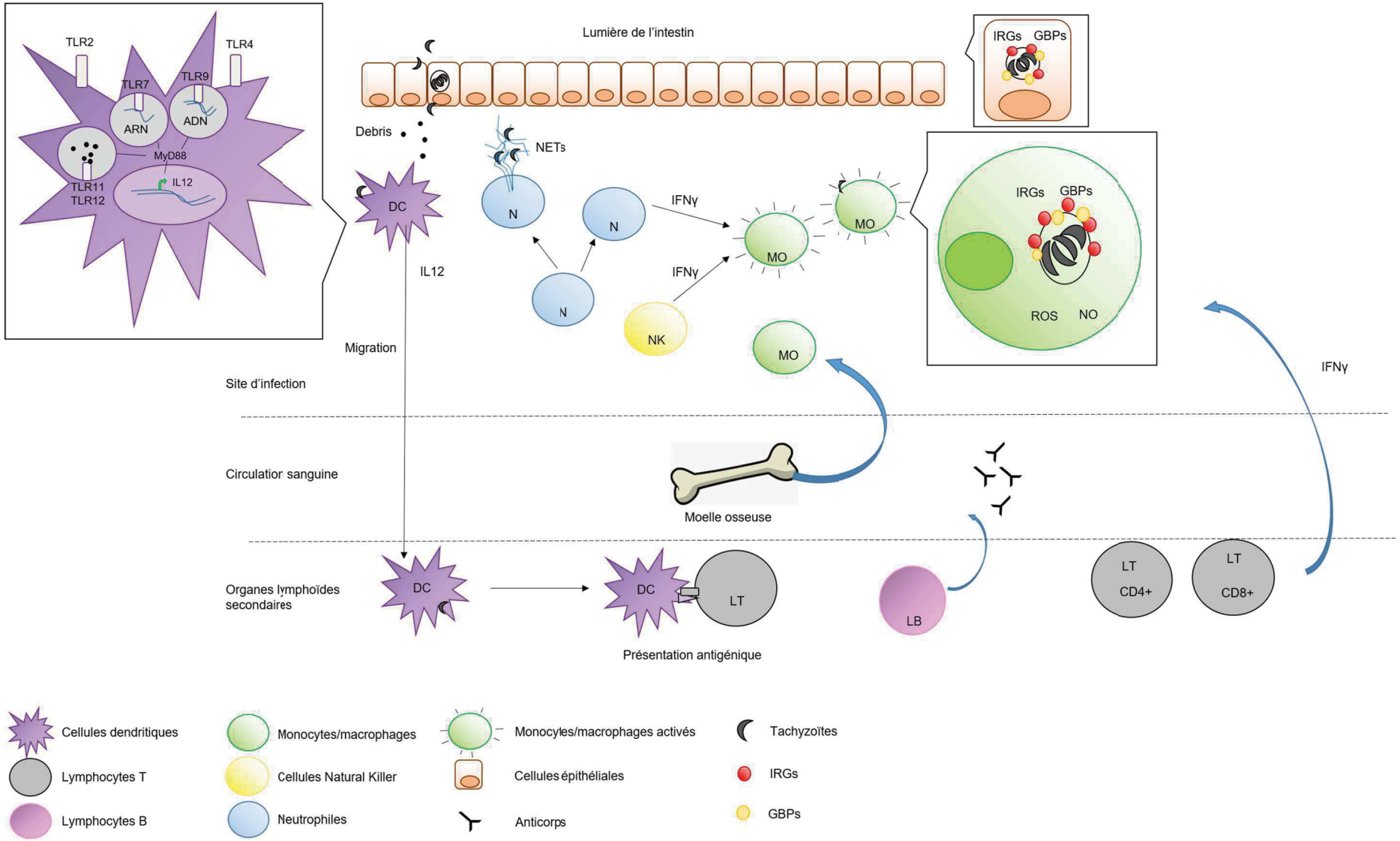
3.1.3. Autres mécanismes

En plus des IRGs et des GBPs, inductibles dans tous les types de cellules murines, d'autres mécanismes contribuent au contrôle parasitaire. Tout d'abord, les macrophages peuvent détruire les parasites par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NO). L'induction de l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase) résulte en la production de NO à partir de l'acide aminé arginine (Khan et al., 1997). Une autre stratégie développée

est la déplétion du tryptophane, un acide aminé essentiel à la croissance de *Toxoplasma gondii* ; cette consommation est assurée par l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-DiOxygenase) (Pfefferkorn, 1984). Cette déplétion permet une inhibition de la croissance du parasite, contribuant ainsi à la protection contre l'infection.

Les effets décrits ci-dessus reflètent un ensemble de défenses autonomes de la cellule. Alors que certains processus sont communs à toutes les cellules, comme les IRGs et les GBPs, d'autres sont restreints à certains types cellulaires, comme la production de NO par les cellules effectrices (macrophages, neutrophiles). La réponse immune contre le parasite nécessite donc de multiples types cellulaires, dont les plus critiques sont décrits ci-dessous.

Figure 6 : Réponse immunitaire primaire contre *Toxoplasma gondii*
La description présentée ci-contre représente une première infection par *Toxoplasma gondii* par voie orale. Le parasite infecte l'épithélium intestinal et les cellules plus profondes dans la lamina propria. Les débris cellulaires et parasitaires sont détectés par les cellules dendritiques (DC), ce qui les active. Les DC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires et activent les lymphocytes T naïfs en leur présentant les antigènes du parasite. Les lymphocytes migrent au site d'infection pour éliminer les cellules infectées, et participent activement à la production d'IFNγ, avec les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK. Les monocytes sont attirés par chimiotactisme au site d'infection, et participent à la destruction des parasites. Les parasites peuvent infecter les cellules migrantes telles que les DC, et ainsi disséminer dans l'organisme de façon efficace.


TLR2
TLR4
TLR7
TLR9
ARN
ADN
MyD88
IL12
TLR11
TLR12
Lumière de l'intestin
IRGs
GBPs
Debris
NETs
DC
N
N
N
IFNγ
IFNγ
MO
MO
NK
IRGs
GBPs
ROS
NO
IL12
Migration
Site d'infection
MO
IFNγ
Circulatior sanguine
Moelle osseuse
Organes lymphoïdes secondaires
DC
DC
LT
LB
LT CD4+
LT CD8+
Présentation antigénique
Cellules dendritiques
Lymphocytes T
Lymphocytes B
Monocytes/macrophages
Cellules Natural Killer
Neutrophiles
Monocyles/macrophages activés
Cellules épithéliales
Anticorps
Tachyzoïtes
IRGs
GBPs

3.2. Contrôle de l'inflammation au point d'infection

3.2.1. Les acteurs cellulaires clés

3.2.1.1. Les cellules NK

Les cellules NK font partie de l'immunité innée, et permettent une protection contre les tumeurs et les pathogènes intracellulaires (Spits et al., 2013). La reconnaissance des cellules anormales (infectées ou tumorales) entraine une activité cytotoxique des cellules NK, conduisant à la destruction des cellules en question et à la production d'IFNγ, après induction par l'IL12. Les cellules NK sont essentielles pour le contrôle de *Toxoplasma gondii* (Denkers et al., 1993). Lors de l'infection systémique, les cellules NK produisent de l'IL10, ce qui permet de limiter la sécrétion massive d'IL12 notamment par les DCs, et donc de réguler l'inflammation et prévenir une immunopathologie délétère (Perona-Wright et al., 2009). Ainsi, en plus de leur rôle pro-inflammatoire et effecteur, ces cellules participent également à l'équilibre du système par la limitation de la réponse T_H1 plus tard dans l'infection.

3.2.1.2. Les neutrophiles

Une des caractéristiques principales des neutrophiles est leur capacité à réagir à l'invasion du pathogène en migrant rapidement au point d'infection. Diverses études ont démontré l'importance critique des neutrophiles dans les stades précoces de l'infection à *Toxoplasma gondii,* avec des niveaux altérés de cytokines de type T_H1 (pro-inflammatoires) et T_H2 (anti-inflammatoires) dans des souris déplétées en neutrophiles, résultant en une infection systémique létale (Bliss et al., 2001). En revanche, une déplétion des neutrophiles ne semble pas avoir d'effet sur le contrôle du stade chronique de l'infection (Bliss et al., 1999; Scharton-Kersten et al., 1997).

Les neutrophiles matures participent au contrôle de l'infection entre autres par la sécrétion d'IL12 sans besoin de signal d'activation par l'IFNγ, mais possèdent également des activités anti-microbiennes, bien que *Toxoplasma gondii* soit capable de se répliquer dans le cytosol des neutrophiles activés (Nakao and Konishi, 1991).

Les neutrophiles sont également capables d'éliminer les tachyzoïtes extracellulaires par un processus de relargage de matériel cellulaire composé de fibres, de composés anti-microbiens, appelé NET (neutrophil extracellular traps) (Brinkmann, 2004), également présent chez les éosinophiles. Les neutrophiles déploient cette activité en réponse à *Toxoplasma gondii* sans besoin d'invasion par le parasite, ce qui conduit à sa destruction (Abi Abdallah et al., 2012).

De par leur capacité migratoire, les neutrophiles sont souvent évoqués comme un moyen utilisé par le parasite pour sa dissémination dans l'organisme.

3.2.1.3. Monocytes pro-inflammatoires et macrophages

Les monocytes sont produits par la moelle osseuse à partir de cellules précurseurs dérivées des cellules souches hématopoïétiques, et circulent dans le système sanguin. Au site d'infection, la sécrétion importante d'IFNγ par les cellules NK induit le remplacement des monocytes résidents par ces monocytes circulants, qui vont ensuite se différencier en monocytes pro-inflammatoires et en cellules dendritiques. Cette migration de la circulation aux tissus est permise par la sécrétion de la chimiokine MCP1, et l'expression sur les monocytes de son récepteur CCR2, ce qui va permettre l'attraction des monocytes sur le site infectieux (Geissmann et al., 2010). De nombreux types cellulaires produisent la protéine MCP1 en réponse à l'infection par *Toxoplasma gondii* (Robben et al., 2005), ce qui permet le recrutement des monocytes pro-inflammatoires au site d'infection. Leur importance a été démontrée lors de l'infection de souris *CCR2* $^{-/-}$ ou *MCP1* $^{-/-}$ par *Toxoplasma gondii*, où le contrôle parasitaire était abrogé, malgré des niveaux d'IFNγ normaux, soulignant l'importance du recrutement des monocytes pro-inflammatoires au site d'infection. Leurs rôles consistent en la sécrétion massive d'IL12, mais aussi l'élimination des parasites phagocytés ou après invasion et détection par les monocytes pro-inflammatoires activés (revus dans (Denkers et al., 2012)).

3.2.1.4. Les cellules dendritiques

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles, dont la fonction principale est de maturer les antigènes et de les présenter à leur surface cellulaire aux lymphocytes pour les activer. Les DC immatures surveillent constamment l'environnement, cherchant les agents infectieux, comme *Toxoplasma gondii*, grâce à la présence de leur TLR, et sont recrutées spécifiquement au point d'infection (Figure 7) (Cohen and Denkers, 2015a). Cette reconnaissance du pathogène entraine leur activation, et le commencement du processus de présentation antigénique. Une fois activées, les cellules dendritiques vont migrer jusqu'aux nœuds lymphatiques, où elles pourront activer à leur tour les lymphocytes B et T pour initier la réponse immunitaire adaptative (Banchereau et al., 2000).

Les DC sont aussi des grandes productrices d'IL12, et permettent ainsi une bonne initiation de la réponse immune durant l'infection aiguë. Il a également été démontré que les cellules dendritiques sont une source majeure d'IL12 dans le système nerveux central pendant

l'infection chronique à *Toxoplasma gondii*, et cette production est nécessaire pour prévenir la réactivation des parasites (Yap et al., 2000).

3.2.1.5. Les lymphocytes

Les lymphocytes T CD8 naïfs sont trouvés initialement dans les tissus lymphoïdes, où ils sont activés par les cellules présentatrices d'antigène après infection. La capacité de survivre à une infection par *Toxoplasma gondii* est dépendante de façon critique de la capacité du parasite à induire une forte réponse médiée par les lymphocytes T. L'IL12 produite par les cellules dendritiques en réponse à l'infection permet une activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, et la sécrétion massive d'IFNγ (Gazzinelli et al., 1992).

Une fois que les LT CD8+ antigène-spécifique sont générés, ils nécessitent une expansion et une différenciation qui est modulée par les cytokines (Kim and Harty, 2014). Durant l'infection, une partie des cellules inflammatoires comme les neutrophiles, les macrophages et les DCs migrent au site d'infection et sécrètent des cytokines et des chimiokines qui modulent le devenir des LT CD8 (Aliberti et al., 2000; Bliss et al., 2000, 2001; Del Rio et al., 2001; Robben et al., 2004; Wilson et al., 2010; Yap et al., 2000). Une des cytokines majeures responsable de la génération des LT CD8 effecteurs est l'IL12 (Gazzinelli et al., 1993a; Khan et al., 1994; Yap et al., 2000), et permet donc d'induire dans le cas d'une infection à *Toxoplasma gondii,* la réponse CD8 (Wilson et al., 2010). Le production de cytokines dépend des souches de parasites, ce qui affecte le développement des LT CD8 (Robben et al., 2004).

Comme beaucoup de pathogènes intracellulaires, *Toxoplasma gondii* est capable d'altérer l'expression des molécules impliquées dans la présentation antigénique dans les cellules infectées, ce qui suggère une diminution de l'habilité de ces cellules à activer les lymphocytes T CD8+ (McKee et al., 2004). Bien que l'activité cytotoxique des lymphocytes T soit le mode d'action principal par destruction des cellules infectées, les lymphocytes T CD8+ sont également capables en culture *in vitro* d'éliminer directement les tachyzoïtes extracellulaires (Khan et al., 1988).

3.2.2. Balance T_H1 / T_H2

Au niveau de la lamina propria, les différentes cellules effectrices sont recrutées en masse pour tenter d'enrayer l'infection. Alors que beaucoup de types cellulaires sécrètent de l'IFNγ, les lymphocytes T CD8+ ont une importance cruciale dans la production de cette cytokine. Cependant, les chercheurs ont pu observer que parmi les différentes souches de souris, celles qui présentaient les plus fort taux d'IFNγ en réponse à l'infection par *Toxoplasma gondii*

avaient une mortalité plus élevée que leurs congénères (McLeod et al., 1989). Si la production d'IFNγ est primordiale pour le bon contrôle de l'infection, il est aussi nécessaire de la réguler correctement, afin d'éviter des effets délétères. Les cytokines de type T_H2 peuvent contrecarrer les effets des cytokines de type T_H1 ; ainsi, l'IL4 peut empêcher la sécrétion d'IFNγ et d'IL12 par les monocytes et les macrophages (Economou et al., 1989; Fernandez-Botran et al., 1988), et donc diminuer la réponse T_H1. La sécrétion d'IL4 permet de diminuer la production de ROS, quand la production d'IL10 par les monocytes, une cytokine anti-inflammatoire permet de diminuer la production d'IL12 et d'IFNγ (D'Andrea et al., 1993; Fiorentino et al., 1991; Poe et al., 1997).

L'IL10 est nécessaire pour la survie des souris infectées par le parasite (Gazzinelli et al., 1996), comme révélé dans une étude où des souris déficientes pour l'IL10 présentaient une mortalité accrue face à l'infection par *Toxoplasma gondii* (Hunter et al., 1994b). Cette mortalité est due à la prolifération incontrôlée des lymphocytes T CD4+ (Suzuki et al., 2000), et à une suractivation du système immunitaire. Malgré son effet protecteur, l'IL10 peut avoir des effets délétères, puisque les souris les plus susceptibles au parasite présentent les plus fort taux de cette cytokine (Hunter et al., 1994b). Les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires doivent donc être régulées pour assurer la coordination de la réponse immunitaire.

L'IL18 va activer la production d'IFNγ par les lymphocytes T et les cellules NK. De par sa capacité à induire la sécrétion d'IFNγ, l'IL18 a initialement été classée comme une cytokine de type T_H1. Cependant, la cytokine anti-inflammatoire IL10 ne permet pas une inhibition de l'IL18 (Zediak and Hunter, 2003), et ces deux cytokines peuvent au contraire agir en synergie pour atténuer la réponse T_H1 (Cai et al., 2000; Micallef et al., 1999). Cette action permettrait de diminuer la réponse T_H1, afin d'éviter une immunopathologie sévère, sans l'abolir complètement. En parallèle, la synergie entre IL4 et l'IL18 permet l'induction de la réponse T_H2 (Xu et al., 2000), ce qui suggère un rôle pour l'IL18 dans l'équilibre entre les réponses T_H1 et T_H2.

3.3. Dissémination du parasite

L'infection des cellules épithéliales lors d'une inoculation par voie orale induit le recrutement et l'activation des DC et des monocytes pro-inflammatoires, comme décrit précédemment (Cohen and Denkers, 2015b). Ces cellules, suite à l'infection par *Toxoplasma gondii,* développent un phénotype d'hypermotilité et donc une capacité migratoire accrue, entrainant rapidement une migration des cellules infectées de l'intestin aux tissus périphériques (Lambert et al., 2006). Les tachyzoïtes sont retrouvés à l'état circulatoire dans le sang à partir de 24 heures après infection des souris (Dubey, 1997).

La barrière hémato-encéphalique est une barrière physiologique semi-perméable constituant une séparation physique entre la circulation sanguine et l'encéphale. Elle est formée par des cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, constituant les capillaires sanguins, et ceux-ci sont entourés d'astrocytes. La barrière hémato encéphalique permet une protection efficace de l'encéphale contre les pathogènes.

L'entrée de *Toxoplasma gondii* dans l'encéphale constitue un défi de taille en raison de la présence de la barrière hémato encéphalique (Chow and Gu, 2015). Cette entrée s'effectue de deux façons différentes : premièrement les tachyzoïtes peuvent entrer dans le système nerveux central de par leur capacité invasive (Furtado et al., 2012), et réplication dans les cellules endothéliales. Une deuxième façon de pénétrer le système est d'utiliser les cellules comme cheval de Troie (Feustel et al., 2012), et d'exploiter la capacité migratoire trans-endothéliale des cellules immunitaires. Les cellules impliquées dans ce processus sont majoritairement les monocytes et autres cellules myéloïdes avec une importance particulière des cellules CD11b+/CD11c+ dans la dissémination parasitaire (Courret et al., 2006).

3.4. Surveillance immunitaire durant la phase chronique

Une fois dans le système nerveux central, les parasites vont pouvoir envahir les cellules, avec chez la souris un tropisme particulier pour les cellules neuronales, les astrocytes et les cellules gliales (Koshy et al., 2010). Contrairement à la plupart des types cellulaires, les neurones n'ont pas la capacité de répondre à une stimulation par l'IFNγ, et sont donc incapables de monter une réponse anti-parasitaire (Schlüter et al., 2001). Une fois activés par l'IFNγ, les cellules gliales et les astrocytes vont pouvoir contrôler la prolifération de *Toxoplasma gondii* (Suzuki, 2002), en partie grâce à l'action des IRGs et de la production de NO (Scharton-Kersten et al., 1997).

La forme bradyzoïte des parasites apparait dès 1 à 2 jours après infection de la souris (Di Cristina et al., 2008). Alors que les défenses de l'hôte permettent l'élimination totale des tachyzoïtes, les bradyzoïtes y échappent en résidant dans des kystes intracellulaires. La présence de ces kystes a des impacts sur la vie de la cellule hôte. En effet, il a été montré entre autres en souris que les niveaux de micro ARN de la cellule, et notamment miR146a, sont altérés par l'expression de protéines du parasite, différemment selon les souches (Cannella et al., 2014).

Les kystes peuvent par la suite entrer en réactivation, les parasites se différenciant en tachyzoïtes pour reprendre le cycle lytique rapide (Ashburn et al., 1998). A l'heure actuelle, on ne sait pas si cette rupture de kystes est aléatoire, ou si les parasites peuvent détecter une baisse de la surveillance immunitaire. Chez les souris immunocompétentes, ces réactivations

conduisent à un recrutement rapide des cellules inflammatoires au site d'infection (Ferguson et al., 1989), et à un contrôle rapide de l'infection. Chez les patients chroniquement infectés, des réactivations sont observées quand les lymphocytes T CD4+ chutent au-delà d'un certain seuil (Pereira-Chioccola et al., 2009), résultant généralement en des encéphalites. Cela suggère que les ces lymphocytes tiennent un rôle primordial dans la surveillance immunitaire et le contrôle durant la phase chronique.

Durant la phase chronique, les DC et les cellules NK semblent jouer un rôle primordial dans le maintien immunitaire, puisqu'elles sont retrouvées dans les cerveaux infectés en plus grande quantité encore 6 mois après l'infection initiale (Hauser et al., 1982). Ces cellules sont souvent qualifiées de sentinelles, permettant en cas de rupture des kystes d'entrer en activation très rapidement, et ainsi de permettre le contrôle de la réinfection de façon très précoce.

La présence de l'IL10 durant la phase chronique de l'infection est primordiale. En effet, les souris chroniquement infectées dont l'IL10 est neutralisée présentent une augmentation importante de l'infiltration leucocytaire au niveau du cerveau (Deckert-Schlüter et al., 1997), et des lésions entrainées. Là encore, l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ainsi que la régulation des effecteurs cellulaires clés sont essentiels pour le maintien de la phase chronique et de l'intégrité de l'hôte.

4. Déterminants pathogéniques du parasite

4.1. Les différents modèles d'étude

Dans le contexte d'Europe et d'Amérique du Nord, les rongeurs constituent un réservoir important d'hôtes intermédiaires. Ils participent en effet au cycle en étant chassés par les félins, et notamment les chats. Etant donné leur importance dans le cycle biologique de *Toxoplasma gondii*, les rongeurs sont communément utilisés comme modèle d'étude pour l'infection par ce parasite.

Parmi les rongeurs, les souris sont les plus utilisées pour les infections par *Toxoplasma gondii*. La dynamique de l'infection va dépendre non seulement de la souche de parasite utilisée, mais aussi du contexte génétique de l'hôte (Johnson, 1984; Liesenfeld et al., 1996) . Les souris C57BL/6, les CBA et les BALB/C sont des souches de souris consanguines, présentant de grandes similarités génétiques. Ces différentes souches sont couramment utilisées dans l'étude de la toxoplasmose, selon la problématique soulevée. Par exemple, les C57BL/6 sont utilisées majoritairement pour les infections orales par kystes, et les parasites peuvent alors établir une infection chronique (Liesenfeld, 2002). Ces souris sont également utilisées pour étudier la toxoplasmose oculaire (Lu et al., 2005). Les souris BALB/C sont les souris les moins

susceptibles à une infection orale par des kystes, mais sont plutôt utilisées dans les cas d'injection de tachyzoïtes dans la cavité péritonéale. Dans ces souris, les parasites forment peu, voire pas de kystes (Brown et al., 1995; Lee and Kasper, 2004; Luo et al., 1997; Suzuki et al., 2010), et elles sont donc rarement utilisées dans l'étude des infections chroniques. La susceptibilité des souris dépend également de la voie d'infection des parasites. Par exemple, les BALB/C présentent une susceptibilité accrue quand les parasites sont injectés directement dans la cavité péritonéale, tandis que les C57BL/6 sont résistantes à l'infection par cette voie (Subauste, 2012).

Il a été montré que les différents niveaux d'hormones sexuelles jouent un rôle dans la réponse immunitaire en souris. En effet, les mâles et les femelles présentent une différence dans la susceptibilité à l'infection et dans leur réponses immunitaires innées (Walker et al., 1997). Les mâles, pour une même dose de parasites, présentent des lésions cérébrales plus faibles, ainsi que des quantités de parasites plus faibles (Kittas et al., 1984). Ces individus montrent des niveaux d'IL12 et d'IFNγ plus importants et de façon plus précoce que les femelles, ce qui explique leur plus forte résistance à l'infection puisque ces cytokines sont primordiales dans le contrôle immunitaire. L'estradiol, une hormone présente en plus grande quantité chez les femelles, inhibe le fonctionnement des cellules NK (Gabrilovac et al., 1988; Provinciali et al., 1995), ainsi que des macrophages, ce qui peut également expliquer la plus grande susceptibilité des femelles (Gómez Marín et al., 1996; Hunter et al., 1994a). Dans ce sens, l'injection d'œstrogènes dans des souris mâles et femelles rend ces individus plus susceptibles, avec une mortalité accrue due à l'inhibition des cellules NK. Chez l'humain, cette différence est plus difficile à étudier. En revanche, il est connu que les hommes et les femmes ne sont pas égaux face à une infection par *Toxoplasma gondii*, et que les femmes immunodéprimées présentent plus fréquemment des encéphalites que les hommes immunodéprimés (Bernin and Lotter, 2014). Il a été mentionné précédemment que les souris infectées par le parasite ne présentent plus de répulsion naturelle pour l'urine de félins (Vyas et al., 2007). De façon intéressante, ce phénotype a été observé uniquement chez des femelles et non des mâles (Xiao et al., 2012).

De façon générale, les souris utilisées dans les expérimentations animales sont toutes du même genre, sauf nécessité contraire. Dans la plupart des cas, les souris choisies sont des individus femelles, en raison de leur susceptibilité accrue et de leur moindre agressivité envers leurs congénères.

Lors de toute expérimentation, il est primordial de choisir avec attention le modèle animal utilisé, en fonction des paramètres souhaités et de la problématique étudiée. De la même

façon, le choix dans les souches parasitaires disponibles et le mode d'infection vont conditionner la réponse observée.

4.2. Les effecteurs du parasite

4.2.1. Les rhoptries à la PVM

4.2.1.1. ROP18 ROP5 ROP17 GRA7

Une des plus grandes différences phénotypique entre les souches est leur habilité à causer une infection létale en souris avec un faible inoculum. Les souches de type 1 présentent une dose létale 100 d'un seul parasite dans les souris de laboratoire, alors que les souches de type 2 présentent une virulence intermédiaire. Enfin, les souches de type 3 ne causent généralement pas d'infections létales (Sibley and Boothroyd, 1992; Su et al., 2002). Afin de comprendre l'origine de ces différences, des croisements génétiques ont été réalisés entre la souche de type 1 GT1 et la souche de type 3 CTG, et le « mapping quantitative trait locus » (QTL) sur le chromosome VIIa (Taylor et al., 2006) a été effectué. L'analyse de ce *locus* ainsi que des gènes différentiellement exprimés a conduit à l'identification de ROP18, une protéine polymorphique, encodant une serine/thréonine kinase (Taylor et al., 2006). ROP18 est secrétée à partir des rhoptries pendant la phase de l'invasion, et reste dans de petites evacuoles qui se déchargent dans le cytosol de la cellule hôte, avant de revenir s'associer à la PVM (Figure 7) (Taylor et al., 2006). L'activité kinase ainsi que l'ancrage à la PVM sont essentiels pour conférer la virulence (Fentress et al., 2012). La comparaison des profils d'expression de *ROP18* a révélé que les parasites de type 3 expriment 100 fois moins *ROP18* que les types 1 et 2. En surexprimant l'allèle type 1 ou 2 de *ROP18* dans une souche de type 3, l'injection de cette souche dans la souris conduit à une virulence accrue (Saeij et al., 2006). Les études suivantes ont montré que ROP18 cible la famille des IRGs, en les phosphorylant sur des résidus thréonine conservés dans une région du domaine GTPase (Fentress et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). Ces résidus interagissent normalement avec le groupe phosphate du GTP (Ghosh et al., 2004). La phosphorylation effectuée par ROP18 empêche l'hydrolyse du GTP et prévient l'oligomérisation des IRGs. Dans les cellules ayant de hauts niveaux d'expression de ROP18, les IRGs ne peuvent pas s'accumuler sur la vacuole, assurant la survie parasitaire, alors qu'un niveau faible de ROP18 conduit à un recrutement accru des IRGs et une éradication du parasite. En conclusion, ROP18 peut expliquer la résistance des parasites de type 1 et la susceptibilité des souches de type 3 à l'élimination par les IRGs.

La cartographie génétique du croisement entre la souche très virulente de type 1 GT1 et la souche de virulence intermédiaire de type 2 Me49 a permis l'identification d'un nouveau *locus*

sur le chromosome XII, comprenant un ensemble de gènes répétés encodant une pseudokinase polymorphique ROP5 (Behnke et al., 2012). Ce locus est également impliqué dans la différence phénotypique entre les souches de type 2 et 3. Dans ce cas, le génotype des souches de type 3 correspond à une augmentation de la virulence, alors que le type 2 correspond à une suppression de la virulence (Reese et al., 2011). ROP5 est secrétée pendant l'invasion, et s'associe avec la PVM (El Hajj et al., 2007). Ce segment de génome consiste en une famille de 4 à 10 gènes en tandem, qui codent pour des pseudokinases injectées directement dans les cellules hôtes. La délétion de *ROP5* dans une souche virulente résulte en une perte totale de virulence de la souche (Behnke et al., 2011). Les variations dans le nombre de copies et dans les séquences sont responsables de la différence de virulence entre les souches (Reese and Boothroyd, 2011). La plupart des souches atypiques présentes en Amérique du sud possède la version virulente.

ROP5 n'est pas responsable seul de la virulence. Ceci s'explique par l'interaction entre ROP5 et ROP18 ; ROP5 agit à la fois en augmentant l'activité kinase de ROP18 (Behnke et al., 2012) et en liant le substrat IRGa6 (Reese et al., 2014), le gardant dans une conformation qui prévient l'assemblage, et facilite sa phosphorylation.

L'analyse de souches d'Amérique du Sud a révélé que *ROP18* est fortement exprimé, et que son expression permet de restaurer la virulence dans une souche non virulente de type 3 par complémentation (Khan et al., 2009). La plupart des souches d'Amérique du Sud possèdent les allèles de *ROP18* et *ROP5* reliés à ceux de type 1 (Niedelman et al., 2012). Un croisement génétique entre la souche de type 10 VAND d'Amérique du Sud et le type 2 Me49 d'Amérique du Nord a confirmé le rôle de ROP18 et ROP5 dans la virulence accrue. De plus, des études utilisant la technique du CRISPR/Cas 9 pour déléter ces gènes dans d'autres souches d'Amérique du Sud ont permis de confirmer leur rôle majeur dans la virulence (Behnke et al., 2015).

La surexpression de *ROP5* étiqueté dans une souche de parasite a permis la confirmation d'une interaction avec ROP18 au sein d'un complexe protéique contenant d'autres pseudokinases. Ceci a également permis l'identification d'une autre kinase active, ROP17. ROP17 n'est pas très polymorphique, et n'a donc pas été trouvée dans le croisement génétique. En revanche, l'inactivation de *ROP17* entraine une perte de fonction de ROP18, et une souche *Δrop17Δrop18* entraine une perte totale de résistance aux IRGs de la même façon que la perte de *ROP5* (Etheridge et al., 2014). ROP17 et ROP18 sont toutes les deux importantes car elles ont différents substrats, qui sont différents résidus thréonine conservés dans la plupart des protéines IRGs (Etheridge et al., 2014). Le complexe ROP18-ROP17-ROP5 contient aussi d'autres pseudokinases ROPs dont les fonctions sont inconnues, ainsi

que la protéine GRA7, qui aide à inhiber les IRGs. GRA7 est une protéine transmembranaire qui s'étend de l'espace vacuolaire au cytosol de la cellule hôte, où elle interagit avec le complexe ROP (Alaganan et al., 2014). GRA7 se lie directement aux IRGs, et accélère leur dissociation *in vitro* (Alaganan et al., 2014). Ensemble, ce complexe cible le système des IRGs en accélérant leur renouvellement (GRA7 et ROP17), en liant les monomères d'IRG pour inhiber leur assemblage (ROP5), et en phosphorylant les IRGs pour prévenir leur oligomérisation (ROP17 et ROP18).

Les différences de virulence des diverses souches de parasite sont attribuées en souris à la résistance ou non aux IRGs, elle-même dépendante de la présence du complexe virulent ROP5/ROP18. Malgré cet élément majeur, il existe d'autres différences entre les souches, qui jouent sur le devenir de l'infection.

4.2.1.2. ROP38

ROP38 est la seule rhoptrie-kinase qui est exprimée différentiellement entre les souches et pendant la différenciation (Peixoto et al., 2010). En effet, durant la phase tachyzoïte, l'expression de ROP38 est plus importante dans le type 2 et encore plus dans le type 3, en comparaison du type 1. ROP38 est une kinase potentiellement fonctionnelle contenant un peptide signal, et qui est observée associée à la membrane plasmique. Une souche de type 1 a été modifiée pour exprimer une copie additionnelle de ROP38 sous le contrôle d'un promoteur tubuline, de façon à ce que l'expression de ROP38 soit similaire à celle dans le type 3. Les parasites ainsi transgéniques montrent une habilité réduite à induire l'expression de gènes de l'hôte *in vitro* en comparaison à la souche sauvage. Ceci suggère que ROP38 pourrait avoir un effet inhibiteur sur la transcription des gènes de l'hôte. Alors que plusieurs gènes affectés sont modulés par la voie des MAPK, aucune corrélation directe n'a encore été démontrée entre ROP38 et cette voie.

4.2.1.3. ROP54

ROP54 est une protéine contenue dans la partie bulbaire des rhoptries, et est injectée dans la cellule hôte sous forme de evacuoles, qui viendront ensuite s'associer avec la face cytoplasmique de la PVM (Kim et al., 2016). Bien que la localisation soit similaire, ROP54 ne s'associe pas avec le complexe ROP5-ROP17-ROP18. Il a été montré que la délétion de ROP54 dans une souche de type 1 n'affecte pas sa croissance *in vitro*, ni sa virulence *in vivo*. Dans une souche de type 2, alors que la délétion de ROP54 n'affecte pas sa croissance *in vitro*, la virulence *in vivo* est drastiquement diminuée. Ces parasites sont plus sensibles à une élimination par le système immunitaire inné, et leur nombre est fortement diminué dès les

premiers jours de l'infection. Il a été démontré que la signalisation IFNγ est nécessaire pour le contrôle de ces parasites, ce qui suggère que ROP54 permet aux parasites d'échapper à l'élimination (Behnke et al., 2012), notamment en échappant aux macrophages. Les IRGs sont un des moyens de défense de la cellule hôte. Cependant, la perte de virulence des parasites *Δrop54* ne corrèlent pas avec la charge des IRGs à la PVM, mais à celle de la protéine GBP2.

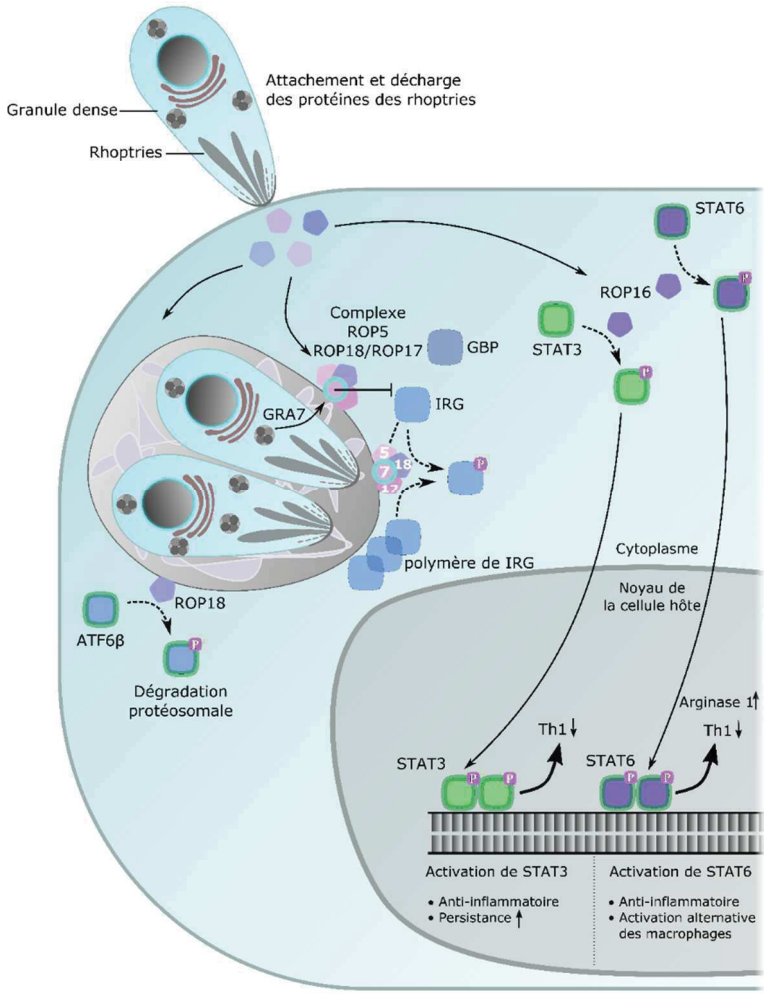


Figure 7 : Les rôles des différents effecteurs de rhoptries
Adapté de Hakimi et al., 2017
Après attachement à la membrane plasmique de l'hôte, les effecteurs issus des rhoptries (ROP) sont sécrétées dans le cytosol de la cellule avant l'entrée du parasite et la formation de la PVM. Les ROP peuvent atteindre le noyau de la cellule hôte, ou s'assembler à la membrane de la PVM. Le complexe ROP5, ROP17 et ROP18, en coopération avec la protéine de granules dense GRA7, permet d'éviter la destruction par les IRGs. ROP18 et ROP16 interagissent directement avec des facteurs de transcription de l'hôte, ATF6B, et STAT3 et 6 respectivement.

4.2.2. ROP16, une rhoptrie à localisation nucléaire

Les souches de type 1 possèdent une protéine kinase active, ROP16, qui est injectée dans le noyau de la cellule hôte au cours de l'invasion (Figure 7). Cette protéine, dont la structure est celle d'une sérine/thréonine kinase, est capable d'activer STAT3 et STAT6 par phosphorylation sur leurs résidus tyrosine 705 et 641 respectivement (Saeij et al., 2007). ROP16 est assez polymorphique, néanmoins un seul acide aminé est responsable de la différence de capacité de phosphorylation de STAT3/6 par ROP16 entre le type 1 et le type 2 (Yamamoto et al., 2009). L'activation de la voie STAT3 et STAT6 conduit à la transcription de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL4, qui vont permettre de diminuer l'induction de l'IL12 (Butcher et al., 2011), et globalement la réponse T_H1, limitant ainsi l'inflammation. STAT6 va également permettre l'induction de l'arginase 1, une hydrolase qui utilise comme substrat l'arginine pour former de la L-ornithine. En utilisant le même substrat que l'enzyme iNOS, productrice d'espèces réactives de l'oxygène (El Kasmi et al., 2008; Modolell et al., 1995; Rutschman et al., 2001), l'induction de l'arginase entraine une consommation de l'arginine, et donc une diminution d'espèces réactives de l'oxygène Cette stratégie pourrait donc permettre au parasite d'échapper à la destruction par les ROS, bien que cet effet puisse être pondéré par le fait que *Toxoplasma gondii* est auxotrophe vis-à-vis de l'arginine, et que donc ROP16 contribue également à sa limitation.

Les parasites de types 1 contrôlent la production de cytokines pro-inflammatoires par le système immunitaire. Cette inhibition, combinée au phénotype de résistance aux IRGs, mène à un échappement quasi-total au système immunitaire et à une réplication accrue du parasite, causant la mort de la souris (Melo et al., 2011).

La situation est assez différente dans le cas d'une infection par des parasites de type 2. En effet, la protéine ROP16, bien que présente, ne possède pas l'acide aminé critique nécessaire à l'activité kinase (Yamamoto et al., 2009). Dans ce sens, les parasites de type 2 n'induisent pas la phosphorylation de STAT3 et STAT6 et donc il n'y a pas d'induction de cytokines anti-inflammatoires.

Chez les souches de type 1, ROP16 a un rôle dans la phosphorylation directe de STAT3 et STAT6 grâce à son domaine kinase fonctionnel. Etant donné la conservation importante présente entre les différentes protéines STAT, il a été suggéré que ROP16 pourrait être responsable en type 1 de la phosphorylation de STAT1 également. ROP16 est effectivement capable de phosphoryler STAT1 sur le résidu tyrosine 701, et d'induire sa dimérisation et sa translocation nucléaire. En revanche, les parasites de type 1 *Δrop16* présentent encore une phosphorylation de STAT1 et une inhibition de la voie IFNγ, indiquant une contribution seulement partielle de ROP16 à ce mécanisme.

4.2.3. Les GRA restreintes à la vacuole

4.2.3.1. GRA6

GRA6 est une protéine sécrétée qui possède une localisation restreinte à la vacuole, qui le facteur de transcription NFAT4 (nuclear factor of activated T cell 4) dans le type 1 spécifiquement, ce qui permet la production des chimiokines CXCL2 et CCL2 (Ma et al., 2014). Cette production engendre l'attraction des monocytes inflammatoires et des neutrophiles au site d'infection, où ils contrôlent la dissémination parasitaire (Ma et al., 2014). L'activation de NFAT nécessite un changement conformationnel qui permet l'exposition du NLS (signal de localisation nucléaire) et donc la translocation nucléaire de NFAT. Alors que la déphosphorylation de résidus sérine spécifiques par la calcineurine est responsable de ce changement, GRA6 promeut l'activation de la phosphatase par une interaction directe avec le ligand activateur calcineurine modulé par le calcium.

4.2.3.2. GRA15

La découverte de GRA15 et de son activité extra-vacuolaire a défini une nouvelle classe d'effecteurs en plus des fonctions précédemment décrites pour les GRA contribuant à la biogénèse et à la maturation de la PVM, ainsi qu'à l'acquisition des nutriments. En effet, l'allèle de type 2 de *GRA15* est localisée à la PVM après sa sécrétion (Figure 8), et est responsable de l'activation et de la translocation nucléaire de NF-κB (hétérodimère p50-p65), permettant la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL12 (Rosowski et al., 2011). L'activation de NF-κB dépend de TRAF6 et du complexe kinase IkB (IKK), mais indépendamment de MyD88 et TRIF (Rosowski et al., 2011). Les souches de type 1 montrent un pattern différent, puisqu'ils expriment une forme de ROP16 qui permet la répression de la production d'IL12, ainsi que la capacité de l'infection à diminuer la production de cytokines par le LPS (lipopolyssacharide) (Butcher et al., 2011). Ensemble, ces deux effecteurs déterminent la polarisation des macrophages, avec les types 1 et 3 induisant une activation alternative via ROP16, et le type 2 induisant une polarisation classique des macrophages via GRA15 (Jensen et al., 2011). GRA15 est également est aussi impliqué dans la production d'IL1β par les cellules humaines via l'activation de la caspase 1 (Gorfu et al., 2014; Gov et al., 2013), ce qui contribue encore à l'induction de la réponse inflammatoire.

Le mécanisme d'action de GRA15 dans le type 2 pour activer NF-κB n'a pas été élucidé. Les membres de la famille NF-κB sont divers, et incluent chez les mammifères 5 protéines, p65 (RelA), RelB, c-rel, p105/p50 (NF-κB 1), et p100/52 (NF-κB 2). Ces protéines peuvent s'assembler dans une combinaison d'homodimères et d'hétérodimères, permettant une grande sélectivité dans la réponse médiée par NF-κB. Malgré l'action de GRA15 dans la

translocation nucléaire de p65 et p50 (Rosowski et al., 2011), leur relocalisation ne contribue pas à l'altération des niveaux de miR146a et miR155, deux micro ARN dépendent de NF-κB (Cannella et al., 2014). D'un autre côté, l'expression de miR146a est altérée spécifiquement dans des souris *c-Rel* $^{-/-}$ (Yang et al., 2012). De plus, c-Rel est activée au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii*, mais indépendamment de GRA15 (Cannella et al., 2014), suggérant que d'autres effecteurs que GRA15 peuvent induire l'activation de membres spécifiques de la famille NF-κB, dont c-Rel. La subversion de la voie NF-κB par *Toxoplasma gondii* n'est pas entièrement révélée, puisque le type 1 bloque de façon transitoire la translocation de NF-κB dans les cellules infectées (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2002), alors que le type 2 montre un effet opposé par l'activité de GRA15 (Rosowski et al., 2011) et d'autres potentiels facteurs inconnus.

4.2.4. Les GRAs exportées

4.2.4.1. GRA16

GRA16 a été la première protéine du parasite trouvée hors de la vacuole, et a amené l'idée que les protéines de granules denses pouvaient sortir de la PVM. GRA16 est exportée dans le noyau de la cellule hôte dans un complexe de haut poids moléculaire contenant la phosphatase de l'hôte PP2A-B55 et la protéase HAUSP (Bougdour et al., 2013). Par ces interactions, GRA16 provoque des altérations dans les niveaux cellulaires de p53, ce qui induit la translocation nucléaire de l'enzyme PP2A. GRA16 permet l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, le cycle cellulaire et la voie p53 (Bougdour et al., 2013). Le facteur de transcription p53 possède un renouvellement rapide, et est maintenu à faibles niveaux dans les cellules normales grâce à l'ubiquitination et la protéolyse de Mdm2. La stabilisation de p53 en réponse à des signaux oncogènes résulte de la déubiquitination par HAUSP. Cette voie est également ciblée par les infections virales, comme par exemple la protéine EBNA1, une protéine du virus Epstein barr qui séquestre HAUSP, et permet la dégradation de p53 (Saridakis et al., 2005). GRA16 agit de façon opposée en induisant de hauts niveaux de p53 de façon dépendante de HAUSP (Bougdour et al., 2013). D'autres études montrent que p53 est également un senseur important du stress métabolique. Durant la déprivation de glutamine, p53 est activé pour permettre la survie cellulaire de façon BB55a dépendante (Reid et al., 2013). En induisant la translocation nucléaire de PP2A-B55, GRA16 régule l'expression de plusieurs gènes induits par p53, comme la glutaminase 2 (Bougdour et al., 2013). Ensemble, ces résultats semblent indiquer un rôle pour GRA16 en permettant la survie de la cellule hôte en condition de stress en contrôlant les niveaux de p53.

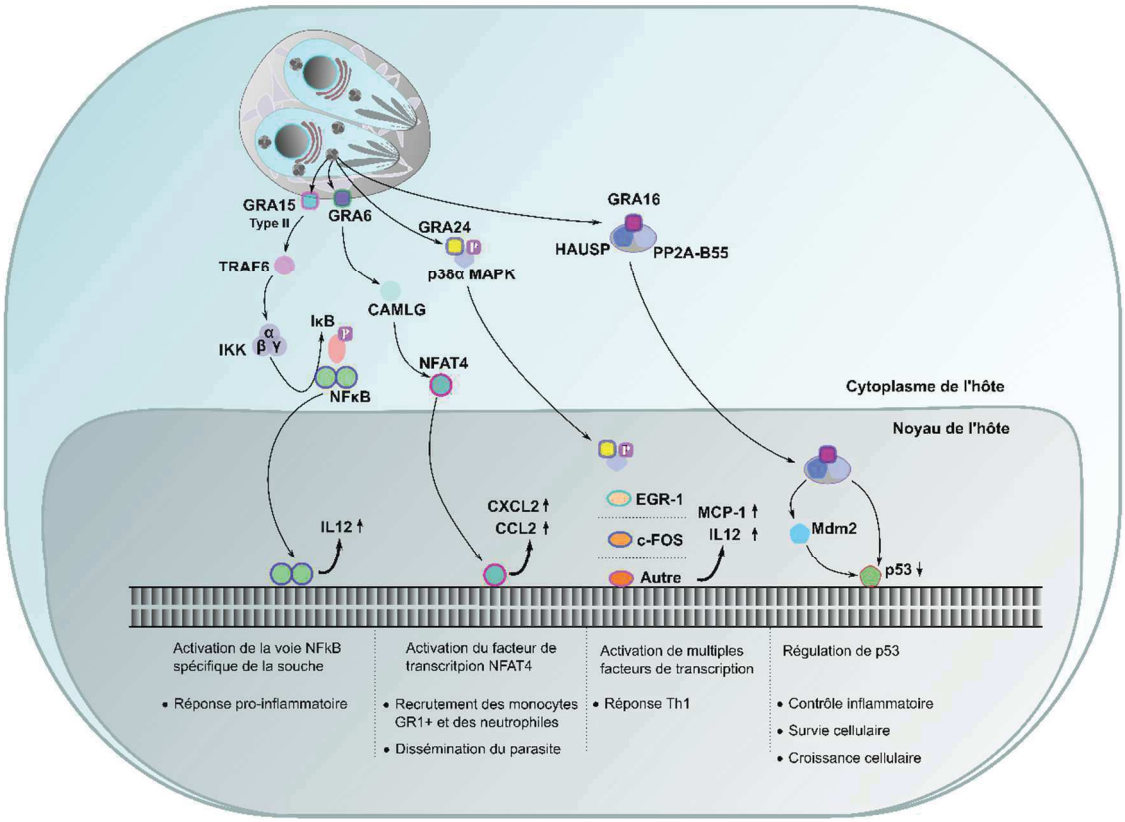


Figure 8 : Les rôles des différents effecteurs de granules denses
Adapté de Hakimi et al., 2017
Après invasion de la cellule hôte, *Toxoplasma gondii* utilise divers effecteurs issus des granules denses pour altérer les voies de signalisation de la cellule hôte à son profit. Certaines protéines GRA restent dans l'espace vacuolaire et au niveau de la PVM, comme GRA15, GRA6. D'autres protéines GRA sont exportées dans la cellule hôte, et interagissent avec diverses protéines de la cellule (GRA16, GRA24).

4.2.4.2. GRA24

GRA24 partage avec GRA16 la capacité à atteindre le noyau de la cellule hôte et de réguler l'expression génomique (Figure 8). GRA24 contourne la voie classique des MAPK (mitogen activated proteine kinase), et induit une autophosphorylation prolongée de p38α, formant un complexe capable d'activer des facteurs de transcription comme ERG1 ou cFos (Braun et al., 2013). En conséquence, GRA24 induit une réponse inflammatoire forte en permettant l'expression de gènes pro-inflammatoires, en particulier la protéine MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) et l'IL12, qui augmentent l'activité phagocytique au site d'infection et limitent la charge parasitaire (Braun et al., 2013). GRA24 est une protéine intrinsèquement désordonnée qui opère par 2 domaines atypiques d'interaction avec des kinases (KIMs), qui

combine les attributs des domaines d'ancrage pour de multiples MAPK partenaires pour augmenter la liaison. GRA24 est capable de lier, chaperonner, activer et permettre la translocation nucléaire de p38α MAPK. GRA24 interagit avec 2 molécules de p38α via les KIMs dans son C terminus. La liaison du KIM1 à p38α altère la conformation du domaine kinase, et permet son activation. Grâce à la diffraction aux petits angles et à la microscopie de force atomique, il a été constaté que GRA24 lie 2 molécules de p38α de façon flexible mais suffisamment pour permettre une auto-activation par transphosphorylation (Pellegrini et al., 2017). Comme de cette façon, la liaison de phosphatases régulatrices est inhibée (Pellegrini et al., 2017), GRA24 est le premier exemple de régulation par imitation moléculaire, contribuant aux interactions hôte pathogène. GRA24 est également responsable de l'activation d'un réseau de gènes sous le contrôle du facteur de transcription CREB, mais le mécanisme d'action est à ce jour inconnu (Braun et al., 2013). Comme GRA24 est co-purifiée avec CBP et p300 (Hakimi unpublished), il est possible que GRA24 court-circuite l'activation de CREB phosphorylé et opère directement pour remodeler la structure de la chromatine au niveau des gènes régulés par CREB.

4.3. Sécrétion des protéines effectrices

4.3.1. Les aspartyl protéases

Alors que les protéines des rhoptries sont secrétées directement du parasite au cytosol par délivrance de petites vacuoles dans l'hôte, les protéines issues des granules denses doivent être exportées dans le cytosol en passant la barrière de la PVM.

Les aspartyl protéases font partie d'une famille de protéines très conservées qui catalysent des clivages protéolitiques (Dunn, 2002). Présentes chez les eucaryotes et les virus, ces protéines effectuent un grand nombre de fonctions, de la dégradation des nutriments à l'activation de molécules de signalisation. Les aspartyl protéases sont critiques pour la survie du parasite ; ces protéines sont d'ailleurs activement étudiées pour leur potentiel de cibles thérapeutiques (Coombs et al., 2001; Nezami et al., 2003).

Toxoplasma gondii possède 7 gènes codants pour de potentielles aspartyl protéases. Les tachyzoïtes expriment 3 de ces gènes, *ASP1*, *ASP3* et *ASP5* (Shea et al., 2007). La protéine ASP1 est localisée au niveau du complexe membranaire interne durant la réplication, ce qui suggère un rôle dans sa biogenèse. Récemment, une étude sur ASP3 a permis d'élucider son rôle dans la biologie de *Toxoplasma gondii* (Dogga et al., 2017). ASP3 est une aspartyl protéase localisée dans un compartiment endosomal, fortement associé à la décharge des rhoptries. Parce que nous nous intéressons particulièrement à la sécrétion des protéines issues des granules denses, nous ne détaillerons ici que le cas de la protéase ASP5.

ASP5 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi du parasite, et a été identifiée comme critique pour l'export de certaines protéines de granules denses (Figure 9) (Hsiao et al., 2013). La plupart des protéines de granules denses exportées possèdent un peptide signal pour l'entrée dans le réticulum endoplasmique, et d'un motif conservé (RxLxE/Q/D), appelé le motif TEXEL (*toxoplasma* export element). Il a été démontré que plusieurs protéines de granules denses de *Toxoplasma gondii* sont directement clivées par ASP5 (Coffey et al., 2015; Curt-Varesano et al., 2016; Hammoudi et al., 2015). En effet, une délétion de *ASP5* dans le parasite conduit à une diminution du fitness, ainsi qu'à une inaptitude à maturer GRA16, et un stockage de GRA16 dans la vacuole parasitophore (Coffey et al., 2015). De façon surprenante, la protéine GRA24, qui ne contient pas de motif TEXEL, est clivée indépendamment de ASP5, mais nécessite ASP5 pour son export (Curt-Varesano et al., 2016). Les parasites *Δasp5* présentent également un défaut d'egress, une altération de la localisation des protéines de granules denses au niveau de l'espace vacuolaire et de la PVM. Ces parasites présentent une virulence atténuée *in vivo* en comparaison des souches sauvages (Hammoudi et al., 2015). Ce phénotype s'explique par l'inhabilité des parasites *Δasp5* à moduler la réponse immune de l'hôte. Contrairement à son homologue chez *Plasmodium falciparum*, ASP5 n'est pas une protéine essentielle chez *Toxoplasma gondii*, bien que sa délétion réduise la capacité du parasite à manipuler l'immunité de l'hôte (Hammoudi et al., 2015), et donc rende les parasites moins virulent au cours d'une infection chez la souris (Coffey et al., 2015).

4.3.2. MYR1

La membrane de la vacuole parasitophore n'est pas imperméable, et les substrats de moins de 3-kDa peuvent librement diffuser d'un côté à l'autre grâce à un complexe protéique composé de GRA17 et GRA23, formant un pore pour la diffusion passive (Gold et al., 2015). En revanche, l'export de composés plus gros tels que les protéines nécessite la protéine MYR1 (Figure 9).

La protéine MYR1 a été identifiée dans un criblage génétique pour identifier l'effecteur responsable de l'induction de c-Myc (un facteur de transcription régulant des processus cellulaires critiques comme le cycle cellulaire) par *Toxoplasma gondii*. Alors que les recherches visaient à identifier un effecteur, une protéine impliquée dans la sécrétion des protéines de granules denses a été découverte. MYR1 est une protéine maturée par ASP5, qui s'associe avec la PVM (Franco et al., 2016), et qui possède 2 domaines transmembranaires en position C terminal. Aucune homologie évidente n'a pu être retrouvée au-delà du genre proche *Hammondia Hammondi*, ce qui suggère une fonction spécifique de cette protéine au sein de la classe de coccidies formant des kystes tissulaires. MYR1 est

nécessaire pour l'export des protéines de granules denses secrétées, comme GRA16 et GRA24. En revanche, la délétion de *MYR1* n'affecte pas les fonctions de GRA15, une protéine de granules denses restreinte à l'espace de la vacuole parasitophore, ce qui suggère que MYR1 permet la translocation à travers de la PVM des protéines GRA secrétées dans la cellule hôte. Bien que MYR1 soit clivé par ASP5, cet évènement n'est pas essentiel concernant le rôle de MYR1 dans l'export des protéines (Naor et al., 2018). La majorité des gènes régulés ou dérégulés au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii* dépend de MYR1, dont la capacité du parasite à bloquer la voie IFNγ (Naor et al., 2018).

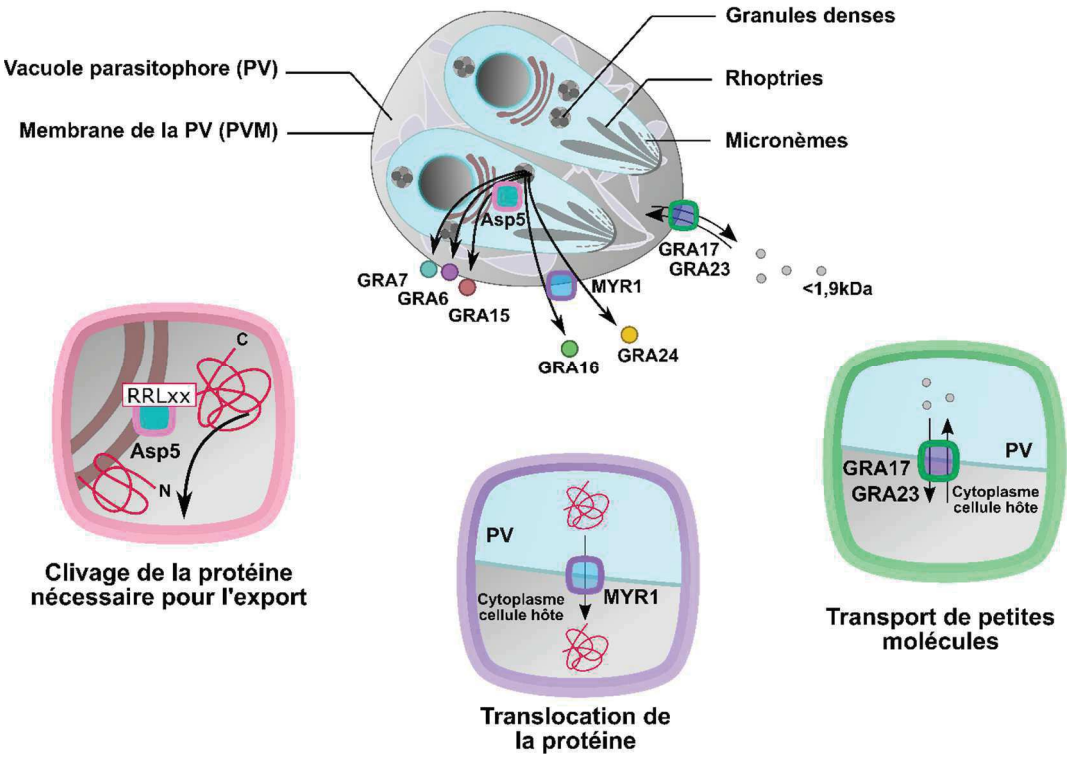


Figure 9 : Les mécanismes d'export protéique et le trafic à travers la membrane de la vacuole parasitophore
Adapté de Hakimi et al., 2017
Certaines protéines issues des granules denses comme GRA15 et GRA16 (mais pas GRA24) nécessite un clivage par ASP5 pour leur export. MYR1 est une protéine localisée à la PVM, nécessaire à l'export des effecteurs désordonnés dans le cytosol de la cellule hôte. Les protéines GRA17 et GRA23 sont localisées à la PVM, et permettent le transport de petites molécules à travers celle-ci.

Récemment, des analyses génétiques ont identifié en plus de MYR1, deux autres protéines, appelées MYR2 et MYR3, nécessaires à l'export de GRA16 et GRA24 (Marino et al., 2018). Contrairement à MYR1, MYR2 et MYR3 ne possèdent pas de motif TEXEL, mais sont localisées comme MYR1 à la PVM, avec une association physique entre MYR1 et MYR3.

Les rôles précis de chacune de ces protéines sont encore peu claires ; cependant, il apparait que MYR1 et MYR3, et dans une moindre mesure MYR2, forment un complexe essentiel pour l'export des protéines du parasite et leur sécrétion dans le cytoplasme de l'hôte.

La sécrétion des protéines parasitaires dans la cellule hôte a un impact sur le fonctionnement de cette cellule. Ces interactions entre l'hôte et le pathogène ont des conséquences non seulement au niveau de la cellule infectée, mais aussi sur la réponse immune globale.

5. Ciblage de la voie STAT1 par *Toxoplasma gondii*

5.1. Fonctionnement de la voie

5.1.1. Signalisation via STAT1

Les protéines STATs (signal transducer and activator of transcription) sont des facteurs de transcription activés après divers signaux extracellulaires. Chez les mammifères, il existe 7 protéines STATs, ayant des structures relativement conservées (Becker et al., 1998). Pour la suite, nous allons nous focaliser sur la voie STAT1 (Figure 10).

Une fois secrété, l'IFNγ va se lier à des récepteurs localisés à la surface des cellules. La signalisation dépendante de l'IFNγ implique 4 familles de protéines : les récepteurs de type 2, les kinases Janus associées aux récepteurs JAKs (Janus associated kinases), les protéines STATs, et les facteurs de transcription IRF (interferon regulatory factor). L'IFNγ se lie aux récepteurs IFNγR, induisant leur dimérisation et leur changement conformationnel. Ce changement va provoquer l'activation par autophosphorylation et transphosphorylation des protéines JAK1 et JAK2, qui sont de la famille des tyrosine kinases. Une fois activées, JAK1 et 2 vont phosphoryler le domaine intracellulaire des récepteurs, créant ainsi un site d'ancrage pour le recrutement de STAT1 (Figure 10, étape 2).

Là, STAT1 est recruté et activé par phosphorylation en résidu tyrosine 701 par JAK1 et 2, ce qui induit alors sa dimérisation par l'interaction des domaines SH2 phosphorylés (Shuai et al., 1992, 1993). Sous sa forme homodimère, STAT1-Y-P arbore un domaine de localisation nucléaire (NLS), qui lui permet de transloquer dans le noyau de la cellule par un système actif d'import (Sekimoto et al., 1996) (Figure 10, étape 3)..

STAT1 comprend plusieurs domaines distincts. Le domaine N terminal est impliqué dans les interactions entre protéines (Figure 10) (John et al., 1999). Le domaine coil-coiled est quant à lui responsable de l'association de STAT1 avec d'autres protéines, et est indispensable à l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Zhu et al., 1999). La séquence se poursuit avec un linker, nécessaire à l'interaction stable entre STAT1 et l'ADN (Yang et al., 2002). Ensuite, le domaine de liaison à l'ADN est une partie plus spécifique des protéines STATs, et chacun reconnait des motifs différents pour une spécificité d'action (Horvath, 2000). Enfin, le domaine C terminal, aussi appelé le domaine transactivateur, permet de lier d'autres facteurs de transcription et des coactivateurs pour une activité transcriptionnelle optimale (Imada and Leonard, 2000; Wen et al., 1995).

5.1.2. Activité transcriptionnelle

Dans le noyau, l'homodimère reconnait une séquence ADN particulière nommée GAS (gamma activated sequences) (TTnCnnnAA), contenue dans les promoteurs des gènes activés par l'IFNγ (Darnell et al., 1994; Schindler and Darnell, 1995).

Une fois lié à l'ADN, STAT1-Y-P va pouvoir recruter différents coactivateurs par le biais de son domaine transactivateur. CBP/p300 appartiennent à la catégorie des histones acétyl-transférases qui permettent un relâchement de la chromatine à proximité des sites de transcription (Kadonaga, 1998). Ces coactivateurs sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle de la plupart des facteurs de transcription.

Une fois lié à l'ADN, STAT1 subit une deuxième phosphorylation sur son résidu sérine 727 (Sadzak et al., 2008). Cette modification, située dans le domaine transactivateur, permet d'augmenter fortement l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Kovarik et al., 2001; Wen et al., 1995). En effet, la phosphorylation en sérine de STAT1 permet un stimulation plus importante de l'acétylation des histones, permettant ainsi l'expression des gènes induits par l'IFNγ (Varinou et al., 2003).

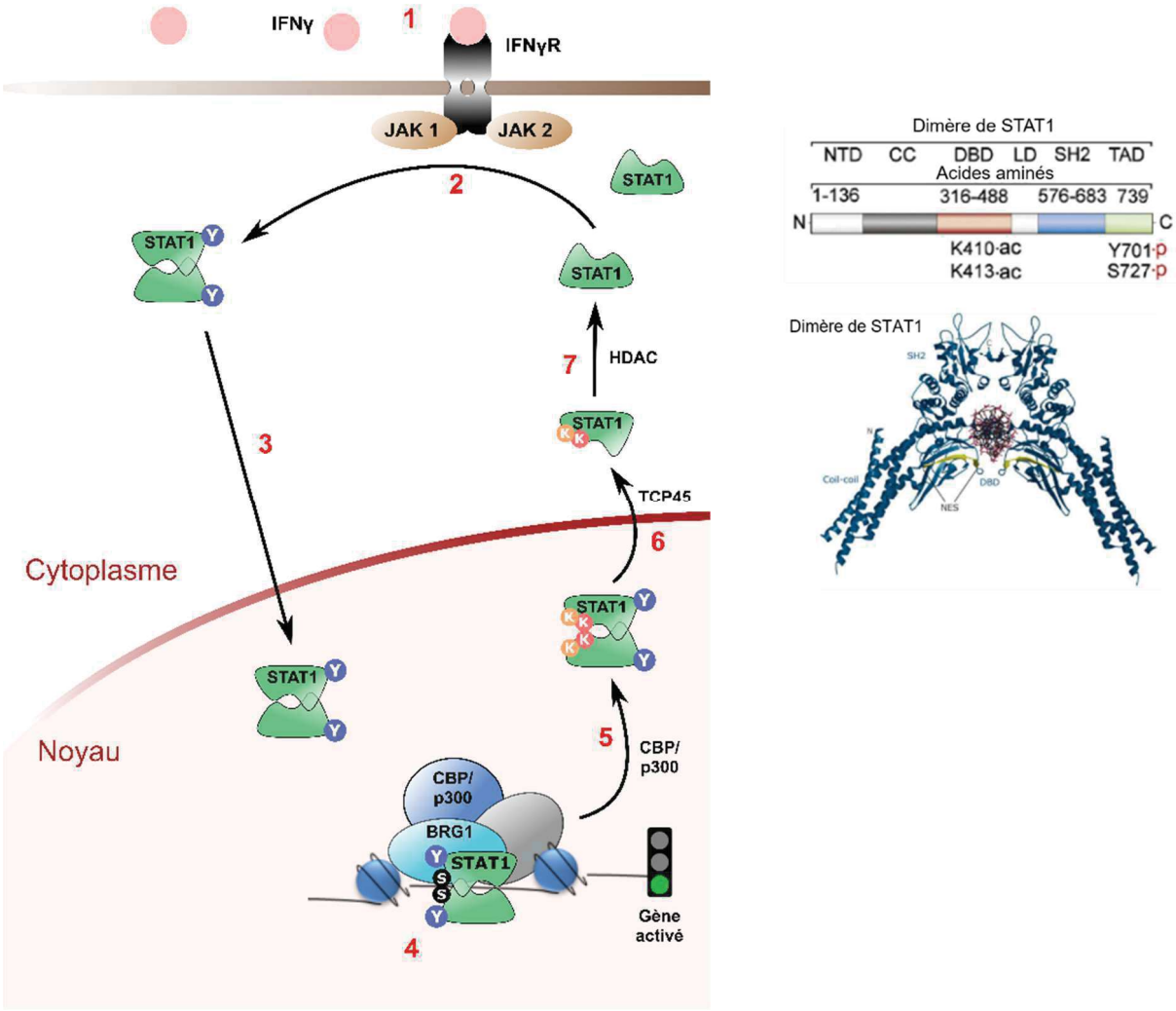


Figure 10: Fonctionnement de la voie JAK/STAT1
(1) L'IFNγ se lie à son récepteur, ce qui active les kinases associées JAK1 et JAK2. (2) STAT1 est recruté et phosphorylé en tyrosine (Y) par les JAK kinases, ce qui induit sa dimérisation. (3) Le dimère de STAT1 entre dans le noyau. (4) STAT1 se lie aux séquences GAS spécifiques, subit une phosphorylation en sérine (S), différents cofacteurs sont recrutés pour permettre la transcription des gènes. (5) CBP/p300 acétyle les résidus lysine (K) 410 et 413 de STAT1, ce qui provoque le décrochage de l'ADN. (6)TCP45 déphosphoryle STAT1, entrainant son export dans le cytoplasme. (7) STAT1 est déacétylé par une HDAC cytoplasmique, ce qui permettra un nouveau cycle d'activation.
NTD : N terminal domain ; CC : coil-coiled domain ; DBD : DNA Binding domain ; LD : Linker domain ; SH2 : Src Homology domain 2 ; TAD : transactivating domain

5.1.3. Recyclage de STAT1

Une fois la transcription des gènes induits par l'IFNγ lancée, STAT1 va subir une acétylation sur ses résidus lysine 410 et 413 par le coactivateur et acétyl-transférase CBP (Figure 10, étape 5) (Krämer et al., 2006). Cette modification entraine alors une perte d'affinité pour l'ADN, et donc un décrochage de STAT1. Une fois libéré, STAT1 va être la cible d'une déphosphorylation de ses résidus tyrosine et sérine par une phosphatase nucléaire, TCP45 (Figure 10, étape 6) (Mertens et al., 2006).

La déphosphorylation de STAT1 coïncide avec son export dans le cytoplasme et son retour à l'état de monomère (Begitt et al., 2000; McBride et al., 2000; Mowen and David, 2000). L'acétylation des résidus lysine inhibe la phosphorylation de STAT1 et donc sa translocation nucléaire. STAT1 doit donc subir une étape de déacétylation, assurée par l'enzyme HDAC3, présente à la fois au niveau nucléaire et cytoplasmique (Klampfer et al., 2004). De cette façon, STAT1 est à nouveau prêt pour un autre cycle d'activation (Figure 10, étape 7).

5.1.4. Régulation de la voie JAK/STAT

L'activation de STAT1 en réponse à une stimulation a comme conséquence une régulation génique importante, induisant entre autres la production de cytokines pro-inflammatoires. Il est donc nécessaire pour la cellule de pouvoir contrôler finement cette voie pour éviter des effets délétères. L'importance des mécanismes de régulation de la voie JAK/STAT a été montrée à plusieurs reprises (Naka et al., 1999; Schindler and Darnell, 1995; Shuai et al., 1992). L'activation de STAT1 est par conséquent transitoire, et plusieurs mécanismes cellulaires existent pour mettre fin à la signalisation STAT1.

Tout d'abord, il existe des tyrosine phosphatases, SHP1 et SHP2, associées au récepteur de l'IFNγ qui permettent, par une déphosphorylation des récepteurs et des protéines JAK, d'inactiver la voie JAK/STAT1 (David et al., 1993; Haque et al., 1997).

SOCS1 (suppressor of cytokine signalling) est un inhibiteur spécifique de STAT1, qui se lie directement aux protéines JAK afin d'inhiber leur activité tyrosine kinase, permettant ainsi d'empêcher l'activation de STAT1 (Endo et al., 1997).

La protéine PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) a été identifiée comme un partenaire spécifique de STAT1 sous sa forme tyrosine phosphorylée et dimérisée (Liu et al., 1998). PIAS1, de par cette interaction, inhibe la capacité de STAT1 à se lier à ses séquences spécifiques au niveau des promoteurs (Liu et al., 2004).

5.2. Blocage de la voie par *Toxoplasma gondii*

Les 3 lignées clonales (type 1, 2 et 3) sont capables d'inhiber efficacement l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Rosowski and Saeij, 2012), suggérant un mécanisme commun pour cette inhibition.

Le gène *IRF1* (interferon regulatory factor 1) est un des premiers gènes induit par l'IFNγ transcrit suite à l'activation de STAT1. IRF1 est un facteur de transcription qui va permettre en coopération avec STAT1 d'induire la transcription de gènes secondaires comme *CXCL9* (chemokine CxC motif ligand 9), un ligand ayant un rôle chimioattractant des lymphocytes T.

Aussi tôt que 3 heures après infection par *Toxoplasma gondii*, l'expression d'*IRF1* et des autres gènes induits est inhibée en réponse à l'IFNγ (Rosowski and Saeij, 2012). Cette inhibition médiée par le parasite, essentielle à sa survie, a été observée dans des fibroblastes humains (Kim et al., 2007), en macrophages primaires murins (Lang et al., 2012), et dans la lignée de macrophages RAW (Rosowski and Saeij, 2012). Cependant, cette inhibition s'effectue par un mécanisme inconnu.

Concernant la mécanique d'inhibition de STAT1 par *Toxoplasma gondii*, plusieurs recherches ont été menées par l'équipe du Dr Saeij (Rosowski and Saeij, 2012; Rosowski et al., 2014). Dans ces études, l'équipe a regardé chaque étape de l'activation de STAT1 par l'IFNγ pour tenter de déterminer l'étape ciblée par le parasite. Tout d'abord, la possibilité de l'induction par le parasite de protéines inhibitrices de STAT1 a été évoquée. Néanmoins, cette piste a été rapidement écartée puisque le blocage de la synthèse protéique de l'hôte n'affecte pas l'inhibition de la voie par le parasite. Le parasite est capable de promouvoir la phosphorylation de STAT1 indépendamment de la stimulation par l'IFNγ. Chez les souches de type 1, ROP16 a un rôle dans la phosphorylation directe de STAT3 et STAT6 grâce à son domaine kinase fonctionnel. Etant donné la conservation importante présente entre les différentes protéines STAT, il a été suggéré que ROP16 pourrait être responsable en type 1 de la phosphorylation de STAT1 également. ROP16 est effectivement capable de phosphoryler STAT1 sur le résidu tyrosine 701, et d'induire sa dimérisation et sa translocation nucléaire. En revanche, les parasites de type 1 *Δrop16* présentent encore une phosphorylation de STAT1 et une inhibition de la voie IFNγ, indiquant une contribution partielle seulement de ROP16 à ce mécanisme.

Toxoplasma gondii induit également une augmentation de l'association de STAT1-Y-P avec l'ADN, sans pour autant conduire à la transcription d'*IRF1*. La déphosphorylation et le recyclage de STAT1 du noyau au cytoplasme est également inhibé. L'hypothèse alors avancée est l'existence potentielle d'un effecteur secrété venant du parasite, peut être venant des rhoptries tout comme ROP16, ROP5, ROP17 et ROP18.

La cytochalasine D est une drogue qui permet d'inhiber la polymérisation de l'actine ; le parasite peut s'accrocher à la membrane de la cellule mais ne peut pas l'envahir. Cependant, la décharge des rhoptries, mais pas celle des granules denses, est permise. De cette façon, il est possible de discriminer entre un effecteur issu de l'un ou l'autre de ces organites.

Grâce à l'utilisation de ce composé, il a été montré que la sécrétion des rhoptries n'était pas suffisante pour bloquer la transcription d'*IRF1* après stimulation des cellules par l'IFNγ, ce qui laisse penser que l'effecteur pourrait être originaire des granules denses. Renfonçant cette hypothèse, il a été montré que le blocage de la réponse IFNγ par le parasite est dépendant de MYR1, une protéine nécessaire à l'export de protéines de granules denses dans la cellule hôte, et non des rhoptries (Franco et al., 2016).

RESULTATS

1. Introduction au papier

Lors du crible bioinformatique à la recherche de potentiels effecteurs de *Toxoplasma gondii*, nous avons identifié la protéine TgIST, sous l'identité TGME49_240060 sur la base de données ToxoDB (Gajria et al., 2008). Par ce processus, notre équipe avait précédemment identifié GRA16 et GRA24 (Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013). Aucune séquence protéique homologue n'a pu être trouvée dans d'autres organismes, pas même chez *Neospora caninum*, une espèce très proche de *Toxoplasma gondii*.

Le but de ce crible était de rechercher des séquences codantes pour des protéines prédites comme étant majoritairement désordonnées, possédant un peptide signal. Les prédictions de ces séquences ont été déterminées grâce au serveur SignalP. Le peptide signal consiste généralement en un petit peptide de 15 à 30 acides aminés en majorité hydrophobes, en position N terminal (Kapp et al., 2013).

Notre laboratoire portant un intérêt particulier aux effecteurs nucléaires, les séquences contenant un ou plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) ont retenu notre attention. Ces séquences sont composées de 8 à 10 acides aminés, qui varient d'une protéine à l'autre, mais avec une forte proportion en acides aminés chargés positivement. La séquence NLS peut être en une ou deux parties; dans ce dernier cas, la séquence est qualifiée de bipartite.

Enfin, les séquences codantes présentant un motif TEXEL dans leur partie N terminal ont également retenu notre attention. Ce motif pentamérique conservé chez *Plasmodium falciparum* consiste en les acides aminés suivants : RxLxE/Q/D (Hiller et al., 2004). Chez *Toxoplasma gondii*, un motif similaire a été identifié pour la protéine GRA16, consistant en la séquence RRLAAE (Coffey et al., 2015; Curt-Varesano et al., 2016; Hammoudi et al., 2015). Dans cette étude, les chercheurs ont montré que ce motif permet une reconnaissance par la protéase ASP5, résidant dans l'appareil de Golgi du parasite, et que sa présence est indispensable à l'export de GRA16 (Curt-Varesano et al., 2016).

Grâce à ces critères, notre équipe a pu sélectionner environ 300 séquences codantes pour de potentielles protéines secrétées. Différentes techniques de marquage des protéines ont été utilisées tout au long des recherches menées. A mon arrivée dans le laboratoire, beaucoup de gènes avaient été étudiés, dont ceux codant pour GRA16 et GRA24 (Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013), et ma première tâche a consisté à marquer de façon endogène une vingtaine de protéines afin d'étudier leur localisation. Parmi ces protéines, celle qui est devenue TgIST montrait une forte localisation dans le noyau de la cellule hôte. Mon projet de

thèse a consisté alors à étudier TgIST, et ce travail a abouti à un article dans le « Journal of Experimental Medecine » (Gay et al., 2016), référé ci-après comme JEM.

2. Résumé de l'article

Une des caractéristiques de l'infection par *Toxoplasma gondii* est le contrôle rapide de la population parasitaire grâce à de multiples réponses de l'immunité innée qui implique les cellules résidentes et migratoires, avec des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Dans ce contexte, l'IFNγ active une variété de réponses anti-parasitaire par les cellules immunes et non-immunes, mais contribue également à l'immunopathologie de l'hôte. *Toxoplasma gondii* a élaboré des mécanismes pour contrecarrer les défenses de l'hôte induites par l'IFNγ en interférant avec la transcription des gènes régulés par cette cytokine. Nous avons identifié TgIST (*Toxoplasma gondii* inhibitor of STAT1 Transcriptional activity) comme étant un interrupteur moléculaire critique secrété par les parasites intracellulaires et localisé dans les noyaux des cellules hôtes infectées. Là, TgIST inhibe l'expression des gènes pro-inflammatoires dépendants de STAT1. Nous avons montré que TgIST séquestre STAT1 à des *loci* spécifiques, mais promeut également l'élaboration d'un état non permissif de la chromatine grâce à sa capacité à recruter le complexe répresseur NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase). Nous avons montré que durant une infection murine, les parasites déficients pour TgIST sont rapidement éliminés par les monocytes pro-inflammatoires GR1+ recrutés au site d'infection. Ce mécanisme met en avant le rôle protecteur de TgIST contre le contrôle parasitaire par l'IFNγ. Cette étude apporte de nouvelles évidences sur la capacité de *Toxoplasma gondii* à élaborer une arme moléculaire de choix pour contrôler l'expression de gènes de l'immunité chez les métazoaires, comme moyen d'établir un parasitisme à long terme.

3. Contribution aux travaux

L'article principal de ma thèse a été réalisé conjointement avec la co-première auteure, le docteur Laurence Braun. A ce titre, je n'ai réalisé qu'une partie des travaux présents dans cet article. Mon travail a consisté en la réalisation de la totalité des vecteurs utilisés, la plupart des souches mentionnées dans l'article (Pru*Δku80*-TgIST-HF, RH*Δku80*-ASP5-Ty-TgIST-HF, RH*Δku80ΔASP5*-TgIST-HF, Pru*Δku80ΔTgIST*, Pru*Δku80*-pTgIST-TgIST-HF, 76K*ΔTgIST*, RH*Δku80ΔTgIST*), ainsi que l'ensemble des immunofluorescences. De plus, j'ai moi-même réalisé la plupart des western blot, à l'exception de ceux présents dans la figure 2D et la figure 6D. Les résultats issus des RTqPCR ont été réalisés indépendamment par Laurence Braun et moi-même. Concernant les expériences d'immuno-purification de la chromatine (JEM, Figure 7), de quantification parasitaire (JEM, Figure 8 D et E), et de manipulation animale, mon travail s'est résumé à la préparation des extraits cellulaires et des souches de parasite utilisées, respectivement.

Concernant l'article annexe, mon travail a consisté à la construction du vecteur pLIC-CPSF3-HF-DHFR, et sa transfection dans la souche RH*Δku80*. Ainsi, la souche RH*Δku80*-CPSF3pLIC-HF-DHFR a été générée, et j'ai pu réaliser la localisation de la protéine CPSF3 par immunofluorescence (données non montrées).

4. Article

Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-γ–mediated host defenses

Gabrielle Gay,[1]* Laurence Braun,[1]* Marie-Pierre Brenier-Pinchart,[1] Julien Vollaire,[3] Véronique Josserand,[3] Rose-Laurence Bertini,[1] Aurélie Varesano,[1] Bastien Touquet,[2] Pieter-Jan De Bock,[4] Yohann Coute,[4] Isabelle Tardieux,[2] Alexandre Bougdour,[1] and Mohamed-Ali Hakimi[1]

[1]Institute for Advanced Biosciences (IAB), Team Host-Pathogen Interactions and Immunity to Infection and [2]IAB, Team Membrane and Cell Dynamics of Host-Parasite Interactions, INSERM U1209, CNRS UMR5309, Université Grenoble Alpes, F-38700 Grenoble, France
[3]IAB, OPTIMAL Small Animal Imaging Facility, 38000 Grenoble, France
[4]Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble-Laboratoire Biologie à Grande Échelle (BIG-BGE), Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), INSERM, 38000 Grenoble, France

An early hallmark of *Toxoplasma gondii* infection is the rapid control of the parasite population by a potent multifaceted innate immune response that engages resident and homing immune cells along with pro- and counter-inflammatory cytokines. In this context, IFN-γ activates a variety of *T. gondii*–targeting activities in immune and nonimmune cells but can also contribute to host immune pathology. *T. gondii* has evolved mechanisms to timely counteract the host IFN-γ defenses by interfering with the transcription of IFN-γ–stimulated genes. We now have identified TgIST (*T. gondii* inhibitor of STAT1 transcriptional activity) as a critical molecular switch that is secreted by intracellular parasites and traffics to the host cell nucleus where it inhibits STAT1-dependent proinflammatory gene expression. We show that TgIST not only sequesters STAT1 on dedicated loci but also promotes shaping of a nonpermissive chromatin through its capacity to recruit the nucleosome remodeling deacetylase (NuRD) transcriptional repressor. We found that during mice acute infection, *TgIST*-deficient parasites are rapidly eliminated by the homing Gr1$^+$ inflammatory monocytes, thus highlighting the protective role of TgIST against IFN-γ–mediated killing. By uncovering TgIST functions, this study brings novel evidence on how *T. gondii* has devised a molecular weapon of choice to take control over a ubiquitous immune gene expression mechanism in metazoans, as a way to promote long-term parasitism.

INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a widespread foodborne infection in humans that poses significant public health problems, being recognized as a leading cause of foodborne deaths in the United States (Scallan et al., 2015). Caused by the protozoan *Apicomplexa* parasite *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, a usually mild disease, in immunocompetent humans can turn into a major threat in immunocompromised patients who experience lethal or chronic cardiac, pulmonary, or cerebral pathologies. Complications of toxoplasmosis are tightened to the capacity of the parasite to differentiate into a quasi-cryptic persistent stage (i.e., bradyzoite) within deep tissue reservoirs and to inflict irreversible damages while differentiating back to the replicative stage (i.e., tachyzoite; Sullivan and Jeffers, 2012). It is during the initial and acute phase of the infection that the tachyzoite–bradyzoite transition occurs in a minor subpopulation while concurring with the massive destruction of the bulk tachyzoite population as a result of a rapid Th1 cell–mediated and short-term proinflammatory response. In this context, IL-12, TNF, and IFN-γ cytokines act at the frontline of defenses against *T. gondii*, with IFN-γ also guaranteeing long-term persistence. Conversely, decline of IFN-γ level correlates with cerebral toxoplasmosis in AIDS patients (Pereira-Chioccola et al., 2009; Meira et al., 2014), whereas genetic loss of IFN-γ renders mice extremely susceptible to toxoplasmosis (Yap and Sher, 1999).

Importantly, counterbalancing of the effect of proinflammatory cytokines is equally essential to the immune response homeostasis and to parasitism, as it prevents immunopathology but preserves host and parasite survival. In line with these requirements, *T. gondii* has found ways to timely

*G. Gay and L Braun contributed equally to this paper.

Correspondence to Mohamed-Ali Hakimi: mohamed-ali.hakimi@inserm.fr

Abbreviations used: ChIP, chromatin immunoprecipitation; CtBP, C-terminal-binding protein; GAS, gamma activated sequence; HAT, histone acetyltransferase; HDACi, HDAC inhibitor; HFF, human foreskin fibroblast; IFA, immunofluorescence analysis; IRG, immunity-related GTPase; NuRD, nucleosome remodeling deacetylase; p.i., post-infection; PVM, parasitophorous vacuole membrane; TFBS, transcription factor binding site; TgIST, *T. gondii* inhibitor of STAT1 transcriptional activity.

© 2016 Gay et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see http://www.rupress.org/terms). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

The Rockefeller University Press $30.00
J. Exp. Med. 2016 Vol. 213 No. 9 1779–1798
www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20160340

The Journal of Experimental Medicine

modulate host responsiveness to proinflammatory cytokines. A leading strategy relies on the delivery of parasite effector proteins inside host cells that interplay with host cell signaling pathways—in priority those related to IFN-γ production—by coopting host transcription factors and gaining control overexpression of immune-related genes (Melo et al., 2011; Sturge and Yarovinsky, 2014; Hakimi and Bougdour, 2015).

Considering STAT1 transcription factor as the main signal transducer of the IFN-γ response to *T. gondii* infection (Zimmermann et al., 2006; Kim et al., 2007; Lang et al., 2012; Schneider et al., 2013; Rosowski et al., 2014), we could expect *T. gondii* to design antagonists of the STAT1-positive activity on gene expression as a way to modulate IFN-γ downstream effects. In support of this scheme, in vitro preinfection of nonhematopoietic and hematopoietic cells with tachyzoites, regardless of their genotypes, impedes the IFN-γ–stimulated STAT1-mediated gene expression program, hence preventing expression of MHC class II molecules, IRF1, iNOS/Nos2, class II transactivator (CIITA), interferon-inducible GTPases, and chemokines (CXCL9 and CXCL10; Scharton-Kersten et al., 1997; Lüder et al., 2003; Kim et al., 2007; Lang et al., 2012; Rosowski and Saeij, 2012). However, despite an intensive search, how *T. gondii* interferes with STAT1 function still remains enigmatic.

STAT1 cycles between the cell membrane/cytoplasm and the nucleus. Initiated by IFN-γ binding to the IFN-γ receptor (IFN-γR), the pool of IFN-γR–associated STAT1 becomes phosphorylated on Y701 residue (STAT1 Y701-P) by the JAK kinases and is subsequently released in the cytoplasm where it homodimerizes (Ramana et al., 2000; Stark and Darnell, 2012). STAT1 Y701-P dimers translocate to the nucleus and regulate gene expression by binding specifically to gamma activated sequence (GAS) elements in the promoters of primary IFN-γ–responsive genes, in particular the interferon regulatory factor 1 gene (IRF1). IRF1 acts in concert with STAT1 Y701-P to activate secondary response genes (Honda and Taniguchi, 2006). The transcriptional activity of STAT1 increases with a second independent phosphorylation event on S727 (Sadzak et al., 2008). Importantly, when bound to DNA, STAT1 provides transcriptionally competent chromatin through a partnership with histone-modifying enzymes such as the histone acetyltransferase (HAT) CBP, which stimulates gene expression (Wojciak et al., 2009).

We report in this study the identification and characterization of a novel *T. gondii* protein that is exported beyond the parasitophorous vacuole to the host cell nucleus where it interferes with STAT1 dynamics and transcriptional activity. We named it TgIST for "inhibitor of STAT1 transcriptional activity." We brought compelling evidence that *T. gondii* infection represses IFN-γ–stimulated STAT1-dependent gene expression in a TgIST-dependent manner in both mouse and human cells of different lineages and regardless of parasite strains. Ectopic expression of TgIST in human cells was sufficient to drive the repression of a STAT1-regulated reporter gene, whereas chromatin immunoprecipitation (ChIP) pointed out the sequestering property of TgIST on STAT1 Y701-P when positioned on the GAS-containing loci. Remarkably, we found that TgIST not only binds to STAT1 Y701-P but also to the chromatin repressor nucleosome remodeling deacetylase (NuRD) complex and corepressor C-terminal–binding protein (CtBP), being thereby ideally positioned to shape the chromatin environment surrounding STAT1-binding sites so as to block IFN-γ–stimulated transcription. Finally, we demonstrated that TgIST avoids early immune-mediated elimination by blocking immunity-related GTPase (IRG)–mediated clearance in macrophages infected by type II persistent parasites.

RESULTS

The ASP5 protease is required for TgIST export into the host cell nucleus

The gene *TGME49_240060* encoding TgIST was originally identified in silico together along with GRA16 (Bougdour et al., 2013) and GRA24 (Braun et al., 2013) in a search for genes encoding parasite effector proteins that are targeted to the host cell nucleus. TgIST is a highly disordered protein that accommodates a transmembrane domain followed by a predicted TEXEL motif (Coffey et al., 2015) and nuclear localization sequences (Fig. 1 A). TgIST protein is unique because it has no significant similarity with any proteins, not even with the close relative *Neospora caninum* proteins. When we monitored TgIST dynamics in *T. gondii* lines expressing the endogenous protein in fusion with the HA-Flag tags, we found that the protein crossed the membrane of mature vacuoles to selectively accumulate in the host cell nucleus (Fig. 1 B). TgIST was detectable in the host cell nucleoplasm as early as 9 h after invasion (Fig. 1 B) and was enriched in the Golgi of the parasites as supported by colocalization with the Golgi marker GRASP (Fig. 1 C). In the absence of the Golgi-resident aspartyl protease ASP5, TgIST was no longer detected in the host cell nucleus (Fig. 1 D), indicating that the protease is essential for TgIST trafficking as it is for GRA16 and GRA24 (Curt-Varesano et al., 2016). Although TgIST-HAFlag was seen by immunoblot analysis as an ~80-kD product when expressed in WT parasites, the protein migrated slightly slower in *Δasp5* mutant parasites (Fig. 1 E), a situation which would be expected if ASP5 was required for TgIST maturation. Whether the predicted TEXEL motif (Fig. 1 A) corresponds to a direct cleavage site for ASP5 and whether this maturation step is required for TgIST export are yet to be determined.

TgIST binds to STAT1 Y701-P and the chromatin repressor complexes NuRD and CtBPs

To get functional insights on how TgIST traffics to the nucleus, we sought host cell partners by applying Flag affinity chromatography to extracts from primary human foreskin fibroblasts (HFFs) infected with TgIST-HAFlag–expressing tachyzoites. Silver stain analysis of the eluate suggested that TgIST binds to multiple partners under high stringent wash-

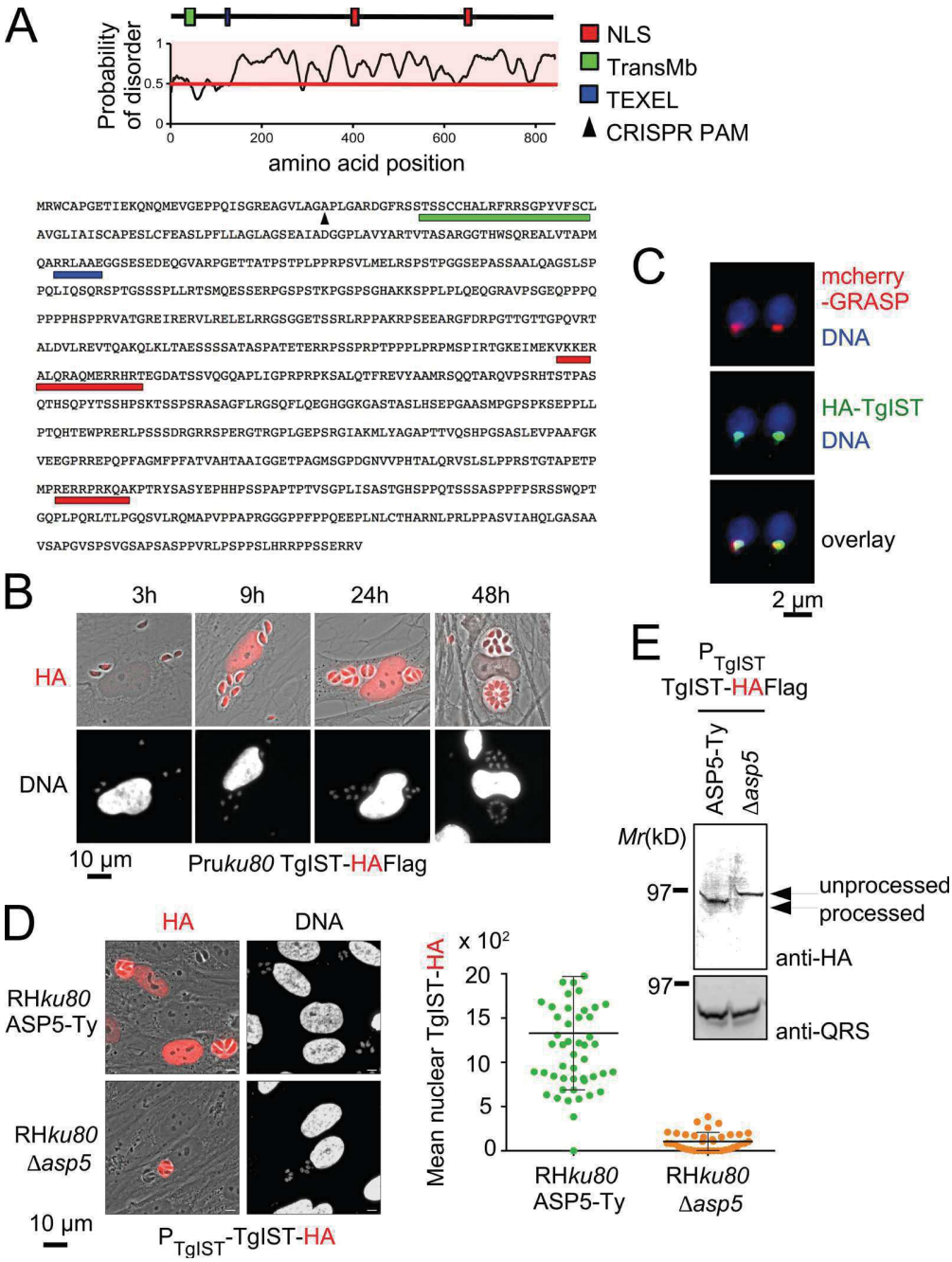


Figure 1. **The export of TgIST in the host cell nucleus is mediated by ASP5.** (A) Schematic representation of the TgIST protein. Values >0.5 are predicted to be disordered (colored red), and values <0.5 correspond to folded domains. The primary structure of the protein harbors a transmembrane domain (in green) followed by a TEXEL motif (in blue) and two nuclear localization signals (NLS, in red). CRISPR PAM sequence location is indicated (black triangle). (B) Time course of TgIST (HA, in red) secretion and export to the host cell nucleus of HFFs infected with parasites expressing a HAFlag (HF)-tagged copy of TgIST. (C) Colocalization of mCherry-GRASP (in red) and TgIST (HA, in green) at the level of the parasite Golgi after transient expression of the mCherry-GRASP vector in the Pru*ku80* TgIST-HAFlag strain. (D) Representative IFA of WT and *Δasp5* parasites transiently expressing P_{TgIST}-TgIST-HAFlag (HA, in red). The amount of TgIST in the nucleus was quantified in at least 50 host cells for each parasite strain. Horizontal bars represent the mean nuclear TgIST intensity ± SDs. (E) Western blot analysis of extracellular tachyzoites shown in D using anti-HA antibodies. Data are representative of two independent experiments.

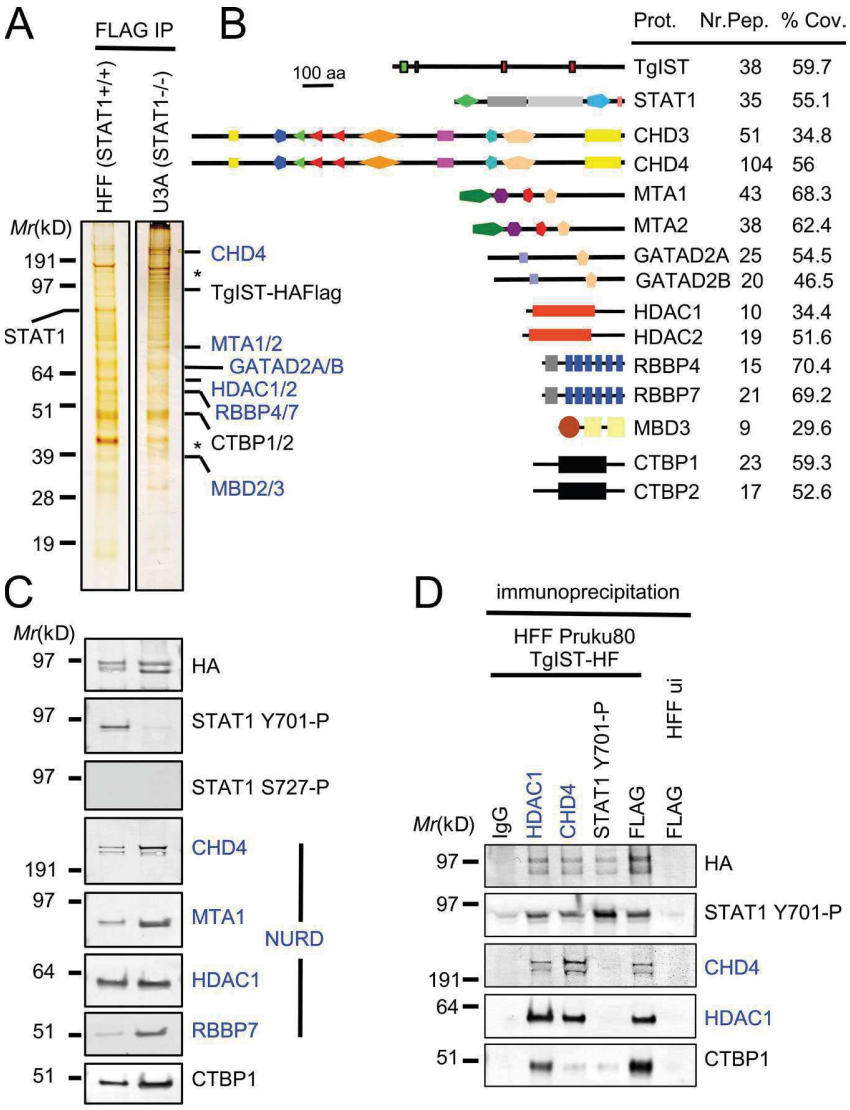


Figure 2. **TgIST binds to STAT1 Y701-P and chromatin-bound repressor complexes.** (A) TgIST-associated proteins were purified by Flag chromatography from protein extracts of HFFs and U3A STAT1-deficient cells infected by Pru*ku80* TgIST-HAFlag. Asterisks indicate degradation products. (A–C) Fractions were analyzed by silver staining (A), mass spectrometry (B), and immunoblotting (C) to detect TgIST-HF (anti-HA) and partners. Identity of the proteins with their respective number of peptides and percentage of coverage are indicated. SMART conserved domains are displayed. NuRD core complex subunits are shown in blue. (D) Coimmunoprecipitation analyses of TgIST-containing complexes. Whole-cell lysates from HFFs left uninfected (ui) or infected with Pru*ku80* TgIST-HAFlag were immunoprecipitated with the antibodies against the indicated proteins, Flag antibody, and IgG as a negative control. Immunocomplexes were then Western blotted using the indicated antibodies on the right. Data are representative of two independent experiments.

ing conditions (0.5 M NaCl and 0.1% NP-40; Fig. 2 A). These partnerships were subsequently resolved by a combination of mass spectrometry–based proteomics and Western blot analysis that identified TgIST in an intact multisubunit NuRD core complex encompassing chromatin remodeling ATPase (CHD4) and deacetylation (HDAC1,2) enzymes (Fig. 2, B and C; Xue et al., 1998). Additional partners besides NuRD were recognized as the transcriptional corepressors CtBP1 and CtBP2 (Fig. 2, B and C; Chinnadurai, 2002).

Importantly, STAT1 was found in the TgIST-containing eluates under the phosphorylated Y701 status, which promotes the formation of STAT1 homodimer formation, a condition required for STAT1 binding to GAS-containing DNA sequences (Fig. 2, B and C). To determine whether TgIST binding to NuRD or CtBPs depends on STAT1, we repeated the purification scheme using U3A STAT1-deficient cells (McKendry et al., 1991). The association of TgIST with NuRD and CtBPs was retained in the absence of STAT1 (Fig. 2, A and C). We then validated the interactions by reverse immunoprecipitation using antibodies against NuRD subunits and STAT1 Y701-P (Fig. 2 D) and noticed that STAT1 Y701-P, while displaying a robust binding to TgIST, was not able to pull down the NuRD complex (Fig. 2 D). These data raise the intriguing possibility of a cooperative action between a transcription factor and a chromatin complex coupling lysine deacetylation and ATPase-mediated chromatin remodeling, all factors known to be important for transcriptional repression.

TgIST represses the IFN-γ–mediated STAT1-dependent IRF1 expression

To explore further the role of TgIST in gene repression, particularly in relation to chromatin modification, we analyzed

the influence of the TgIST-containing complex on IRF1 expression because STAT1 is a primary regulator of IRF1 and was previously reported as robustly repressed by *T. gondii* (Kim et al., 2007; Schneider et al., 2013; Rosowski et al., 2014). Infected human and mouse cells did not express IRF1 within 4 h of IFN-γ treatment unlike the neighboring uninfected cells (Fig. 3, A and B). Conversely, IRF1 expression was no longer repressed in cells infected with tachyzoites genetically engineered to lack TgIST (*ΔTgIST*), thereby indicating that TgIST operates as a transcriptional repressor of *IRF1*. Reintroduction of a copy of TgIST into *TgIST*-deficient parasites resulted in the restoration of IRF1 repression (Fig. 3 C), in agreement with TgIST being necessary and sufficient to regulate IRF1 expression in *T. gondii*–infected cells stimulated with IFN-γ. We then confirmed that TgIST repressor activity occurs at the transcriptional level (Fig. 3 D). Finally, although nuclear accumulation of TgIST was retained in the absence of STAT1 (Fig. 3 E, left), IFN-γ treatment was inefficient at driving IRF1 expression in STAT1-deficient U3A cells regardless of the infection status (Fig. 3 E, right), highlighting the importance of STAT1 in the control loop of IRF1 transcription.

T. gondii genome-wide alteration of STAT1-dependent transcription is mediated by TgIST

The ability of TgIST to repress IRF1 expression prompted us to investigate whether the parasite protein could regulate IFN-γ–induced gene expression in a broader fashion. To this end, we first performed a genome-wide expression profiling of HFFs left uninfected or infected for 24 h with 76KGFP (WT) and 76KGFP*ΔTgIST* (Δ) and stimulated 6 h with IFN-γ (Fig. 4 A). We focused our analysis on genes displaying more than a fourfold change when comparing the *ΔTgIST* mutant with the parental strain. Gene set enrichment analysis (GSEA) highlighted seven pathways significantly and selectively repressed ($P < 0.05$) in a TgIST-dependent fashion (Fig. 4 B). A majority of these pathways clustered into biological processes related to immunity, including signaling through NF-κB and those involved in IFN-γ response (Fig. 4 B). Indeed, many inflammatory genes can be synergistically up-regulated by both the STAT1/IRF1 and NF-κB transcription factors because their promoters contain transcription factor binding sites (TFBSs) for both STAT1 and NF-κB. Quantitative RT-PCR of the mRNA levels of six secondary IFN-γ response genes (CXCL9, CXCL10, CIITA, MX1, GBP2, and IGTP) revealed a similar profile with a repression of gene expression triggered by infection with WT parasites but not with TgIST-deficient tachyzoites (Fig. 4, C and D), which presumably reflects the lack of both STAT1 and IRF1 for their transcriptional activation.

To evaluate the contribution of STAT1 to the TgIST-mediated repression of IFN-γ–induced genes, we performed a comprehensive profiling of gene expression in STAT1-null U3A versus parental 2fTGH cells first infected either by WT or *ΔTgIST* parasites and then stimulated by IFN-γ. 234 unique genes were at least fourfold regulated in *T. gondii*–infected IFN-γ–stimulated cells in a TgIST-dependent manner when comparing 2fTGH with U3A cells (data are accessible through NCBI GEO accession no. GSE81613). Hierarchical clustering of the 70 top-ranked genes (more than fourfold, false discovery rate <1%) delineated clusters of coregulated IFN-γ–induced transcripts that are repressed by *T. gondii* infection in both a TgIST- and STAT1-dependent manner (Fig. 5 A). Analysis of regulatory elements of these genes revealed enrichment of IRF1 and STAT1 (ISRE) TFBSs in their promoters (Fig. 5, B and C). GSEA hallmark analysis highlighted that gene products belonging to IFN-γ– and IFN-α–related pathways were highly enriched (Fig. 5 D). These data suggested that beyond negatively regulating IRF1 (Fig. 3), TgIST contributes more widely to inhibit IFN-γ–mediated STAT1-dependent gene regulation.

Ectopic expression of TgIST is sufficient to repress STAT1-dependent promoter

We next wanted to determine whether TgIST alone was sufficient to repress STAT1-dependent promoter or whether other *T. gondii* effectors might contribute to the phenotype. Therefore, we constructed mammalian expression vectors carrying N- or C-terminal epitope-tagged TgIST to monitor TgIST activity in HEK-Blue IFN-γ sensor cells. These cells express a fully active STAT1 signaling pathway and a reporter gene under the control of an ISG54 promoter fused to four GAS elements. We first confirmed that, regardless of the tag position, TgIST chimeric proteins were similarly targeted to the host cell nucleus (Fig. 6 A and not depicted) as when delivered by intracellular parasites and second that TgIST expression significantly repressed (approximately threefold) the expression of the reporter gene by IFN-γ (Fig. 6 B). These data are consistent with TgIST being sufficient to control STAT1 activity.

TgIST modulates the phosphorylation status of STAT1

To get insights on the mechanism by which TgIST regulates STAT1 activity, we examined whether infection and IFN-γ stimulation modified the phosphorylation status and cellular location of STAT1 isoforms. Immunoblot analysis of cytoplasmic and nuclear fractions revealed that inactive STAT1 localized mainly in the cytoplasm of resting cells (Fig. 6 C, lane 1) and underwent a transient phosphorylation on Y701, an event which concurred with nuclear localization in IFN-γ–stimulated cell (Fig. 6 C, compare lanes 2 and 4). Active STAT1 Y701-P, in turn, fostered transcriptional activation of primary IFN-γ response genes such as *IRF1* (Fig. 6 C, lane 4). After infection, we observed a drastic change in the subcellular localization of the STAT1 isoforms. In the absence of IFN-γ stimulation, infected cells harbored a genuine signature of a fully active STAT1 (STAT1 Y701-P), but intriguingly, the protein remained transcriptionally incompetent as no IRF1 protein was detected (Fig. 6 C, lanes 5 and 6). In the presence of IFN-γ, the expression levels of IRF1

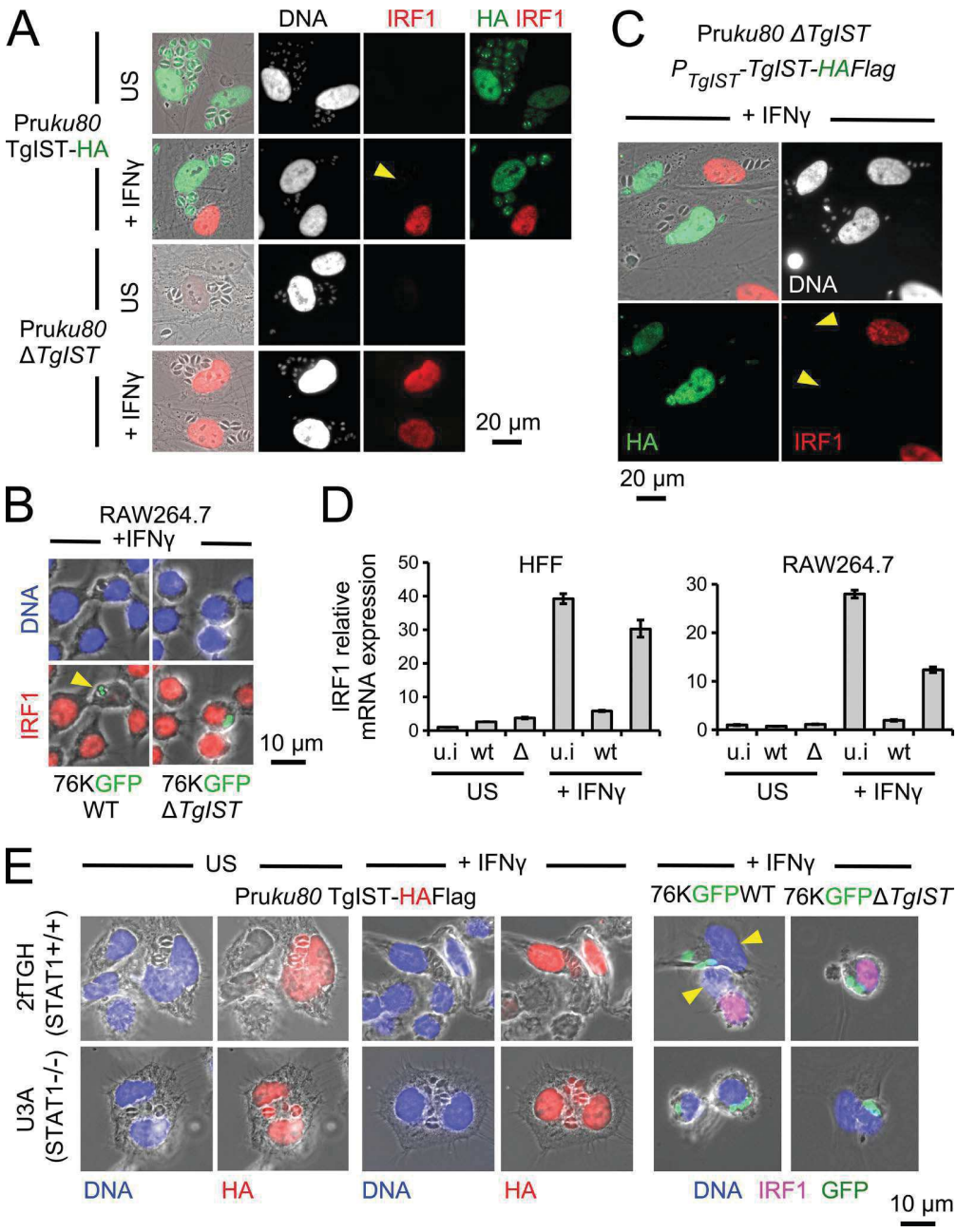


Figure 3. **TgIST is required to inhibit IFN-γ–induced IRF1 expression.** (A) HFFs were infected for 24 h with Pru*ku80* TgIST-HAFlag or Pru*ku80 ΔTgIST* and stimulated 6 h with IFN-γ or left unstimulated (US). Cells were stained to detect nuclear localization of IRF1 (red) and TgIST (HA, green). (B) IFN-γ–induced IRF1 expression was monitored in mouse macrophages as described in A after infection with 76KGFP-WT and -*ΔTgIST*. GFP-expressing parasites (green) and IRF1 (red) were detected. (C) HFFs were infected for 24 h with *ΔTgIST* parasites transiently expressing a copy of P_{TgIST}-TgIST-HAFlag whose expression was driven by its own promoter. After IFN-γ stimulation, TgIST (HA, green) and IRF1 expression (red) were detected. (D) *IRF1* mRNA levels were determined by RT-qPCR in both HFFs and RAW264.7 infected and stimulated as described in A. *β2-microglobulin* was used for normalization. Data are displayed as fold difference relative to the uninfected cells. The mean of two experiments is shown; error bars represent SEM. This was performed three times with similar results. (E, left) Export of TgIST (HA, red) in U3A STAT1-deficient cells and the corresponding parental line 2fTGH. Cells were infected for 24 h with Pru*ku80* TgIST-HAFlag and stimulated 6 h with IFN-γ or left unstimulated (US). (right) IFN-γ–induced IRF1 expression (magenta) was monitored in 2fTGH and U3A infected for 24 h with 76KGFP-WT and -*ΔTgIST* and stimulated for 6 h with IFN-γ. Immunofluorescence data are representative of at least three experiments. Yellow arrowheads indicate infected cells in which IRF1 expression was repressed.

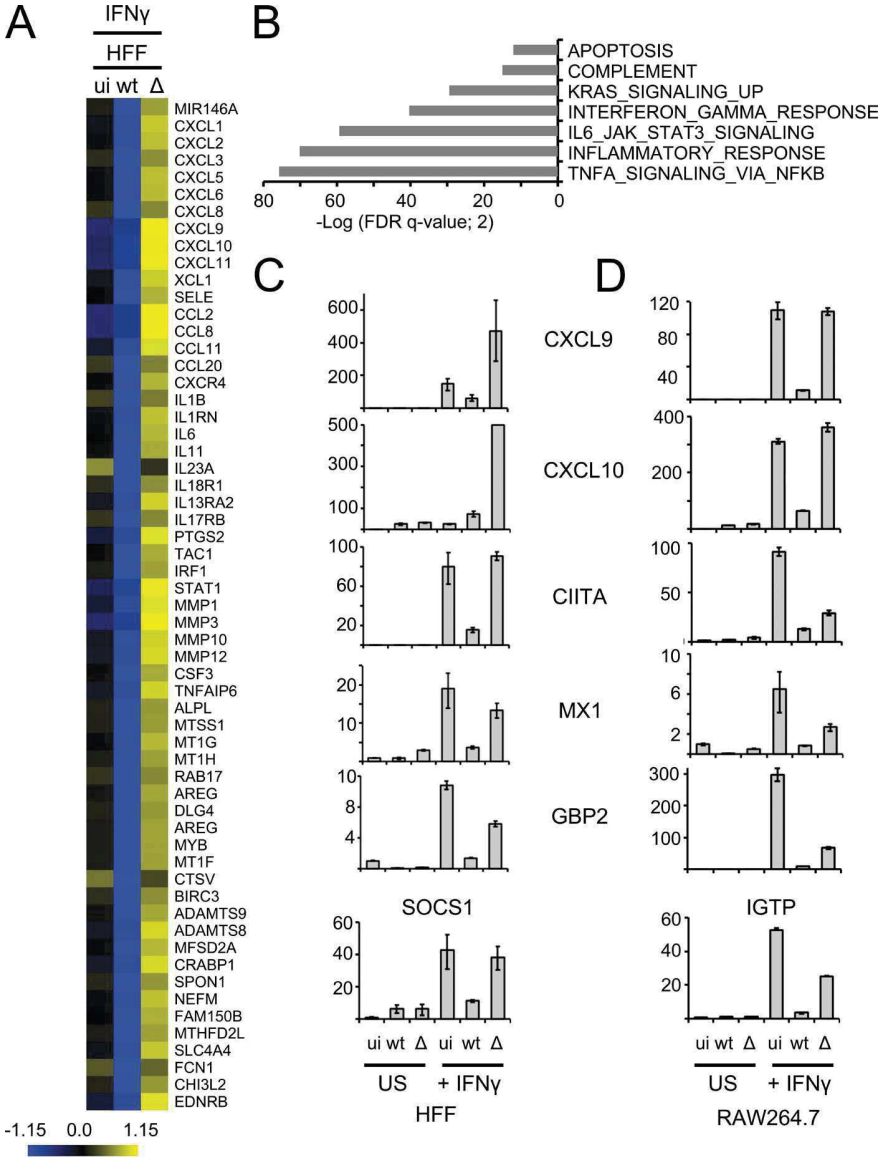


Figure 4. ***T. gondii* inhibits IFN-γ–induced gene expression in a TgIST-dependent fashion.** (A) TgIST represses IFN-γ–induced genes in human fibroblasts. HFFs were infected for 24 h with 76KGFP (WT) and 76KGFP *ΔTgIST* (Δ) or left uninfected (ui) and stimulated 6 h with IFN-γ. Heat map of expression values for the 60 most differentially expressed genes between WT and *ΔTgIST*. Mean log2 gene expression values were median centered, and genes were clustered according to the biological pathways identified. The complete set of genes is listed in the GEO dataset (accession no. GSE81613). (B) Top-scoring pathways regulated by TgIST in a STAT1-dependent manner and upon IFN-γ stimulation in HFFs were determined by GSEA. (C and D) Human and mouse cells were infected for 24 h with Pru*ku80* (WT) and Pru*ku80 ΔTgIST* (Δ) or left uninfected (ui) and stimulated for 6 h with IFN-γ or left unstimulated (US). Levels of CXCL9, CXCL10, CII TA, MX1, GBP2, IGTP, and SOCS1 mRNAs were determined by RT-qPCR. *β2-microglobulin* was used for normalization. Data are displayed as fold difference relative to the uninfected cells. The mean of two experiments is shown; error bars represent SEM. This experiment is representative of at least three experiments and was repeated with 76KGFP (WT and Δ) strains with similar results (not depicted).

in cells infected with WT parasites were kept lower than in uninfected cells (Fig. 6 C, compare lanes 4 and 8), in line with the repressor activity of TgIST seen at the transcriptional level (Fig. 3 D). When cells were infected with *ΔTgIST* tachyzoites, none of the effects induced by WT parasites were observed as the distribution of STAT1 isoforms or the level of IRF1 expression recapitulated those of uninfected cells independently of IFN-γ treatment, thus stressing the pivotal role of TgIST in driving the responses to IFN-γ (Fig. 6 C, lanes 9–12). We also observed that infection of unstimulated cells promoted the phosphorylation of S727 in a TgIST-dependent fashion (Fig. 6 C, compare lanes 6 and 10). Originally, S727 phosphorylation of STAT1 was shown to occur exclusively after the stable association of STAT1 Y701-P with chromatin at the vicinity of IFN-γ–inducible genes (Sadzak et al., 2008). Finally, we found the subcellular distribution of both all NuRD subunits and CtBP1 to be unaltered upon infection (Fig. 6 C). We concluded from these data that the TgIST repressor effect on STAT1 activity coincided with phosphorylation of STAT1, a modification that could increase STAT1 ability to associate with chromatin.

TgIST enhances occupancy of fully activated STAT1 on GAS-containing loci

Because STAT1 Y701-P was markedly enriched in the nucleus of cells infected by *T. gondii*, we hypothesized that TgIST could interfere with STAT1 function at the chromatin level. To test whether TgIST affected STAT1 binding to chromatin, we performed ChIP analysis on samples probed across the *IRF1* locus and found that in the absence of IFN-γ

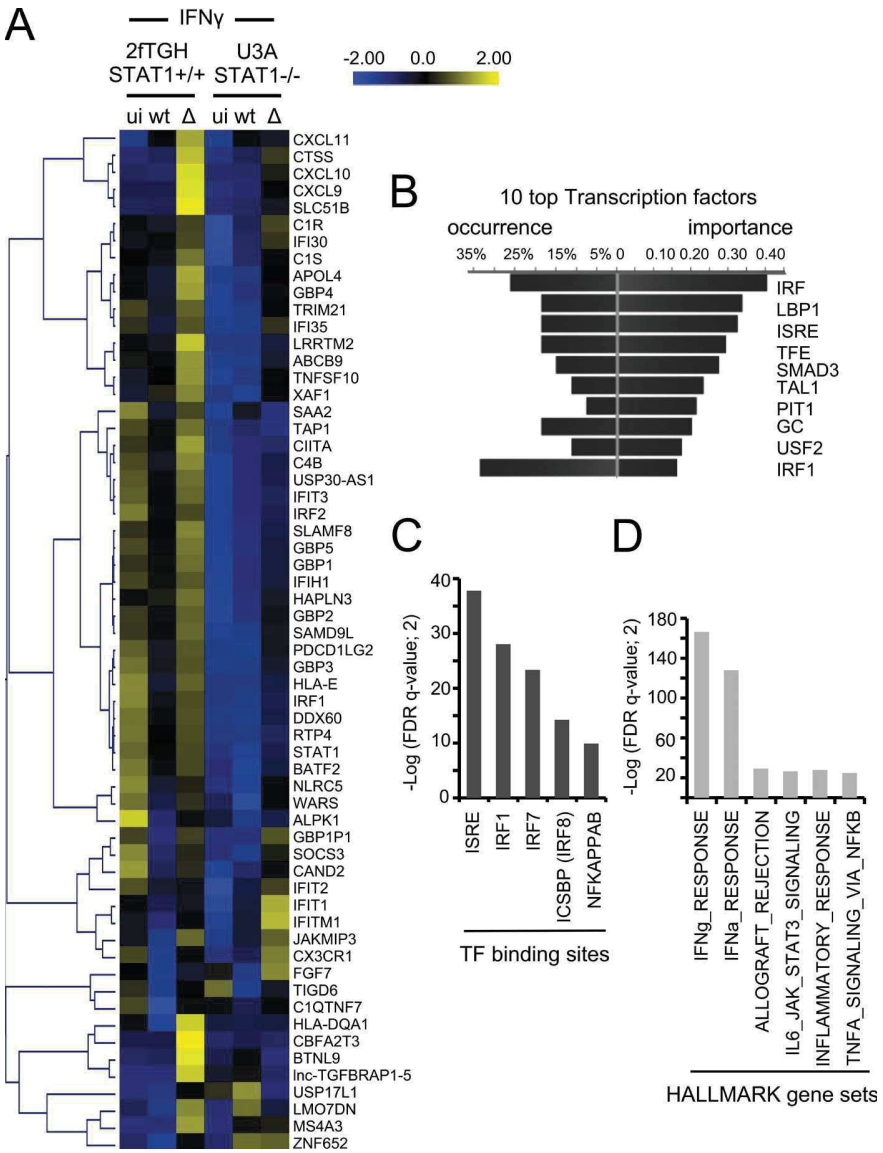


Figure 5. **TgIST represses IFN-γ–induced gene expression in human epithelial cells in a STAT1-dependent manner.** (A) Heat map of expression values for differentially expressed genes in U3A versus 2fTGH cells infected with 76KGFP (WT) or Δ*TgIST* (Δ) parasites. For the 70 genes that are defined as core TgIST- and STAT1-regulated genes, mean log2 gene expression values were median centered, genes were clustered by hierarchical clustering, and a heat map is presented. The complete set of genes is listed in GEO dataset (accession no. GSE81613). (B and C) TFBS analysis of STAT1-regulated core genes influenced by TgIST was performed by DIRE (B) and GSEA (C), and the most significant transcription factors (TF) are listed. (D) Top-scoring pathways regulated by TgIST in a STAT1-dependent manner and upon IFN-γ stimulation were determined by GSEA.

stimulation, STAT1 Y701-P was enriched at the *IRF1*-GAS in a TgIST-dependent manner (Fig. 7 A, compare bars 1, 3, and 5). Because IFN-γ treatment induced a STAT1 recruitment we found to be exacerbated by WT but not *TgIST*-deficient tachyzoites (Fig. 7 A, compare bars 2, 4, and 6), we next hypothesized that TgIST prolongs STAT1 occupancy at the chromatin, a sequestering activity that would account for the slow STAT1 recycling to the cytoplasm. Of note, the dual Y701-S727 phosphorylation of STAT1 is known to characterize the chromatin-bound pool of STAT1 (Sadzak et al., 2008), and we observed this STAT1 (Y701/S727)-P isoform to be significantly enriched at the *IRF1*-GAS location in particular in the presence of WT parasites (Fig. 7 A). Next, when we analyzed the STAT1 isoforms present at the chromatin, both Y701-P and S727-P forms persisted at the chromatin near the GAS-driven secondary genes (i.e., CXCL10 and CIITA; Fig. 7 B, and C). We concluded that the TgIST inhibitory activity on STAT1 involves the stable association of STAT1 with the promoter region of the IFN-γ–regulated genes in a way that protects the DNA-bound STAT1 molecules from dephosphorylation while promoting S727 phosphorylation.

TgIST remodels the chromatin environment at the STAT1-binding site

STAT1 sequestration at the chromatin does not explain the mechanism underlying transcriptional repression by TgIST of *IRF1* expression. We thus next asked whether the deacetylase activity of the TgIST-associated HDAC1 and 2, previously identified as interacting with TgIST (Fig. 2), could account for the transcriptional repression activity of TgIST. In agreement with a previous study (Rosowski et al., 2014), we showed that treatment of infected cells with HDAC inhibitors

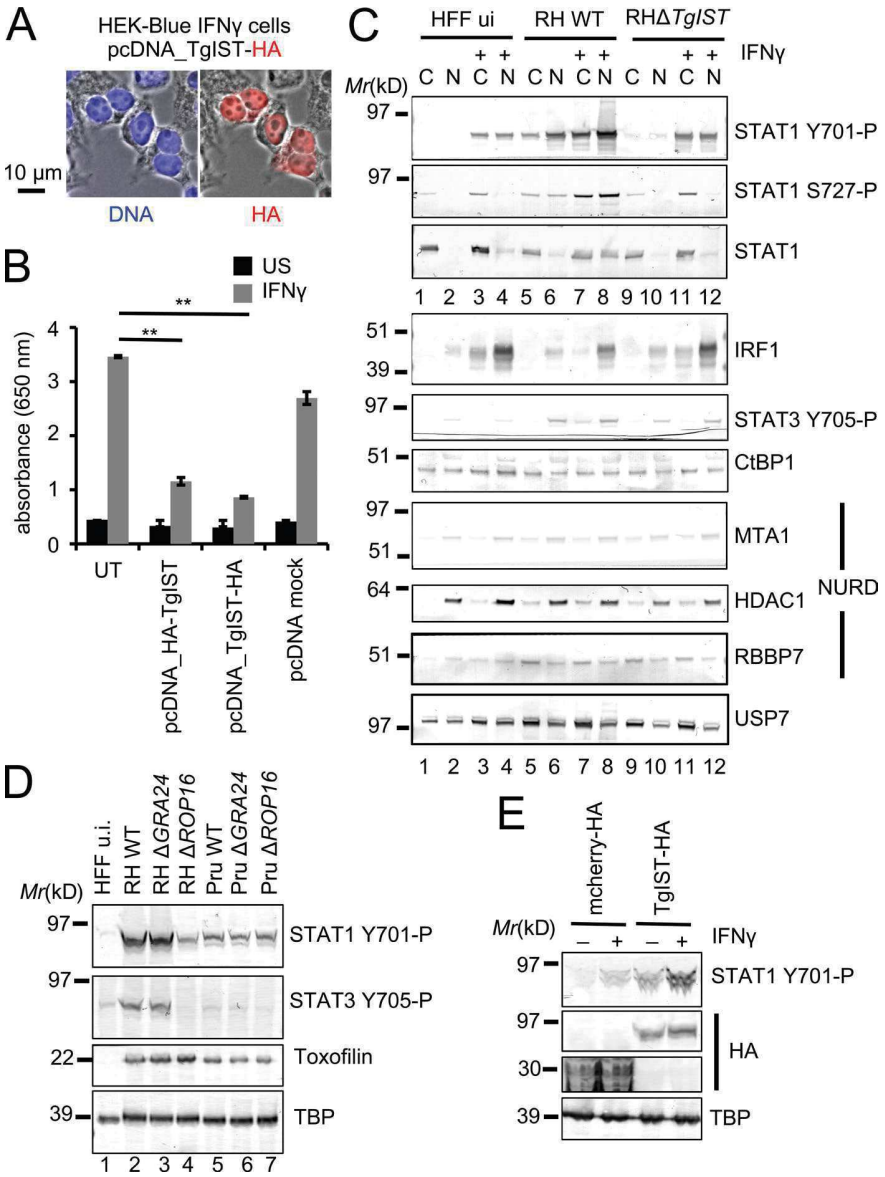


Figure 6. **TgIST represses GAS-containing loci by enhancing occupancy of activated STAT1 at DNA.** (A and B) HEK-Blue IFN-γ sensor cells expressing an active STAT1 signaling pathway were transfected with pcDNA_HA-TgIST, pcDNA_TgIST-HA, or pcDNA mock or left untransfected (UT) and stimulated 24 h with IFN-γ or left unstimulated (US). (A) Nuclear localization of TgIST-HA (in red) was confirmed. (B) Cell supernatant for each aforementioned condition was collected and tested for the presence of reporter gene SEAP. Error bars represent the SD calculated from results of three independent experiments. **, $P < 0.005$ (Student's *t* test). (C) Cellular fractionation of HFFs infected 24 h by WT or *ΔTgIST* or left uninfected (ui) and stimulated 6 h with IFN-γ or left unstimulated. Cytosolic (C) and nuclear (N) cell lysates were probed with the indicated antibodies. USP7 levels are shown as loading control. This experiment is representative of two experiments and was repeated with Pru*ku80* (WT and Δ) strains with similar results (not depicted). (D) Immunoblotting detection of STAT1 Y701-P and STAT3 Y705-P in unstimulated HFFs left uninfected (u.i.) or infected 24 h with type I RH*ku80* (WT) or type II Pru*ku80* (WT) and their corresponding *Δgra24* and *Δrop16* mutants. TBP (host specific) and Toxofilin (parasite specific) levels are shown as loading controls. (E) RAW264.7 cells were transfected with pcDNA_TgIST-HA or mock pcDNA_mcherry-HA and stimulated 24 h with IFN-γ or left unstimulated. Ectopic expression of both TgIST and mcherry (HA) and the levels of STAT1 Y701-P were determined by immunoblotting. TBP levels are shown as loading control. The experiments were repeated two times.

(HDACis) targeting both class I and II enzymes did not prevent TgIST from inhibiting IFN-γ–induced expression of IRF1 (not depicted). Likewise, we confirmed that the levels of three major histone acetylated marks (i.e., H3K9ac, H3K27ac, and H4K5,8,12,16ac) remained unchanged at STAT1-binding loci after infection (Fig. 7 D). Although counterintuitive, the lack of hypoacetylation of neighboring nucleosomes at GAS-containing loci (Fig. 7 D) in the presence of a direct interaction between HDAC1,2 enzymes and TgIST (Fig. 2) can also be explained by a competition between HDAC and HAT that would dynamically regulate STAT1 acetylation (Krämer and Heinzel, 2010).

To investigate further the chromatin contribution to TgIST-mediated gene repression, we next analyzed whether other histone modifications could be found across the *IRF1* gene locus. We chose to track the H3K4me1/me3 histone modifications because they were reported as a genome-wide signature for STAT1-binding sites in HeLa cells (Robertson et al., 2008). We found that H3K4me3 was significantly enriched (~20-fold) with *IRF1*-GAS in resting cells but was quasi-absent from this promoter region and instead drastically increased at the middle region of the gene (~70-fold) upon IFN-γ stimulation (Fig. 7 A, compare bars 1, 2, 7, and 8), an observation consistent with ongoing transcription (Fig. 3 D). Infection with WT but not with *ΔTgIST* tachyzoites led to a marked increase of H3K4me3 levels at the promoter, which was potentiated by IFN-γ to reach a 60-fold enrichment (Fig. 7 A, bars 3–6). Importantly, depletion of the histone mark into the coding region that followed IFN-γ treatment (Fig. 7 A, compare bars 8 and 10) correlated with the

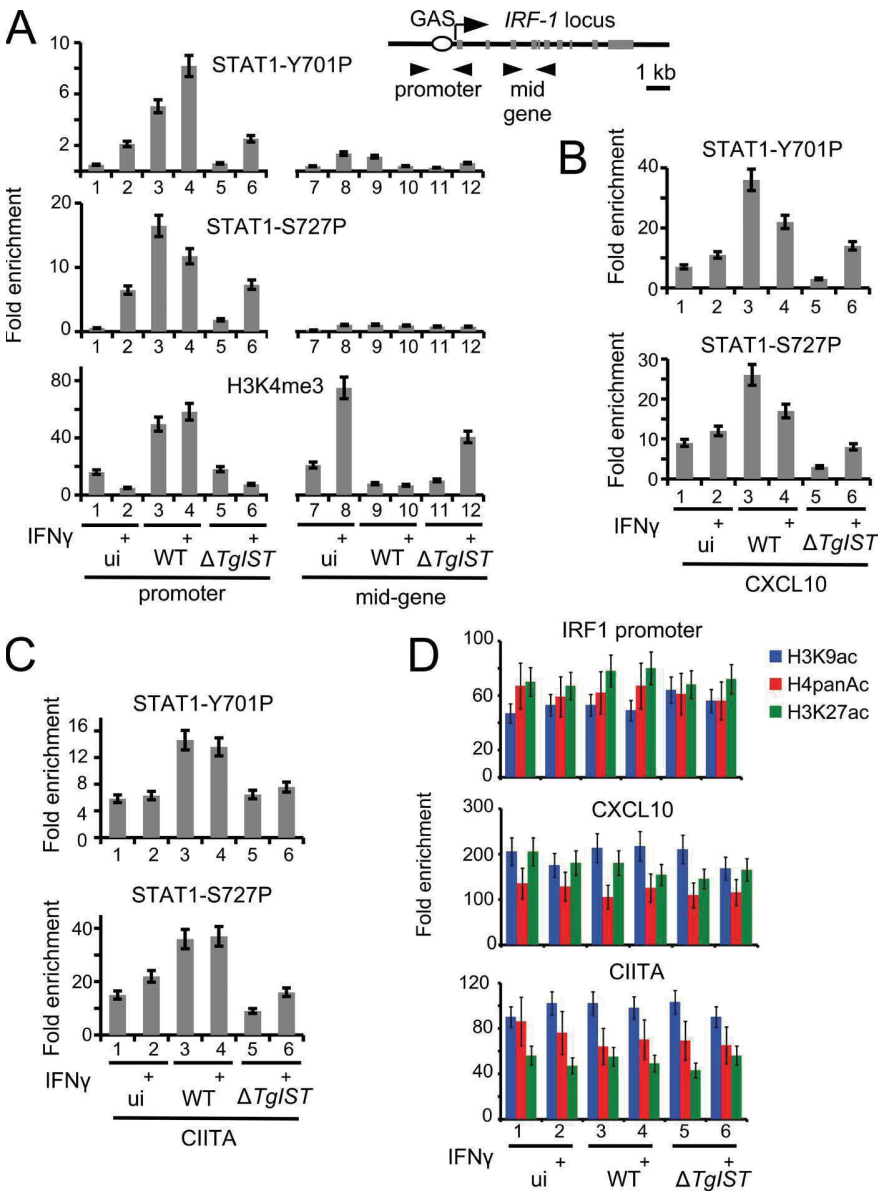


Figure 7. **IFN-γ–induced activated STAT1 DNA association is enhanced by *T. gondii* in a TgIST-dependent manner.** (A–C) HFFs were infected for 24 h with Pru*ku80* (WT) and Pru*ku80 ΔTgIST* (*ΔTgIST*) or left uninfected (ui) and stimulated 6 h with IFN-γ (+) or left unstimulated. Samples were analyzed by ChIP assay with antibodies to STAT1 Y701-P, STAT1 S727-P, and H3K4me3. IgG was used as negative control. Bound DNA corresponding to IRF1, CXCL10, and CIITA loci was quantified by qPCR-ChIP, and signals were normalized with the input DNA. Error bars represent SD (n = 3). Data are from one representative of three independent experiments. (D) ChIP-qPCR was used as aforementioned to monitor enrichment of H3K9ac, H4panAc, and H3K27ac at IRF1, CXCL10, and CIITA promoters. Error bars represent SD (n = 3). Data are from one representative of two independent experiments.

TgIST-mediated repressed state of *IRF1* (Fig. 3 D). Because H3K4me3 marks active promoters, its pattern and dynamics after infection at the *IRF1* locus are reminiscent of bivalent chromatin domains capable of silencing developmental genes while keeping them poised for rapid activation (Voigt et al., 2013; Matsumura et al., 2015).

The IRG load on the parasitophorous vacuoles was increased for *ΔTgIST* parasites together with the increased parasite clearance in IFN-γ–activated macrophages

A major defense mechanism of innate immunity against *T. gondii* is mediated by the IFN-γ–inducible IRG pathway (Collazo et al., 2002; Howard et al., 2011). Given that TgIST interferes with the IFN-γ–STAT1 pathway, we tested whether TgIST could affect IRG expression and/or activity. IRGs are cytoplasmic proteins that target and disrupt the young parasitophorous vacuole membrane (PVM) surrounding type II avirulent but not type I virulent *T. gondii* strains, the latter being able to counteract IRG function through the kinase activity of secreted ROP5/ROP18/ROP17 products (Martens et al., 2005; Etheridge et al., 2014). We first examined Irgb6 in IFN-γ–prestimulated mouse cells and detected similar high enrichment of Irgb6 at the PVM of either WT or *TgIST*-deficient type II tachyzoites (Fig. 8 A, top). In sharp contrast, when cells were infected first and then stimulated with IFN-γ, the PVM of WT type II parasites showed lower Irgb6 loading than those of *TgIST* mutant strain (Fig. 8 A, bottom), consistent with the early TgIST-mediated repression

at the transcriptional level before IFN-γ trigger. As previously reported, type I parasites prevented the Irgb6 loading (Zhao et al., 2009); Irgb6 loading was not significantly affected by the absence of *TgIST* (Fig. 8 B), very likely because of the ROP5/ROP18-mediated IRG inactivation. These data suggest that ROP5/ROP18 are epistatic to TgIST function in the IFN-γ pathway and bring strong evidence that *T. gondii* infection regulates at the transcriptional level *Irgb6* expression in a TgIST-dependent manner (Fig. 8 C).

In these assays we also assessed parasite growth. Considering the known activity of Irgb6 loading on the PVM disruption, it was not surprising to observe a decrease (twofold) in parasite growth in the absence of *TgIST* when BMDM or RAW264.7 cells were infected before IFN-γ (Fig. 8, D and E). However, we saw that when cells were prestimulated with IFN-γ before infection, growth of both WT and *TgIST* mutant type II parasites was inhibited, very likely as the result of TgIST failing to inhibit transcription once host cell effector proteins were produced (Fig. 8 D and not depicted).

Influx of Gr1$^+$ inflammatory monocytes associates with the limited expansion of *TgIST*-deficient parasites in mice

Because IFN-γ–dependent effector mechanisms are critical for the control of the *T. gondii* burden in mice and because TgIST was shown to regulate IFN-γ–mediated responses, we compared the parasitic process in BALB/c inbred mice after i.p. injection of either WT or TgIST-deficient parasites expressing luciferase, the inoculum content ranging from 5×10^4 to 5×10^5 tachyzoites. Monitoring parasite multiplication and dissemination with in vivo bioluminescent imaging, we found a reduction in the Δ*TgIST* parasite population size when compared with the WT population that started as early as day 5 postinfection (p.i.) and that markedly rose up with time over the 9 d of assay (Fig. 9 A). In line with the bioluminescence analysis, mice inoculated with a lethal dose (5×10^5) of WT failed to establish a chronic infection and died within 6 d p.i., whereas mice infected with the same dose of Δ*TgIST* showed a 60% survival (Fig. 9 B). We next quantified parasites recovered from the peritoneal cavity after injection of higher dose of tachyzoites (10^5) and confirmed the rapid control of the Δ*TgIST* population when compared with WT parasites using parasite DNA quantification by real-time PCR (Fig. 9 C) or GFP-based detection of the tachyzoites (Fig. 10 A).

To investigate whether TgIST contributes to the early innate events that determine the priming of adaptive immunity, we measured local (peritoneal fluid, Fig. 9 C) and systemic (plasma, not depicted) cytokine profiles over time, after infection. From day 7 to day 9 p.i., we observed that mice infected with *TgIST*-deficient parasites produced significantly less of the "late" proinflammatory IFN-γ, IL-6, IL-1β, and IL-18 cytokines and antiinflammatory IL-10 cytokine in their peritoneal cavities than mice infected with the parental strain (Fig. 9 C). In contrast, the early source of IL-12 driving protective Th1 responses to *T. gondii* remained unchanged from days 5 to 9 (Fig. 9 C). Thus, *TgIST*-deficient parasites, although still efficient to mount a proper Th1 response, were unsuccessful to expand in vivo. We also assessed whether a potent cellular response could account for the early control of the Δ*TgIST* parasite population. Previous studies have emphasized the critical role of inflammatory Gr1$^+$ monocytes inflowing at the *T. gondii* infection site to control acute toxoplasmosis in mice (Robben et al., 2005; Dunay et al., 2008). In this regard, we examined by FACS whether the control of *TgIST*-deficient parasites could be assigned to differences in the early cellular recruitment of myeloid cells in the peritoneal cavity. After i.p. inoculation of BALB/c mice with a high dose of tachyzoites (10^5), resident peritoneal monocytes (CD11b$^+$ Gr1$^-$ Ly6G$^-$) were gradually replaced by both neutrophils (CD11b$^+$ Gr1^{high} Ly6G$^+$) and activated inflammatory monocytes (CD11b$^+$ Gr1^{int} Ly6G$^-$; Fig. 10, B and C). Of note, a significant gap was first detected at day 7 p.i. in the relative and absolute amounts of inflammatory monocytes between mice infected with WT or *TgIST*-deficient parasites (Fig. 10, B and C). Therefore, homing of the CD11b$^+$ Gr1^{int} Ly6G$^-$ cells is likely to play a pivotal role in the control of *TgIST*-deficient parasite expansion (Figs. 9 A and 10 A).

DISCUSSION

T. gondii elicits a strong Th1 inflammatory response typified by the secretion of substantial levels of IFN-γ by CD4$^+$, CD8$^+$ T lymphocytes and NK cells in both humans and mice (Sturge and Yarovinsky, 2014; Yarovinsky, 2014). IFN-γ drives the expression in infected cells of multiple antimicrobial proteins that are instrumental in activating cell-autonomous immunity against intracellular *T. gondii*. In mice, the two major IFN-γ–induced protein families, i.e., IRGs and guanylate-binding proteins (GBPs), actively cooperate to target parasites that reside in parasitophorous vacuoles by inducing PVM disruption (Martens et al., 2005; Zhao et al., 2009; Yamamoto et al., 2012), whereas GBPs can in addition attack the parasite membrane (Kravets et al., 2016). Although these immune effectors transform the infected cell into a hostile environment and account for the restriction of avirulent type II *T. gondii* populations, their action is expected and partially counteracted, hence allowing the persistence of type II strains in animals.

Early studies have reported that *T. gondii* counter-defense remodels the host cell to be unresponsive to IFN-γ at the transcriptional level in both humans and mice (Zimmermann et al., 2006; Kim et al., 2007; Lang et al., 2012). Next, it was convincingly argued that *T. gondii* infection inhibits STAT1 transcriptional activity by preventing its nuclear–cytoplasmic cycling (Rosowski et al., 2014); however, the identity of the parasite effector remained unknown. In this study, we identified the missing link as TgIST and we uncovered how TgIST down-regulates IFN-γ–dependent signaling. Although this STAT1 silencing device appeared beneficial to the early phase of *T. gondii* infection by protecting the first wave of invading tachyzoites from the potent antiparasitic

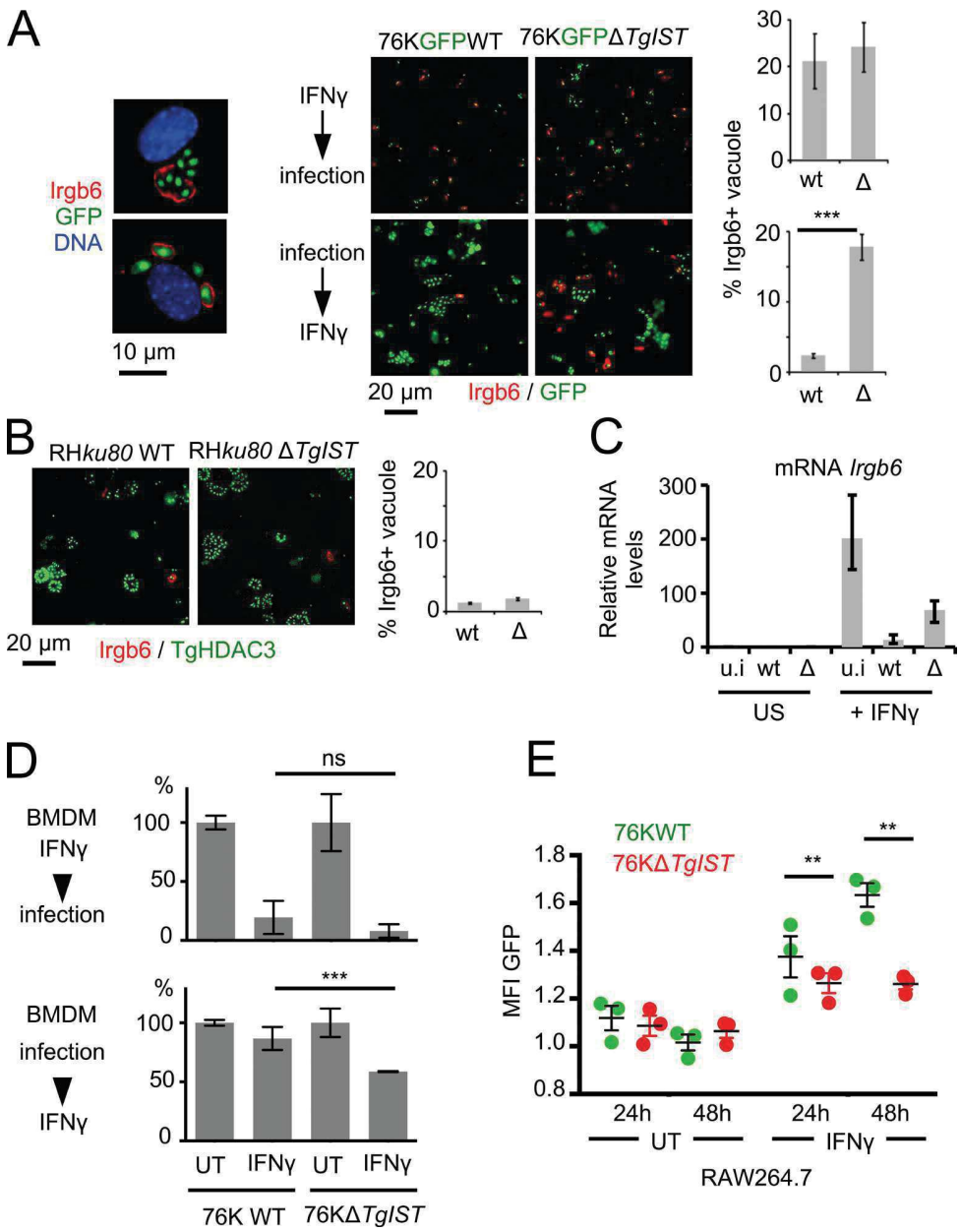


Figure 8. ***ΔTgIST*-containing vacuoles display increased IRG loading and are more sensitive to clearance in macrophages when cells are IFN-γ stimulated after infection.** (A) In the top panel, mouse tail fibroblasts were stimulated 18 h with IFN-γ before infection for 4 h with type II 76KGFP (WT) and 76KGFP *ΔTgIST* (Δ) strains. In the lower panel, mouse tail fibroblasts were infected for 4 h and then stimulated 12 h with IFN-γ. IFA with Irgb6 (red) at the PVM was quantified. Enlarged fields of Irgb6 loading at the PVM are shown on the left. Means ± SEM; $n = 3$ samples each from three combined experiments. ***, $P < 0.005$ (Student's *t* test). Data are from one representative of two independent experiments. (B) Mouse tail fibroblasts were infected for 4 h with type I RH*ku80* (WT) and RH*ku80 ΔTgIST* (Δ) strains and then stimulated 12 h with IFN-γ. TgHDAC3 (green) and Irgb6 (red) were detected by IFA, and the loading of Irgb6 at the PVM was quantified. Means ± SEM; $n = 3$ samples each from three combined experiments. (C) *Irgb6* mRNA levels were determined by RT-qPCR in mouse tail fibroblasts left uninfected (u.i) or infected with 76KGFP strain (WT) and 76KGFP *ΔTgIST* (Δ) and then stimulated with IFN-γ. *β2-microglobulin* was used for normalization. Data are displayed as fold difference relative to the uninfected cells. The mean of two experiments is shown; error bars represent SEM. This was performed two times with similar results. (D) In vitro clearance of parasites in mouse BMDMs that were prestimulated (12 h) before infection (36 h; top graph) or infected (8 h) and then stimulated (40 h; bottom graph). Type II 76KGFP strain (WT) and 76KGFP *ΔTgIST* (Δ) were used for infection. Parasite growth was evaluated by high-content imaging assay using the scanR system (Olympus). Means ± SEM. ***, $P < 0.005$ (Student's *t* test). (E) In vitro clearance of parasites in RAW264.7 mouse macrophages that were infected for 12 h with type II 76KGFP (WT) and 76KGFP *ΔTgIST* (Δ) strains and then stimulated with IFN-γ for 24 or 48 h or left unstimulated (UT). The MFI of GFP expression was quantified by flow cytometry. Means ± SEM; $n = 3$ combined independent experiments. **, $P \leq 0.0354$ (two-way ANOVA test).

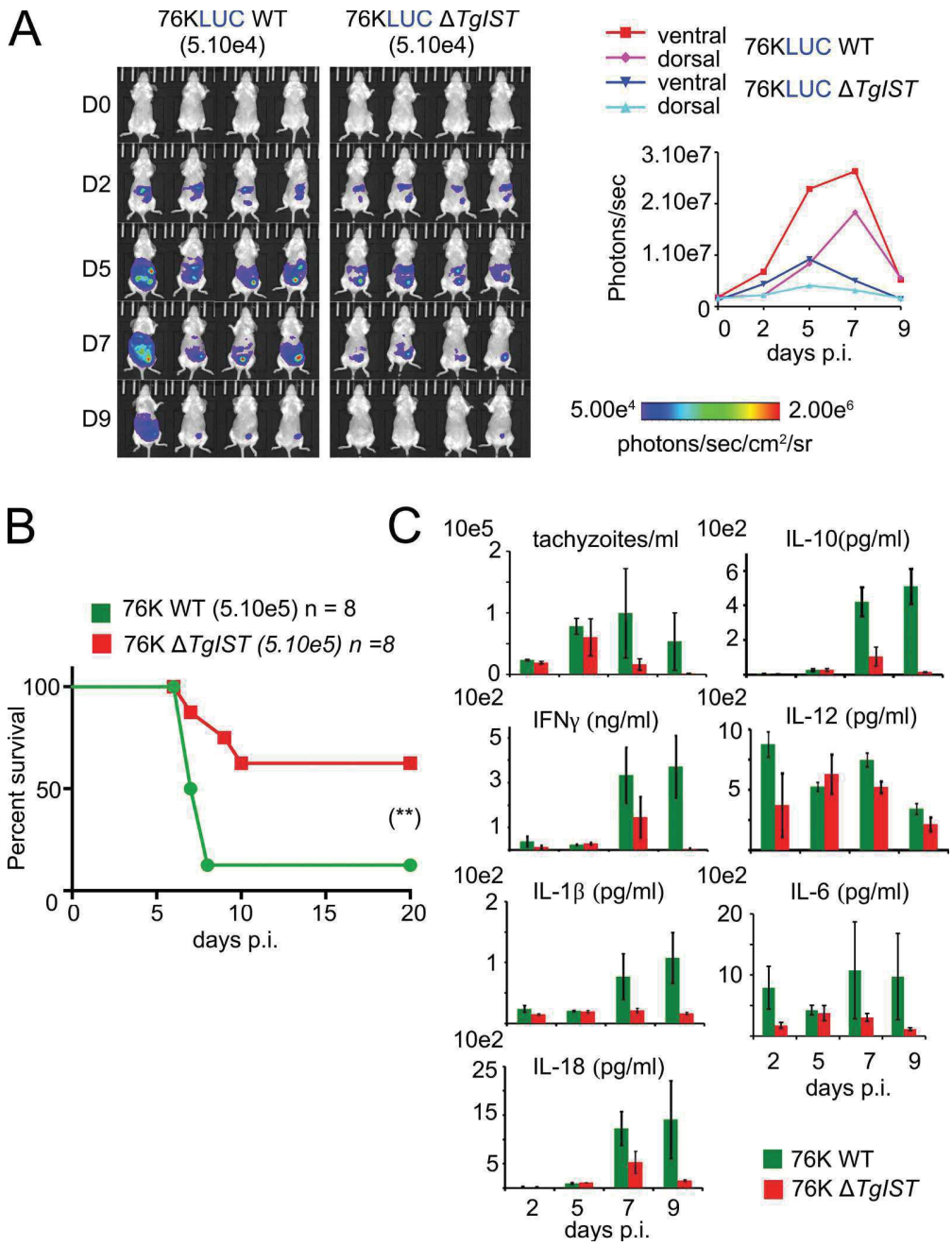


Figure 9. **Control of *TgIST*-deficient parasite expansion in vivo is associated with an efficient Th1 response.** (A) Luminescent parasites were imaged with an IVIS imaging system from day 0 to 9 after the i.p. inoculation to BALB/c of 5.10^4 tachyzoites per condition. Graph on the right depicts mean whole-animal radiance. (B) Virulence of *ΔTgIST* strain was compared with its parental 76KGFP in BALB/c mice. Mice (n = 8) were inoculated with 5×10^5 tachyzoites by i.p. injection, and survival was monitored. Significance was tested using Log-rank (Mantel-Cox) test (**, p-value = 0.0161) and Gehan-Breslow-Wilcoxon test (**, p-value = 0.0154). (C) BALB/c mice were given i.p. a dose of 10^5 76KLUC-WT or 76KLUC *ΔTgIST* tachyzoites. Peritoneal lavage fluids were collected on days 2, 5, 7, and 9 after inoculation. Number of tachyzoites was estimated within the collected samples by parasite DNA PCR and concentrations of IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, and IFN-γ were determined by ELISA. Data shown are means ± SD with n = 3 individual mice per parasite genotype at each time point.

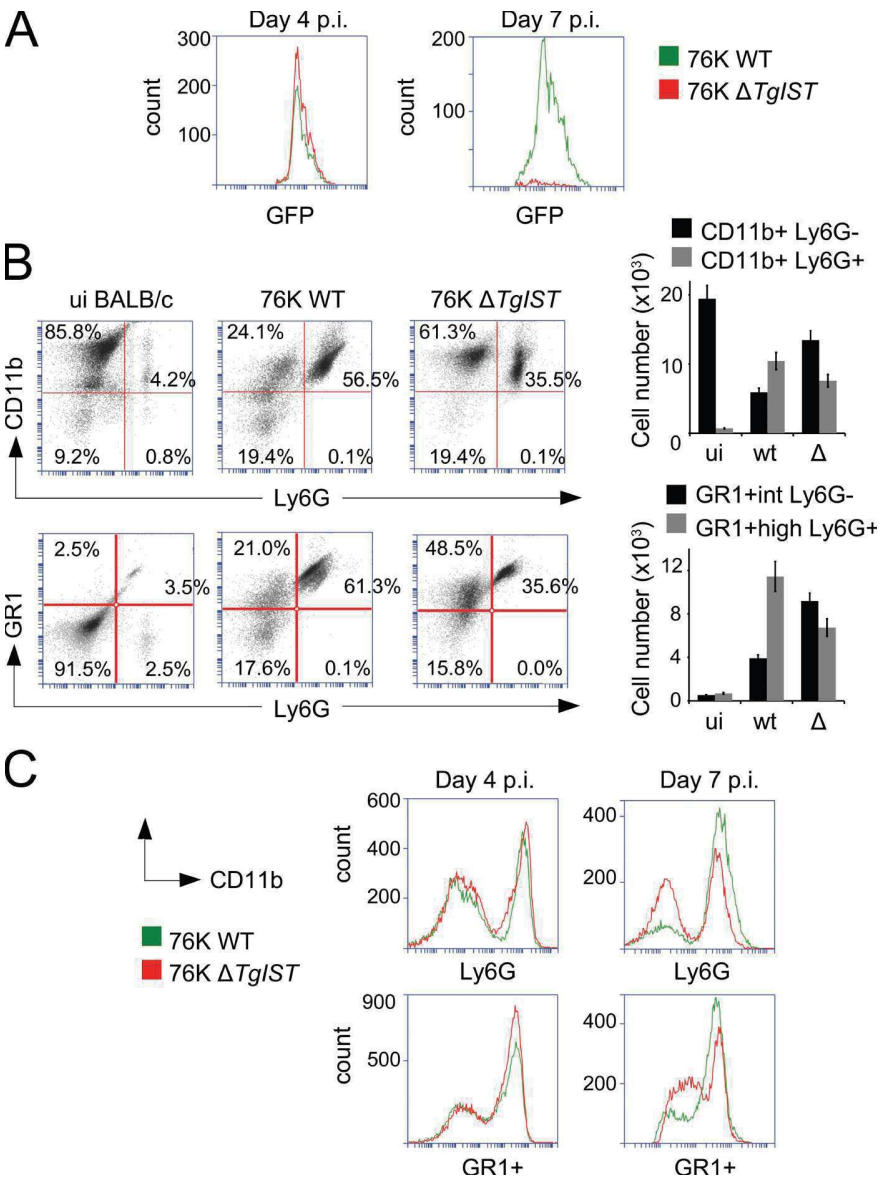


Figure 10. **Flow cytometry analyses of myeloid cells in the peritoneal lavage fluids after inoculation to mice of either WT or *TgIST*-deficient parasites.** (A) Flow cytometric detection of GFP-expressing parasites in the peritoneal lavage fluids collected from BALB/c mice at days 4 and 7 after inoculation of either 10^5 76KGFP WT or Δ*TgIST* tachyzoites. (B) Detection of Gr1$^+$ proinflammatory macrophages and neutrophils in the peritoneal lavage fluids of mice after *T. gondii* infection. Cell populations were characterized and quantified by flow cytometry with anti-CD11b (conjugated to PE), anti-Ly6G (conjugated to APC), and anti-Gr1 (mAb RB6-8C5 conjugated to PE). Numbers indicate the percentage of cells within the gate. Histograms represent the absolute number of the aforementioned cells. Results are representative of two or more independent experiments ($n = 3$ animals were pooled for each) for all panels. Data shown are means ± SD. (C) Flow cytometry quantification of CD11b$^+$, Ly6G, and Gr1$^+$ populations present at days 4 and 7 in the peritoneal lavage fluids collected from BALB/c mice to which were given i.p. either 10^5 76KGFP WT or Δ*TgIST* tachyzoites.

effectors downstream of IFN-γ, it became inefficient with time when most myeloid cells were already primed for their killing activity by the burst of cytokines prior infection (Fig. 8). Accordingly, we observed a rapid control of the *TgIST*-deficient parasites in mice (Fig. 9) that also concurred with a highly efficient i.p. homing of Gr1$^+$ proinflammatory monocytes (Fig. 10). Thus, the time-restricted activity of TgIST in vivo seems compatible with the observation that mice deficient in STAT1 signaling remain highly susceptible to toxoplasmosis (Yap and Sher, 1999; Silva et al., 2002; Gavrilescu et al., 2004) and led us to assume that a TgIST-independent STAT1-dependent additional IFN-γ responsiveness is required to limit parasite propagation over time, thereby ensuring host survival.

It is noteworthy to mention that this work challenges the general view that nuclear STAT1Y701-P obligatory signs for active transcription. Indeed, we now show that the initiation of transcription of IFN-γ–stimulated genes can be impaired in the presence of STAT1Y701-P bound to chromatin in the particular case of *T. gondii* infection. This arrest of transcription in infected cells only occurred if parasites secreted TgIST and if the latter formed such a tight complex with STAT1 that it prevented its dissociation from DNA (Fig. 7).

Importantly, because unchecked cytokine activation has dire consequences on tissue integrity, immune homeostasis requires negative feedback regulators. Regarding the JAK/STAT pathway, negative regulators fall into three groups, namely the SH2-containing phosphatases (SHPs), the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins, and the protein inhibitor of activated STAT (PIAS) proteins, that all act by down-regulating the cytokine responses (Rakesh and

Agrawal, 2005). Our work reveals intriguing similarities in the modus operandi of TgIST and PIAS1, as the latter negatively regulates the expression of PIAS1-sensitive genes (including *Gbp1*) by enhancing promoter occupancy through a direct binding to STAT1 when cells are stimulated by IFN-γ (Liu et al., 2004). PIAS1-insensitive genes (including *Irf1*) were shown to be under the negative control of PIASy, which cooperates with PIAS1 to regulate the specificity and magnitude of STAT1-mediated gene activation (Tahk et al., 2007). Of note, *Pias1*-deficient mice displayed increased protection against both bacterial and viral infections (Liu et al., 2004) in line with the rapid recovery of mice infected with *TgIST*-deficient *T. gondii* (Fig. 9, A and B).

Gene transcription depends on the activation of HAT and inhibition of HDAC as both activities shape chromatin in a more open state. Interestingly, repression of the *T. gondii*–induced IFN-γ–stimulated gene was initially correlated with a reduced recruitment of HAT that resulted in hypoacetylated chromatin (Lang et al., 2012). In this respect, HDACis were shown to increase acetylation of histones and to favor the switch toward permissive chromatin of IFN-γ–activated cells (Lang et al., 2012). However, our data contradict this model. First, HDACi treatment did not alter *T. gondii*–mediated repression of IFN-γ–stimulated genes (unpublished data), in agreement with a previous study (Rosowski et al., 2014). Second, infection did not affect acetylated histone marks at *IRF1*, CIITA, and CXCL10 loci regardless of TgIST presence or absence (Fig. 7 D), though the parasite effector firmly bound to both HDAC1 and HDAC2 (Fig. 2). We inferred that the aforementioned enzymes may play a positive role while associated to STAT1 and TgIST. For example, it was shown that HDAC activity is required to recruit RNA Pol II to the promoters of selected IFN-γ–stimulated early response genes (Sakamoto et al., 2004). An alternative explanation is that TgIST-bound HDAC prevents STAT1 acetylation and DNA dissociation, thereby reducing the pool of activation-competent STAT1 molecules in the cytosol and compromising a new round of STAT1-mediated transactivation (Krämer and Heinzel, 2010).

Even though HDAC enzymes do not contribute to alter the chromatin landscape, TgIST also bound to CHD 3 and 4 proteins that are both involved in NuRD-mediated transcriptional repression by influencing nucleosome positioning (Xue et al., 1998). Our current working model is that TgIST not only coopts transcriptionally competent STAT1 to target IFN-γ–dependent genes but also remodels the local environment by recruiting NuRD to create a nonpermissive chromatin state that shuts down RNA Pol II transcription. TgIST-mediated inhibition led to the paradoxal situation where H3K4me3, a hallmark of activation, was sustainably enriched at STAT1-binding loci throughout infection. H3K4me3 contributes with other histone modifications to mark bivalent chromatin domains known to promote the silencing of developmental genes while keeping them poised for rapid activation (Voigt et al., 2013; Matsumura et al., 2015). TgIST-dependent H3K4me3 enrichment at *IRF1* promoter was observed in both unstimulated and stimulated infected cells, suggesting that TgIST acts as a repressive "memory mark."

We showed that TgIST-mediated gene silencing resulted in a prolonged nuclear retention of activated STAT1 at the level of GAS-containing promoter sites, concomitantly with H3K4me3 enrichment. Because IFN-γ–mediated STAT1 activation is essential for the control of *T. gondii* growth, much effort has focused on understanding how the parasite can interfere with STAT1-mediated transcription in IFN-γ–treated cells. However, this study highlights that in the absence of IFN-γ stimulation, *T. gondii* infection triggered a significant increase of STAT1 Y701-P levels (Fig. 6 C, lanes 5 and 6). Because ROP16 directly tyrosine phosphorylates STAT3 and STAT6 (Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009), it is likely that the kinase also activates STAT1. ROP16 is highly polymorphic between type I (or III) and II parasites, and a single amino acid determines the strain difference in terms of STAT3 activation (Yamamoto et al., 2009). As shown previously (Rosowski and Saeij, 2012), we noticed that ROP16 from type I parasites contributed only to some extent to STAT1 Y701 phosphorylation, whereas controlled STAT3 phosphorylation was completely abrogated in cells infected with *Rop16*-deficient type I (RH) parasites and unstimulated cells (Fig. 6 D, lanes 2 and 4). Conversely, type II strain was unable to direct STAT3 phosphorylation but able to activate STAT1 in a ROP16-independent manner (Fig. 6 D, lanes 5 and 7). Intriguingly, lack of TgIST in either type I or II tachyzoites is sufficient to abrogate this phosphorylation (Fig. 6 C, lanes 9 and 10; and not depicted). Remarkably, ectopic expression of TgIST in mouse macrophages was sufficient to induce significant STAT1 Y701-P when compared with mCherry mock-transfected cells (Fig. 6 E). Moreover, TgIST-mediated activation was largely potentialized when IFN-γ was added (Fig. 6 E). Because TgIST shares no common structural domain with kinases (Fig. 1 A), it is therefore likely that the protein coopts a host kinase to shortcut the JAK-STAT signaling cascade and to promote a sustained STAT1-Y701 phosphorylation throughout infection.

With this study, we added to the growing list of *T. gondii* effectors TgIST, a protein that bridges host proteins to efficiently challenge the JAK/STAT canonical pathway, and in contrast to the IRG system that was lost in primates (Bekpen et al., 2005), this sophisticated type of molecular device appears ubiquitous in metazoans including humans and is likely to play a pivotal contribution to the pathophysiology of infectious diseases.

MATERIALS AND METHODS

Mice and experimental infection

6-wk-old BALB/cJRj mice were obtained from Charles River. Mouse care and experimental procedures were performed under pathogen-free conditions in accordance with established institutional guidance and approved protocols

from the institutional Animal Care and Use Committee of the University Grenoble Alpes (agreement #B3851610006).

Parasites and host cells

T. gondii strains were maintained in vitro by serial passage on monolayers of HFFs. The strains used in this study were RH*ku80*, Pru*ku80*, and 76K-GFP-LUC (gift of M. Grigg, National Institutes of Health, Bethesda, MD). HFF primary cells, RAW264.7, 2fTGH(STAT1$^{+/+}$), and U3A (STAT1$^{-/-}$; gift of J. Saeij, University of California, Davis, Davis, CA) cell lines were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen), 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 2 mM L-glutamine, and 50 µg/ml penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific). A HEK-Blue IFN-γ responsive reporter cell line was cultured according to the manufacturer's instructions (InvivoGen).

Generation of mouse fibroblasts

Mouse primary fibroblasts were obtained from the tail (MTFs) and ears of female BALB/c mice. Biopsies were minced and incubated overnight in 400 U/ml collagenase type II (Sigma-Aldrich) dissolved in DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% heat-inactivated FBS and incubated overnight at 37°C and 5% CO_2. Then, cells were dislodged from the digested tissues by repeated pipetting and were passed through 70-µm sterile netting into sterile 14-ml centrifuge tubes. The samples were centrifuged for 5 min at 350 *g*, and the cell pellet was resuspended in DMEM, 20% FBS, and further expanded in a 175-cm^2 cell culture flask. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2.

Generation of BMDMs

BMDMs were obtained from female C57BL/6 mice. BM was isolated by flushing hind tibias and femurs using a 25-gauge needle followed by passages through an 18-gauge needle to disperse cell clamps. Cells were suspended in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 20 ng/ml recombinant M-CSF (Invitrogen) and incubated in a tissue culture–treated flask for 8–12 h. Then, nonadherent cells were harvested and transferred in 55-cm^2 non–tissue culture–treated plates (Corning) at 4–6 × 10^6 cells per plate and further incubated at 37°C, with 5% CO_2 in humidified air. After 6 d, cells were washed with PBS to remove nonadherent cells, harvested by dislodging with a cell scraper in ice-cold PBS, and replated for the assay. This method yielded a highly pure population of F4/80$^+$ macrophages by immunofluorescence analysis (IFA).

Reagents

Antibodies against HA (3F10; Roche), IRF1 (D5E4; Cell Signaling Technology), STAT1 (Cell Signaling Technology), STAT1 Y701-P (Cell Signaling Technology), STAT1 S727-P (Cell Signaling Technology), STAT3 Y705-P (Cell Signaling Technology), USP7/HAUSP (A300-033A-3; Bethyl Laboratories, Inc.), CHD4 (3F2/4; Abcam), MTA1 (D40D1; Cell Signaling Technology), HDAC1 (10E2; Cell Signaling Technology), RBBP7 (V415; Cell Signaling Technology), CTBP1 (Abcam), Toxofilin, TBP (Abcam), H3K4me3 (Diagenode), H3K9ac (17-658; EMD Millipore), anti-acetyl–Histone H4 (06-866; EMD Millipore), H3K27ac (17-683; EMD Millipore), and Irgb6 (gift of J. Howard, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal) were used in immunofluorescence, immunoblotting, and/or ChIP assays. Immunofluorescence secondary antibodies were coupled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific). Secondary antibodies used in Western blotting were conjugated to alkaline phosphatase (Promega). Recombinant human and mouse IFN-γ (Roche) were used to stimulate the aforementioned cells.

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence assays were performed as described previously (Braun et al., 2013). In brief, cells grown on coverslips were washed in PBS and fixed for 20 min at room temperature with PBS containing 3% (vol/vol) formaldehyde. Fixed cells were permeabilized with PBS–0.1% Triton X-100 (vol/vol) for 10 min and blocked in PBS–3% BSA for 1 h at room temperature. Samples were incubated in PBS–3% BSA with the primary antibodies indicated in the figures, followed by the secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific) at a 1:1,000 dilution each in PBS–3% BSA. Nuclei of both host cells and parasites were stained for 10 min at room temperature with Hoechst 33258 at 2 µg/ml in PBS. After four washes in PBS, coverslips were mounted on a glass slide with Mowiol mounting medium. Images were acquired with a fluorescence microscope (Axio Imager 2_apotome; ZEISS).

Plasmid constructs

To construct the vector pLIC-TgIST-HA-DHFR, the coding sequence of TgIST was amplified using primers pLIC-HF-DHFR_F and pLIC-HF-DHRF_R using Pru*ku80* genomic DNA as template. The resulting PCR product was cloned into the pLIC-HF-dhfr vector using the LIC cloning method (Bougdour et al., 2013) yielding pLIC-TgIST-HA-DHFR. The plasmid pTOXO_Cas9-CRISPR::sgIST vector was generated as previously described (Curt-Varesano et al., 2016). In brief, primers TgIST-CRISP-FWD and TgIST-CRISP-REV containing the sgRNA targeting TgIST genomic sequence were phosphorylated, annealed, and ligated in the pTOXO_Cas9-CRISPR plasmid linearized with BsaI, yielding pTOXO_Cas9-CRISPR::sgTgIST. To construct the mammalian expression vector pcDNA4-HA-TgIST, TgIST coding sequence was amplified using primers pcDNA4-HA-TgIST_F and pcDNA4-HA-TgIST_R using Pru*ku80* genomic DNA as template. The resulting PCR product was cloned by LIC into the pcDNA-LIC-HF plasmid (Bougdour et al., 2013). Likewise, pcDNA4-TgIST-HA_F and pcDNA4-TgIST-HA_R primers were used to generate the plasmid pcDNA4-TgIST-HA, harboring a C-terminal HA tag.

T. gondii transfection

Vectors were transfected into RH*ku80*, Pru*ku80*, and 76K-GFP-LUC tachyzoites by electroporation. Electroporation was performed in a 2-mm cuvette in a BTX ECM 630 (Harvard Apparatus) at 1,100 V, 25 Ω, and 25 μF. Stable integrants were selected in media with 1 μM pyrimethamine and cloned by limiting dilution.

Generation of the TgIST insertional mutant

Type I (RH*ku80*) and II (Pru*ku80* and 76KGFP/LUC) were cotransfected with a mixture of the pTOXO_Cas-9CRISP::sgIST vector with purified amplicons containing the DHFR cassette flanked by sequences homologous to the sequence targeted by sgIST. These amplicons were generated by PCR amplification of the DHFR cassette using the primers TgIST-DHFR-F and TgIST-DHFR-R and a vector carrying the DHFR cassette as template. To generate a complemented Pru*ku80 ΔTgIST* strain, vector pLIC-P_{TgIST}-*TgIST*-HF was coelectroporated with the pMiniHX at 1:10 ratio, followed by selection with mycophenolic acid and xanthine, and cloned by limiting dilution. The resulting strain was named Pru*ku80 ΔTgIST,* pLIC-P_{TgIST}-*TgIST*-HF (Table S1).

HEK-Blue IFN-γ cells transfection

24 h before transfection, the HEK-Blue IFN-γ cells (InvivoGen) were plated (80% confluency) in 24-well tissue culture dishes. 0.8 μg HA fusion protein–expressing plasmids were transfected into cells with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. 24 h after transfection, IFN-γ was added at 100 U/ml, and the plates were incubated at 37°C for 24 h. 20 μl of induced HEK-Blue IFN-γ cells supernatant was added to 180 μl QUANTI-Blue. After incubating for 1–3 h at 37°C, the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) levels were determined using a spectrophotometer at 650 nm.

Chromatographic purification of TgIST-containing complexes

Pru*ku80*_TgIST-HAFlag–infected host cell extracts containing Flag-tagged protein were incubated with anti–FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) for 1 h at 4°C. Beads were washed with 10 column volumes of BC500 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, 0.5 mM PMSF, and 1 μg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin). Bound peptides were eluted stepwise with 250 μg/ml FLAG peptide (Sigma-Aldrich) diluted in BC100 buffer.

Mass spectrometry–based proteomics

Protein bands were excised from colloidal blue–stained gels (Thermo Fisher Scientific), treated with DTT and iodoacetamide to alkylate the cysteines before in-gel digestion using modified trypsin (sequencing grade; Promega). Resulting peptides from individual bands were analyzed by online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 coupled to LTQ-Orbitrap Velos Pro; Thermo Fisher Scientific) using a 25-min gradient. Peptides and proteins were identified and quantified using MaxQuant (version 1.5.3.17) through concomitant searches against ToxoDB (20151112 version), SwissProt (Homo sapiens taxonomy, 20151112 version), and the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant. Minimum peptide length was set to 7 amino acids. Minimum number of peptides, razor + unique peptides, and unique peptides were all set to 1. Maximum false discovery rates were set to 0.01 at peptide and protein levels.

Cell fractionation

For cytosolic and nuclear fractionation analysis, cells were washed in ice-cold PBS and harvested using a cell scraper. After centrifugation, cells were resuspended in buffer D (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 1× Roche protease inhibitor cocktail) and lysed for 8 min with Triton X-100 at a final concentration of 0.1%. Cell lysates were centrifuged at 1,300 *g* for 5 min, and the supernatant containing the cytosolic fraction was collected. The pellet, containing the nuclear fraction, was washed once in buffer D and resuspended in cell extraction buffer (Thermo Fisher Scientific) for protein extraction. The supernatant and pellet fractions were clarified by centrifugation at 20,000 *g* for 10 min at 4°C. Supernatants were mixed with protein sample buffer (Thermo Fisher Scientific) for Western blot analysis.

Western blot

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P; EMD Millipore) by liquid transfer, and Western blots were probed using appropriate primary antibodies followed by phosphatase-conjugated goat secondary antibodies (Promega). Signals were detected using NBT-BCIP (Amresco).

Harvest of peritoneal contents, in vivo cytokine ELISA, and determination of parasite load

6-wk-old BALB/cJRj mice (Charles River) were i.p. infected with 10^5 parasites and sacrificed on days 2, 5, 7, and 9 p.i. Immediately after being killed, mice were peritoneally lavaged with 3 ml of physiological serum. 2 ml of recovered lavage fluid was centrifuged at 20,000 *g* for 15 min at 4°C, and the clarified supernatant was stored at −80°C until analyzed by ELISA. IL-12, IFN-γ, and IL-1β levels were determining using commercially available ELISA kits (IL-12 p40 ELISA kit [Thermo Fisher Scientific], IFN-γ ELISA kit [Thermo Fisher Scientific], and IL-1β Quantikine ELISA kit [R&D Systems]). The parasite loads in peritoneal content were quantified after DNA extraction (QIAamp DNA mini kit; QIAGEN) using the quantitative PCR targeting of the *T. gondii*–specific 529-bp repeat element.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from infected cells using TRIzol (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized with random hexamers by using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). Samples were analyzed by real-time quantitative PCR for appropriate probes using TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. *β2-microglobulin* was used as an internal control gene.

ChIP assay

HFF cells were infected for 24 h with Pru*ku80*TgIST-HAFlag and Pru*ku80 ΔTgIST* and stimulated with 100 U/ml IFN-γ for 1 h or left unstimulated. Cells were then cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min before quenching with 125 mM glycine for 5 min. The ChIP assay was performed by using the Transcription Factor Chromatin Immunoprecipitation kit (Diagenode) according to the manufacturer's protocol. In brief, fixed cells were sonicated to shear the cross-linked chromatin into a mean DNA fragment size of 200–600 bp. We used 40 million sorted nuclei in 300 µl of immunoprecipitation buffer supplemented with fresh proteinase inhibitors. By using a Diagenode Bioruptor precooled to 4°C, shearing was achieved in 1.5-ml low binding tubes in the appropriate tube adapter with 18 high-energy cycles of 30 s on/30 s off. The aforementioned antibodies were used for immunoprecipitation. After overnight incubation, DNA–protein–antibody complex was eluted. The cross-links were reversed by heating the samples at 65°C for 4 h. DNA was purified by using IPure kit (Diagenode) according to the manufacturer's protocol. For validation, quantitative real-time ChIP-PCR was performed by SYBR Green (Applied Biosystems) using the StepOnePlus (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed and then quantitated using the delta–delta CT (ΔΔCT) method. Primer sequences are listed in Table S1.

Bioluminescence imaging

Noninvasive bioluminescence imaging was performed 0, 2, 5, 7, and 10 d after *T. gondii* infection (5×10^4 tachyzoites). 5 min before imaging, vigil mice received an i.p. injection of 150 µg/g of D-luciferin (Promega) and were then anesthetized (isoflurane 4% for induction and 1.5% thereafter) and placed in the optical imaging system (IVIS Kinetic; PerkinElmer). This allowed localization of luciferase-positive *T. gondii* and evaluation of the abdominal load. Bioluminescence signal was expressed as photons/seconds (p/s).

Flow cytometry

6-wk-old BALB/cJRj mice (Charles River) were i.p. infected with 10^5 parasites and sacrificed on days 4 and 7 p.i. Immediately after being killed, mice were peritoneally lavaged with PBS, and recovered lavage fluid was centrifuged at 500 *g* for 8 min. Peritoneal cells were washed in stain buffer (PBS containing 2% FBS and 0.1 mM EDTA), and cells were then pretreated at 4°C for 1 h with mAb 2.4G2 to block nonspecific binding to Fcγ receptors. Thereafter, cells were incubated for 1 h with fluorescently conjugated antibodies for cell surface markers from BD: PE-conjugated anti-CD11b, PE-conjugated anti-Gr1, PE-conjugated anti-CD11c, and APC-conjugated anti–Ly-6G. Isotype controls consisted of PE-conjugated rat IgG2b, PE-conjugated hamster IgG1, and APC-conjugated rat IgG2a, provided by BD. Analysis of stained cells was performed with a FACSCalibur flow cytometer (BD). For all samples, 100,000 cells were analyzed for plot generation.

Microarray hybridization and data analysis

HFFs, 2fTGH, and U3A were plated at $8–10 \times 10^6$ cells per 55-cm^2 plate, infected (MOI = 6) for 24 h with 76KG-FP-WT and -*ΔTgIST* and with 100 U/ml IFN-γ for 6 h. RNA was isolated using TRIzol reagent, followed by phenol/chloroform/isoamyl extraction. RNA quantity and quality were measured by NanoDrop ND-1000. RNA integrity was assessed by standard denaturing agarose gel electrophoresis. Transcripts were obtained from three biological replicates each. Total RNA from each sample was linearly amplified and labeled with Cy3-UTP. The labeled cRNAs were purified by RNeasy Mini kit (QIAGEN). The concentration and specific activity of the labeled cRNAs (pmol Cy3/µg cRNA) were measured by NanoDrop ND-1000. 1 µg of each labeled cRNA was fragmented by adding 11 µl of 10× blocking agent and 2.2 µl of 25× fragmentation buffer and then heated at 60°C for 30 min, and finally 55 µl of 2× hybridization buffer (GE Healthcare) was added to dilute the labeled cRNA. 100 µl of hybridization solution was dispensed into the gasket slide and assembled to the gene expression microarray slide. The slides were incubated for 17 h at 65°C in a hybridization oven (Agilent Technologies). Feature extraction software (version 11.0.1.1; Agilent Technologies) was used to analyze the acquired array images. Quantile normalization and subsequent data processing were performed with using the GeneSpring GX version 12.1 software (Agilent Technologies). After quantile normalization of the raw data, genes that had at least 3 out of 27 samples have flags in Detected ("All Targets Value") were chosen for further data analysis. Differentially expressed genes with statistical significance were identified through Volcano Plot filtering. Hierarchical clustering was performed using the R software (version 2.15). GO analysis and Pathway analysis were performed in the standard enrichment computation method. The thresholds were fold change ≥ 2.0, p-value ≤ 0.05. GO analysis and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analysis were performed using the DAVID Bioinformatics Resources. GSEA and DIRE analysis were performed to identify TFBSs. Microarray data has been uploaded to GEO Datasets under accession no. GSE81613.

Online supplemental material

Table S1, included as an Excel file, describes all of the oligonucleotides, plasmids, and strains generated in this study.

Online supplemental material is available at http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20160340/DC1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Geneviève Milon (Pasteur Institute) for her valuable comments. We thank Pr. Jonathan Howard (Lisbon) for his kind gift of the Irgb6 antibody.

This work was supported by the Laboratoire d'Excellence (LabEx) ParaFrap (ANR-11-LABX-0024), the European Research Council (ERC Consolidator Grant N° 614880 Hosting TOXO to M.-A. Hakimi), and Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant ANR Blanc 2012 TOXOHDAC (ANR-12-BSV3-0009-01). Proteomic experiments were partly supported by the ANR (Investissement d'Avenir Infrastructures, ProFi project ANR-10-INBS-08-01).

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 3 March 2016
Accepted: 22 July 2016

REFERENCES

Bekpen, C., J.P. Hunn, C. Rohde, I. Parvanova, L. Guethlein, D.M. Dunn, E. Glowalla, M. Leptin, and J.C. Howard. 2005. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* 6:R92. http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-11-r92

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, et al. 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. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002

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, et al. 2013. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J. Exp. Med.* 210:2071–2086. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130103

Chinnadurai, G. 2002. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol. Cell.* 9:213–224. http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00443-4

Coffey, M.J., B.E. Sleebs, A.D. Uboldi, A. Garnham, M. Franco, N.D. Marino, M.W. Panas, D.J. Ferguson, M. Enciso, M.T. O'Neill, et al. 2015. An aspartyl protease defines a novel pathway for export of *Toxoplasma* proteins into the host cell. *eLife.* 4:e10809. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10809

Collazo, C.M., G.S. Yap, S. Hieny, P. Caspar, C.G. Feng, G.A. Taylor, and A. Sher. 2002. The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments. *Infect. Immun.* 70:6933–6939. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.12.6933-6939.2002

Curt-Varesano, A., L. Braun, C. Ranquet, M.-A. Hakimi, and A. Bougdour. 2016. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells. *Cell. Microbiol.* 18:151–167. http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12498

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. http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.019

Etheridge, R.D., A. Alaganan, K. Tang, H.J. Lou, B.E. Turk, and L.D. Sibley. 2014. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe.* 15:537–550. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002

Gavrilescu, L.C., B.A. Butcher, L. Del Rio, G.A. Taylor, and E.Y. Denkers. 2004. STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma interferon production during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 72:1257–1264. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.3.1257-1264.2004

Hakimi, M.-A., and A. Bougdour. 2015. *Toxoplasma*'s ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 26:24–31. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.003

Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6:644–658. http://dx.doi.org/10.1038/nri1900

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*. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:414–421. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.002

Kim, S.-K., A.E. Fouts, and J.C. Boothroyd. 2007. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-γ-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J. Immunol.* 178:5154–5165. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5154

Krämer, O.H., and T. Heinzel. 2010. Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315:40–48. http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.10.007

Kravets, E., D. Degrandi, Q. Ma, T.-O. Peulen, V. Klümpers, S. Felekyan, R. Kühnemuth, S. Weidtkamp-Peters, C.A. Seidel, and K. Pfeffer. 2016. Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *eLife.* 5:e11479. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.11479

Lang, C., A. Hildebrandt, F. Brand, L. Opitz, H. Dihazi, and C.G.K. Lüder. 2012. Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-infected macrophages to IFN-γ. *PLoS Pathog.* 8:e1002483. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002483

Liu, B., S. Mink, K.A. Wong, N. Stein, C. Getman, P.W. Dempsey, H. Wu, and K. Shuai. 2004. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat. Immunol.* 5:891–898. http://dx.doi.org/10.1038/ni1104

Lüder, C.G., C. Lang, M. Giraldo-Velasquez, M. Algner, 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. *J. Neuroimmunol.* 134:12–24. http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00320-X

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 Pathog.* 1:e24. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0010024

Matsumura, Y., R. Nakaki, T. Inagaki, A. Yoshida, Y. Kano, H. Kimura, T. Tanaka, S. Tsutsumi, M. Nakao, T. Doi, et al. 2015. H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation. *Mol. Cell.* 60:584–596. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.025

McKendry, R., J. John, D. Flavell, M. Müller, I.M. Kerr, and G.R. Stark. 1991. High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:11455–11459. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.24.11455

Meira, C.S., V.L. Pereira-Chioccola, J.E. Vidal, C.C.B. de Mattos, G. Motoie, T.A. Costa-Silva, R. Gava, F.B. Frederico, and L.C. de Mattos. Toxoplasma Groups. 2014. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN-γ, TNF-α, and IL-10 levels. *Front. Microbiol.* 5:492.

Melo, M.B., K.D.C. Jensen, and J.P.J. Saeij. 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.* 27:487–495. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001

Pereira-Chioccola, V.L., J.E. Vidal, and C. Su. 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 4:1363–1379. http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.89

Rakesh, K., and D.K. Agrawal. 2005. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 70:649–657. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.042

Ramana, C.V., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen, and G.R. Stark. 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene.* 19:2619–2627. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203525

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. *J. Exp. Med.* 201:1761–1769. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050054

Robertson, A.G., M. Bilenky, A. Tam, Y. Zhao, T. Zeng, N. Thiessen, T. Cezard, A.P. Fejes, E.D. Wederell, R. Cullum, et al. 2008. Genome-wide relationship between histone H3 lysine 4 mono- and tri-methylation and transcription factor binding. *Genome Res.* 18:1906–1917. http://dx.doi.org/10.1101/gr.078519.108

Rosowski, E.E., and J.P.J. Saeij. 2012. *Toxoplasma gondii* clonal strains all inhibit STAT1 transcriptional activity but polymorphic effectors differentially modulate IFNγ induced gene expression and STAT1 phosphorylation. *PLoS One.* 7:e51448. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051448

Rosowski, E.E., Q.P. Nguyen, A. Camejo, E. Spooner, and J.P.J. Saeij. 2014. *Toxoplasma gondii* inhibits gamma interferon (IFN-γ)- and IFN-β-induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. *Infect. Immun.* 82:706–719. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01291-13

Sadzak, I., M. Schiff, I. Gattermeier, R. Glinitzer, I. Sauer, A. Saalmüller, E. Yang, B. Schaljo, and P. Kovarik. 2008. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:8944–8949. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0801794105

Saeij, J.P.J., 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. http://dx.doi.org/10.1038/nature05395

Sakamoto, S., R. Potla, and A.C. Larner. 2004. Histone deacetylase activity is required to recruit RNA polymerase II to the promoters of selected interferon-stimulated early response genes. *J. Biol. Chem.* 279:40362–40367. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406400200

Scallan, E., R.M. Hoekstra, B.E. Mahon, T.F. Jones, and P.M. Griffin. 2015. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiol. Infect.* 143:2795–2804. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814003185

Scharton-Kersten, T.M., G. Yap, J. Magram, and A. Sher. 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185:1261–1274. http://dx.doi.org/10.1084/jem.185.7.1261

Schneider, A.G., D.S. Abi Abdallah, B.A. Butcher, and E.Y. Denkers. 2013. *Toxoplasma gondii* triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFNγ-induced STAT1 transcriptional activity. *PLoS One.* 8:e60215. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060215

Silva, N.M., C.V. Rodrigues, M.M. Santoro, L.F. Reis, J.I. Alvarez-Leite, and R.T. Gazzinelli. 2002. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect. Immun.* 70:859–868. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.859-868.2002

Stark, G.R., and J.E. Darnell Jr. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity.* 36:503–514. http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013

Sturge, C.R., and F. Yarovinsky. 2014. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 82:3090–3097. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01722-14

Sullivan, W.J. Jr., and V. Jeffers. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:717–733. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x

Tahk, S., B. Liu, V. Chernishof, K.A. Wong, H. Wu, and K. Shuai. 2007. Control of specificity and magnitude of NF-κB and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:11643–11648. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701877104

Voigt, P., W.-W. Tee, and D. Reinberg. 2013. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 27:1318–1338. http://dx.doi.org/10.1101/gad.219626.113

Wojciak, J.M., M.A. Martinez-Yamout, H.J. Dyson, and P.E. Wright. 2009. Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains. *EMBO J.* 28:948–958. http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.30

Xue, Y., J. Wong, G.T. Moreno, M.K. Young, J. Côté, and W. Wang. 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell.* 2:851–861. http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80299-3

Yamamoto, M., D.M. Standley, S. Takashima, H. Saiga, M. Okuyama, H. Kayama, E. Kubo, H. Ito, M. Takaura, T. Matsuda, et al. 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206:2747–2760. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091703

Yamamoto, M., M. Okuyama, J.S. Ma, T. Kimura, N. Kamiyama, H. Saiga, J. Ohshima, M. Sasai, H. Kayama, T. Okamoto, et al. 2012. A cluster of interferon-γ-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 37:302–313. http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009

Yap, G.S., and A. Sher. 1999. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-γ- and tumor necrosis factor (TNF)-α-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 189:1083–1092. http://dx.doi.org/10.1084/jem.189.7.1083

Yarovinsky, F. 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat. Rev. Immunol.* 14:109–121. http://dx.doi.org/10.1038/nri3598

Zhao, Y., D.J.P. 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. *J. Immunol.* 182:3775–3781. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0804190

Zimmermann, S., P.J. Murray, K. Heeg, and A.H. Dalpke. 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-γ signaling. *J. Immunol.* 176:1840–1847. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1840

5. Résultats complémentaires sur TgIST

5.1. L'export de TgIST nécessite la protéine MYR1

Comme vu précédemment dans l'article, la protéase ASP5 est nécessaire à l'export de TgIST et sa sécrétion dans la cellule hôte. Elle est également impliquée dans l'export de protéines de granules denses secrétées, telles que GRA16 et GRA24 (Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013).

Afin de compléter nos connaissances sur le mécanisme d'export de TgIST, nous avons regardé l'implication de la protéine MYR1 dans la sécrétion de TgIST dans la cellule hôte. Cette protéine est impliquée dans la sécrétion de toutes les protéines de granules denses connues à ce jour (Franco et al., 2016).

La souche de type 1 RH*Δku80Δmyr1* a été générée dans le laboratoire par la technique CRISPR Cas9 (Braun et al., unpublished). Afin d'évaluer l'implication de MYR1 dans l'export de TgIST, les souches RH*Δku80* parentale et *Δmyr1* ont été transfectées de façon transitoire avec un vecteur contenant la séquence de TgIST fusionnée à une étiquette HA, sous le contrôle du promoteur endogène de TgIST. 24 heures après l'invasion, des images d'immunofluorescences ont été prises, et la fluorescence dans les noyaux des cellules hôtes infectées par les parasites transfectés a été quantifiée.

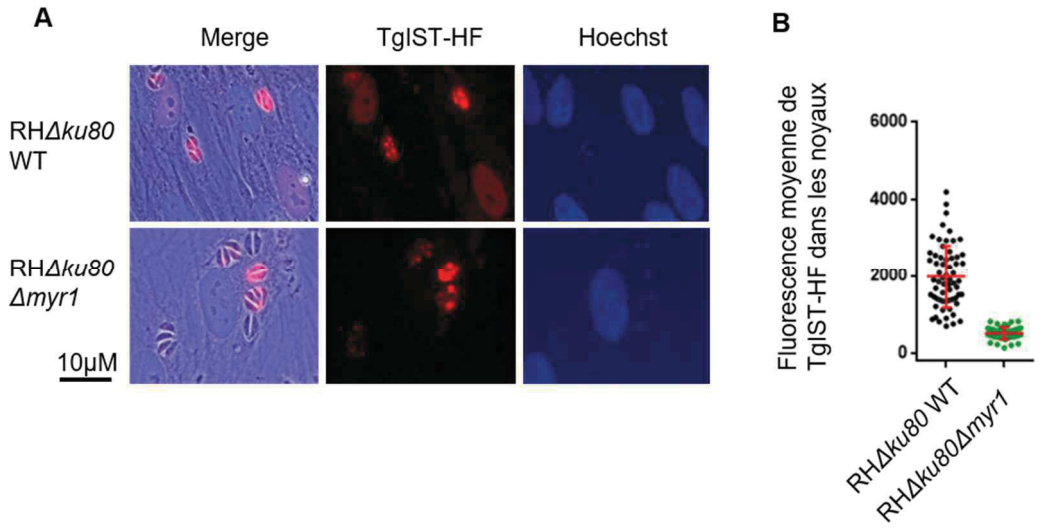


Figure 11 : La sécrétion de TgIST est dépendante de MYR1.
Un vecteur contenant la séquence de TgIST fusionnée à une étiquette HA a été transfecté de façon transitoire dans des parasites RHku80 sauvage (WT) ou *Δmyr1*. Des immunofluorescences ont été réalisées 24 heures après la transfection (A), et les quantités de TgIST dans le noyau des cellules hôtes ont été mesurées (B) Les barres horizontales représentent l'intensité moyenne de TgIST dans les noyaux +/- la déviation standard.

Dans le cas des parasites *Δmyr1*, TgIST n'est plus détectable dans le noyau des cellules hôtes, et semble bloquée au sein de l'espace vacuolaire (Figure 11 A). Les niveaux de fluorescence détectés dans les noyaux des cellules hôtes corroborent cette observation, avec des quantités de fluorescence faibles dans le cas des cellules infectées par la souche *Δmyr1* (Figure 11 B). Ces observations indiquent que la protéine MYR1 est nécessaire à l'export de TgIST dans la cellule hôte.

Ces observations sont cohérentes avec une précédente étude sur *MYR1* (Franco et al., 2016). Dans cette étude, il a été démontré que la capacité de régulation de l'IFNγ par le parasite est totalement dépendante de MYR1. Notre article traitant de TgIST a montré son importance dans le blocage de la voie IFNγ de la cellule hôte (JEM, Figure 3), et les présents résultats (Figure 11) nous permettent de lier les premières observations concernant MYR1 avec TgIST.

5.2. TgIST instaure la résistance à l'IFNγ chez *Neospora caninum*

Le parasite *Neospora caninum* est un membre du groupe Apicomplexa, et fait plus précisément partie de la famille des coccidies formant des kystes tissulaires, tout comme *Toxoplasma gondii* (Dubey and Lindsay, 1996). Ce parasite infecte majoritairement le chien ainsi que divers autres mammifères. En revanche, aucune transmission à l'homme n'a été observée. Ce parasite est responsable de la néosporose, une maladie touchant les animaux immunodéprimés, et entrainant chez eux des dégâts neurologiques.

Le parasite *Neospora caninum* est capable d'envahir les cellules humaines et murines, et induit chez la souris une infection comparable à celle de l'infection par une souche de type 3 de *Toxoplasma gondii* (Regidor-Cerrillo et al., 2011). Contrairement à *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* ne possède pas de résistance à l'IFNγ ; en effet, les parasites sont rapidement ciblés par les IRGs après stimulation des cellules par cette cytokine (Spekker et al., 2013).

Les parasites *Toxoplasma gondii* possédant TgIST sont capables de bloquer l'expression des gènes de l'hôte inductibles à l'IFNγ, dont le gène *IRF1* (JEM, Figure 3 A). De plus, nous avons montré que la transfection en cellules humaines de la séquence codante de TgIST seule permet d'empêcher l'induction d'*IRF1* dans des cellules stimulées à l'IFNγ (JEM, Figure 6 E).

Comme précisé dans l'article, aucune protéine homologue à TgIST n'a pu être identifiée chez *Neospora caninum*. Nous avons donc transfecté de façon transitoire les parasites *Neospora caninum* sauvages avec un vecteur contenant la séquence codante pour TgIST fusionnée à une étiquette HA-FLAG, sous le contrôle du promoteur endogène de TgIST (Figure 12). Les parasites transfectés ont infecté des cellules HFF pendant 24 heures, puis les cellules ont été

stimulées avec de l'IFNγ, et des immunofluorescences ont été réalisées pour détecter l'étiquette HA de TgIST (en vert) et IRF1 (en rouge).

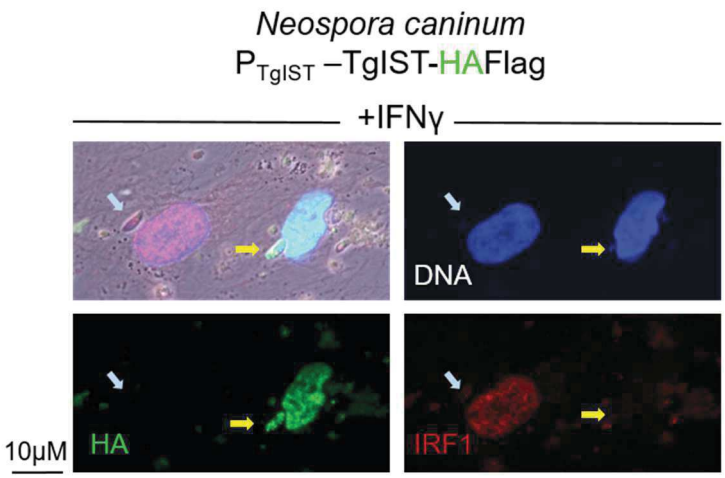


Figure 12 : TgIST bloque l'expression d'IRF1 en présence d'IFNγ dans *Neospora caninum*
Un vecteur contenant la séquence de TgIST fusionnée à une étiquette HA a été transfecté de façon transitoire dans des parasites *Neospora caninum*. Des HFFs ont été infectées pendant 24 heures, et stimulées pendant 6h avec l'IFNγ. Des immunofluorescences ont été réalisées pour détecter le HA de TgIST (vert) et IRF1 (rouge). Les flèches blanches montrent les parasites non transfectés, et les flèches jaunes montrent les parasites transfectés, exprimant une copie de TgIST.

Les parasites correctement transfectés avec le vecteur contenant TgIST présentent un marquage vert par la détection de l'étiquette HA. Ces parasites sont donc capables de sécréter TgIST, qui se localise correctement dans le noyau de la cellule hôte. Alors que les cellules infectées par des parasites n'exprimant pas TgIST (non marqués) présentent un marquage pour IRF1, celles infectées par les parasites contenant TgIST ne présentent pas ce marquage. Il semble donc que TgIST exprimé dans les parasites *Neospora caninum* soit capable de bloquer la voie IFNγ.

5.3. Dissection fonctionnelle de TgIST

TgIST, une fois secrétée dans la cellule hôte, va se lier à STAT1 sous sa forme phosphorylée en tyrosine, puis au complexe multimérique NuRD une fois dans le noyau. TgIST est une protéine très largement désordonnée, et à ce titre, aucun domaine d'interaction n'a pu être prédit.

Afin d'essayer de cartographier les zones d'interactions de TgIST avec ses différents partenaires, nous avons élaboré différentes versions de TgIST, tronquées à leur extrémité C terminal. La séquence complète de TgIST est composée de 844 acides aminés. Les versions élaborées ont été tronquées aux positions 394, 596, et 755 (Figure 13). La première version, TgIST C 394, possède une séquence tronquée juste avant le segment codant pour le NLS. La partie C terminal de TgIST est composée de deux zones moins désordonnées que le reste de la séquence. Nous avons choisi de tronquer avant la première zone (TgIST C 576) ou avant la deuxième zone (TgIST C 755).

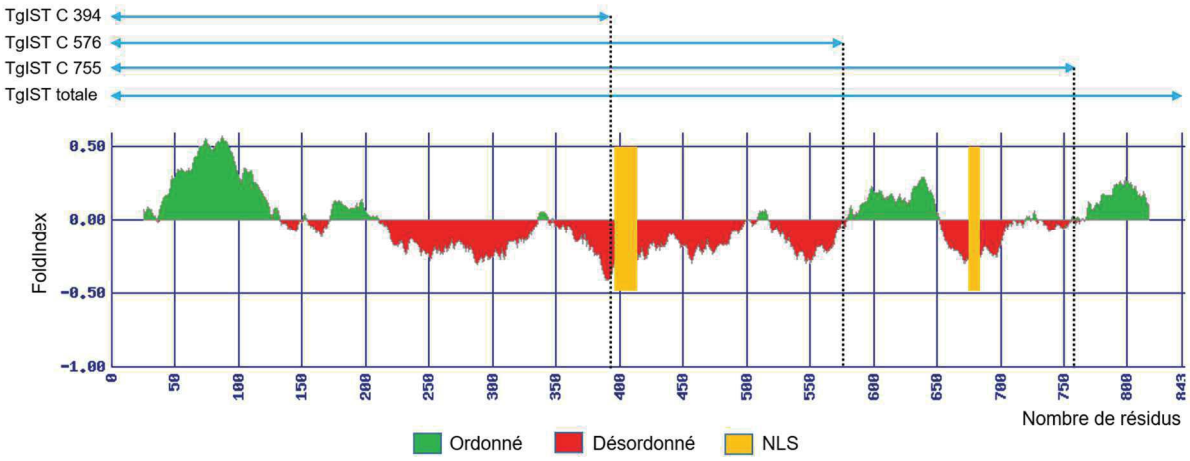


Figure 13 : Représentation schématique des différentes versions tronquées de TgIST
La séquence protéique de TgIST a été analysée grâce au serveur FoldIndex, permettant de prédire l'état intrinsèque d'une protéine. Les zones en vert correspondent à des fragments ordonnés, celles en rouge correspondent à des zones désordonnées, et les parties en orange représentent aux NLS prédits.

Après avoir généré les séquences par PCR grâce à des oligonucléotides adaptés, elles ont été insérées dans un vecteur par la technique du pLIC, dans le but de générer un marquage endogène.

5.4. Le NLS de TgIST semble jouer un rôle dans l'export au noyau

Les vecteurs contenant les séquences des différentes versions de TgIST possédant une étiquette HA-Flag à l'extrémité C terminal ont été transfectés dans la souche Pru*Δku80* parentale, de façon stable.

Avant d'évaluer la capacité de ces versions à bloquer l'induction d'*IRF1* en présence d'IFNγ, nous avons tout d'abord étudié la localisation des différentes versions de TgIST dans la cellule hôte par immunofluorescence (Figure 14). De façon attendue, les 2 versions les plus longues de TgIST (C596 et C755) sont correctement exportées dans le noyau de la cellule hôte infectée à 24 heures post-infection.

En revanche, la version la plus courte de TgIST n'est pas détectable dans le noyau de la cellule hôte. Ce résultat était attendu, puisque la version C 394 de TgIST est dépourvue de NLS.

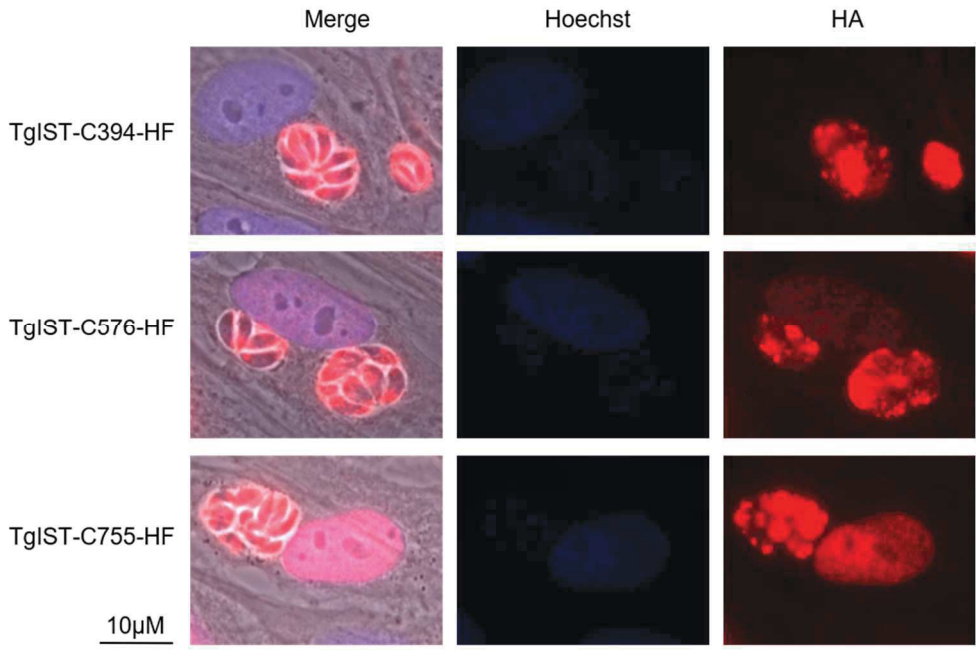


Figure 14 : Localisation des différentes versions de TgIST tronquées
Les vecteurs contenant les différentes formes de TgIST fusionnées à une étiquette HA-Flag en C terminal et sous le contrôle du promoteur endogène de TgIST ont été transfectés dans la souche Pru*Δku80*. Après insertion stable, des immunofluorescences ont été réalisées 24 heures après infection.

Par la suite, nous avons souhaité analyser la capacité de ces différentes formes de TgIST à réprimer *IRF1*.

5.5. La répression d'*IRF1* semble nécessiter la forme TgIST C755

Nous avons infecté des tapis de cellules HFFs pendant 18 heures, puis ceux-ci ont été traités 2 heures avec de l'IFNγ. Des immunofluorescences ont ensuite été réalisées afin de détecter IRF1 dans les noyaux des cellules hôtes (Figure 15). La fluorescence moyenne de IRF1 dans les noyau des cellules hôtes infectées a été mesurée pour chaque condition en présence d'IFNγ, et comparées à celle obtenue avec la souche Pru*Δku80* WT.

La forme C755 de TgIST permet une répression d'IRF1 semblable à celle observée avec souche Pru*Δku80* WT, contenant la version complète de TgIST. La forme C576, bien que présentant une localisation nucléaire (Figure 14), ne semble pas avoir d'activité répressive forte sur *IRF1*. Enfin, la forme C394,qui n'apparait pas dans le noyau des cellules hôtes (Figure 14), ne semble pas pouvoir bloquer l'induction d'*IRF1*. Ce dernier résultat était attendu, étant donné la non localisation de la forme C 394 dans le noyau.

Ces observations et ces mesures ont été effectuées exclusivement en utilisant des cellules infectées par 1 à 2 vacuoles contenant 1 à 2 parasites. En revanche, en utilisant les cellules infectées par un plus grand nombre de parasites, d'autres observations ont été faites (Figure 15, panel du bas). Dans ces cellules, il semble que *IRF1* soit réprimé par les formes C 576 et C 394. Ce résultat est étonnant, particulièrement dans le cas de la forme la plus courte, C 394, qui n'apparait pas dans le noyau de la cellule hôte (Figure 14). Une des hypothèses est que la protéine TgIST C 394 localise bien dans le noyau, mais en quantité trop faible et en dessous du seuil de détection de fluorescence, rendant impossible sa visualisation dans le noyau. Cependant, la forme C 394 de TgIST est tronquée avant son NLS (Figure 13), et sa localisation pourrait en réalité être cytoplasmique ; dans ce cas, la diffusion dans tout le cytoplasme de la cellule rendrait difficile la détection de la protéine. En admettant que la protéine TgIST C 394 est toujours capable de lier STAT1, le complexe pourrait potentiellement atteindre le noyau grâce au NLS de STAT1. La raison pour laquelle les formes C 576 et C 394 ne peuvent bloquer *IRF1* lors d'une infection de 1 à 3 parasites par cellule, mais le bloquent efficacement lors d'une infection avec un plus grand nombre de parasites, est inconnue. Il pourrait s'agir d'un problème de stabilité de la protéine sous ces formes, ou bien d'une sécrétion altérée dans la cellule. Afin de comprendre plus amplement ce phénomène, d'autres expérimentations sont nécessaire ; il serait notamment intéressant d'effectuer des recherches sur la stœchiométrie du complexe STAT1-TgIST, ainsi que d'observer l'activité de TgIST dépourvu de son NLS sur *IRF1*.

Dans cette expérience, le nombre de cellules multi-infectées était trop faible pour effectuer des mesures de fluorescence significatives. Ce résultat doit être analysé avec précaution, et d'autres expérimentations sont nécessaire pour conclure clairement sur ce point.

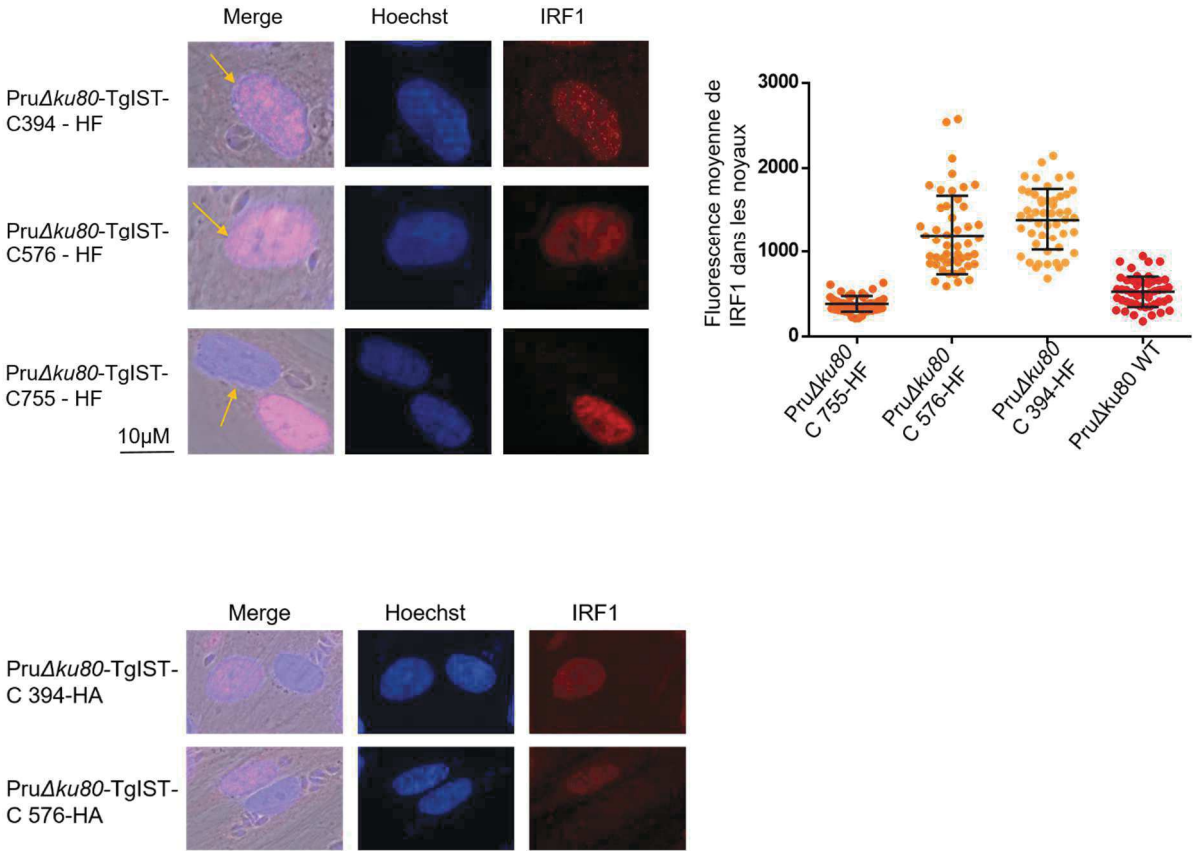


Figure 15 : La répression d'*IRF1* dans les cellules hôtes ne semble pas effective avec les formes tronquées TgIST C 394 et 576

Panel du haut : les cellules ont été infectées avec les différentes souches de parasites possédant une version tronquée de TgIST pendant 18 heures, et traitées avec de l'IFNγ pendant 2 heures. La fluorescence d'IRF1 dans les noyaux des cellules hôtes a été quantifiée dans au moins 50 noyaux pour chaque condition et comparée à celle dans les cellules infectées par la souche sauvage (Pru*Δku80* WT). Les barres horizontales représentent l'intensité moyenne de IRF1 dans les noyaux +/- la déviation standard. Les flèches oranges indiquent les noyaux des cellules infectées.

Panel du bas : immunofluorescence des cellules infectées par de multiples parasites

5.6. Mécanisme de répression dépendant de TgIST

L'activité répressive de TgIST s'opère par la séquestration de STAT1 à la chromatine, comme démontré dans la figure 7 du papier JEM. Brièvement, les cellules HFFs ont été infectées 24 heures avec des parasites parentaux Pru*Δku80* ou *ΔTgIST*, et stimulées ou non 6 heures avec de l'IFNγ. Les échantillons ont été analysés par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec des anticorps dirigés contre STAT1 Y701P, STAT1 S727P, et la marque d'histone H3K4me3, au *locus* d'*IRF1* notamment. Les 2 formes de STAT1 sont enrichies au promoteur d'*IRF1* dans le cas des parasite parentaux, même en l'absence d'IFNγ. Les parasites *ΔTgIST* présentent le même profil que les cellules non infectées, soit une absence de STAT1 phosphorylé en l'absence d'IFNγ, et un enrichissement en présence d'IFNγ.

Nous avions émis l'hypothèse que la répression via TgIST s'effectuait grâce au complexe NuRD, et potentiellement par l'activité enzymatique de HDAC 1 et 2 par remodelage de la chromatine.

Nous avons donc traité les cellules infectées avec les souches RH*Δku80* parentale ou *ΔTgIST* avec des composés inhibiteurs des enzymes HDAC de classe I et II, et nous avons regardé l'induction d'*IRF1* dans les différentes conditions par immunofluorescence (Figure 17).

Des différents composés inhibiteurs utilisés (FR235222, NaButyrate, ou le TSA pour trichostatin), aucun n'a permis d'inverser l'effet répresseur de TgIST sur l'expression d'*IRF1* suite à un traitement à l'IFNγ. Ce résultat est en accord avec de précédentes recherches sur le sujet (Rosowski et al., 2014), où des HFFs ont été prétraitées avec l'inhibiteur TSA, infectées avec des parasites, et stimulées avec de l'IFNγ. Aucune altération dans la capacité répressive du parasite sur l'induction d'*IRF1* n'a été constatée avec l'utilisation de TSA. De plus, les niveaux d'enrichissement de H3K9ac, H4panAc, et H3K27ac, trois marques majeures d'acétylation d'histones, ont été étudiés (JEM, Figure 7). Ces niveaux ne changent pas au cours de l'infection par l'une ou l'autre des souches utilisées. L'activité enzymatique déployée par HDAC1 et 2 n'est donc pas reliée au remodelage des nucléosomes aux alentours du promoteur d'*IRF1*.

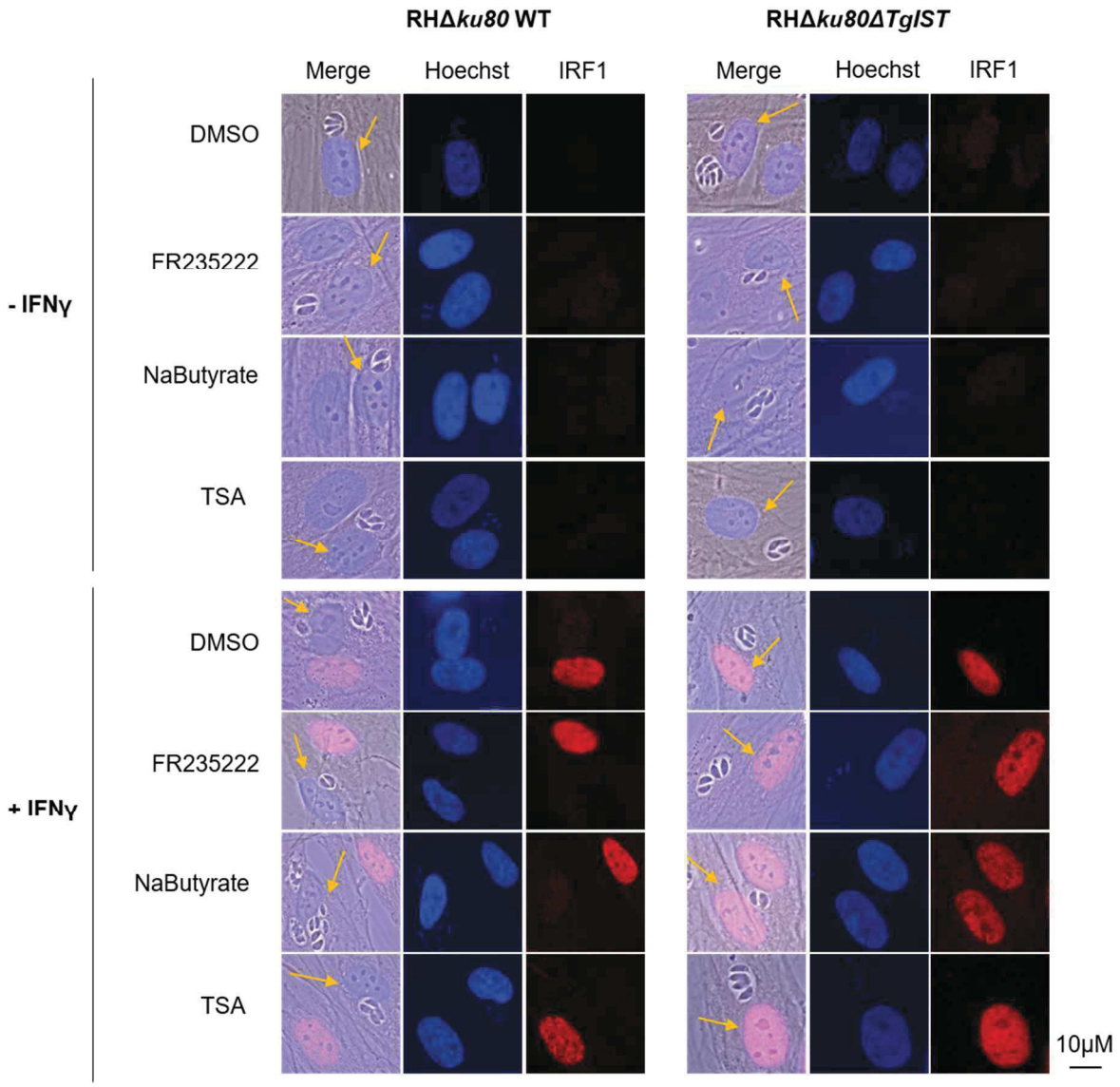


Figure 17 : Les HDACi n'ont pas d'influence sur la répression d'*IRF1* via TgIST
Les cellules HFFs ont été infectées 12 heures avec les souches RHΔ*ku80* parentale (WT) ou *ΔTgIST*, puis traitées avec les différents inhibiteurs de HDAC pendant 4 heures, et enfin traitées ou non à l'IFNγ pendant 6 heures. La fluorescence d'IRF1 a été étudiée dans les noyaux des cellules. Les flèches oranges indiquent les noyaux des cellules infectées.

5.7. Effet de TgIST dans le contexte génétique de la COUG

5.7.1. Introduction du travail sur la COUG

Contrairement aux souches type 1 et 2, utilisée couramment dans les laboratoires, la souche COUG est une souche qualifiée d'atypique, en raison de son origine non-clonale et de sa pathogénicité chez l'hôte immunocompétent.

Cette souche est encore peu étudiée, et la plupart des travaux qui la mentionnent consistent en une analyse globale de plusieurs souches (Fux et al., 2007; Melo et al., 2013).

Une de ces études a révélé la capacité unique de la souche COUG parmi toutes celles analysées à provoquer une induction d'IFNβ dans des macrophages murins (Melo et al., 2013). Or TgIST est capable de bloquer STAT1, qui est impliqué à la fois dans la voie IFNβ (via l'hétérodimère STAT1-STAT2), et dans la voie IFNγ (via l'homodimère STAT1-STAT1). Au niveau transcriptionnel, nous avons montré que la parasite bloque la transcription de gènes dépendent de l'IFNγ (JEM Figure 3). La souche COUG présentant un profil transcriptionnel atypique et unique, nous avons donc voulu étudier le rôle de TgIST dans cette souche.

Les séquences protéiques ont été comparées entre les souches de type 1 GT1, de type 2 Me49, et la COUG. Les séquences pour les souches GT1 et Me49 sont accessibles directement sur le site ToxoDB.org, sous l'identification TgIST ou TGGT1_240060, TGME49_240060. En revanche, la souche COUG, bien que séquencée, n'est pas entièrement annotée, et la séquence correspondant à TgIST n'est pas accessible par ce biais. Afin de l'identifier, nous avons utilisé l'outil BLAST du site ToxoDB, avec la séquence protéique de TgIST de la souche GT1, à la recherche d'un cadre ouvert de lecture. Une séquence nucléotidique correspondante a été identifiée, et la séquence protéique associée a été alignée avec celles des autres souches (Figure 18).

```
TGGT1          1  MRWCAPGETIEKQNQMEVGEPPQISGREAGVLAGAPLGARDGFRSSTSSCCHALRFRRSGPYVFSCLAVGLIAISCAPESLCFEASLPFLLAGLAGSEAIADGGHLAVYAGT
COUG           1  MRWCAPGETIEKQNQMEVGEPPQISGREAGVLAGAPLGARDGFRSSTSSCCHALRFRRSGPYVFSCLAVGLIAISCAPESLCFEASLPFLLAGLAGSEAIADGGHLAVYART
TGME49         1  MRWCAPGETIEKQNQMEVGEPPQISGREAGVLAGAPLGARDGFRSSTSSCCHALRFRRSGPYVFSCLAVGLIAISCAPESLCFEASLPFLLAGLAGSEAIADGGPLAVYART
consensus>50      MRWCAPGETIEKQNQMEVGEPPQISGREAGVLAGAPLGARDGFRSSTSSCCHALRFRRSGPYVFSCLAVGLIAISCAPESLCFEASLPFLLAGLAGSEAIADGGhLAVYArT

TGGT1        113  VTASARGGTHWSQREALVTAPMQARRLAAEGGSESEDEQGVARPGGTTATPSTPLPPRPSVLMELRSPSTPGGSEPASSAALQAGSLSAPQLIQSQRSPTGSSSPLLRTSMQ
COUG         113  VTASARGGTHWSQREALVTAPMQARRLAAEGGSESEDEQGVARPGGTTATPSTPLPPRPSVLMELRSPSTPGGSEPASSAALQAGSLSAPQLIQSQRSPTGSSSPLLRTSMQ
TGME49       113  VTASARGGTHWSQREALVTAPMQARRLAAEGGSESEDEQGVARPGETTATPSTPLPPRPSVLMELRSPSTPGGSEPASSAALQAGSLSPPQLIQSQRSPTGSSSPLLRTSMQ
consensus>50      VTASARGGTHWSQREALVTAPMQARRLAAEGGSESEDEQGVARPGgTTATPSTPLPPRPSVLMELRSPSTPGGSEPASSAALQAGSLSaPQLIQSQRSPTGSSSPLLRTSMQ

TGGT1        225  ESSEQPGSPSTKPGSPSGHANKSPPLPLQEQGRAVPSGDQPPPQPPPPHSPPRVATGREIRERVLRELELRRGSGGETSSRLRPPAKRPSEEARGFDRPGTTGTEGPRVRTA
COUG         225  ESSERPGSPSTKPGSPSGHANKSPPLPLQEQDRAVPSGDQPPPQPPPPHSPPRVATGREIRERVLRELELRRGSGGETSSRLRPPAKRPSEEARGFDTPGTTGTKGPRVRTA
TGME49       225  ESSERPGSPSTKPGSPSGHAKKSPPLPLQEQGRAVPSGEQPPPQPPPPHSPPRVATGREIRERVLRELELRRGSGGETSSRLRPPAKRPSEEARGFDRPGTTGTTGPQVRTA
consensus>50      ESSErPGSPSTKPGSPSGHAnKSPPLPLQEQgRAVPSG#QPPPQPPPPHSPPRVATGREIRERVLRELELRRGSGGETSSRLRPPAKRPSEEARGFDrPGTTGT.GPrVRTA

TGGT1        337  LDVFREMTQQTKRLKLTAESSSSATASPGIDRPGTTGTKGPQVRTALDVLRELTQQAKQLRLTAESSSTATASPAPETERRSSSPRPTPPPLPRPMSPIRTGKEIMEKVKRE
COUG         337  LDVFREMTQQTKRLKLTAESSSSATASPGIDRPETTGTKGPQVRTALDVLRELTEQAKQLRLTAESSSTATASPAPETERRPSSPRPTPPPLPRPMSPIRTGKEIMEKVKRE
TGME49       337  LDVLREVT..........................QAKQLKLTAESSSSATASPATETERRPSSPRPTPPPLPRPMSPIRTGKEIMEKVKKE
consensus>50      LDVfREmTqqtkrlkltaessssataspgidrp.ttgtkgpqvrtaldvlreltqQAKQLrLTAESSStATASPApETERRpSSPRPTPPPLPRPMSPIRTGKEIMEKVKrE

TGGT1        449  RALQRAQMERRHRTEGDATSSVQGQAPLIGPRPRPKSALQTFREVYAEMRARQAARQVLSRHTSTPASQMHSQPYTSSHPSKTSSPSRASAGSLRGSQLLQEGHGGKGASTA
COUG         449  RALQRAQMERRHRTEGDATSSVQGQAPLIGPRPRPKSALQTFREVYAAMRARQAARQVLSRHTSTPASQMHSQPYASSQPSKTSSPSRASAGSLRGSQLLQEGHGGKGASTA
TGME49       402  RALQRAQMERRHRTEGDATSSVQGQAPLIGPRPRPKSALQTFREVYAAMRSQQTARQVPSRHTSTPASQTHSQPYTSSHPSKTSSPSRASAGFLRGSQFLQEGHGGKGASTA
consensus>50      RALQRAQMERRHRTEGDATSSVQGQAPLIGPRPRPKSALQTFREVYAaMRarQaARQVlSRHTSTPASQmHSQPYtSShPSKTSSPSRASAGsLRGSQlLQEGHGGKGASTA

TGGT1        561  SLHSEPGAASMPGPSPKSEPPLLPTQRTEWPRERFPSSSDRGRRSPERGTRGPLGEPSHGIAKMLYAGAPTTVQSHPGSASLEVPAAFGKVEEGPRREPQPFAVMFPFATVA
COUG         561  SLHSEPGAASMPGPSPKSEPPLLPTQHTEWPRERLPSSSDRGRRSPERGTRGPLGEPSRDIAKMLYAGAPTTVQSHPGSASLEVPAAFGKVEEGPRREPQPFACMFPFATVA
TGME49       514  SLHSEPGAASMPGPSPKSEPPLLPTQHTEWPRERLPSSSDRGRRSPERGTRGPLGEPSRGIAKMLYAGAPTTVQSHPGSASLEVPAAFGKVEEGPRREPQPFACMFPFATVA
consensus>50      SLHSEPGAASMPGPSPKSEPPLLPTQhTEWPRERlPSSSDRGRRSPERGTRGPLGEPSrgIAKMLYAGAPTTVQSHPGSASLEVPAAFGKVEEGPRREPQPFAgMFPFATVA

TGGT1        673  HRAAIGGETPAGMSGPDGNVVRHIALQRVSLSLPPRSTGTAPETPMPRERRPRKQAKPTRYSASYEPHHPSSPAPTPTVSGPLISASTGHSPPQTSSSASPPFPSQSSWQPT
COUG         673  HTAAIGGATPAGMSGPDGNVVRHLALQRVSLSLPPRSTGTAPETPMPRERRPRKQPKPTRYSASYEPHHPSSPAPTPTVSGPLISASTGHSPPQTSSSASPPFPSRSSWQPT
TGME49       626  HTAAIGGETPAGMSGPDGNVVPHTALQRVSLSLPPRSTGTAPETPMPRERRPRKQAKPTRYSASYEPHHPSSPAPTPTVSGPLISASTGHSPPQTSSSASPPFPSRSSWQPT
consensus>50      HtAAIGGeTPAGMSGPDGNVVrHiALQRVSLSLPPRSTGTAPETPMPRERRPRKQaKPTRYSASYEPHHPSSPAPTPTVSGPLISASTGHSPPQTSSSASPPFPSrSSWQPT

TGGT1        785  GQPLTQRLTLPGQSVLRQMAPVPPAPRGGGPAFPPQEEPLNLCTHARNLPRLPPASVIAHQLGASAAVSAPGVSPSVGSAPSASPPVRLPSPPSLHRRPPSSERRV
COUG         785  GQPLTQRLTLPGQSVLRQMAPVPPAPRGGGPPFPPQEEPLNLCTHARNLPRLPPAPVIAHQLGASAAVSAPGVSPSVGSAPSASPPVRLPSPPSLHRRPPSSERRV
TGME49       738  GQPLPQRLTLPGQSVLRQMAPVPPAPRGGGPPFPPQEEPLNLCTHARNLPRLPPASVIAHQLGASAAVSAPGVSPSVGSAPSASPPVRLPSPPSLHRRPPSSERRV
consensus>50      GQPLtQRLTLPGQSVLRQMAPVPPAPRGGGPpFPPQEEPLNLCTHARNLPRLPPAsVIAHQLGASAAVSAPGVSPSVGSAPSASPPVRLPSPPSLHRRPPSSERRV
```

Figure 18 : comparaison des séquences protéiques de TgIST dans les souches GT1, Me49 et COUG
Les séquences protéiques de TgIST ont été alignées grâce au serveur Clustal Omega. Les différences de résidus entre les souches sont identifiés : les résidus communs aux 3 souches (rouge), à 2 souches (jaune), ou différents dans les 3 souches (blanc).

Les séquences de TgIST des souches GT1 et Me49 possèdent 96% d'identité, avec des SNP dispersés au long des séquences. La souche COUG contient un fragment supplémentaire en comparaison de la souche Me49, qui est également retrouvé au niveau de la souche GT1.

A part le fragment supplémentaire en COUG et en GT1, les différentes séquences de TgIST sont très proches. En conséquence, nous avons émis l'hypothèse que la version COUG de TgIST possède les mêmes capacités de répression de la voie IFNγ que celles de type 1 et 2.

5.7.2. Rôle de TgIST au niveau cellulaire

5.7.2.1. Répression de IRF1

Afin de confirmer le rôle de TgIST dans le contexte de la souche COUG, nous avons généré une souche *ΔTgIST* par la technique du CRISPR Cas9.

Les cellules HFFs ont ensuite été infectées 18 heures avec la souche COUG sauvage ou *ΔTgIST*, puis stimulée avec de l'IFNγ. L'induction d'*IRF1* a ensuite été évaluée par immunofluorescence. Alors que la souche sauvage est capable de réprimer IRF1, les cellules infectées avec la souche *ΔTgIST* présentent une induction d'*IRF1* (Figure 19). Ce résultat est similaire avec ce qui a été observé dans les souches RH*Δku80* (type 1), Pru*Δku80* et 76K (type 2). L'homologie entre les séquences de TgIST pour ces souches et celle de la COUG est assez forte, et il semble que le rôle de TgIST dans chacune de ces souches soit similaires. Néanmoins, d'autres recherches sont nécessaires pour confirmer cela, comme une comparaison de profils transcriptionnels entre des souches de différents types, possédant ou non TgIST.

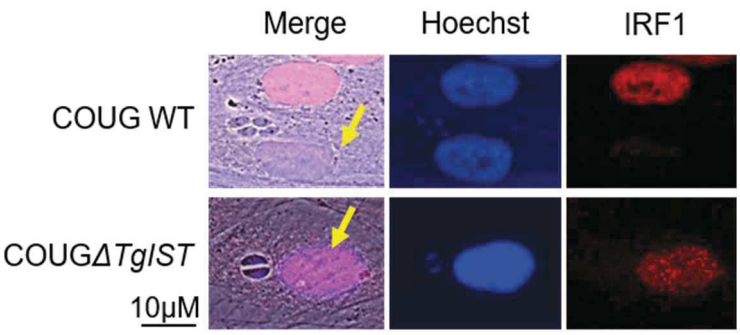


Figure 19 : TgIST réprime l'induction d'*IRF1* par l'IFNγ dans la souche COUG
Les cellules HFF ont été infectée 18 heures par les souches COUG sauvage (WT) ou *ΔTgIST* (COUG*ΔTgIST*), puis stimulées avec de l'IFNγ pendant 2 heures. Des immunofluorescences ont été réalisées pour détecter IRF1 (rouge). Les flèches jaunes indiquent les noyaux des cellules hôtes infectées. Les images montrées sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes.

5.7.2.2. Contrôle général de la réponse IFNγ par TgIST

Pour confirmer la répression globale de la réponse à l'IFNγ, nous avons regardé la régulation de l'expression de gènes induits par l'IFNγ (*Cxcl9*, *Cxcl10*, *Mx1* et *Gbp2*), lors de l'infection des cellules humaines ou murines par la souche COUG sauvage ou *ΔTgIST* (Figure 20). L'analyse des RTqPCR des niveaux d'ARNm de ces gènes a révélé globalement un profil similaire à celui obtenu précédemment avec la souche Pru*Δku80* sauvage et *ΔTgIST* (JEM Figure 4). Comme attendu, aucun des gènes cités ne s'exprime en absence d'IFNγ. En présence d'IFNγ, les cellules non infectées expriment tous les gènes testés, tandis que les cellules infectées par les parasites sauvages exprimant TgIST répriment globalement leur expression. Les parasites *ΔTgIST* ne sont plus capables d'exercer leur activité répressive, et les gènes sont transcrits en présence d'IFNγ. Pour le paragraphe suivant, les conditions étudiées sont celles en présence d'IFNγ.

L'étude de la transcription de ces différents gènes a été conduite sur 2 types cellulaires : des cellules fibroblastiques humaines (HFFs), et une lignée dérivée de macrophages murins (RAW). Il est intéressant de noter les différences entre ces deux conditions. En effet, les niveaux de répression diffèrent globalement entre ces 2 types cellulaires. Par exemple, concernant *Cxcl10*, la répression opérée via TgIST est assez faible, puisqu'il subsiste un fort niveau d'ARN dans le cas des HFF infectées avec la souche sauvage, et en présence d'IFNγ. Dans les cellules RAW, la répression de *Cxcl10* via TgIST est efficace, et le niveau d'ARN dans cette condition est très faible. Concernant *Cxcl9*, l'infection par les parasites *ΔTgIST* dans les HFF restaure un haut niveau d'ARN, légèrement plus important que dans les cellules non

infectées. En revanche, dans les cellules RAWs, le niveau de *Cxcl9* dans les cellules infectées par les parasites *ΔTgIST* n'est pas aussi élevé que dans les cellules non infectées, mais est environ 3 fois plus faible.

Ce dernier profil est déjà apparu dans le papier (JEM, Figure 4), sur des gènes différents (*Mx1*, *Ciita*). Ceci semble indiquer une implication d'un autre effecteur parasitaire dans la répression de certains gènes induits par l'IFNγ. Concernant *Mx1*, les mesures effectuées sur le génotype Pru*Δku80* (JEM, Figure 4) et sur la COUG (Figure 20) montrent aussi bien dans les HFFs que dans les RAWs, une répression forte par le parasite, partiellement dépendante de TgIST. *Mx1* est un gène induit à la fois par l'IFNγ et par l'IFNβ. Etant donné la capacité de la souche COUG à induire la production d'IFNβ par la cellule hôte (Melo et al., 2013), il est possible que les niveaux de *Mx1* dépendent partiellement de cette capacité unique. D'autres expérimentations sont nécessaires pour permettre une analyse plus précise du profil d'expression induit par la souche COUG. Des échantillons pourraient être générés avec les souches sauvage et *ΔTgIST*, dans divers types cellulaires, et analysés grâce aux techniques de micropuce ou de séquençage d'ARN. Cette analyse nous permettrait de visualiser efficacement le profil transcriptionnel des cellules hôtes infectées, et de déterminer la contribution de TgIST dans ce profil.

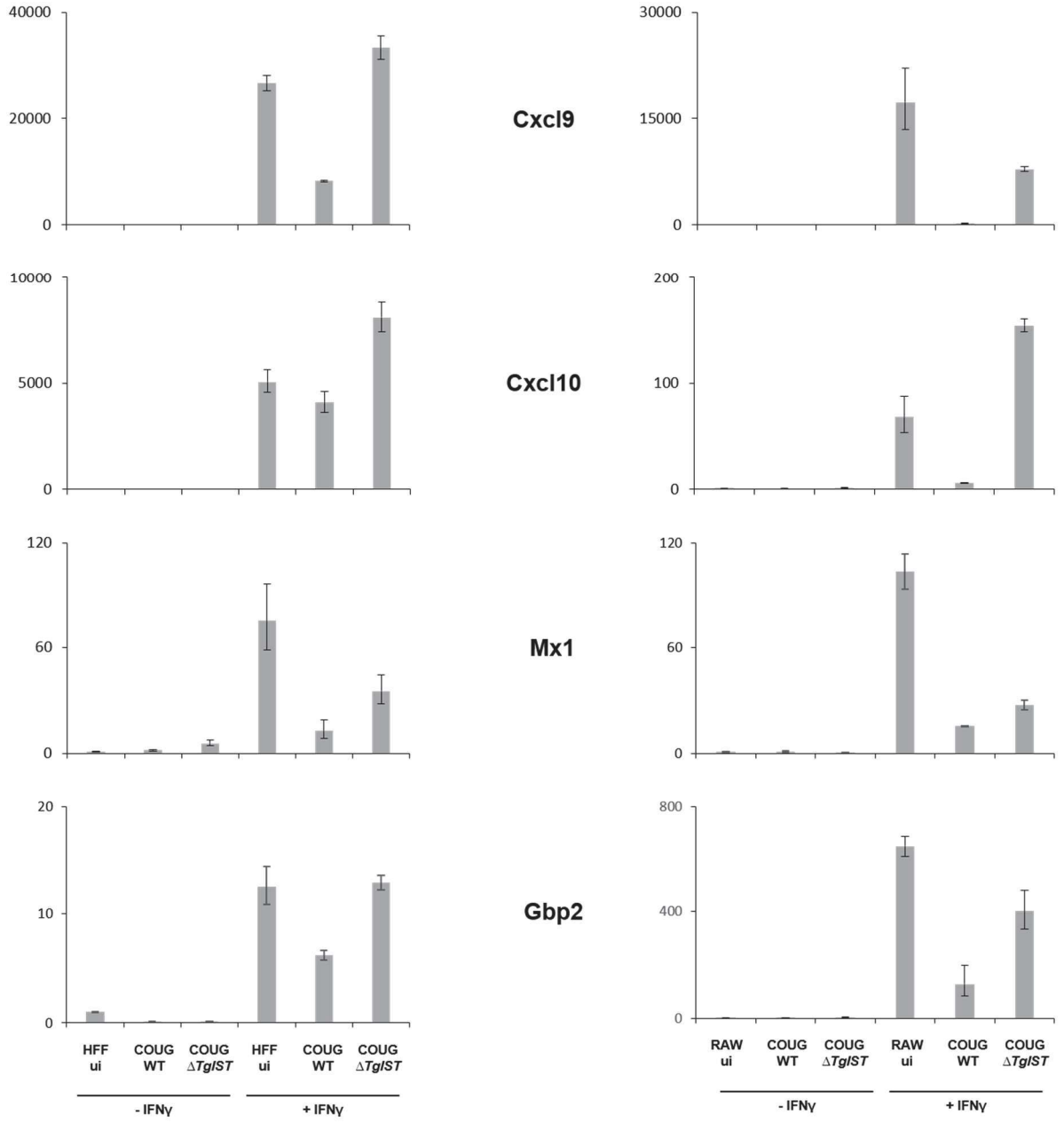


Figure 20 : TgIST réprime globalement la réponse à l'IFNγ dans la souche COUG
Des cellules humaines (HFFs) et murines (RAWs) ont été infectées 24 heures avec la souche COUG sauvage (WT) ou *ΔTgIST* (*ΔTgIST*), ou laissées non infectées (ui), et stimulées pendant 6 heures à l'IFNγ, ou laissées non stimulées. Les niveaux d'ARN messager de *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Mx1* et *Gbp2* ont été déterminés par RTqPCR. La β2-microglobuline a été utilisée pour la normalisation. Les données sont exprimées en niveaux de différence par rapport aux cellules non infectées et non stimulées. La moyenne de 2 expérimentations est montrée, les barres d'erreurs représentent la déviation standard. Cette expérience est représentative de 3 expériences indépendantes.

5.7.2.3. Les IRGs

Après avoir vérifié la capacité répressive de TgIST, nous avons regardé le recrutement des IRG aux membranes parasitophores des parasites, et si TgIST avait une implication dans ce processus. Nous avons tout d'abord regardé le marquage des vacuoles parasitophores dans des fibroblastes murins pré-stimulés avec de l'IFNγ, par immunofluorescence de la protéine Irgb6 (Figure 21). Environ 30% des vacuoles parasitophores sont marquées par Irgb6, indépendamment de la présence ou l'absence de TgIST, ce qui correspond au phénotype observé avec l'utilisation des parasites de type 2, 76K (JEM, Figure 8). Ce phénotype correspond à une absence de la version virulente de ROP5 dans la souche COUG, ce qui semble être confirmé dans une autre étude (Niedelman et al., 2012).

De façon surprenante, quand nous avons infecté les fibroblastes murins avec les deux souches, puis ajouté l'IFNγ, nous avons constaté un faible marquage des vacuoles, d'environ 9%, similaire pour les deux souches (Figure 21).

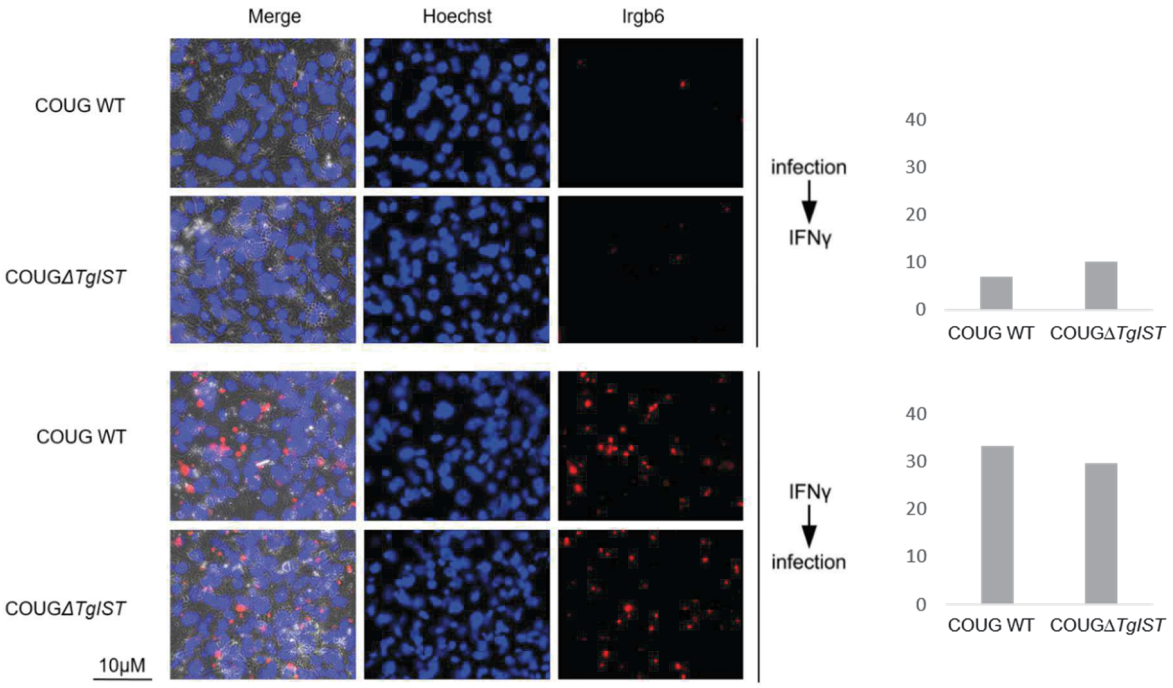


Figure 21 : Rôle de TgIST dans le recrutement des IRGs aux membranes parasitophores des parasites COUG
Dans le panel du haut, des fibroblastes murins ont été infectés 4 heures, puis stimulés avec de l'IFNγ 12 heures. Dans le panel du bas, des fibroblastes murins ont été stimulés 18 heures avec de l'IFNγ suivi d'une infection de 4 heures par les parasites COUG sauvage (WT) ou *ΔTgIST*. Les vacuoles positives au marquage Irgb6 ont été comptées et rapportées au nombre de vacuoles totales par champs. Au moins 150 vacuoles ont été analysées sur une quinzaine de champs aléatoirement pour chaque conditions. Le résultat est exprimé en terme de pourcentage de vacuoles marquées. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

5.7.3. Effet physiologique

En souris, la virulence d'une souche est déterminée par sa capacité à éviter l'élimination du parasite par le système des IRGs, inductibles à l'IFNγ. Compte tenu du résultat obtenu avec les expérimentations sur les IRGs, nous avons souhaité regarder au niveau physiologique l'implication de TgIST dans la virulence de la souche COUG. Nous avons injecté à des souris BALB/C au niveau de la cavité péritonéale une solution contenant des parasites COUG sauvages (WT) ou des COUG*ΔTgIST*. Cependant, nous n'avons pas pu déduire de conclusions sur cette expérimentation, puisqu'à la dose injectée (10^3 parasites par souris), certaines souris infectées avec la souche COUG sauvage ont survécu à l'infection, contrairement à ce qui était attendu. Cela suggère une atténuation de la virulence de la souche COUG possiblement due aux passages successifs en culture cellulaire. Un tel phénomène a déjà été observé avec d'autres souches cultivées dans le laboratoire.

En parallèle, nous avons élaboré la souche COUG *Δmyr1*, de façon à déterminer globalement si la virulence de la souche COUG pourrait être due à une protéine des granules denses secrétée dans l'hôte. Nous avons tout d'abord vérifié que les effecteurs sécrétés des granules denses étaient bloqués dans l'espace vacuolaire dans le cas de la souche COUG *Δmyr1* en utilisant TgIST comme contrôle. En effet, un vecteur contenant la séquence de TgIST sous le contrôle de son promoteur endogène, et fusionnée à une étiquette HA, a été transfecté dans les souches COUG sauvage ou *Δmyr1*, et la sécrétion dans le noyau a été évaluée par immunofluorescence (Figure 22).

Comme observé dans le cas de la souche de type 1 RH*Δku80*, TgIST n'est plus exporté dans la souche COUG *Δmyr1*. En conséquence, il semble que MYR1 soit indispensable à l'export de TgIST dans le contexte de la COUG.

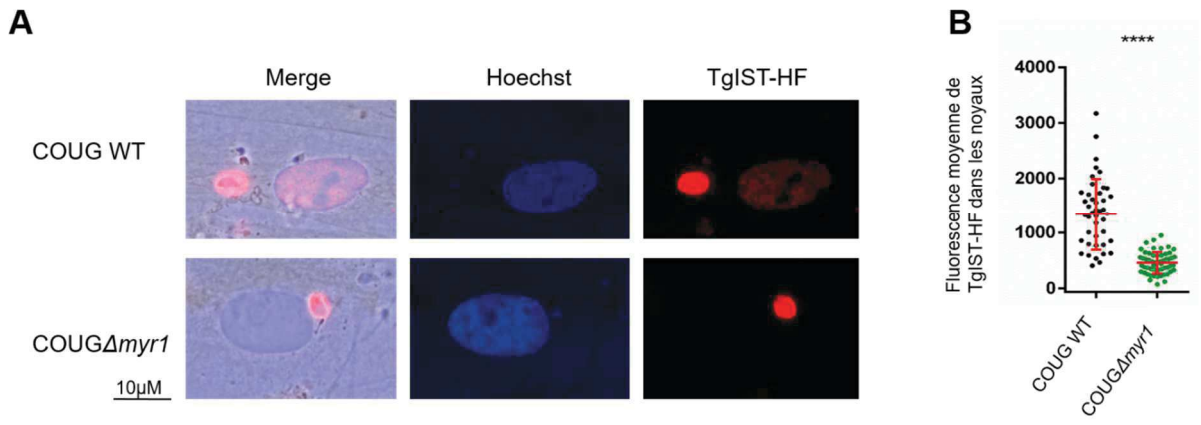


Figure 22 : MYR1 est indispensable à l'export de TgIST dans la souche COUG
Un vecteur contenant la séquence de TgIST fusionnée à une étiquette HA a été transfecté de façon transitoire dans des parasites COUG sauvage (WT) ou *Δmyr1* (COUG*Δmyr1*). (A) Des HFF ont été infectées pendant 24 heures, et des immunofluorescences ont été réalisées pour détecter le HA de TgIST (rouge). (B) La fluorescence dans le noyau des cellules hôtes a été quantifié sur au moins 50 vacuoles pour chaque souche parasitaire. Les barres horizontales représentent l'intensité nucléaire moyenne de TgIST plus ou moins la déviation standard.

Afin d'évaluer l'importance de la sécrétion des protéines de granules denses exportées dans la cellule hôte dans la virulence de la COUG, nous avons injecté à des souris BALB/C de façon intrapéritonéale des parasites COUG sauvages ou des parasites COUG *Δmyr1*. Aux vues des résultats obtenus pour l'expérience de test de virulence pour TgIST, nous avons décidé d'augmenter la dose de parasite injectés, les portant à 10^4 par souris, afin de provoquer une toxoplasmose aiguë fatale. Après 8 jours d'infection, toutes les souris sans distinctions ont dû être euthanasiées car elles présentaient toutes les symptômes d'une toxoplasmose aiguë, avec une grande perte de mobilité chez tous les individus, indépendamment de la souche injectée. Donc concernant la virulence de la souche en souris, les effecteurs sécrétés de granules denses ne semblent pas jouer de rôle.

La disponibilité d'une souche COUG *Δmyr1* nous a poussé à déterminer le rôle de cette protéine dans la transcription des IRGs. Des fibroblastes murins (MEFs) ont été infectés avec la souche COUG sauvage (WT) ou *ΔTgIST* ou *Δmyr1* pendant 18 heures, ou laissés non infectés (UI), puis stimulés ou non avec de l'IFNγ pendant 2 heures (Figure 24). Les niveaux d'ARNm ont été mesurés par RTqPCR.

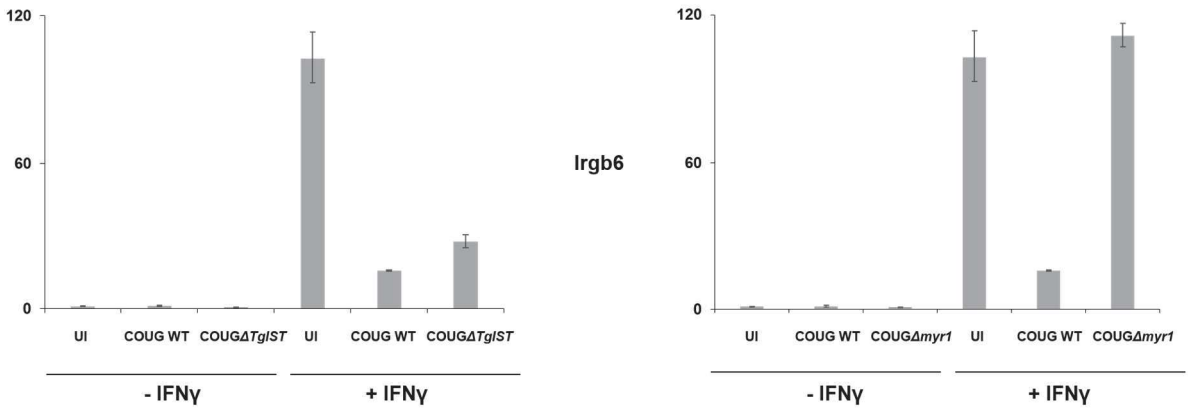


Figure 24 : Le contrôle transcriptionnel des IRGs est indépendant de TgIST, mais dépendent de MYR1
Des fibroblastes murins (MEF) ont été infectées 18 heures avec la souche COUG sauvage (WT) ou *ΔTgIST* ou *Δmyr1*, ou laissées non infectées (UI), et stimulées pendant 2 heures à l'IFNγ, ou laissées non stimulées. Les niveaux d'ARN messager de Irgb6 a été déterminés par RTqPCR. La β2-microglobuline a été utilisée pour la normalisation. Les données sont exprimées en niveaux de différence par rapport aux cellules non infectées et non stimulées. La moyenne de 2 expérimentations est montrée, les barres d'erreurs représentent la déviation standard. Ce résultat est représentatif de 2 expériences.

Sous traitement à l'IFNγ, les cellules infectées par les parasites sauvages présentent une répression d'*Irgb6* en comparaison avec les cellules non infectées. De façon surprenante, les parasites *ΔTgIST* ne permettent pas une restauration des niveaux d'ARNm pour Irgb6. Ce résultat suggère que TgIST ne semble pas impliqué dans le contrôle transcriptionnel des IRGs, et diffère des observations sur la souche 76K *ΔTgIST*. En revanche, les parasite *Δmyr1* induisent des niveaux d'*Irgb6* comparables à ceux des cellules non infectées (Figure 24). Ce résultat est surprenant ; en effet, il suggère que les parasites pourraient nécessiter la participation d'un effecteur dépendant de MYR1, indépendamment de TgIST. Cette observation doit encore être confirmée par la répétition des expériences décrites, ainsi que par la réalisation d'autres expérimentations. Il serait intéressant d'effectuer d'autres recherches et de comparer les profils transcriptionnels de cellules infectées par les parasites COUG sauvages, *ΔTgIST*, mais aussi ceux *Δmyr1*.

DISCUSSION

1. Le contrôle de l'IFNγ, une étape nécessaire à l'interaction équilibrée entre l'hôte et le pathogène

L'IFNγ est une cytokine centrale dans la lutte contre les infections, et permet entre autres l'activation des macrophages, et la polarisation T_H1. L'IFNγ est produite en premier lieu par les cellules NK durant l'immunité innée, puis par les lymphocytes T activés durant la phase de l'immunité adaptative. Cette cytokine est également produite par les cellules lymphoïdes immunes, un groupe de cellules non-cytotoxiques découvertes il y a peu (Spits et al., 2013).

Au sein de l'immunité, l'IFNγ occupe une place primordiale dans le contrôle des infections, et particulièrement dans le cas de *Toxoplasma gondii*. Afin de survivre, les pathogènes doivent élaborer des stratégies pour contrecarrer les défenses de l'hôte. Dans le cas de la résistance à l'IFNγ, de nombreux pathogènes ciblent spécifiquement STAT1, de diverses manières. L'agent de la leishmaniose, *Leishmania donovani* bloque la transmission du signal IFNγ en inhibant l'étape de phosphorylation de STAT1 (Nandan and Reiner, 2005; Ray et al., 2000). De plus, ce parasite promeut l'adressage de STAT1 au protéasome, induisant ainsi sa dégradation (Forget et al., 2005). Une autre espèce du genre, *Leishmania mexicana*, déploie un mécanisme supplémentaire pour ce blocage. En effet, cette espèce promeut la phosphorylation de la forme inactive STAT1β, ce qui permet une diminution du signal (Bhardwaj et al., 2005).

Un grand nombre de virus ciblent également la protéine STAT1. Certains, comme le virus Parainfluenza type 5 (HPIV5), séquestrent STAT1 (Nishio et al., 2001) en l'englobant dans un complexe viral de haut poids moléculaire, et entrainant l'inhibition de son activation et de sa translocation nucléaire (Hagmaier et al., 2006; Rodriguez et al., 2002). D'autres séquestrent une version inactive de STAT1 dans le noyau et empêche son recyclage, comme le virus Nipah (Ciancanelli et al., 2009). Un exemple du monde bactérien provient de l'agent de la brucellose, *Brucella melitensis*. Cette bactérie empêche indirectement l'association entre STAT1 et CBP/p300, et inhibe ainsi la transcription efficace des gènes inductibles à l'IFNγ (Bouhet et al., 2009). Ces différents exemples illustrent la stratégie commune de bloquer la voie IFNγ, bien que les micro-organismes emploient différents moyens. Concernant *Toxoplasma gondii*, la stratégie du parasite est unique et originale. Le parasite envahit la cellule hôte, puis exporte une protéine, TgIST, qui va se lier directement à la forme active de STAT1, phosphorylé en tyrosine, et au complexe répresseur chromatinien NuRD. Jusqu'alors, ces deux éléments n'avaient jamais été retrouvés associés dans la cellule. L'association de ceux-ci via TgIST

permet une répression efficace des gènes induits par l'IFNγ. Dans certains cas particuliers, il a été démontré qu'un autre mécanisme est employé par le parasite pour bloquer la voie IFNγ. Dans les conditions normales, la signalisation STAT1 est bloquée par SOCS1 en réponse à une boucle de régulation négative, afin de terminer la signalisation et d'éviter un emballement du système. En effet, SOCS1 se lie aux tyrosine kinases JAK associées au récepteur de l'IFNγ, et de ce fait inhibe la réactivation de STAT1. Il a été démontré que *Toxoplasma gondii* induit à la fois la diminution de l'expression de *SOCS1* en cellules humaines HFFs (Kim et al., 2007), et son augmentation en macrophages murins (Jensen et al., 2013; Zimmermann et al., 2006). Dans les 2 cas, le blocage précoce de la voie IFNγ va permettre aux parasites de se répliquer, et à l'infection de s'étendre.

Le cycle naturel du parasite implique l'ingestion de kystes contenant des bradyzoïtes, ou d'oocystes contenant des sporozoïtes (Figure 1). Une fois dans le système digestif, les parasites sont libérés et peuvent envahir les cellules épithéliales proximales, où ils se différencient en tachyzoïtes. Ceux-ci atteignent rapidement la lamina propria, et envahissent alors les tissus plus profonds. Les cellules infectées produisent la protéine MCP1, qui va permettre le recrutement des leucocytes, par reconnaissance de cette protéine par le récepteur membranaire CCR2 (Geissmann et al., 2010; Robben et al., 2005). Le recrutement de phagocytes, comme les monocytes pro-inflammatoires permet de contrôler l'infection et de protéger l'hôte. L'activation et le recrutement de cellules compétentes dont les lymphocytes T permet un bon contrôle des parasites et une résolution de l'infection (Wilson et al., 2010). Les lymphocytes naïfs résident dans les ganglions lymphatiques, où ils attendent leur activation par les cellules présentatrices d'antigène professionnelles, les cellules dendritiques (DC). Celles-ci participent à la surveillance immunitaire dans les tissus ; lors d'une infection, les DC sont activées, soit par leur infection directe, soit par l'internalisation d'antigènes à présenter. Une fois activées, les DC migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques, où elles présentent les antigènes aux lymphocytes. Ceci permet l'activation et le développement de lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques, qui vont alors migrer au site d'infection pour permettre de contrôler l'infection et d'éliminer les pathogènes. L'IFNγ est produit en grandes quantités, ce qui permet une activation optimale des cellules effectrices. Cependant, afin d'assurer la survie de l'hôte, il est nécessaire de réguler le système et de bloquer la réponse T_H1, afin d'éviter des dégâts tissulaires dus à une activation prolongée, et la mort de l'individu (McLeod et al., 1989). Ainsi, des cytokines de type T_H2, comme l'IL4, ou l'IL10 sont produites, et permettent de contrecarrer les effets de l'IFNγ, et sont nécessaires à la survie des individus infectés par *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli et al., 1996).

L'infection par les parasites de type 1 résulte en une mortalité due à une réplication non contrôlée des parasites, puisque ceux-ci inhibent la réponse T_H1, notamment grâce à l'action

de ROP16 (Saeij et al., 2007). En effet, ROP16 stimule la réponse T_H2, en particulier en induisant l'expression de l'arginase 1 via l'activation de STAT6. L'arginase 1 utilise comme substrat la L-ornithine, le même substrat que pour l'enzyme iNOS. En limitant la disponibilité du substrat de iNOS, le parasite permet de limiter la production d'espèces réactives de l'oxygène (El Kasmi et al., 2008; Modolell et al., 1995; Rutschman et al., 2001; Yamamoto et al., 2009). En revanche, dans le cas d'une infection par les parasites de type 2, la mortalité est due à un emballement du système immunitaire. En effet, la capacité de ces parasites à stimuler le système immunitaire et la réponse T_H1 est très importante, et les parasites sont éradiqués du site d'infection. Malgré cela, et à cause de l'activation très précoce de l'axe IL12-IFNγ, les souris développent une immunopathologie au site d'infection, conduisant à des nécroses intestinales et à la mort de l'individu. Les parasites de type 3 sont capables d'induire une réponse T_H1 modérée mais suffisante pour permettre le recrutement des cellules effectrices et le contrôle de l'infection (Melo et al., 2011). La présence de cellules à capacité migratoire permet également au parasite de les utiliser comme « cheval de Troie » (Feustel et al., 2012). En effet, le parasite stimule leur motilité, ce qui permet une dissémination dans l'organisme, loin du site d'infection, et en particulier au niveau cérébral. Là, grâce à la capacité de diapédèse des cellules, les parasites franchissent aisément la barrière hémato-encéphalique, ce qui leur permet d'envahir diverses cellules, dont les cellules neuronales, les cellules gliales, et les astrocytes (Schlüter et al., 2001). En particulier, les monocytes pro-inflammatoires et les DC sont essentiels pour la dissémination, puisque leur inactivation par anticorps diminue fortement la quantité de parasites dans les cerveaux des souris infectées (Courret et al., 2006). En parallèle, il a récemment été démontré que les parasites étaient capables de passer la barrière de façon active, par invasion et migration trans-endothéliale (Furtado et al., 2012). Une fois dans cet environnement, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes, qui sont contenus dans des kystes tissulaires, quasi-invisibles pour le système immunitaire. En conséquence, alors que les tachyzoïtes sont éradiqués de l'organisme, les bradyzoïtes restent cachés dans les tissus, ce qui constitue la phase chronique de l'infection.

Dans notre étude, nous avons choisi d'inoculer les parasites aux souris par injection péritonéale. Ce mode d'infection nous a permis d'étudier en BALB/C une infection aigüe (JEM, Figure 9), ainsi que la dissémination des parasites sauvages ou *ΔTgIST*. En conséquence, la potentielle influence de TgIST sur l'initiation de l'infection au niveau de l'épithélium intestinal n'a pas été étudié. Cependant, aux vues du rôle global de TgIST dans la voie IFNγ, nous pouvons émettre quelques hypothèses. Dans l'épithélium intestinal, la présence de micro-organismes de la flore commensale participe à la modulation de la réponse immunitaire. Dans le cas d'une infection par voie orale de *Toxoplasma gondii*, le parasite traverse l'épithélium

intestinal afin de pouvoir atteindre les tissus plus profonds, et crée donc une brèche pour ces micro-organismes. Il a notamment été montré que l'IFNγ augmente la susceptibilité des souris à l'effet toxique du LPS (Kohler et al., 1993). En effet, les souris déficientes pour le récepteur de l'IFNγ ou STAT1 présentent une résistance accrue au LPS (Car et al., 1994; Karaghiosoff et al., 2003). Compte tenu de la capacité de TgIST à bloquer la voie de l'IFNγ, celle-ci pourrait avoir un rôle dans la résistance de l'hôte, en inhibant la voie IFNγ. Ainsi, au niveau du site d'infection, TgIST pourrait avoir un rôle protecteur envers l'hôte en empêchant la réaction des cellules au LPS, et donc en contrecarrant son effet toxique. Ainsi, tôt dans le processus d'infection, le parasite pourrait optimiser son entrée dans l'organisme en causant de moindres dégâts, et en se protégeant lui-même des mécanismes effecteurs via l'IFNγ de la cellule.

Au niveau de la cavité péritonéale, des macrophages dits « résidents » sont présents à l'état physiologique. Ces cellules proviennent de la moelle osseuse, et ne portent pas le marqueur GR1+. Une fois dans la circulation sanguine, ces cellules adhèrent et migrent dans les tissus à partir de la face luminale des vaisseaux sanguins (Auffray et al., 2007). Au contraire, les monocytes pro-inflammatoires portent le marqueur GR1+, et sont recrutés au site d'infection par chimiotactisme (Geissmann et al., 2010). De nombreux types cellulaires produisent la protéine de chimioattraction MCP1 en réponse à l'infection par *Toxoplasma gondii* (Dunay et al., 2008; Robben et al., 2005). MCP1 est l'un des ligands du récepteur CCR2, exprimé entre autres par les monocytes pro-inflammatoires, et ces deux composants sont cruciaux pour le contrôle de la toxoplasmose aiguë. En effet, des souris *CCR2* $^{-/-}$ ou *MCP1* $^{-/-}$ succombent très rapidement à l'infection ; l'absence des monocytes pro-inflammatoires résulte en une prolifération non contrôlée des parasites. Les diverses catégories de monocytes sont pléomorphiques, et sont ainsi capables de moduler leurs marqueurs de surface et leur caractéristiques phénotypiques selon les conditions locales (Geissmann et al., 2010). Cependant, il a été démontré que la présence des cellules GR1+ est due à leur recrutement à partir de la périphérie, plutôt qu'à une différenciation des monocytes résidents (Dunay et al., 2008; Robben et al., 2005).

Les monocytes pro-inflammatoires ont un rôle prédominant dans la lutte contre l'infection par *Toxoplasma gondii*. Nous avons montré que ces cellules sont recrutées au site d'infection dès 4 jours après infection (JEM Figure 10 C), en accord avec de précédentes recherches (Mordue and Sibley, 2003). La quantité de monocytes pro-inflammatoires est similaire dans le cas de l'infection par les parasites sauvages ou *ΔTgIST* (JEM Figure 10 C). En revanche, plus tard dans l'infection, à 7 jours, les souris infectées par les parasites *ΔTgIST* arborent un recrutement plus élevé des monocytes pro-inflammatoires, en comparaison avec les souris

infectées avec les parasites sauvages. Cette observation est concomitante d'un meilleur contrôle des parasites déficients pour TgIST constaté dans les souris infectées (JEM Figure 9 A). De la même façon, 7 jours après l'infection, les niveaux de la plupart des cytokines testées (JEM Figure 9 C) sont plus faibles dans les souris infectées par les parasites *ΔTgIST.*

Dans ces expériences, le rôle de TgIST est remis en question. En effet, la protéine parasitaire pourrait avoir un effet direct ou indirect sur les niveaux de cytokines ainsi que sur le recrutement des monocytes pro-inflammatoires. Au 7ème jour après infection, les parasites *ΔTgIST* sont présents en plus faible nombre dans la cavité péritonéale, en comparaison des parasites sauvages (JEM Figure 9 A et C), ce qui reflète vraisemblablement la susceptibilité ou la résistance aux IRGs, respectivement. Cette différence en charge parasitaire pourrait avoir un impact sur le développement des défenses de l'hôte. En particulier, concernant les monocytes pro-inflammatoires, des études suggèrent un lien entre la charge parasitaire et le type de cellules recrutées au site d'infection. Ces cellules sont recrutées dans le cas d'une infection par une souche de type 1 ou de type 2, en plus grande proportion dans le dernier cas (Mordue and Sibley, 2003). Les souches de type 1 induisent quant à elles un recrutement plus conséquent des neutrophiles, et cette capacité semble liée à la sensibilité des neutrophiles à la charge antigénique, et donc aux nombre de parasites (Bliss et al., 2000).

Dans notre étude, la quantité de monocytes pro-inflammatoires recrutés est plus importante dans le cas d'une infection par les parasites *ΔTgIST*, et au contraire dans le cas de l'infection par les parasites sauvages, les neutrophiles sont présents en plus grande proportion (JEM, Figure 10 B). Ces observations semblent donc reliées à la charge parasitaire plutôt qu'à une action directe de TgIST. Dans l'ensemble, TgIST façonne le devenir de l'infection, en affectant à la fois la réponse cellulaire, mais également le recrutement des cellules effectrices sur le site d'infection.

Le recrutement des cellules immunitaires au site d'infection est important non seulement pour le contrôle de la charge parasitaire et la protection de l'hôte, mais également pour permettre aux parasites de disséminer dans l'organisme. En effet, les DC assurent la surveillance immunitaire des tissus, et permettent aussi le transport des virus, des bactéries ou des levures des épithéliums jusqu'aux nœuds lymphatiques (Bozza et al., 2002; Hopkins et al., 2000; Pron et al., 2001). De plus, il a été démontré que les monocytes pro-inflammatoires CD11b+ Ly6C+ (GR1+) jouent un rôle durant le processus inflammatoire dans les cerveaux infectés par les bactéries du genre *Listeria* (Drevets et al., 2004). Dans le cas de *Toxoplasma gondii*, il a été observé que les organes lymphoïdes secondaires des souris sont largement infectés après inoculation de kystes par voie orale, indiquant une dissémination durant l'infection (Sumyuen et al., 1995). Les cellules CD11b+ (type monocytes) et CD11c+ (type DCs) sont colonisées

par un parasite unique, et disséminent jusqu'au cerveau. Ce mode d'action est responsable de la charge parasitaire à ce niveau, puisqu'une administration d'anticorps dirigés contre le marqueur CD11b, qui bloque l'activité des monocytes (Rosen and Gordon, 1987), réduit fortement la quantité de parasites dans le cerveau de souris infectées (Courret et al., 2006). Dans le cadre de notre étude, nous avons pu montrer que si la quantité de monocytes pro-inflammatoires recrutés dans la cavité péritonéale est plus importante en absence de TgIST, cet effecteur n'inhibe pas totalement leur recrutement. Ceci concorde avec leur rôle dans la dissémination ; en effet, l'étape ultime de l'infection est l'établissement de la chronicité via la présence de kystes dans le cerveau. Pour que cette étape puisse être réalisée, il est nécessaire d'assurer la dissémination du parasite à des sites distants du site d'infection. Cet exemple illustre parfaitement le degré de modulation de l'hôte par le parasite, qui cherche à maintenir un équilibre profitable entre son hôte et lui-même.

Nous avons choisi d'étudier la souche COUG, une souche atypique d'Amérique du Nord. Il s'agit de la souche responsable de la plus grande épidémie de toxoplasmose humaine détectée (Aramini et al., 1998). L'infection par cette souche a provoqué des symptômes d'importance variable sur des individus immunocompétents de tous âges. Nos expérimentations montrent que dans le contexte de la COUG, TgIST permet également de bloquer l'induction d'*IRF1* dans les cellules stimulées à l'IFNγ (Figure 19). La présence de TgIST et la constance de son effet d'une souche à l'autre nous suggère que cet effecteur est très important dans l'évolution du parasite. Ceci est cohérent avec l'effet de TgIST ; en effet, la capacité à bloquer la voie IFNγ, primordiale pour le contrôle parasitaire, est nécessaire pour la survie de *Toxoplasma gondii*. L'étude de la souche COUG est également très intéressante dans le cadre de cellules humaines. En effet, cette souche présente la particularité d'être phylogénétiquement proche des souches de type 2 (Figure 3), tout en présentant une grande virulence. L'étude de l'expression de quelques gènes de l'immunité, exprimés en réponse à l'IFNγ, a montré que globalement, TgIST permet la répression de l'expression de ces gènes (Figure 20). Cependant, les niveaux de répression varient d'un gène à l'autre ; ainsi, alors que *CXCL9* est bien réprimé, TgIST semble avoir un impact mineur sur l'expression de *CXCL10* en HFFs. Afin de visualiser plus globalement l'implication de TgIST dans le contexte de la COUG, il serait intéressant d'effectuer une analyse en microarray de la même façon que décrit précédemment (JEM Figure 4). De plus, il a été montré que la COUG est capable d'induire la production d'IFNβ (Rosowski et al., 2014). Or de nombreux gènes sont induits à la fois par l'IFNβ et IFNγ, comme *MX1*. En conséquence, il est possible que le profil des gènes réprimés par la COUG varie de ceux trouvés dans l'analyse de la souche Pru*Δku80*, avec des implications au niveau physiologique.

Chez la souris, la forte virulence des parasites de type 1 est reliée à leur capacité à contrecarrer le système de défense des IRGs. En effet, ces parasites possèdent les effecteurs ROP18 et ROP5 sous leur version active, qui permettent la phosphorylation des IRGs sur des résidus conservés, ce qui inhibe leur oligomérisation. Ainsi, les parasites évitent la vésiculation de leur PVM, et se préservent de la destruction. Nous avons montré que les parasites de type 1 présentent une faible accumulation d'IRGs à la PVM, indépendamment de TgIST (JEM Figure 8). En revanche, les parasites de type 2 possèdent une version non virulente de ROP5, et les IRGs décorent la PVM après stimulation à l'IFNγ. Dans le cas d'une pré-infection suivie d'une stimulation, l'expression des IRGs est bloquée via TgIST (JEM, Figure 8 A), ce qui permet d'éviter l'élimination par les macrophages (JEM, Figure 8 E). Dans la souche COUG, une pré-stimulation à l'IFNγ résulte en une forte charge d'IRGs à la PVM indépendamment de TgIST, de façon similaire aux souches de type 2 (JEM, Figure 8 A). En revanche, contrairement à celles-ci, une pré-infection suivi d'une stimulation montre une faible charge des IRGs, indépendamment de TgIST. Comme le phénotype des IRGs en cellules murines est dépendant de ROP5 et ROP18, il est possible que les versions alléliques contenues dans la COUG puissent expliquer de tels résultats. En raison de la multiplicité d'allèles pour ROP5, l'analyse de ce gène dans la souche COUG n'est pas aisée. En effet, alors que la forte expression de *ROP18* est bien établie (Niedelman et al., 2012), la combinaison allélique de *ROP5* n'est pas évidente.

Globalement, 3 isoformes de ROP5 ont été identifiées dans chaque type, nommés A, B et C, avec les types 1 et 3 très similaires. Le *locus* de *ROP5* est composé de 4 à 10 gènes en tandem, et il est assez difficile à séquencer. Pour cette raison, le *locus ROP5* des parasites de type 2 n'a pas pu être déterminé de façon précise. Il est composé de 5 à 10 gènes, avec une copie de *ROP5A*, et un nombre indéterminé d'allèles *ROP5B/C*. Le type 1 comprends 6 séquences, 2 de chaque allèle. Enfin, le type 3 comprends 4 séquences, dont 2 allèles *ROP5C* (Reese et al., 2011). L'allèle B de type 2 présente un codon stop en milieu de séquence, aboutissant à une forme tronquée de la protéine. Cependant, il a été montré que cette forme n'est présente qu'à hauteur de 20% parmi toutes les protéines ROP5, et alors qu'elle pourrait jouer un rôle d'atténuation, cette forme ne semble pas responsable de la totale non-virulence de l'allèle de *ROP5* de type 2. Dans les souches de type 3, les IRGs s'accumulent malgré la présence d'une version virulente de *ROP5*, en raison de l'absence de ROP18. Cependant, parmi les diverses souches de type 3, le niveau d'expression de ROP5 est corrélé à une diminution de la charge d'IRGs (Niedelman et al., 2012). L'expression de l'allèle *ROP5A* de

type 3 dans une souche de type 2 a montré une faible mais significative réduction de la charge des IRGs à la PVM. En revanche, l'expression de l'allèle de *ROP5C* de type 3 dans une souche de type 2 aboutit à une très forte diminution de la charge des IRGs à la PVM (Niedelman et al., 2012). Cette expérience suggère que l'allèle de type *ROP5C* des types 1 et 3 serait responsable de la virulence en souris.

Concernant la souche COUG, la combinaison ROP18 et ROP5 a été déterminée dans une étude sur diverses souches, leur phénotype vis-à-vis des IRGs, et leur virulence en souris (Niedelman et al., 2012). Dans l'ensemble, les souches présentant une forte virulence en souris sont résistantes aux IRGs, avec une faible charge des IRGs et un faible pourcentage de plages de lyses. Parmi les souches étudiées, il existe 2 exceptions, les souches CASTELLS et COUG, présentant toutes les deux une forte mortalité en souris, intermédiaire entre les souches de type 1 et de type 2. La souche CASTELLS appartient au type 3, avec une absence de la protéine ROP18, et présente la particularité d'une charge des IRGs sur la PVM importante, mais un pourcentage de plages de lyses relativement faible, expliquant probablement sa létalité en souris. La souche COUG au contraire présente une forte charge des IRGs ainsi qu'un fort pourcentage de plages de lyses, malgré une létalité élevée en souris (Niedelman et al., 2012). Cette étude a été réalisée en infectant des cellules murines de type macrophages pré-stimulées à l'IFNγ.

Concernant la version du *locus* de *ROP5* présent dans la souche COUG, il a été montré qu'elle présente des similarités avec celle de souches virulentes d'Amérique du Sud telles que la VAND ou la GUY concernant les allèles A et B (Niedelman et al., 2012). En revanche, la souche COUG semble ne posséder aucun allèle ROP5C, qui est supposé être responsable de l'évasion aux IRGs. Ceci pourrait expliquer partiellement le résultat que nous avons obtenu (Figure 21). De plus, alors que le nombre de copies de l'allèle *ROP5A* est égal à celui des copies *ROP5B/C*, l'expression de *ROP5A* est bien inférieure à celle de *ROP5B/C*. Comme pour les souches de type 3, les niveaux d'expression de ROP5 pourraient avoir un effet sur le contrôle des IRGs.

Bien que la combinaison allélique de ROP5 et ROP18 ne soit pas très claire, il semble qu'elle permette la lyse des parasites par les IRGs. De façon inattendue, à ce à quoi nous nous attendions, le phénotype des IRGs en COUG n'est pas dépendant de TgIST, contrairement au type 2 (JEM Figure 8, et Figure 21). En effet, la délétion de TgIST dans une souche COUG n'augmente pas la charge des IRGs à la PVM (Figure 21), et n'a qu'un impact mineur sur la répression transcriptionnelle du gène *Irgb6* (Figure 24). Bien que nous n'ayons pas regardé au niveau transcriptionnel global, la répression d'*IRF1* similaire à celles observées en type 1

et type 2 nous permet de supposer que le mécanisme d'action de TgIST est identique, et permet de réprimer d'autres gènes dépendants de l'IFNγ. De plus, nous avons évalué l'impact de TgIST sur quelques gènes inductibles à l'IFNγ, qui présentent le même profil de répression globale via cette protéine (Figure 20). Nous avons montré que MYR1 semble jouer un rôle dans la répression transcriptionnelle des IRGs (Figure 24). Etant donné le rôle de MYR1 dans l'export des effecteurs issus de granules denses, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un autre effecteur, différent de TgIST, est nécessaire pour le contrôle transcriptionnel du gène *Irgb6*. Afin de confirmer ces observations, et de trouver éventuellement l'effecteur responsable, d'autres recherches sont nécessaires.

Les résultats obtenus vis-à-vis des IRGs dans la souche COUG sont très intrigants. En effet, la virulence d'une souche en souris est généralement attribuée à sa capacité à éviter le système IRG. La souche COUG est modérément virulente en souris, en comparaison d'une souche de type 1, dont l'inoculation est létale à partir d'un seul parasite. Ceci s'explique probablement par l'incapacité du parasite à inhiber l'action des IRGs dans une cellule pré-stimulée à l'IFNγ (Figure 21). Alors que TgIST semble jouer un rôle modeste dans la répression transcriptionnelle des IRGs, MYR1 semble être primordial, reflétant potentiellement l'implication d'un effecteur exporté des granules denses. En revanche, il est étonnant que les parasites COUG *Δmyr1* présentent le même niveau de virulence en souris que la souche sauvage. En effet, nous avons démontré précédemment que les parasites de type 2 76K présentaient une virulence atténuée en l'absence de TgIST (JEM Figure 9). Or nous avons également démontré que les parasites *Δmyr1* n'étaient plus capables de réprimer *IRF1*, reflétant la nécessité de MYR1 dans la sécrétion de TgIST (Figure 22). En conséquence, dans l'expérience de virulence de la COUG, les parasites *Δmyr1* n'exportent pas TgIST. Ceci nous permet d'émettre 2 hypothèses. Premièrement, nous pouvons penser que dans le cas de la souche COUG, TgIST n'est pas un facteur de virulence comme dans le type 2. Cependant, comme d'autres effecteurs sont bloqués dans l'espace vacuolaires par l'absence de MYR1, nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'absence de TgIST est contrebalancée par l'absence d'un autre facteur. Dans ce cas, la perte de virulence hypothétique des parasites *ΔTgIST* pourrait être annulée par l'absence d'un autre effecteur. Afin de renforcer ces hypothèses, les expérimentations notamment animales devront être répétées.

Afin d'élucider plus précisément les rôles de TgIST et de MYR1 dans la virulence de la souche COUG, d'autres expérimentations sont nécessaires. Nous pourrions refaire un test de virulence avec les parasites de la souches COUG *ΔTgIST,* afin d'évaluer de façon certaine l'impact de la protéine sur la virulence. De plus, il serait intéressant d'identifier le potentiel

effecteur responsable de la répression transcriptionnelle des IRGs. Un des moyens pour atteindre cet objectif serait d'appliquer un agent mutagène sur des parasites COUG, et de chercher les clones ayant perdu cette capacité de répression transcriptionnelle sur les IRGs. Cependant, ce travail nécessitera probablement beaucoup de temps et de mise au point. En effet, nous avons pu constater que les parasites COUG sont difficiles à manipuler génétiquement, et contrairement aux parasites de type 1 et 2, plusieurs essais ont été nécessaires pour obtenir les souches COUG *ΔTgIST* ou *Δmyr1*. Il serait également intéressant de visualiser la dissémination des parasites COUG dans la souris. Pour cela, nous pourrions élaborer des parasites possédant la luciférase, une enzyme qui oxyde la luciférine en oxyluciférine, qui elle-même émet des photons afin de retrouver un état électroniquement stable. Ceux-ci pourront ensuite être captés par microscopie de bioluminescence, comme utilisée précédemment (JEM, Figure 9). Nous pourrions inoculer à des souris une souche Δ*TgIST* possédant le gène codant pour la luciférase, et observer au fil des jours la progression de l'infection, en comparaison de la souche luminescente possédant TgIST.

Comme évoqué précédemment, les différents modes d'infection influent beaucoup le devenir de celle-ci. Concernant la COUG, nous avons choisi d'inoculer les parasites sous leur forme tachyzoïtes en injection intrapéritonéale. Il a été démontré que la souche COUG est capable de se différencier en bradyzoïtes, et de produire des kystes en souris (Fux et al., 2007). Il est probable que l'inoculation des souris avec des kystes de COUG montre un comportement différent en termes de virulence. Dans ce sens, il a été montré que la COUG possède à la fois une version active de ROP16, comme en type 1, et une version active de GRA15, comme en type 2 (Melo et al., 2013). En conséquence, la souche COUG pourrait à la fois induire la phosphorylation de STAT3/6 par ROP16, et induire la voie NF-κB via GRA15. Il a été suggéré qu'une telle combinaison d'effecteurs pourrait influer sur l'immunité protective dans l'épithélium intestinal (Jensen et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs montrent la capacité de ROP16 à phosphoryler STAT5, uniquement dans le contexte de la présence de GRA15. La synergie de ROP16 de type 1 et GRA15 de type 2 dans une souche de type 2 permet un recrutement accru des monocytes pro-inflammatoires, et ainsi une protection plus importante de l'hôte. Dans ce sens, il a été montré que cette synergie permet de réduire la susceptibilité des souris B6 face à une infection par voie orale. La souche COUG possédant ces 2 effecteurs naturellement actifs, il serait intéressant d'étudier sa virulence après infection orale, ainsi que le profil immunitaire déployé par l'hôte. En effet, nous pourrions nous attendre à des résultats similaires à ce qui a été décrit dans le cas de l'insertion d'une copie active de ROP16 dans le

contexte génétique de type 2, où GRA15 est actif. Cependant, il est possible que d'autres effecteurs de la COUG jouent un rôle. Il a également été démontré que la souche COUG présente la particularité d'être hétérogène quant à sa croissance intracellulaire ; en effet, au cours du temps, le nombre de parasites par vacuoles diminue globalement, ce qui semble indiquer une mort intracellulaire d'une partie des parasites (Rosowski et al., 2014). Ce phénotype a d'ailleurs été relié à l'induction d'IFNβ par la COUG ; en effet, l'hypothèse la plus largement avancée est qu'une partie des parasites sont détruits dans les cellules, ce qui pourrait libérer leurs acides nucléiques et stimuler la reconnaissance d'ARN et d'ADN étranger par le récepteur cytoplasmique RIG-I (Xu et al., 2018). L'induction d'IFNβ par la souche COUG est unique, et pourrait avoir des implications importantes dans la réponse cellulaire de l'hôte et le contrôle immunitaire global. Certaines espèces du parasite *Leishmania* abrite un virus, qui est détecté par l'hôte, qui engage alors la voie IFNβ pour sa défense (Tarr et al., 1988). Il a été démontré que cette particularité confère une virulence accrue à ces parasites. Ainsi, la virulence accrue de la COUG pourrait être en lien également à la présence d'un virus.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, une infection par *Toxoplasma gondii* provoque de nombreux effets sur la cellule hôte qui permettent de façonner son devenir. Ces effets découlent pour la plupart de l'action d'effecteurs, qui peuvent agir spécifiquement selon les souches (ROP5, ROP18, GRA15) ou non (GRA16, GRA24, TgIST).

Certains effecteurs possèdent des actions spécifiques selon les souches étudiées. C'est le cas par exemple du complexe ROP5/ROP18, de ROP16 et de GRA15. La combinaison de ces différents facteurs conditionne le devenir de l'infection (Melo et al., 2011). Dans les souches de type 1, l'activité de ROP16 et du complexe ROP5/ROP18 induit une diminution de la réponse IL12/IFNγ, entrainant une prolifération non contrôlée du parasite par l'absence de recrutement des IRGs, et la mort des souris par un excès de tachyzoïtes. Dans le type 2, l'action de GRA15 induit une réponse IL12 précoce, ainsi que des niveaux élevés d'IFNγ. Le recrutement important des cellules au point d'infection, ainsi que la destruction par les IRGs entraine un emballement immunitaire, délétère pour les souris qui meurent d'inflammation accrue avec les tissus nécrosés. Enfin, dans les souches de type 3, l'action de ROP16 permet de modérer la réponse IL12/IFNγ. Ainsi, combiné à une destruction efficace par les IRGs, le contrôle parasitaire est suffisant, et les effets délétères maîtrisés pour permettre l'établissement d'une infection chronique.

2. Les effecteurs, divers modes d'action pour contrôler l'hôte

Le succès du parasite *Toxoplasma gondii* repose sur sa capacité à moduler à son avantage les interactions qu'il entretient avec son hôte. Entre autres, ce parasite affecte très fortement le profil transcriptionnel de l'hôte, incluant les gènes impliqués dans le métabolisme énergétiques, les réponses immunitaires et la signalisation cellulaire (Blader et al., 2001; Stutz et al., 2012; Zhou et al., 2016). Le contrôle de ces voies chez l'hôte s'effectuent notamment grâce à des effecteurs déployés par le parasite.

Actuellement, les effecteurs connus de *Toxoplasma gondii* font majoritairement partie de 2 classes, les protéines de rhoptries, et les protéines de granules denses. Alors que les rhoptries contiennent des protéines ordonnées contenant des domaines bien définis (notamment des domaines kinases), les protéines effectrices GRA connues à ce jour sont désordonnées, sans domaines ou fonctions identifiables (Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013).

L'abondance et l'importance des protéines désordonnées chez les eucaryotes n'ont été mis en évidence que durant la fin des années 1990. Les recherches ont permis de déterminer que les régions de désordre protéique sont très courantes au sein des protéines eucaryotes, spécialement celles impliquées dans la régulation cellulaire, la signalisation et la transcription génomique (revue en (Dunker et al., 2002; Wright and Dyson, 1999)). Les protéines désordonnées sont caractérisées par une faible complexité de séquence, ainsi qu'une faible présence de blocs d'acides aminés hydrophobes. Ces protéines sont incapable de se replier spontanément de façon stable en structure tertiaire, et fluctuent plutôt entre les conformations (Dyson and Wright, 2005). Les protéines intrinsèquement désordonnées interagissent et fonctionnent très souvent avec des partenaires, potentiellement nombreux (Dunker et al., 2005; Kim et al., 2008). En général, ces protéines possèdent de courts motifs linéaires (SLiM), permettant l'interaction avec les partenaires (Davey et al., 2017; Hugo et al., 2013).

L'utilisation des protéines désordonnées par *Toxoplasma gondii* peut être justifiée par les avantages évolutifs qui en découlent. En effet, en plus des caractéristiques énumérées précédemment, ces protéines peuvent évoluer rapidement par l'apparition plus fréquente de mutations ponctuelles, sans changer l'effet sur la protéine. Sur une protéine ordonnée possédant des domaines structurés, une mutation peut mener facilement à la perte de fonction de la protéine, et à une non conservation de cette mutation. Dans le cas des protéines désordonnées, cet effet est plus rare et plus improbable. De plus, leur nature désordonnée leur permet potentiellement de se lier à divers partenaires. Ainsi, dans le cas d'un pathogène comme *Toxoplasma gondii*, ces protéines qui évoluent plus facilement représentent un avantage dans l'adaptation rapide à l'environnement.

Les premières études sur les interactions entre *Toxoplasma gondii* et son hôte se sont penchées sur les différences transcriptionnelles des cellules infectées par différentes souches de parasites. Ces analyses ont tout d'abord identifié ROP16, une protéine issue des rhoptries qui cible STAT3 et STAT6 en les phosphorylant, et en induisant l'expression des gènes qui leur sont associés (Saeij et al., 2007). Ce phénotype est observé dans les souches de type 1 et type 3, et non dans le type 2, en raison d'un polymorphisme de séquence. Il a notamment été démontré qu'un seul acide aminé et responsable de cette différence entre les types (Yamamoto et al., 2009). Le complexe formé par ROP5, ROP17 et ROP18 agit quant à lui sur les IRGs, en les phosphorylant sur des résidus critiques conservés, ce qui permet d'inhiber leur oligomérisation (Fentress et al., 2010, 2012; Ghosh et al., 2004; Steinfeldt et al., 2010, 2010; Taylor et al., 2006). Ces effecteurs parasitaires agissent directement sur des protéines de l'hôtes, à partir du cytoplasme ou de la face cytoplasmique de la PVM. D'autres effecteurs présentent des modes d'action différents. En effet, les effecteurs GRA6, GRA7, et GRA15 altèrent le fonctionnement de la cellule hôte, malgré leur localisation restreinte à la vacuole parasitophore (Alaganan et al., 2014; Ma et al., 2014; Rosowski et al., 2011). En particulier, GRA15 induit la translocation nucléaire de NF-κB, mais le mécanisme précis n'est à ce jour pas connu (Rosowski et al., 2011). Enfin, une nouvelle catégorie d'effecteurs de granules denses a été découverte assez récemment, des protéines GRA exportées dans le noyau des cellules hôtes. GRA16 a été la première protéine de granules denses à montrer une localisation nucléaire, et permettant la survie de l'hôte en conditions de stress (Bougdour et al., 2013). Ensuite, GRA24 a été identifiée comme étant également exportée dans le noyau, où elle agit comme agoniste de la voie d'induction classique de la cascade des MAPK (Braun et al., 2013). Enfin, la découverte de TgIST a permis de révéler un mode d'action inédit, avec une action directe au niveau de la chromatine des gènes cibles de STAT1.

Il est intéressant de noter que, bien que la souche COUG soit proche génétiquement des souches de type 2 (Figure 3), certains de ses effecteurs sont assez différents. Par exemple, la version allélique de *ROP16* en COUG est similaire à celle du type 2, sauf sur 2 acides aminés, dont l'acide aminé critique nécessaire à l'activité kinase de ROP16. En outre, il a été montré que cette souche présente la capacité d'induire la phosphorylation de STAT6 dans les cellules qu'elle infecte, ce qui semble correspondre directement à une action de ROP16 (Melo et al., 2013). Au niveau des séquences génétiques, nous avons établi que la version COUG de TgIST est similaire à celle de la souche de type 1 GT1 (Figure 18), bien qu'aucune différence phénotypique n'ait été constatée entre les différentes souches de parasites. En

revanche, concernant ROP18 et ROP5, il semble que la COUG possède des versions alléliques similaires aux souches de type 2, menant à une susceptibilité de cette souche aux IRGs. Enfin, la version allélique de *GRA15* en COUG est similaire à celle en type 2, et on observe une localisation nucléaire du facteur NF-κB p65 dans les cellules infectées (Melo et al., 2013). La souche COUG est donc constituée au niveau génétique d'un mélange entre les souches de type 1 et de type 2, au moins au niveau des effecteurs, et possède une virulence importante chez l'humain. En conséquence, il semble intéressant et nécessaire de poursuivre les recherches sur cette souche, afin de mieux comprendre l'origine de sa virulence, notamment chez l'humain.

Comme pour les souches de type 1 RH*Δku80* et de type 2 Pru*Δku80*, la souche COUG exporte l'effecteur TgIST, qui montre un rôle similaire de répression de la voie IFNγ (Figure 19). La découverte de cet effecteur lié à la fois à la forme active de STAT1 et à un répresseur chromatinien nous a poussé à étudier le mode d'action de cet effecteur, inédit jusqu'alors.

3. TgIST, un mode d'action unique

L'expérimentation menée sur des formes tronquées de TgIST (Figure 15) nous fournit un résultat préliminaire à l'étude des interactions entre TgIST et STAT1. En effet, les formes tronquées les plus courtes (C 576 et C 394) ne semblent pas capables de réprimer *IRF1* en présence d'IFNγ dans le cas d'une infection par 1 ou 2 parasites. En revanche, une infection par plus de 4 parasites par cellule semble réprimer *IRF1*. Une des hypothèses pour expliquer ce résultat est reliée à la stabilité protéique. En effet, en altérant la séquence de TgIST, la stabilité de la protéine pourrait être compromise, ainsi que son export. Dans ce cas, une faible quantité seulement de TgIST serait exportée dans la cellule hôte. Dans ce contexte, une grande quantité de parasites pourrait être nécessaire à l'export d'une quantité suffisante de TgIST pour opérer une répression efficace.

Une autre hypothèse est liée à la nature désordonnée de TgIST. Les protéines intrinsèquement désordonnées ont la capacité de se lier à leurs partenaires avec une forte spécificité, mais une affinité modeste, permettant une dissociation rapide et spontanée (Dyson and Wright, 2005; Oldfield et al., 2005; Wright and Dyson, 1999). La dynamique des interactions de STAT1 avec TgIST n'a pas été étudiée de façon précise. Cependant, TgIST est une protéine entièrement intrinsèquement désordonnée, et nous pouvons supposer qu'elle se comporte de la même façon, avec une forte spécificité mais une affinité modeste. Il est

possible qu'une protéine de cette taille possède plusieurs zones d'interactions avec STAT1. Cette hypothèse pourrait expliquer le fait que la forme C 755, dépourvue seulement d'un petit domaine plus structuré, peut réprimer efficacement *IRF1*. Dans ce cas, les formes plus courtes possèderaient moins de zones d'interaction, et la répression ne serait pas effective. En augmentant le nombre de parasites, le nombre de protéines exportées augmenterait également, et la répression augmenterait, reflétant un plus grand nombre de zones d'interaction.

Ces résultats ne constituent que des données préliminaires, et d'autres recherches sont nécessaires afin de comprendre précisément le mécanisme de recrutement de STAT1 et de NuRD par TgIST. Une des possibilités serait de produire de façon recombinante les protéines STAT1 et TgIST, et une fois mise en présence l'une avec l'autre, de tenter de produire des cristaux, dans le but de résoudre la structure du complexe.

La forme phosphorylée en tyrosine de STAT1 est la plupart du temps considérée comme la forme active, permettant la transcription des gènes inductibles par l'interféron. De façon surprenante, alors que le parasite est capable de réprimer les gènes induits par l'IFNγ, il promeut également la phosphorylation de STAT1 en tyrosine (Figure 25). Ceci s'opère grâce à TgIST, qui permet d'induire la phosphorylation de STAT1, ainsi que le recrutement de NuRD aux gènes cibles, permettant la répression de ces gènes. Le mode opératoire de TgIST pour la promotion de cette phosphorylation est encore inconnu. En effet, l'analyse bioinformatique de sa séquence n'a pas permis d'identifier clairement de domaines structurés (JEM Figure 1A, et Figure 13). Nous en avons conclu que TgIST, ne présentant pas de similarités avec une kinase, ne phosphorylait pas directement STAT1.

Comme décrit en introduction, une équipe a précédemment démontré que dans les parasites de type 1, ROP16 est capable de phosphoryler STAT1 directement. Dans ce sens, nous avons montré que l'infection des cellules avec des parasites de type 1 RH*Δku80Δrop16* résulte en une plus faible phosphorylation de STAT1 sur le résidu tyrosine 701 (JEM, Figure 6 D). Dans le cas d'une infection par les parasites de type 2 Pru*Δku80*, aucune différence dans la quantité de STAT1 phosphorylée n'a pu être observée en présence ou en absence de ROP16, reflétant l'absence d'activité kinase de ROP16 de type 2.

En analysant les résultats donnés par la spectrométrie de masse sur l'immuno-purification de TgIST, nous avons constaté l'absence de peptide de ROP16. Ceci peut s'expliquer par le type de parasites utilisés pour cette analyse. Cette expérimentation a été réalisée à partir de lysats de cellules infectées avec des parasites de type 2. Or, ROP16 ne dispose pas de l'activité kinase dans cette souche ; en conséquence, ROP16 n'a probablement plus la capacité de se lier avec STAT1. Il n'est donc pas surprenant de ne pas retrouver cette protéine en interaction

avec STAT1. Sachant que ROP16 en type 1 est capable d'interagir directement avec STAT1, nous pouvons supposer qu'en utilisant une lignée de type 1 comme la souche RH*Δku80*, nous pourrions retrouver des peptides de ROP16 dans l'analyse de spectrométrie de masse.

Malgré la contribution de ROP16 dans la phosphorylation de STAT1, son rôle est accessoire, puisque les parasites de type 2 dans lesquels ROP16 est inactif présentent une forte phosphorylation de STAT1 en absence d'IFNγ (JEM Figure 6 D). De plus, nous avons démontré que la phosphorylation dépendante de TgIST ne nécessite pas d'autres facteurs parasitaires, puisqu'une transfection d'un vecteur contenant la séquence codant pour TgIST suffit à induire une augmentation de la phosphorylation de STAT1 (JEM, Figure 6 E).

L'analyse des résultats obtenus par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier des peptides issus de 9 différentes tyrosine kinases de la cellule hôte. Les quantités de peptides présents dans l'échantillon sont très faibles, ce qui pourrait refléter la fugacité de l'interaction de ces protéines avec STAT1. En effet, l'évènement de phosphorylation en général par les tyrosines kinases est un processus très rapide, ce qui signifie que le temps d'interaction entre une kinase et son substrat est très court. Techniquement, cette caractéristique pose le problème suivant : à l'instant de l'extraction cellulaire, malgré une grande quantité de STAT1 phosphorylé, peu de complexes kinase-STAT1 sont en cours d'interaction. La quantité de kinase détectée est ainsi assez faible.

Parmi les différentes kinases retrouvées, deux sont déjà connues pour leur capacité à phosphoryler STAT1. La protéine SRC est une kinase non-récepteur activée par de multiples classes de récepteurs cellulaires, dont les récepteurs de l'immunité, les intégrines et autres récepteurs d'adhésion, ainsi que par les récepteurs de cytokines (revue dans (Rane and Reddy, 2002)). SRC possède la capacité de phosphoryler STAT1 en tyrosine, ainsi que STAT3 à la suite de la stimulation par le PDGF (platelet-derived growth factor, qui régule la différenciation cellulaire et la croissance). La protéine PKR est une kinase inductible par l'interféron et dépendante de l'ARN double brin. Cette protéine joue un rôle dans l'immunité aux infections virales, et est impliquée dans la régulation de nombreux processus, dont la transduction du signal, l'apoptose, la différenciation et la prolifération (Handy and Patel, 2013). Après activation, la kinase PKR peut phosphoryler STAT1 afin de transmettre le signal. Il existe plusieurs possibilités concernant la phosphorylation médiée par TgIST. Une de ces 2 kinases pourrait être recrutée directement et spécifiquement via TgIST, afin de phosphoryler STAT1. Une autre hypothèse est que, du fait de la redondance des tyrosine kinases dans la cellule, celles-ci pourraient être recrutées de façon non-spécifiques grâce à leur domaine SH2, le domaine de liaison entre protéines (Figure 10). Ces modèles impliquent que TgIST pourrait se

lier à la forme non-phosphorylée de STAT1 dans le cytoplasme, ce que nous n'avons pas étudié.

Dans la cellule, les interactions sont dynamiques et à ce titre, les différents cycles d'activation/ inactivation ne sont pas figés. Ainsi, l'augmentation de phosphorylation de STAT1 pourrait également résulter d'une inhibition de phosphatases par le parasite. Dans ce sens, nous avons retrouvé dans l'analyse en spectrométrie de masse quelques peptides correspondant à diverses phosphatases. Bien que cette hypothèse soit possible, le modèle d'induction de la phosphorylation par une kinase est plus intuitif, notamment par l'illustration du rôle de ROP16, qui agit directement en tant que kinase.

D'autres recherches sont nécessaires afin de révéler le mode d'action de TgIST dans la promotion de STAT1 phosphorylée en tyrosine. Une expérimentation possible serait d'effectuer des tests d'interaction et de phosphorylation *in vitro* afin d'évaluer l'implication des potentielles kinases de l'hôte. Une des limites à l'expérimentation *in vitro* est la simplification du système, qui occulte tous les autres composants cellulaires, ce qui peut faire fortement varier es résultats *in vitro* et *in cellulo*.

L'IFNγ induit la phosphorylation de STAT1 en tyrosine 701, sa dimérisation et la translocation du dimère au noyau. Une fois fixé à l'ADN, une deuxième phosphorylation est effectuée sur le résidu sérine 727, nécessaire à une activité transcriptionnelle optimale. Diverses protéines co-activatrices sont recrutées, dont CBP, une histone acétyl-transférase, ainsi que BRG1, une hélicase (Khavari et al., 1993) permettant un meilleur accès à l'ADN, et nécessaire à la transcription de divers gènes (Pattenden et al., 2002). Beaucoup d'autres facteurs peuvent contribuer à la transcription d'un gène ; en effet, l'ARN polymérase II est nécessaire à l'initiation de la transcription, et plus d'une centaine de protéines peuvent la recruter (Holstege and Young, 1999). La phosphorylation de STAT1 en sérine 727 est nécessaire au recrutement de l'ARN polymérase II (Ramsauer et al., 2007). Parmi les cofacteurs évoqués, CBP joue un rôle primordial dans la transcription médiée par STAT1 (Zhang et al., 1996). Cette protéine possède une activité d'acétyl-transférase, et permet entre autre l'acétylation des histones (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996). L'acétylation des histones est un prérequis indispensable pour la transcription des gènes dépendants de STAT1 (Kouzarides, 2007; Paulson et al., 2002). Dans le cas d'une infection par *Toxoplasma gondii*, l'analyse des résultats de spectrométrie de masse nous a permis d'identifier STAT1 sous sa forme phosphorylée en tyrosine, une forme classiquement désignée comme transcriptionnellement active (JEM, Figure 2). En revanche, la protéine co-activatrice CBP n'a pas été détectée, ce qui est cohérent avec la capacité répressive du parasite, via TgIST et la présence de NuRD.

La capacité de *Toxoplasma gondii* à réprimer les gènes induits par l'IFNγ a été constaté il y a quelques années (Rosowski and Saeij, 2012). La translocation de STAT1 au noyau et sa liaison à l'ADN malgré une absence de transcription suggère une interférence du parasite avec le remodelage de la chromatine ou le recrutement de la machinerie de transcription. Grâce à un test de décalage de mobilité électrophorétique (EMSA), des recherches ont permis de mettre en évidence que le parasite induisait la formation d'un complexe au *locus* des gènes induits par l'IFNγ différent par rapport aux cellules non infectées. En effet, un complexe GAS différent, ayant une mobilité réduite a été observé, et il en a été conclu que *Toxoplasma gondii* induisait la formation d'un complexe de taille bien supérieure au niveau des promoteurs des gènes induits par l'IFNγ (Lang et al., 2012). Notre étude a permis de révéler ce complexe, composé de STAT1, de TgIST et du complexe NuRD. L'association de STAT1 et NuRD est unique, et n'avait jamais été observée avant. Dans des conditions physiologiques, NuRD possède un rôle primordial dans la différenciation tissulaire de l'embryon, et permet de maintenir la chromatine dans un état ouvert, tout en permettant la répression des gènes. Ainsi, la chromatine est facilement accessible aux facteurs de transcription, et les gènes peuvent être régulés de façon très rapide (Torchy et al., 2015).

NuRD contenant des enzymes de déacétylation HDAC1 et 2, nous avons souhaité déterminer leur rôle potentiel dans ce contexte. Différents composés inhibiteurs de l'activité déacétylase de HDAC1 et 2 ont été utilisés afin de déterminer leur impact sur l'induction du gène *IRF1* (Figure 17). Au niveau de ce gène, les inhibiteurs ne semblent pas avoir d'effet sur la production d'IRF1, suggérant que l'activité déacétylase n'a pas d'effet sur l'expression de ce gène, en accord avec une précédente étude (Rosowski et al., 2014).

Nos résultats sont en désaccord avec une étude précédente sur le sujet, qui avait conclu que l'activité HDAC était nécessaire pour l'expression des gènes secondaires induits par l'IFNγ, comme *CIITA* ou *GBP2* (Lang et al., 2012). Dans cette étude, l'inhibition de ces gènes par le parasite correspond à une diminution de recrutement de BRG1, ayant un impact sur la structure de la chromatine. Plus tard, il a été démontré que les gènes primaires tels que *IRF1* ne nécessitent pas BRG1 pour leur expression (Wang et al., 2011). Il semble donc que la régulation des gènes primaires ou secondaires nécessite différents modes d'action, et que le parasite soit capable d'inhiber leur expression dans les deux cas.

Bien que nous n'ayons pas étudié l'expression des gènes secondaires avec un traitement aux inhibiteurs de HDAC, nous avons recherché le niveau d'acétylation des histones à divers promoteurs, au cours de l'infection (JEM Figure 7). Concernant IRF1, l'absence de variation de ces niveaux corrèle avec l'absence d'effet des inhibiteurs de HDAC (Figure 17) (Rosowski et al., 2014; Sakamoto et al., 2004), et reflète probablement la non nécessité de BRG1 dans

ce contexte (Wang et al., 2011). En revanche, contrairement à une étude précédente (Lang et al., 2012), aucune différence dans les niveaux d'acétylation de gènes secondaires *CIITA* et *CXCL10* n'a été constaté au cours de l'infection. Cela suggère que la présence des enzymes HDACs n'est pas liée à un remodelage local de la chromatine au niveau des gènes impliqués. Cependant, alors que l'étude précédente a été réalisée dans des macrophages (RAW et BMDM) (Lang et al., 2012), nous avons effectué ces expérimentations en HFFs. Comme il a été démontré que l'effet des inhibiteurs de HDAC varient selon les gènes observés (Sakamoto et al., 2004), on peut émettre l'hypothèse que leurs effets pourraient dépendre également du type cellulaire utilisé pour l'étude. Afin de déterminer exactement l'effet de ces inhibiteurs, nous pourrions effectuer une étude comparative de l'expression des gènes induits par l'IFNγ dans divers types cellulaires, et avec ces inhibiteurs.

TgIST s'accumule dans le noyau de la cellule hôte dans les 9 heures qui suivent l'invasion (JEM Figure 1). Lors de son transit vers ce noyau, la protéine traverse la membrane vacuolaire aidée dans sa translocation vers l'espace cytoplasmique de la cellule hôte par la protéine MYR1 (Figure 9). TgIST promeut ensuite la phosphorylation de STAT1, indépendamment d'autres facteurs parasitaires (JEM Figure 6 E), malgré une contribution possible de ROP16 (JEM Figure 6 D). Le mécanisme exact déployé par TgIST pour cette étape n'est pas connu. Même si un blocage de phosphatases, qui permettrait de garder STAT1 phosphorylé, ne peut pas être exclu, un modèle plus intuitif propose que TgIST recrute une ou plusieurs kinases de l'hôte pour effectuer une phosphorylation directe de STAT1.

La séquence de TgIST contient un NLS bipartite (JEM Figure 1 A), qui est probablement responsable de l'adressage au noyau lors de l'expression de TgIST dans la cellule hôte (JEM Figure 6 A). De plus, nous avons démontré que TgIST localise dans les noyaux des cellules hôtes infectées U3A, dépourvues de STAT1 (McKendry et al., 1991) (JEM Figure 3 A). Ces observations prouvent que TgIST peut atteindre le noyau indépendamment de STAT1. Comme dit précédemment, les protéines désordonnées ont la capacité de se lier à ses partenaires avec une forte spécificité, mais une affinité modeste, permettant une dissociation rapide et spontanée (Dyson and Wright, 2005; Oldfield et al., 2005; Wright and Dyson, 1999). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que dans le cytoplasme, TgIST permet la phosphorylation de STAT1 par une ou plusieurs kinases de l'hôte, puis se dissocie de STAT1 alors phosphorylé. Sous cette forme, STAT1 va être adressé au noyau, tout comme TgIST. Une autre possibilité est que TgIST pourrait se lier à STAT1 dans le cytoplasme, et rester en interaction avec celui-ci au moment du transport à travers le pore nucléaire. Ceci pourrait être reflété par le fait que la version TgIST C 394, qui est tronquée juste avant son NLS n'a pas été

observée dans le noyau des cellules hôtes (Figure 14), mais semble pouvoir réprimer *IRF1* lors d'une infection par de multiples parasites. Afin de compléter nos connaissances, nous pourrions regarder plus précisément la présence de cette forme de TgIST dans le noyau d'une cellule infectée par de multiples parasites. Enfin, pour discriminer entre ces 2 possibilités, il serait intéressant d'élaborer une version de TgIST dépourvue de son NLS uniquement, et de regarder son comportement dans une souche possédant ou non STAT1 (comme les cellules 2fTGH et U3A, respectivement).

Notre étude, en accord avec une publication précédente (Rosowski et al., 2014), a permis de démontrer que, concernant au moins IRF1, l'activité enzymatique des HDAC 1 et 2 de NuRD n'est pas requise pour la répression de la transcription des gènes. Cette capacité de répression semble plutôt provenir de la présence de corépresseurs, comme CtBP1 et 2, ainsi que de la présence du complexe NuRD en lui-même. Nous avons également montré une forte présence des formes phosphorylées en tyrosine et sérine à la chromatine, au niveau des promoteurs de divers gènes induits par l'IFNγ (JEM Figure 2). Ceci pourrait refléter une séquestration de STAT1 à la chromatine, et une absence de décrochage du complexe. Le décrochage de l'ADN nécessite une étape d'acétylation des résidus lysine 410 et lysine 413 de STAT1 (Figure 10). L'affinité de STAT1 pour l'ADN est réduite, et STAT1 est libéré dans l'espace nucléaire. Etant donné que les enzymes HDAC ne sont pas requise pour la modification des histones et la restructuration de la chromatine, nous pouvons envisager une autre fonction. L'activité HDAC de NuRD pourrait être requise alors pour maintenir STAT1 sous forme déacétylée, et ainsi prévenir ce décrochage (Figure 25). De plus, il a été montré que l'acétylation de STAT1 est concomitante du recrutement de CBP/p300, une histone acétyl-transférase (HAT) nécessaire au recrutement de l'ARN polymérase II (Krämer et al., 2006). Il est donc possible que la simple absence de cette HAT, par non recrutement et inaccessibilité à l'ADN, suffise à garder STAT1 déacétylée, et donc accroché à la chromatine. Afin de déterminer le rôle des HDAC dans le blocage de la voie STAT1 via TgIST, il serait intéressant de réaliser des expérimentations de ChIP comme décrit précédemment (JEM Figure 7), mais en mettant les cellules en présence d'inhibiteurs de HDAC.

La séquestration de STAT1 à la chromatine au sein d'un complexe de répression de la transcription opérée par le parasite est un procédé intéressant. En effet, en absence d'IFNγ, le parasite promeut la formation de ce complexe par export de TgIST, qui induit à son tour la phosphorylation de STAT1 et le recrutement de NuRD. Ce procédé permet de bloquer les promoteurs des gènes induits par l'IFNγ avant toute stimulation. Ainsi, une fois les cellules stimulées, les promoteurs devant être activés sont déjà bloqués, et la transcription génique ne peut plus se faire. Ceci permet au parasite de bloquer l'activation des cellules, et ainsi d'augmenter sa survie intracellulaire (JEM Figure 8).

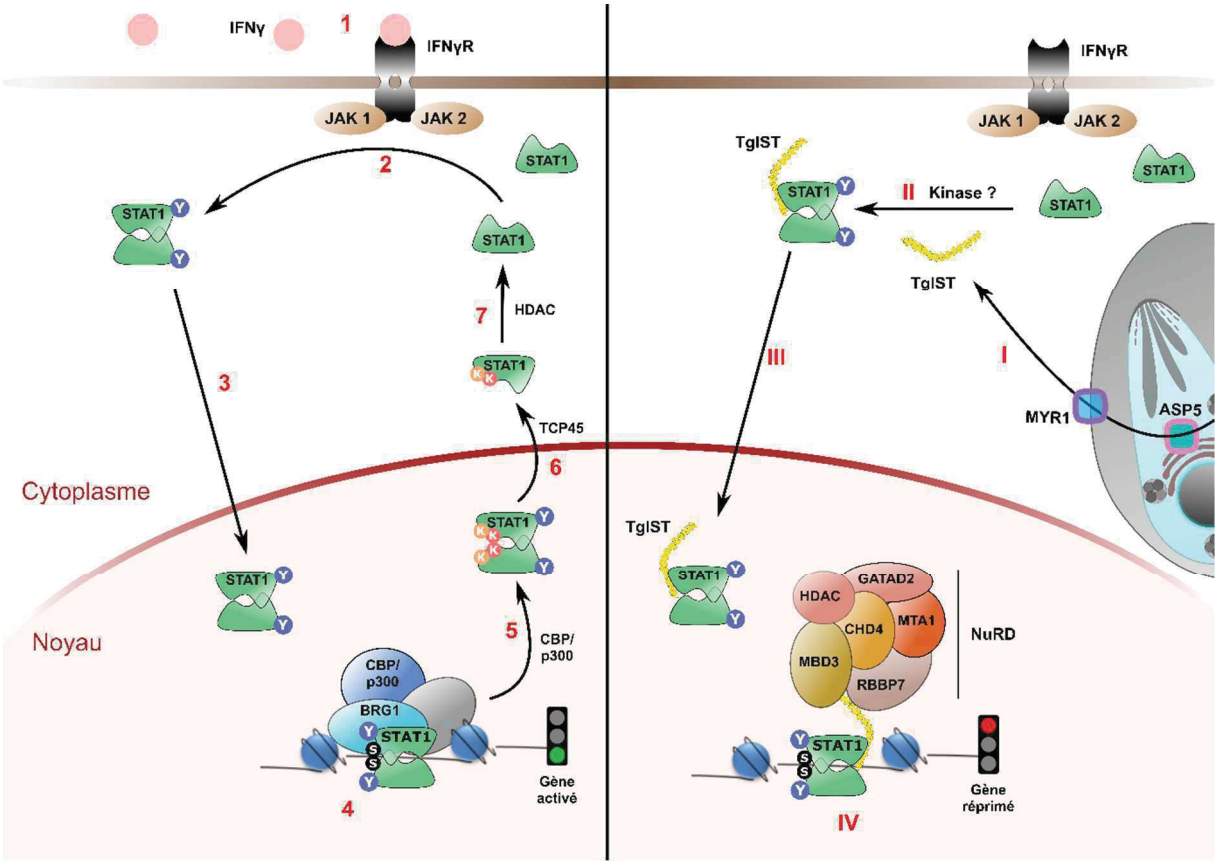


Figure 25 : Proposition d'un modèle pour le mécanisme d'action de TgIST

Panel de gauche : cycle d'activation classique de la voie STAT1. (1) L'IFNγ se lie à son récepteur, ce qui active les kinases associées JAK1 et JAK2. (2) STAT1 est recruté et phosphorylé en tyrosine (Y) par les kinases JAK, ce qui induit sa dimérisation. (3) Le dimère de STAT1 entre dans le noyau. (4) STAT1 se lie aux séquences GAS spécifiques, subit une phosphorylation en sérine (S), différents cofacteurs sont recrutés pour permettre la transcription des gènes. (5) CBP/p300 acétyle les résidus lysine (K) 410 et 413 de STAT1, ce qui provoque le décrochage de l'ADN. (6) TCP45 déphosphoryle STAT1, entraînant son export dans le cytoplasme. (7) STAT1 est déacétylé par une HDAC cytoplasmique, ce qui permettra un nouveau cycle d'activation.

Panel de droite : blocage via TgIST. (I) TgIST est exporté dans la cellule hôte de façon dépendante de ASP5 et de MYR1. (II) TgIST permet la phosphorylation en tyrosine (Y) de STAT1 en absence d'IFNγ par un mécanisme inconnu. (III) Le complexe STAT1-TgIST est importé dans le noyau de la cellule. (IV) Le complexe NuRD est recruté par TgIST, STAT1 se lie aux séquences GAS, et la transcription des gènes est bloquée.

Pour conclure, cette étude nous a permis d'identifier l'effecteur responsable du blocage de la voie IFNγ, TgIST. Cet effecteur joue un rôle primordial dans le contrôle du système immunitaire de l'hôte, puisqu'il permet de bloquer l'activation des cellules naïves infectées par le parasite. Nous avons montré que l'export de TgIST dans la cellule hôte nécessite la protéase ASP5, tout comme pour d'autres effecteurs (GRA16 , GRA24) (Curt-Varesano et al., 2016). Chez *Plasmodium falciparum*, la protéine Plasmepsin V, un homologue de ASP5, est nécessaire à l'export de protéines parasitaires, et clive directement celles-ci sur une séquence spécifique appelée PEXEL. Chez *Toxoplasma gondii*, des séquences similaires, appelées TEXEL sont retrouvées dans certains effecteurs exportés, comme GRA16. Concernant GRA24, la protéine ne contient pas de motif TEXEL, mais il a été démontré que son export dans la cellule hôte nécessite ASP5 (Curt-Varesano et al., 2016). ASP5 est apparemment essentielle à l'export de TgIST (JEM, Figure 1 D), mais son activité est indépendante du motif TEXEL identifié dans sa séquence (JEM, Figure 1 A) puisque la version mutée du TEXEL prédit (RRL => AAL) ne compromet pas l'export de TgIST (données non-montrées). Le rôle de ASP5 bien qu'essentiel à l'export de TgIST est à l'image de GRA24, indépendant de la présence/maturation d'un motif TEXEL.

Le blocage de l'expression des gènes médié par TgIST est majoritairement dépendant de STAT1. Cependant, nous avons observé qu'en absence de STAT1, quelques gènes sont induits dans les cellules infectées par les parasites *ΔTgIST* comme *IFIT1, IFIT 2 et IFITM* (JEM Figure 5 A). Ceci montre que concernant certains gènes, la répression par TgIST s'effectue par un mécanisme différent, indépendant de STAT1. De plus amples recherches sont nécessaires pour révéler ce mode d'action.

Nous avons pu observer que malgré le polymorphisme présent sur la séquence de TgIST, cet effecteur a le même effet sur la cellule hôte quel que soit son origine génétique. En effet, TgIST permet au parasite de bloquer la voie IFNγ dans les cellules non-activées. D'autres effecteurs, comme ROP16 ou GRA15, ont des actions spécifiques selon les souches (Rosowski et al., 2011; Saeij et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier la fonction de TgIST dans le contexte d'une sécrétion séquentielle ou concomitante de plusieurs effecteurs et ainsi peut-être révéler de potentiels antagonismes ou synergies des effecteurs entre eux sur la régulation des transcriptomes des cellules infectées. Si la découverte des effecteurs exportés au-delà de l'espace vacuolaire a permis de lever le voile sur une dimension nouvelle de la régulation de l'(épi)génome de la cellule hôte, les limites et les restrictions de ces régulations restent encore inconnues.

MATERIEL ET METHODE

1. Souches parasitaires et lignées cellulaires

1.1. Les parasites

Les souches utilisées dans ce document sont RH*Δku80*, Pru*Δku80*, COUG, et une souche du parasite *Neospora caninum*.

Les souches RH*Δku80* et Pru*Δku80* sont dérivées des souches parentales RH et PRU, dans lesquelles le système ku80 a été enlevé (Fox et al., 2009, 2011), rendant possible l'étiquetage de gènes spécifiques (Huynh and Carruthers, 2009).

Enfin, la souche COUG est issue de l'isolation clinique des parasites ayant causé une épidémie en Colombie Britannique, en 1995 (Aramini et al., 1998). La souche nous a été fournie par le docteur M. Griegg (Laboratory of parasitic diseases, NIH, Etats-Unis d'Amérique).

Les diverses souches de parasites sont maintenues par passages successifs sur des tapis cellulaires de HFF.

1.2. Les cellules hôtes

1.2.1. Lignées cellulaires utilisées

Les cellules HFF sont des fibroblastes primaires adhérents issus de la peau, et servent aux passages successifs des parasites. Les cellules sont cultivées en monocouches, et doivent régulièrement être rediluées et subir des « passages ». D'un passage à l'autre, les cellules doivent être rincées 3 fois au PBS1x, puis mises en présence de trypsine, qui va permettre de dissocier les cellules. Une fois diluées, les cellules sont mises en culture dans des flasques 175 cm^2.

Les cellules RAW 264.7 (abrégé dans le document RAW) sont une lignée cellulaire murine adhérentes, de type monocyte/macrophages, établie à partir d'une tumeur induite par un virus (Abelson murine leukemia virus). D'un passage à l'autre, les cellules doivent être raclées à l'aide de râteaux.

Les MEF (mouse ear fibroblast) sont des fibroblastes primaires murins. Ces cellules sont obtenues à partir d'oreilles de souris BALB/C femelles. Les tissus sont hachés et incubés une nuit en présence de 400 U/mL de collagénase de type II (Sigma) diluée dans du DMEM complet, à 37°C, 5% CO2. Cette étape va permettre la dissolution de la matrice extracellulaire, et donc la séparation des cellules. Les cellules sont ensuite détachées des tissus digérés par pipetages répétés, et passées à travers un filtre de 70 µm, afin d'éliminer les gros déchets

tissulaires. Les échantillons contenant les cellules sont ensuite centrifugés 5 minutes à 350g, et le culot est resuspendu dans du milieu DMEM complet, et mis en culture dans des flasques 175 cm^2 et incubés à 37°C, 5%CO2. Les cellules cultivées ainsi doivent être utilisées dans les premiers passages (jusqu'à passage 5, à partir duquel les cellules perdent leur capacité de division).

1.2.2. Protocole de culture

Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) complété. Les milieux doivent être complémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Invitrogen), qui doit être préalablement inactivé par incubation à 56°C pendant une heure. Le milieu est également complété avec 10 mM de tampon HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) pH 7,2 (Invitrogen), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), et 50 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont incubées à 37°C et à 5% de CO2.

2. Construction des souches

2.1. Les vecteurs

2.1.1. pLIC

La technique de pLIC (pour Ligation Independent Cloning) est une alternative au clonage par enzymes de restriction (Figure 26). Dans notre cas, cette technique va nous permettre d'étiqueter un gène en C terminal en le laissant sous le contrôle de son promoteur endogène. Le gène d'intérêt est amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique du parasite, grâce à des oligonucléotides contenant des séquences spécifiques au LIC. L'insert est ensuite traité avec l'ADN polymérase T4 (Novagen, ref 69197) en absence de dNTP, mais seulement de dCTP. Dans ces conditions, l'enzyme ne peut effectuer la réaction de polymérisation, et va avoir à l'inverse une activité 3'-5' exonucléase. Du fait de la présence de dCTP, l'activité d'excision va cesser une fois le premier nucléotide C rencontré, l'enzyme est à l'arrêt. Après digestion du vecteur, il est traité par la même enzyme, en présence de dGTP, afin de créer des brins complémentaires à celui de l'insert. Les parties s'assemblent sans besoin de ligation, et le vecteur transformé en bactérie est assemblé et amplifié.

Le vecteur ainsi complet est linéarisé par un site unique se trouvant dans la séquence du gène d'intérêt, et est transfecté dans une souche Δ*ku80*. Ce système permet normalement la recombinaison non homologue ; dans les souches Δ*ku80*, le seul système de réparation existant est celui de la recombinaison homologue. Dans notre cas, le parasite pourra intégrer le vecteur linéarisé au locus du gène d'intérêt, et ainsi permettre le marquage endogène.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés (les séquences en bleu correspondent à la partie LIC) :

LIC-TgIST-FWD :

5'- TACTTCCAATCCAATTTAGCTCGTCCGACCGCGGACGTCGTTCTCCTG -3'

LIC-TgIST-REV :

5'- TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGACCCGCCGTTCACTACTCGGCGGCCGGCG -3'

LIC-TgISTpromGene-FWD :

5'- TACTTCCAATCCAATTTAGCTCACGGACGACTGGCAAGACACAGAATG -3'

LIC-TgISTpromGene-REV :

5'- TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGACCCGCCGTTCACTACTCGGCGGCCGGCG -3'

LIC-TgIST-C-FWD :

5'- TACTTCCAATCCAATTTAGCCTCCGGATATGGATACCTCTTTCAC -3'

LIC-TgISTC394-REV :

5'- TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGATTTCTTTGCCTGTCCGGATAGGCG -3'

LIC-TgISTC576-REV :

5'- TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCTTGGCGATGCCACGCGACGGCTCTC -3'

LIC-TgISTC755-REV :

5'- TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCTGCCTCAAGACGCTCTGTCCAGGTAAG -3'

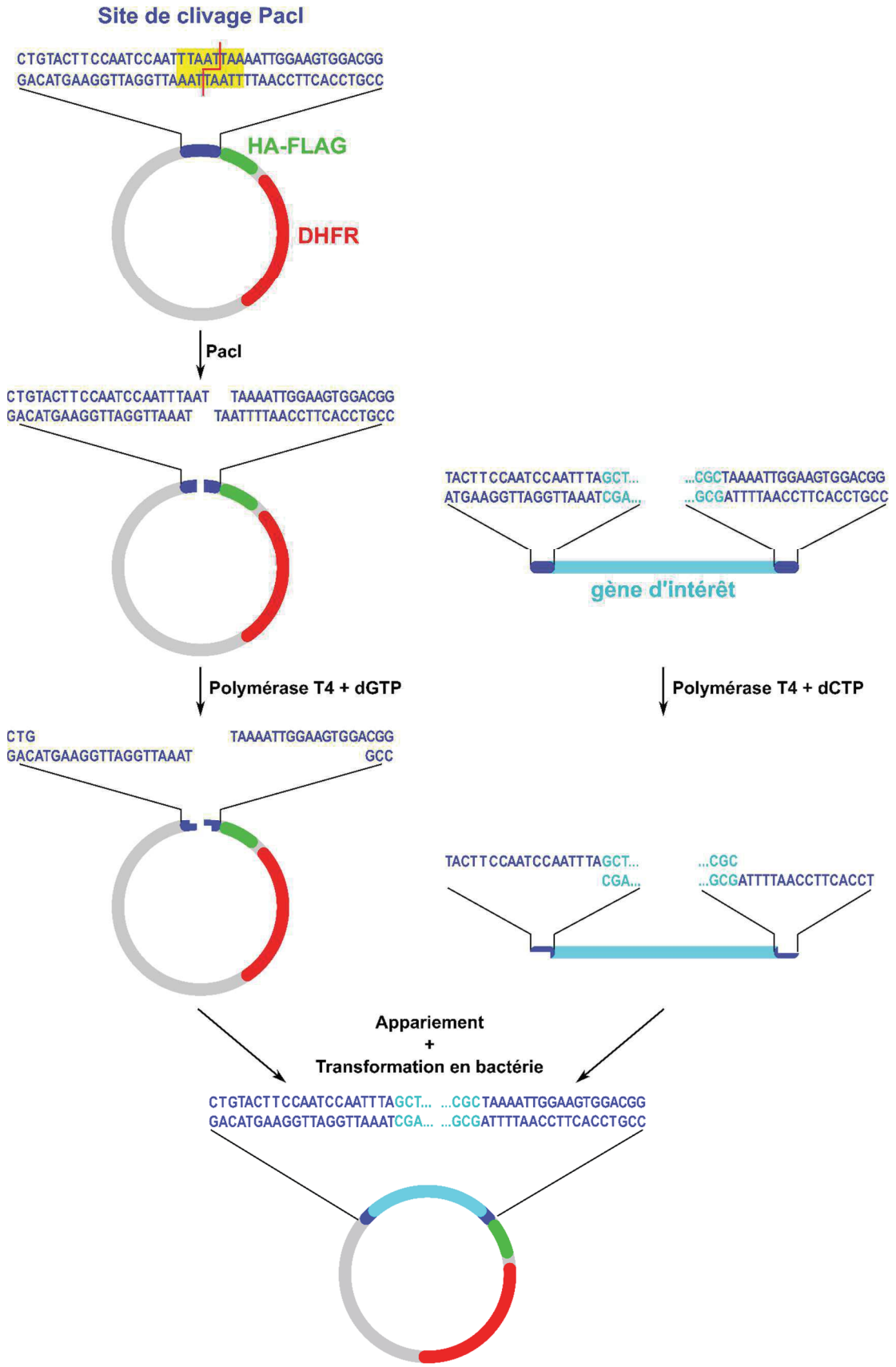


Figure 26 : Principe du pLIC

2.1.2. CRISPR/Cas9

La Cas 9 est une endonucléase d'ADN double brin guidée par ARN., et est associée aux courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées (CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats). A l'origine, ce système appartient à l'immunité adaptative de certaines bactéries, dont *Streptococcus pyogenes*, et détecte l'ADN étranger pour le cliver via une séquence de 20 nucléotides complémentaires (Figure 27).

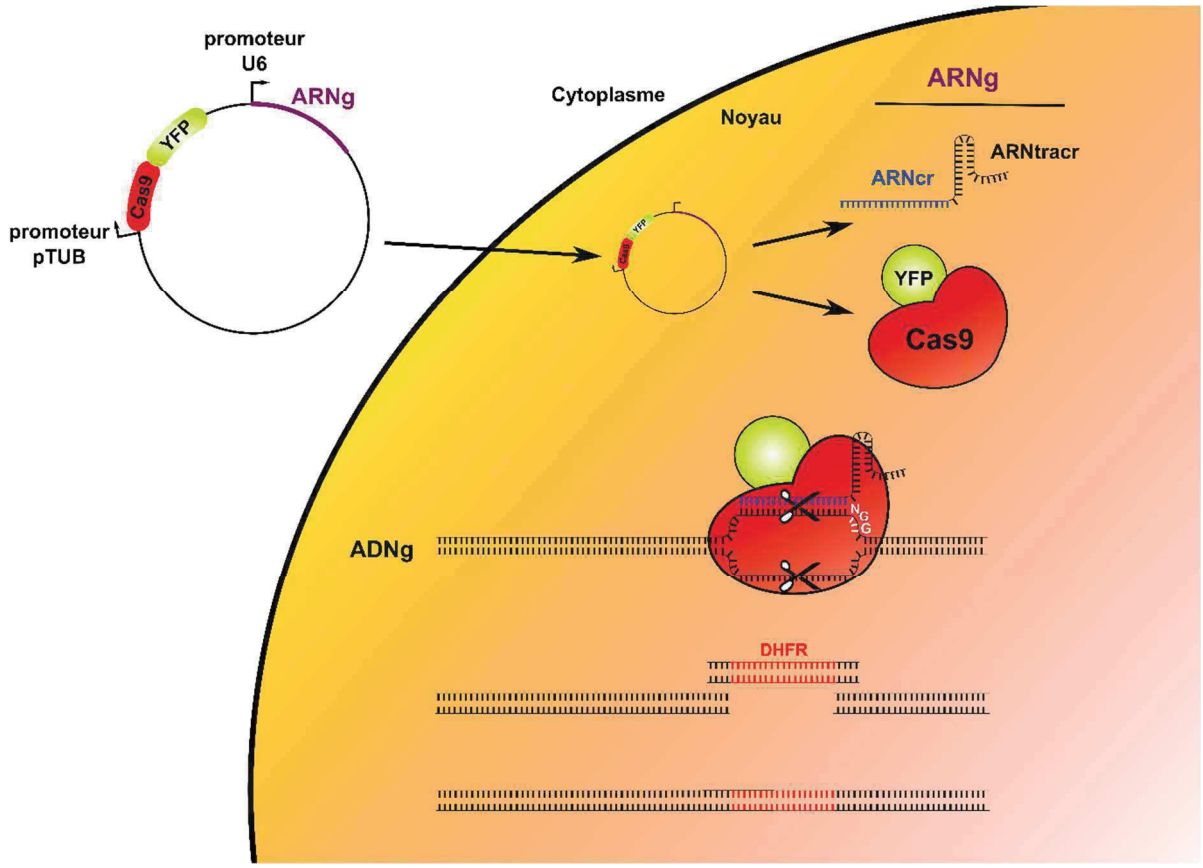


Figure 27 : Principe du CRISPR/Cas9
Le vecteur CRISP contenant la séquence spécifique d'ADN correspondant à l'ARN guide et la séquence codant pour la DHFR (en rouge) flanquée de régions homologues sont transfectés ensemble dans les parasites. L'ARN guide est transcrit dans la cellule par l'ARN polymérase III, la Cas9 est produite et s'assemble avec l'ARN guide. Le complexe rejoint le noyau de la cellule, l'ARN se fixe à la séquence cible par complémentarité, et l'enzyme clive l'ADNg sur ses 2 brins. L'ADN codant pour la DHFR intègre l'ADNg grâce aux séquences flanquantes homologues.
ADNg : ADN génomique ; ARNg : ARN guide ; ARNcr : ARN complémentaire ; ARNtracr : ARN de structure

La technique de CRISPR/Cas9 est utilisée en biotechnologies pour modifier l'ADN de façon irréversible. La séquence guide est composée de 20 nucléotides précédant une séquence PAM (protoscaper adjacent motif) composé du trio NGG, ou N représente l'un des 4 nucléotides présent dans l'ADN. La séquence guide doit préférentiellement commencer par un G, afin de permettre une meilleure transcription par le promoteur U6 (Figure 27), reconnu par l'ARN polymérase III.

La première étape consiste à phosphoryler les oligonucléotides afin d'optimiser la liaison au vecteur. La phosphorylation est assurée par l'enzyme T4 polynucleotide kinase (Invitrogen, ref 18004-010). Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, et arrêt de la réaction par incubation 10 minutes à 65°C. La dénaturation de l'enzyme et l'assemblage des oligonucléotides phosphorylés s'effectue par ajout de tampon NaCl/EDTA (10x), durant un programme qui descend progressivement de 95°C à 25°C à raison de 1°C de perte toutes les 30 secondes. Après dilution au 1/50 des oligonucléotides phosphorylés, ils sont ajoutés au vecteur digéré CRISPR/Cas 9, en présence de la T7 DNA ligase (New England Lab, ref M0318L), et le mélange est incubé à 25°C pendant 1 heure. Le mélange est ensuite transformé en bactéries compétentes : après incubation des bactéries et du mélange dans la glace pendant 30 minutes, les bactéries sont plongées pendant 40 secondes dans un bain-marie à 42°C. Ce choc thermique va permettre l'entrée du vecteur dans la bactérie par l'altération de ses membranes. Après récupération pendant quelques minutes sur la glace, les bactéries sont préincubées dans un milieu riche pendant 30 minutes environ, puis étalées sur boîtes de pétri contenant du LB-Agar et de l'ampicilline à 100 µg/mL. Après une croissance de quelques heures, des colonies apparaissent, et doivent être testées pour la présence du vecteur ou non. Les colonies positives sont amplifiées et le vecteur est purifié par Midiprep (Macherey-nagel, ref 740410.50).

Le vecteur comprenant la Cas 9 et l'ARN guide est transfecté dans le parasite en même temps que la séquence codante pour la cassette de résistance DHFR, flanquée de séquences homologues pour permettre l'intégration au site de coupure. Ce processus résulte en la délétion totale du gène d'intérêt.

Les oligonucléotides suivant ont été utilisés :

TgIST-CRISP-FWD :

5'- **AAGTT**GTTCTCGCAGGAGCTCCTCT**G** -3'

TgIST-CRISP-REV :

5'- **AAAAC**AGAGGAGCTCCTGCGAGAAC**A** -3'

Les séquences en gras correspondent au site de coupure *Bsa*I.

TgIST-DHFR-FWD :

5'- GGACCCAGTTCTGTGGGCCGTGGAAGCCCGGGCTTCGCCAGGCTGTAAATCCCGTG -3'

TgIST-DHFR-REV :

5'- CTGCCCGCAAATGCATCCACCCACTAGACCCGGAATTCATCCTGCAAGTGCATAG -3'

DHFR-FWD :

5'- GCTTCGCCAGGCTGTAAATCCCGTG -3'

DHFR-REV :

5'- GGAATTCATCCTGCAAGTGCATAG -3'

2.2. Transfection transitoire

L'intérêt d'une transfection transitoire est qu'elle ne nécessite pas de sélection, et le processus est donc rapide. La transfection a lieu à J0 (jour de l'expérimentation), puis les parasites infectent les tapis cellulaires pendant une nuit. Les immunofluorescences sont réalisées le lendemain, à J1.

Afin d'assurer un bon taux de transfection, les parasites doivent être fraîchement lysés. L'équivalent d'une flasque 25 cm^2 est récupéré et centrifugé à 900 xg pendant 7 minutes. Ensuite, le culot de parasites est délicatement resuspendu et lavé dans une solution de cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl2, 10 mM KH2PO4/KH2PO4 à pH 7,6, 25 mM HEPES à pH 7.6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl2). Après une nouvelle centrifugation, les parasites sont dilués du cytomix. Le volume utilisé pour cette dilution varie selon les souches. Ainsi, une flasque 25 cm^2 de parasites RH*Δku80* contient beaucoup de parasites, et la dilution sera effectuée dans un volume d'environ 400 µL. La souche de type 2 est diluée dans environ 300 µL. Enfin, la souche COUG étant plus fragile, les parasites sont repris dans seulement 200 µL de cytomix.

Environ 150 µL de parasites resuspendus sont ensuite mélangés délicatement à l'ADN à transfecter. La quantité d'ADN nécessaire varie selon l'utilisation nécessaire. Dans le cas de nos transfections transitoires, nous avons transfecté environ 90 µg d'ADN circulaire. Une fois le mélange parasite-ADN prêt, celui-ci est transféré rapidement dans une microcuve de 2 mm (MBP, ref 5520), et subit une électroporation à 1100 V, 25 ohm et 25 F, dans un appareil BTX ECM 630 (Harvard Apparatus). Parce que le voltage requis n'est pas atteint en un seul choc, 2 chocs successifs sont nécessaires. Les parasites sont ensuite directement transférés sur

des tapis cellulaires disposés sur des lamelles, en plaque 4 puits. Au temps désiré, après 24 heures dans notre cas, des immunofluorescences sont réalisées.

2.3. Transfection stable

Afin de modifier de manière permanente les différentes souches, des transfections stables ont été réalisées. La préparation des parasites est la même que pour les transfections transitoires, mais la différence réside dans le mélange à l'ADN et le devenir des parasites. En effet, dans le cas du CRISPR/Cas 9, en plus du vecteur, des cassettes de sélections doivent être transfectées, pour permettre la sélection des parasites les ayant intégrés. Dans notre cas, nous avons généré la cassette de résistance à la DHFR par PCR, avec des régions adjacentes ou non du gène d'intérêt selon la souche utilisée. En effet, les souches Δ*ku80* favorisent fortement la réparation homologue, et l'ajout de régions adjacentes permet d'optimiser l'intégration de la cassette. En revanche, les souches 76K et COUG possèdent en plus le système de réparation non homologue. Dans ce cas, l'intégration au site est plus difficile, et ne nécessite pas de régions adjacentes. La co-transfection du vecteur CRISPR/Cas 9 et de la cassette DHFR se fait avec un ratio d'environ 1 pour 10, en faveur du vecteur. Le principe est que statistiquement, toute cellule ayant reçu la cassette DHFR aura aussi reçu le vecteur. Concernant le vecteur LIC, la recombinaison au site n'est permise que dans le cas d'une souche Δ*ku80*.

Après l'électroporation, les parasites sont incubés en flasque 25 cm^2 sur un tapis de cellules HFFs (P0, ou passage 0). Dans la plupart des cas, 24 heures plus tard, le tapis est lysé, et les parasites sont centrifugés 7 minutes à 900 xg, puis remis dans une nouvelle flasque 25 cm^2 de HFF avec 1 µM de pyriméthamine (Fluka, ref 46706), ce qui constitue le P1. Dans le cas des parasites COUG, 24 heures ne suffisent pas pour passer du P0 au P1 ; le milieu de culture est changé délicatement pour un nouveau milieu contenant la pyriméthamine à 1 µM. A partir de l'ajout de pyriméthamine, la croissance de la culture parasitaire est ralentie en raison de la mort des parasites n'ayant pas intégré la cassette de résistance. A partir de P5, les parasites sont régulièrement testés ; par immunofluorescence dans le cas de l'étiquetage endogène (pLIC), ou par PCR au locus d'intérêt après extraction d'ADN dans le cas de la délétion du gène (CRISPR/Cas 9). Une fois la confirmation d'une certaine proportion de la population correctement transfectée, les parasites sont sélectionnés par processus de dilution limite. A partir d'une flasque 25 cm^2 lysée, et par dilutions successives, les parasites sont ensemencés en plaque 96 puits, afin qu'elles contiennent théoriquement 1 parasite par puits. Après incubation des plaques à 37°C, 5% CO2, pendant 8 jours, les plaques sont examinées au microscope, et les puits contenant une plage de lyse unique sont sélectionnés. Après lyse

totale, les parasites issus de ces puits sont remis en culture, et sont testés en immunofluorescence ou par PCR.

De cette façon, les souches suivantes ont été élaborées : RH*Δku80ΔTgIST,* RH*Δku80*-ASP5-TY – TgIST-HA-FLAG*,* RH*Δku80Δasp5-P*$_{TgIST}$*-TgIST-HA-FLAG,* Pru*Δku80*-TgIST-HA-FLAG, Pru*Δku80ΔTgIST,* Pru*Δku80-TgIST-C394,* Pru*Δku80-TgIST-C576,* Pru*Δku80-TgIST-C755* 76KGFP/LUC*ΔTgIST,* COUG*ΔTgIST,* COUG*Δmyr1.*

3. Les techniques

3.1. Extraction d'ADN génomique

Les parasites issus d'une ou deux flasques 25 cm^2 fraichement lysés sont centrifugés à 900 xg pendant 7 minutes. Le culot est repris dans 500 µL de tampon de lyse (20% de glycérol, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 0,5% NPO4, 100 mM PMSF, soit du fluorure de phénylméthylsulfonyle), complété avec 0,5 mM de DTT (dithiotréitol) (Euromedex, ref EU0006-D) et un inhibiteur de protéase à 1x (Roche, ref26733200). Ensuite, 500 µL de solution de phénol/chloroforme sont ajoutés, et le mélange est vortexé. Après centrifugation 10 minutes à 900 xg, la phase aqueuse contenant l'ADN est conservée, et va être précipitée. Environ un dixième du volume récupéré est ajouté en sodium acétate à 3 M (40 µL pour 400 µL de volume récupéré), et après mélange au vortex, environ 2 volumes d'éthanol 100% froid est ajouté. Les échantillons sont ensuite placés au froid, soit à -20°C pendant une nuit, soit 1 heure à -80°C. A ce stade, l'ADN peut être visible sous forme de précipita blanc. L'ADN est récupéré par centrifugation à 20 000 xg, pendant 1 heure, à 4°C. Une fois l'ADN sous forme de culot, ce dernier est lavé deux fois par de l'éthanol 70% froid, afin d'éliminer les résidus de sels encore présents. Enfin, après centrifugation 10 minutes à 7 500 xg, les culots sont séchés environ 10 minutes à l'air libre, puis repris dans un volume d'eau stérile adéquat (environ 50 µL).

3.2. Traitement aux HDACi

Les divers inhibiteurs d'histones déacetylase ont été dilués dans du DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma, ref D2438). Les différents inhibiteurs sont dilués aux concentrations suivantes : FR-235222 à 90 nM, trichostatin A à 100 nM, et sodium butyrate à 2 µM. Les cellules HFFs ont été infectées pendant 12 heures avec les parasites, puis les différents composés inhibiteurs ont été ajoutés au milieu de culture pendant 10 heures. Enfin, 6 heures avant la fin, les cellules ont été également traitées avec de l'IFNγ humain (100 U/mL) (Roche, ref 11040596001). Les cellules sont ensuite fixées pour réaliser des immunofluorescences.

3.3. Immunofluorescence

L'immunofluorescence nous permet de marquer spécifiquement des antigènes donnés et de les visualiser par microscopie à fluorescence. Les cellules sont ensemencées sur des lamelles positionnées dans des plaques 4 puits, contenant du milieu de culture, et mises à l'incubateur à 37°C, 5% CO2 jusqu'à utilisation. Les cellules sont infectées ou non selon les conditions désirées, puis au temps voulu, les cellules sont rincées avec du PBS 1x (Gibco, ref 14190-094), puis fixées 20 minutes à température ambiante grâce à une solution de PBS contenant 3% de formaldéhyde (Sigma, ref F8775). Les cellules ainsi fixées sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS-Triton X100 0.1% (Sigma, ref T8787) - BSA1% (Sigma, ref A9418) pendant 10 minutes à température ambiante, permettant ainsi la pénétration des différents réactifs à travers les membranes cellulaires. L'étape suivante consiste à saturer les cellules avec une solution de PBS-BSA 3% pendant une heure à température ambiante, et ce pour masquer les épitopes et ainsi réduire les associations non-spécifiques. Les échantillons sont ensuite incubés avec les solutions d'anticorps primaires souhaités pendant une heure à température ambiante, puis incubés avec une solution contenant les anticorps secondaires couplés avec des fluorophores Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594 dilués au 1/1000ème . Les noyaux des cellules et des parasites sont colorés pendant 10 minutes à température ambiante avec du Hoechst 33258 à 2 µg/mL (Life, ref H3570) dans du PBS. Après 4 lavages au PBS, les lamelles ont été montées sur des lames avec du milieu de montage Mowiole (EMD millipore, ref 475904). Les images ont été prises grâce à un microscope à fluorescence (Axio Imager2_apotome ; Zeiss).

Anticorps primaires :

HA (Roche, 3F10), IRF1 (Cell signaling Technology, D5E4), IRGb6 (fourni par le Dr J. Howard, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal).

Anticorps secondaires :

AlexaFluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen, ref A11001), AlexaFluor 594 goat anti-mouse (Invitrogen, ref A11005), AlexaFluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, ref A11008), AlexaFluor 594 goat anti-rabbit (Invitrogen, ref A11012)

3.4. Quantification de fluorescence

Une fois les images de microscopie prises, la fluorescence dans les noyaux des cellules hôtes a été quantifiée grâce au logiciel de microscopie Zeiss (ZENBlue). Un cercle de la taille des noyaux délimite ceux-ci, et permet d'enregistrer les niveaux de fluorescence de chaque canal. L'opération est répétée pour chaque noyau de cellule hôte infectée. Afin de prendre en considération la fluorescence parasite, 3 mesures par champs sont positionnées hors de tout

marquage spécifique. Ces valeurs sont retranchées pour chaque champ aux valeurs de fluorescence du canal correspondant. La totalité des valeurs est ensuite insérée dans le logiciel PRISM6/GraphPad, qui permet l'élaboration des graphiques en nuages de points. La moyenne et la déviation standard sont indiquées pour chaque conditions.

3.5. Les RTqPCR

3.5.1. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est une étape délicate, puisque les ARNs sont très sensibles à la dégradation. Avant toute expérimentation impliquant de l'ARN, les plans de travail ainsi que le matériel utilisé doivent être désinfectés avec une solution de RNAse (Ambion, ref AM9782), permettant de dégrader toute enzyme de dégradation des ARN éventuellement présentes. Ces conditions, qualifiées de « RNAse free », doivent être maintenues tout au long de la manipulation.

Dans nos expérimentations, nous avons utilisé des tapis cellulaires (HFFs ou RAWs) infectés avec les diverses souches de parasites. Après infection d'une nuit, et traitement ou non des cellules avec des substances comme l'IFNγ, les tapis cellulaires infectés sont rincés une fois au PBS1x (Gibco, ref 14190-094), et récoltés grâce à un râteau. Après centrifugation 5 minutes à 400 xg, du TriZol (Ambion, ref 15596018) est ajouté, le volume étant ajusté en fonction de l'échantillon de départ. Dans nos expérimentations, 1 mL de Trizol est ajouté à une flasque 75 cm^2 de cellules HFFs ou à une flasque 25 cm^2 de cellules RAW. Le TriZol étant toxique et irritant, ces étapes se déroulent sous hotte chimique. Les culots de cellules sont resuspendus plusieurs fois pour permettre également une lyse mécanique. Le TriZol est composé de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, ce dernier étant un inhibiteur de RNAses. Après incubation de 5 minutes, environ 1/5ème de volume de chloroforme (Chimie +, ref 40022) est ajouté (environ 200 µL dans notre cas), et les tubes sont fortement secoués (et non vortexés) pendant quelques secondes, puis incubés 2 à 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation 15 minutes à 12 000 xg, la phase supérieure est prélevée (environ 400 µL), mélangée par vortex à 500 µL d'isopropanol 100% (Carlo ARBA, ref 415154), et incubée 10 minutes. Après centrifugation 10 minutes à 12 000 xg, le culot est lavé 2 fois à l'éthanol 75%, et après séchage, repris dans environ 30 µL d'eau stérile (Invitrogen, ref 10977-035).

3.5.2. Rétrotranscription

La rétrotranscription a été réalisée à partir des ARN précédemment extraits, grâce à un kit commercial Taqman (Applied Biosystem, ref 4366596) . Brièvement, 2 µg d'ARN sont utilisés, et mis en présence d'enzyme de rétrotranscription 20x, de tampon de solution 2x et d'eau,

dans un volume final de 20 µL. Le mélange est ensuite placé à 37°C pendant 1 heure, et la réaction est arrêtée par une étape d'inactivation de l'enzyme 5 minutes à 95°C. Une fois la réaction finie, les échantillons sont dilués dans un volume final de 50 µL environ. L'ADN complémentaire (ADNc) ainsi généré sera utilisé comme matrice pour les PCR quantitatives.

3.5.3. RTqPCR

Le principe de la PCR quantitative en temps réel consiste à évaluer la quantité d'ADNc dans chaque échantillon, reflétant elle-même la quantité d'ARN des échantillons de départ, et donc l'expression génique des cellules infectées. Une sonde spécifique correspondant au gène recherché est ajoutée à l'ADNc, et se lie à celui-ci. Grâce à une polymérase, l'ADNc va être amplifié sur le principe de la PCR, et la progression va être suivie et quantifiée en temps réel. En effet, la sonde Taqman possède un fluorophore, ainsi qu'un désactivateur (ou « quencher »). Quand ces 2 éléments sont proches physiquement, soit quand la sonde est intacte, le fluorophore est inhibé, et le signal n'est pas produit. Lors de l'élongation, la polymérase dégrade la sonde hybridée, libérant ainsi le fluorophore, qui au contact de la lumière, émet une fluorescence, qui est détectée par le thermocycleur. La quantité de sonde hybridée est donc directement liée à la fluorescence détectée par l'appareil.

Pour ce protocole, le kit Taqman (Applied Biosystem, ref 4369016) a été utilisé. Les réactions s'effectuent en plaques 96 puits (Applied Biosystem, ref 4346906), suivant un schéma de plaque établi au préalable par l'utilisateur. Il est nécessaire de prévoir pour chaque sonde, un échantillon de référence (dans notre cas, les cellules non infectées, non stimulées), ainsi qu'un contrôle négatif où l'échantillon est remplacé par de l'eau. De plus, une série de réactions doit être attribuée pour chaque plaque 96 puits à une sonde de référence (β2 microglobuline dans notre cas). Les réactions ont été réalisées en duplicats. Les réactions nécessitent chacune 10 µL de mix (contenant enzyme, nucléotides, et tampon), 1 µL de sonde, et 5 µL d'eau stérile. Après dispersion de 16 µL par puits, 4 µL d'ADNc sont répartis dans les puits adéquats, et ce pour toutes les sondes souhaitées. Les plaques sont ensuite scellées par un film plastique (Applied Biosytem, ref 4311971), et centrifugées quelques secondes à 500 xg. Enfin, les plaques sont insérées dans le thermocycleur, et le programme est lancé. Il se compose d'une phase de dénaturation initiale avec une étape à 50°C pendant 2 minutes, puis à 95°C 10 minutes, et enfin de 40 cycles répétés comprenant la dénaturation (95°C, 15 secondes), et l'hybridation et l'élongation (60°C, 1 minute).

Les sondes utilisées sont les suivantes (Applied Biosystem) :

- Sondes humaines : Cxcl9 (Hs00171065_m1), Cxcl10 (Hs00171042_m1), Mx1 (Hs00895608_m1), GBP2 (Hs00894837_m1), β2microglobuline (Hs00984230_m1)

- Sondes murines : Cxcl9 (Mm00434946_m1), Cxcl10 (Mm00445235_m1), Mx1 (Mm00487796_m1), GBP2 (Mm004945576_m1), IRGb6 (Mm01295120_m1), β2microglobuline (Mm00437762).

Bibliographie

Abi Abdallah, D.S., Lin, C., Ball, C.J., King, M.R., Duhamel, G.E., and Denkers, E.Y. (2012). Toxoplasma gondii Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. Infect Immun *80*, 768–777.

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. Parasitology *103 Pt 3*, 321–329.

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. Immunity *9*, 143–150.

Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J., and Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J. Cell Biol. *77*, 72–82.

Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., and Dardé, M.-L. (2002). Genotype of 86 Toxoplasma gondii isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis. *186*, 684–689.

Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., and Dardé, M.L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in Toxoplasma gondii. International Journal for Parasitology *34*, 1185–1196.

Alaganan, A., Fentress, S.J., Tang, K., Wang, Q., and Sibley, L.D. (2014). Toxoplasma GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 1126–1131.

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

Andrade, W.A., Souza, M. do C., Martinez, E.R., Nagpal, K., Dutra, M.S., Melo, M.B., Bartholomeu, D.C., Ghosh, S., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2013). Combined action of Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors (TLRs) and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice. Cell Host Microbe *13*, 42–53.

Aramini, J.J., Stephen, C., and Dubey, J.P. (1998). Toxoplasma gondii in Vancouver Island Cougars (Felis concolor vancouverensis): Serology and Oocyst Shedding. The Journal of Parasitology *84*, 438.

Ashburn, D., Davidson, M.M., Joss, A.W., Pennington, T.H., and Ho-Yen, D.O. (1998). Improved diagnosis of reactivated toxoplasmosis. Mol Pathol *51*, 105–109.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science *317*, 666–670.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *18*, 767–811.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. Nature *384*, 641–643.

Bartošová-Sojková, P., Oppenheim, R.D., Soldati-Favre, D., and Lukeš, J. (2015). Epicellular Apicomplexans: Parasites “On the Way In.” PLoS Pathog. *11*, e1005080.

Becker, S., Groner, B., and Müller, C.W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. Nature *394*, 145–151.

Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K.A. (1994). The Toxoplasma gondii rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. J. Cell Biol. *127*, 947–961.

Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., and Vinkemeier, U. (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 10418–10423.

Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., and Sibley, L.D. (2011). Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 9631–9636.

Behnke, M.S., Fentress, S.J., Mashayekhi, M., Li, L.X., Taylor, G.A., and Sibley, L.D. (2012). The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence in Toxoplasma gondii by Regulating the Active Kinase ROP18. PLoS Pathog *8*.

Behnke, M.S., Khan, A., Lauron, E.J., Jimah, J.R., Wang, Q., Tolia, N.H., and Sibley, L.D. (2015). Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of Toxoplasma gondii. PLoS Genet *11*.

Bent, A.F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annu Rev Phytopathol *45*, 399–436.

Bernin, H., and Lotter, H. (2014). Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. J. Infect. Dis. *209 Suppl 3*, S107-113.

Bhardwaj, N., Rosas, L.E., Lafuse, W.P., and Satoskar, A.R. (2005). Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-γ signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1β by Leishmania mexicana. International Journal for Parasitology *35*, 75–82.

Bierly, A.L., Shufesky, W.J., Sukhumavasi, W., Morelli, A.E., and Denkers, E.Y. (2008). Dendritic Cells Expressing Plasmacytoid Marker PDCA-1 Are Trojan Horses during Toxoplasma gondii Infection. J Immunol *181*, 8485–8491.

Blackman, M.J., and Bannister, L.H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol. Biochem. Parasitol. *117*, 11–25.

Blader, I.J., Manger, I.D., and Boothroyd, J.C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in Toxoplasma gondii-infected human cells. J. Biol. Chem. *276*, 24223–24231.

Blader, I.J., Coleman, B.I., Chen, C.-T., and Gubbels, M.-J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later. Annual Review of Microbiology *69*, 463–485.

Blander, J.M., Sant’Angelo, D.B., Metz, D., Kim, S.-W., Flavell, R.A., Bottomly, K., and Janeway, C.A. (2003). A pool of central memory-like CD4 T cells contains effector memory precursors. J. Immunol. *170*, 2940–2948.

Bliss, S.K., Zhang, Y., and Denkers, E.Y. (1999). Murine neutrophil stimulation by Toxoplasma gondii antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. J. Immunol. *163*, 2081–2088.

Bliss, S.K., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2000). Rapid Recruitment of Neutrophils Containing Prestored IL-12 During Microbial Infection. The Journal of Immunology *165*, 4515–4521.

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

Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu Rev Plant Biol *60*, 379–406.

Bossi, P., and Bricaire, F. (2004). Severe acute disseminated toxoplasmosis. The Lancet *364*, 579.

Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M.-P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Bastien, O., Coute, Y., et al. (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.

Bouhet, S., Lafont, V., Billard, E., Gross, A., and Dornand, J. (2009). The IFNγ-induced STAT1-CBP/P300 association, required for a normal response to the cytokine, is disrupted in Brucella-infected macrophages. Microbial Pathogenesis *46*, 88–97.

Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., and Romani, L. (2002). Dendritic cells transport conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. J. Immunol. *168*, 1362–1371.

Brandão, G.P., Ferreira, A.M., Melo, M.N., and Vitor, R.W.A. (2006). Characterization of Toxoplasma gondii from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. Parasite *13*, 143–149.

Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Yogavel, M., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Hussain, T., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Pelloux, H., Tardieux, I., et al. (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.

Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science *303*, 1532–1535.

Brown, C.R., Hunter, C.A., Estes, R.G., Beckmann, E., Forman, J., David, C., Remington, J.S., and McLeod, R. (1995). Definitive identification of a gene that confers resistance against Toxoplasma cyst burden and encephalitis. Immunology *85*, 419–428.

Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., and Denkers, E.Y. (2001). Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. J. Immunol. *167*, 2193–2201.

Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., and Denkers, E.Y. (2011). Toxoplasma gondii Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. PLoS Pathogens *7*, e1002236.

Butler, N.J., Furtado, J.M., Winthrop, K.L., and Smith, J.R. (2013). Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. Clin. Experiment. Ophthalmol. *41*, 95–108.

Cai, G., Kastelein, R., and Hunter, C.A. (2000). Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to Toxoplasma gondii. Infection and Immunity *68*, 6932–6938.

Cannella, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Braun, L., van Rooyen, J.M., Bougdour, A., Bastien, O., Behnke, M.S., Curt, R.-L., Curt, A., Saeij, J.P.J., et al. (2014). miR-146a and miR-155 Delineate a MicroRNA Fingerprint Associated with Toxoplasma Persistence in the Host Brain. Cell Reports *6*, 928–937.

Canonne, J., and Rivas, S. (2012). Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription. Plant Signal Behav *7*, 217–221.

Car, B.D., Eng, V.M., Schnyder, B., Ozmen, L., Huang, S., Gallay, P., Heumann, D., Aguet, M., and Ryffel, B. (1994). Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. J. Exp. Med. *179*, 1437–1444.

Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. Eur. J. Cell Biol. *73*, 114–123.

Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by Toxoplasma gondii. Traffic *5*, 855–867.

Choi, J., Park, S., Biering, S.B., Selleck, E., Liu, C.Y., Zhang, X., Fujita, N., Saitoh, T., Akira, S., Yoshimori, T., et al. (2014). The Parasitophorous Vacuole Membrane of Toxoplasma gondii is Targeted for Disruption by Ubiquitin-like Conjugation Systems of Autophagy. Immunity *40*, 924–935.

Chong, A., Wehrly, T.D., Nair, V., Fischer, E.R., Barker, J.R., Klose, K.E., and Celli, J. (2008). The Early Phagosomal Stage of Francisella tularensis Determines Optimal Phagosomal Escape and Francisella Pathogenicity Island Protein Expression. Infect Immun *76*, 5488–5499.

Chow, B.W., and Gu, C. (2015). The molecular constituents of the blood-brain barrier. Trends Neurosci. *38*, 598–608.

Ciancanelli, M.J., Volchkova, V.A., Shaw, M.L., Volchkov, V.E., and Basler, C.F. (2009). Nipah virus sequesters inactive STAT1 in the nucleus via a P gene-encoded mechanism. J. Virol. *83*, 7828–7841.

Coffey, M.J., Sleebs, B.E., Uboldi, A.D., Garnham, A., Franco, M., Marino, N.D., Panas, M.W., Ferguson, D.J., Enciso, M., and T O'Neill, M. (2015). An aspartyl protease defines a novel pathway for export of Toxoplasma proteins into the host cell. Elife *4*.

Cohen, S.B., and Denkers, E.Y. (2015a). The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunology *37*, 108–117.

Cohen, S.B., and Denkers, E.Y. (2015b). Impact of Toxoplasma gondii on Dendritic Cell Subset Function in the Intestinal Mucosa. J Immunol *195*, 2754–2762.

Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Woude, G.F.V., Sher, A., and Taylor, G.A. (2001). Inactivation of Lrg-47 and Irg-47 Reveals a Family of Interferon γ–Inducible Genes with Essential, Pathogen-Specific Roles in Resistance to Infection. J Exp Med *194*, 181–188.

Collazo, C.M., Yap, G.S., Hieny, S., Caspar, P., Feng, C.G., Taylor, G.A., and Sher, A. (2002). The Function of Gamma Interferon-Inducible GTP-Binding Protein IGTP in Host Resistance to Toxoplasma gondii Is Stat1 Dependent and Requires Expression in Both Hematopoietic and Nonhematopoietic Cellular Compartments. Infection and Immunity *70*, 6933–6939.

Coombs, G.H., Goldberg, D.E., Klemba, M., Berry, C., Kay, J., and Mottram, J.C. (2001). Aspartic proteases of Plasmodium falciparum and other parasitic protozoa as drug targets. Trends Parasitol. *17*, 532–537.

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

Cristina, N., Dard►, M.L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M., and Ambroise-Thomas, P. (1995). A DNA fingerprinting method for individual characterization ofToxoplasma gondii strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. Parasitology Research *81*, 32–37.

Curt-Varesano, A., Braun, L., Ranquet, C., Hakimi, M.-A., and Bougdour, A. (2016). The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells: TgASP5 is essential for GRA16 and GRA24 export. Cellular Microbiology *18*, 151–167.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J. Exp. Med. *178*, 1041–1048.

Dardé, M.L. (1996). Biodiversity in Toxoplasma gondii. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *219*, 27–41.

Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science *264*, 1415–1421.

Davey, N.E., Seo, M.-H., Yadav, V.K., Jeon, J., Nim, S., Krystkowiak, I., Blikstad, C., Dong, D., Markova, N., Kim, P.M., et al. (2017). Discovery of short linear motif-mediated interactions through phage display of intrinsically disordered regions of the human proteome. FEBS J. *284*, 485–498.

David, M., Grimley, P.M., Finbloom, D.S., and Larner, A.C. (1993). A nuclear tyrosine phosphatase downregulates interferon-induced gene expression. Mol. Cell. Biol. *13*, 7515–7521.

Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., et al. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii. J. Immunol. *179*, 1129–1137.

Deckert-Schlüter, M., Buck, C., Weiner, D., Kaefer, N., Rang, A., Hof, H., Wiestler, O.D., and Schlüter, D. (1997). Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic Toxoplasma encephalitis. J. Neuroimmunol. *76*, 167–176.

Deckert-Schlüter, M., Bluethmann, H., Rang, A., Hof, H., and Schlüter, D. (1998). Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. J. Immunol. *160*, 3427–3436.

Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klümpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2013). Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 294–299.

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

Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Dardé, M.-L., Dei-Cas, E., and Houfflin-Debarge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a Toxoplasma gondii strain with an atypical genotype: case report and review. Prenat. Diagn. *30*, 902–905.

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., Martin, D., and 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.

Denkers, E.Y., Schneider, A.G., Cohen, S.B., and Butcher, B.A. (2012). Phagocyte Responses to Protozoan Infection and How Toxoplasma gondii Meets the Challenge. PLoS Pathogens *8*, e1002794.

Di Cristina, M., Marocco, D., Galizi, R., Proietti, C., Spaccapelo, R., and Crisanti, A. (2008). Temporal and spatial distribution of Toxoplasma gondii differentiation into Bradyzoites and tissue cyst formation in vivo. Infect. Immun. *76*, 3491–3501.

Dianzani, U., Luqman, M., Rojo, J., Yagi, J., Baron, J.L., Woods, A., Janeway, C.A., and Bottomly, K. (1990). Molecular associations on the T cell surface correlate with immunological memory. Eur. J. Immunol. *20*, 2249–2257.

Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996). Toxoplasma Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. Cell *84*, 933–939.

Dogga, S.K., Mukherjee, B., Jacot, D., Kockmann, T., Molino, L., Hammoudi, P.-M., Hartkoorn, R.C., Hehl, A.B., and Soldati-Favre, D. (2017). A druggable secretory protein maturase of Toxoplasma essential for invasion and egress. ELife *6*.

Doyle, E.L., Stoddard, B.L., Voytas, D.F., and Bogdanove, A.J. (2013). TAL effectors: highly adaptable phytobacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. Trends Cell Biol. *23*, 390–398.

Drevets, D.A., Dillon, M.J., Schawang, J.S., Van Rooijen, N., Ehrchen, J., Sunderkötter, C., and Leenen, P.J.M. (2004). The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports Listeria monocytogenes into the brain during systemic infection of mice. J. Immunol. *172*, 4418–4424.

Driscoll, C.A., Menotti-Raymond, M., Roca, A.L., Hupe, K., Johnson, W.E., Geffen, E., Harley, E.H., Delibes, M., Pontier, D., Kitchener, A.C., et al. (2007). The Near Eastern Origin of Cat Domestication. Science *317*, 519–523.

Dubey, J.P. (1997). Distribution of tissue cysts in organs of rats fed Toxoplasma gondii oocysts. J. Parasitol. *83*, 755–757.

Dubey, J.P. (1998). Comparative infectivity of Toxoplasma gondii bradyzoites in rats and mice. J. Parasitol. *84*, 1279–1282.

Dubey, J.P. (2010). Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. Parasit Vectors *3*, 112.

Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. (1973). Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. J. Parasitol. *59*, 505–512.

Dubey, J.P., and Lindsay, D.S. (1996). A review of Neospora caninum and neosporosis. Vet. Parasitol. *67*, 1–59.

Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., and Blixt, J.A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed Toxoplasma gondii oocysts. J. Parasitol. *83*, 870–882.

Dubremetz, J.F., and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J. Ultrastruct. Res. *62*, 94–109.

Dunay, I.R., DaMatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1+ Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen Toxoplasma gondii. Immunity *29*, 306–317.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradović, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. Biochemistry *41*, 6573–6582.

Dunker, A.K., Cortese, M.S., Romero, P., Iakoucheva, L.M., and Uversky, V.N. (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. FEBS J. *272*, 5129–5148.

Dunn, B.M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chem. Rev. *102*, 4431–4458.

Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 197–208.

Economou, J.S., McBride, W.H., Essner, R., Rhoades, K., Golub, S., Holmes, E.C., and Morton, D.L. (1989). Tumour necrosis factor production by IL-2-activated macrophages in vitro and in vivo. Immunology *67*, 514–519.

El Hajj, H., Lebrun, M., Fourmaux, M.N., Vial, H., and Dubremetz, J.F. (2007). Inverted topology of the Toxoplasma gondii ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. Cellular Microbiology *9*, 54–64.

El Kasmi, K.C., Qualls, J.E., Pesce, J.T., Smith, A.M., Thompson, R.W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., König, T., Schleicher, U., Koo, M.-S., et al. (2008). Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. Nat Immunol *9*, 1399–1406.

Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., et al. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature *387*, 921–924.

Ercoli, G., Fernandes, V.E., Chung, W.Y., Wanford, J.J., Thomson, S., Bayliss, C.D., Straatman, K., Crocker, P.R., Dennison, A., Martinez-Pomares, L., et al. (2018). Intracellular replication of Streptococcus pneumoniae inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicaemia. Nature Microbiology *3*, 600–610.

Etheridge, R.D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H.J., Turk, B.E., and Sibley, L.D. (2014). The Toxoplasma Pseudokinase ROP5 Forms Complexes with ROP18 and ROP17 Kinases that Synergize to Control Acute Virulence in Mice. Cell Host & Microbe *15*, 537–550.

Fayer, R., Esposito, D.H., and Dubey, J.P. (2015). Human Infections with Sarcocystis Species. Clin. Microbiol. Rev. *28*, 295–311.

Feng, C.G., Zheng, L., Jankovic, D., Báfica, A., Cannons, J.L., Watford, W.T., Chaussabel, D., Hieny, S., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., et al. (2008). Immunity Related GTPase Irgm1 promotes expansion of

activated CD4+ T cell populations by preventing interferon-γ-induced cell death. Nat Immunol *9*, 1279–1287.

Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., et al. (2010). Phosphorylation of Immunity-Related GTPases by a Toxoplasma gondii-Secreted Kinase Promotes Macrophage Survival and Virulence. Cell Host & Microbe *8*, 484–495.

Fentress, S.J., Steinfeldt, T., Howard, J.C., and Sibley, L.D. (2012). The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of Toxoplasma gondii. Cell. Microbiol. *14*, 1921–1933.

Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., and Pettersen, E. (1989). Tissue cyst rupture in mice chronically infected with Toxoplasma gondii. An immunocytochemical and ultrastructural study. Parasitol. Res. *75*, 599–603.

Fernandez-Botran, R., Sanders, V.M., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.S. (1988). Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. J. Exp. Med. *168*, 543–558.

Feustel, S.M., Meissner, M., and Liesenfeld, O. (2012). *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier. Virulence *3*, 182–192.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., and O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. *147*, 3815–3822.

Flegr, J. (2013). How and why Toxoplasma makes us crazy. Trends in Parasitology *29*, 156–163.

Forget, G., Gregory, D.J., and Olivier, M. (2005). Proteasome-mediated Degradation of STAT1α following Infection of Macrophages with *Leishmania donovani*. Journal of Biological Chemistry *280*, 30542–30549.

Fox, B.A., Ristuccia, J.G., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2009). Efficient Gene Replacements in Toxoplasma gondii Strains Deficient for Nonhomologous End Joining. Eukaryot Cell *8*, 520–529.

Fox, B.A., Falla, A., Rommereim, L.M., Tomita, T., Gigley, J.P., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.-F., Weiss, L.M., and Bzik, D.J. (2011). Type II Toxoplasma gondii KU80 Knockout Strains Enable Functional Analysis of Genes Required for Cyst Development and Latent Infection ▿. Eukaryot Cell *10*, 1193–1206.

Franco, M., Panas, M.W., Marino, N.D., Lee, M.-C.W., Buchholz, K.R., Kelly, F.D., Bednarski, J.J., Sleckman, B.P., Pourmand, N., and Boothroyd, J.C. (2016). A Novel Secreted Protein, MYR1, Is Central to *Toxoplasma* 's Manipulation of Host Cells. MBio *7*, e02231-15.

Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. J. Infect. Dis. *122*, 553–559.

Frenkel, J.K., and Dubey, J.P. (2000). The taxonomic importance of obligate heteroxeny: distinction of Hammondia hammondi from Toxoplasma gondii - another opinion. Parasitology Research *86*, 783–786.

Frenkel, J.K., and Escajadillo, A. (1987). Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. Am. J. Trop. Med. Hyg. *36*, 517–522.

Furtado, J.M., Bharadwaj, A.S., Chipps, T.J., Pan, Y., Ashander, L.M., and Smith, J.R. (2012). Toxoplasma gondii tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 in vitro. Immunol. Cell Biol. *90*, 912–915.

Fux, B., Nawas, J., Khan, A., Gill, D.B., Su, C., and Sibley, L.D. (2007). Toxoplasma gondii Strains Defective in Oral Transmission Are Also Defective in Developmental Stage Differentiation. Infect Immun *75*, 2580–2590.

Gabrilovac, J., Zadjelović, J., Osmak, M., Suchanek, E., Zupanović, Z., and Boranić, M. (1988). NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. Gynecol. Obstet. Invest. *25*, 165–172.

Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J.C., Mackey, A.J., et al. (2008). ToxoDB: an integrated Toxoplasma gondii database resource. Nucleic Acids Res *36*, D553–D556.

Gavrilescu, L.C., and Denkers, E.Y. (2001). IFN-γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence Toxoplasma gondii infection. The Journal of Immunology *167*, 902–909.

Gavrilescu, L.C., Butcher, B.A., Del Rio, L., Taylor, G.A., and Denkers, E.Y. (2004). STAT1 Is Essential for Antimicrobial Effector Function but Dispensable for Gamma Interferon Production during Toxoplasma gondii Infection. Infection and Immunity *72*, 1257–1264.

Gay, G., Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Vollaire, J., Josserand, V., Bertini, R.-L., Varesano, A., Touquet, B., De Bock, P.-J., Coute, Y., et al. (2016). *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-γ–mediated host defenses. The Journal of Experimental Medicine *213*, 1779–1798.

Gazzinelli, R.T., and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat. Rev. Immunol. *6*, 895–906.

Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with Toxoplasma gondii. J. Immunol. *149*, 175–180.

Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. (1993a). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 6115–6119.

Gazzinelli, R.T., Eltoum, I., Wynn, T.A., and Sher, A. (1993b). Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. J. Immunol. *151*, 3672–3681.

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

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

Gazzinelli, R.T., Mendonça-Neto, R., Lilue, J., Howard, J., and Sher, A. (2014). Innate Resistance against Toxoplasma gondii: An Evolutionary Tale of Mice, Cats, and Men. Cell Host & Microbe *15*, 132–138.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science *327*, 656–661.

Ghosh, A., Uthaiah, R., Howard, J., Herrmann, C., and Wolf, E. (2004). Crystal structure of IIGP1: a paradigm for interferon-inducible p47 resistance GTPases. Mol. Cell *15*, 727–739.

Gold, D.A., Kaplan, A.D., Lis, A., Bett, G.C.L., Rosowski, E.E., Cirelli, K.M., Bougdour, A., Sidik, S.M., Beck, J.R., Lourido, S., et al. (2015). The Toxoplasma Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. Cell Host & Microbe *17*, 642–652.

Gómez Marín, J.E., Bonhomme, A., Guenounou, M., and Pinon, J.M. (1996). Role of interferon-gamma against invasion by Toxoplasma gondii in a human monocytic cell line (THP1): involvement of the parasite's secretory phospholipase A2. Cell. Immunol. *169*, 218–225.

Gorfu, G., Cirelli, K.M., Melo, M.B., Mayer-Barber, K., Crown, D., Koller, B.H., Masters, S., Sher, A., Leppla, S.H., Moayeri, M., et al. (2014). Dual Role for Inflammasome Sensors NLRP1 and NLRP3 in Murine Resistance to Toxoplasma gondii. MBio *5*.

Gov, L., Karimzadeh, A., Ueno, N., and Lodoen, M.B. (2013). Human Innate Immunity to Toxoplasma gondii Is Mediated by Host Caspase-1 and ASC and Parasite GRA15. MBio *4*.

Hager, K.M., Striepen, B., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite Toxoplasma gondii. J. Cell. Sci. *112 (Pt 16)*, 2631–2638.

Hagmaier, K., Stock, N., Goodbourn, S., Wang, L.-F., and Randall, R. (2006). A single amino acid substitution in the V protein of Nipah virus alters its ability to block interferon signalling in cells from different species. J Gen Virol *87*, 3649–3653.

Håkansson, S., Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2001). Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J *20*, 3132–3144.

Hakimi, M.-A., Olias, P., and Sibley, L.D. (2017). Toxoplasma effectors targeting host signaling and transcription. Clinical Microbiology Reviews *30*, 615–645.

Haldar, A.K., Saka, H.A., Piro, A.S., Dunn, J.D., Henry, S.C., Taylor, G.A., Frickel, E.M., Valdivia, R.H., and Coers, J. (2013). IRG and GBP Host Resistance Factors Target Aberrant, "Non-self" Vacuoles Characterized by the Missing of "Self" IRGM Proteins. PLoS Pathogens *9*, e1003414.

Hall, A.O., Beiting, D.P., Tato, C.M., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C.G., Pritchard, G.H., Silver, J.S., Bouladoux, N., Stumhofer, J.S., et al. (2012). The cytokines Interleukin 27 and Interferon-γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. Immunity *37*, 511–523.

Hammoudi, P.-M., Jacot, D., Mueller, C., Di Cristina, M., Dogga, S.K., Marq, J.-B., Romano, J., Tosetti, N., Dubrot, J., Emre, Y., et al. (2015). Fundamental Roles of the Golgi-Associated Toxoplasma Aspartyl Protease, ASP5, at the Host-Parasite Interface. PLOS Pathogens *11*, e1005211.

Han, S.-J., Melichar, H.J., Coombes, J.L., Chan, S.W., Koshy, A.A., Boothroyd, J.C., Barton, G.M., and Robey, E.A. (2014). Internalization and TLR-dependent type I interferon production by monocytes in response to Toxoplasma gondii. Immunol. Cell Biol. *92*, 872–881.

Handy, I., and Patel, R.C. (2013). STAT1 requirement for PKR-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells in response to heparin. Gene *524*, 15–21.

Haque, S.J., Wu, Q., Kammer, W., Friedrich, K., Smith, J.M., Kerr, I.M., Stark, G.R., and Williams, B.R. (1997). Receptor-associated constitutive protein tyrosine phosphatase activity controls the kinase function of JAK1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 8563–8568.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell *52*, 269–279.

Hauser, W.E., Sharma, S.D., and Remington, J.S. (1982). Natural killer cells induced by acute and chronic toxoplasma infection. Cell. Immunol. *69*, 330–346.

Hill, D., and Dubey, J.P. (2002). Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin. Microbiol. Infect. *8*, 634–640.

Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., Ooij, C. van, Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C., and Haldar, K. (2004). A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection. Science *306*, 1934–1937.

Holstege, F.C., and Young, R.A. (1999). Transcriptional regulation: contending with complexity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 2–4.

Hopkins, S.A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I.E., and Kraehenbuhl, J.P. (2000). A recombinant Salmonella typhimurium vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. Cell. Microbiol. *2*, 59–68.

Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. Trends in Biochemical Sciences *25*, 496–502.

Howard, J.C., Hunn, J.P., and Steinfeldt, T. (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 Sibley, L.D. (1995). Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis. *172*, 1561–1566.

Hsiao, C.-H.C., Luisa Hiller, N., Haldar, K., and Knoll, L.J. (2013). A HT/PEXEL motif in Toxoplasma dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. Traffic *14*, 519–531.

Hu, K., Roos, D.S., and Murray, J.M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Cell Biology *156*, 1039–1050.

Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. Nat. Rev. Microbiol. *12*, 101–114.

Hugo, W., Sung, W.-K., and Ng, S.-K. (2013). Discovering interacting domains and motifs in protein-protein interactions. Methods Mol. Biol. *939*, 9–20.

Hunn, J.P., Koenen-Waisman, S., Papic, N., Schroeder, N., Pawlowski, N., Lange, R., Kaiser, F., Zerrahn, J., Martens, S., and Howard, J.C. (2008). Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to Toxoplasma gondii. EMBO J *27*, 2495–2509.

Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. Nature Reviews Microbiology *10*, 766–778.

Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., and Remington, J.S. (1994a). 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. Infect. Immun. *62*, 2818–2824.

Hunter, C.A., Litton, M.J., Remington, J.S., and Abrams, J.S. (1994b). Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. J. Infect. Dis. *170*, 939–945.

Hunter, C.A., Chizzonite, R., and Remington, J.S. (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.

Huynh, M.-H., and Carruthers, V.B. (2009). Tagging of Endogenous Genes in a Toxoplasma gondii Strain Lacking Ku80. Eukaryotic Cell *8*, 530–539.

Imada, K., and Leonard, W.J. (2000). The Jak-STAT pathway. Mol. Immunol. *37*, 1–11.

Jensen, K.D.C., Wang, Y., Wojno, E.D.T., Shastri, A.J., Hu, K., Cornel, L., Boedec, E., Ong, Y.-C., Chien, Y., Hunter, C.A., et al. (2011). Toxoplasma Polymorphic Effectors Determine Macrophage Polarization and Intestinal Inflammation. Cell Host & Microbe *9*, 472–483.

Jensen, K.D.C., Hu, K., Whitmarsh, R.J., Hassan, M.A., Julien, L., Lu, D., Chen, L., Hunter, C.A., and Saeij, J.P.J. (2013). Toxoplasma gondii Rhoptry 16 Kinase Promotes Host Resistance to Oral Infection and Intestinal Inflammation Only in the Context of the Dense Granule Protein GRA15. Infection and Immunity *81*, 2156–2167.

John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J.E., and Leonard, W.J. (1999). The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. Mol. Cell. Biol. *19*, 1910–1918.

Johnson, A.M. (1984). Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. Z Parasitenkd *70*, 303–309.

Johnston, A.C., Piro, A., Clough, B., Siew, M., Virreira Winter, S., Coers, J., and Frickel, E.-M. (2016). Human GBP1 does not localize to pathogen vacuoles but restricts *Toxoplasma gondii*: hGBP1 restricts Toxoplasma *away from the vacuole*. Cellular Microbiology *18*, 1056–1064.

Jones, J.L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., and Wilson, M. (2007). Toxoplasma gondii Infection in the United States, 1999–2004, Decline from the Prior Decade. 6.

Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. Cell *92*, 307–313.

Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M.K., and Dobberstein, B. (2013). Post-Targeting Functions of Signal Peptides (Landes Bioscience).

Karaghiosoff, M., Steinborn, R., Kovarik, P., Kriegshäuser, G., Baccarini, M., Donabauer, B., Reichart, U., Kolbe, T., Bogdan, C., Leanderson, T., et al. (2003). Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. Nat. Immunol. *4*, 471–477.

Kawai, Y., Mickiewicz, K., and Errington, J. (2018). Lysozyme Counteracts β-Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria. Cell *172*, 1038-1049.e10.

Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I.T., Berriman, M., et al. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of Toxoplasma gondii. Nucleic Acids Res. *33*, 2980–2992.

Khan, A., Böhme, U., Kelly, K.A., Adlem, E., Brooks, K., Simmonds, M., Mungall, K., Quail, M.A., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., et al. (2006). Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of Toxoplasma gondii. Genome Res. *16*, 1119–1125.

Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D. (2007). Recent transcontinental sweep of Toxoplasma gondii driven by a single monomorphic chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 14872–14877.

Khan, A., Taylor, S., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D. (2009). Selection at a Single Locus Leads to Widespread Expansion of Toxoplasma gondii Lineages That Are Virulent in Mice. PLoS Genetics *5*, e1000404.

Khan, I.A., Smith, K.A., and Kasper, L.H. (1988). Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of Toxoplasma gondii. J. Immunol. *141*, 3600–3605.

Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. Infect. Immun. *62*, 1639–1642.

Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1997). A dichotomous role for nitric oxide during acute Toxoplasma gondii infection in mice. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 13955–13960.

Khavari, P.A., Peterson, C.L., Tamkun, J.W., Mendel, D.B., and Crabtree, G.R. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. Nature *366*, 170–174.

Kim, M.T., and Harty, J.T. (2014). Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. Front Immunol *5*, 295.

Kim, B.-H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J., and MacMicking, J.D. (2012). IFN-inducible GTPases in host cell defense. Cell Host Microbe *12*, 432–444.

Kim, E.W., Nadipuram, S.M., Tetlow, A.L., Barshop, W.D., Liu, P.T., Wohlschlegel, J.A., and Bradley, P.J. (2016). The Rhoptry Pseudokinase ROP54 Modulates Toxoplasma gondii Virulence and Host GBP2 Loading. MSphere *1*.

Kim, P.M., Sboner, A., Xia, Y., and Gerstein, M. (2008). The role of disorder in interaction networks: a structural analysis. Mol. Syst. Biol. *4*, 179.

Kim, S.-K., Fouts, A.E., and Boothroyd, J.C. (2007). Toxoplasma gondii dysregulates IFN-γ-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. The Journal of Immunology *178*, 5154–5165.

Kittas, S., Kittas, C., Paizi-Biza, P., and Henry, L. (1984). A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with Toxoplasma gondii. Br J Exp Pathol *65*, 67–74.

Klampfer, L., Huang, J., Swaby, L.-A., and Augenlicht, L. (2004). Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. J. Biol. Chem. *279*, 30358–30368.

Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to Toxoplasma gondii. Immunity *38*, 119–130.

Kohler, J., Heumann, D., Garotta, G., LeRoy, D., Bailat, S., Barras, C., Baumgartner, J.D., and Glauser, M.P. (1993). IFN-gamma involvement in the severity of gram-negative infections in mice. J. Immunol. *151*, 916–921.

Koshy, A.A., Fouts, A.E., Lodoen, M.B., Alkan, O., Blau, H.M., and Boothroyd, J.C. (2010). Toxoplasma secreting Cre recombinase for analysis of host-parasite interactions. Nat. Methods *7*, 307–309.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell *128*, 693–705.

Kovarik, P., Mangold, M., Ramsauer, K., Heidari, H., Steinborn, R., Zotter, A., Levy, D.E., Müller, M., and Decker, T. (2001). Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. EMBO J. *20*, 91–100.

Krämer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jäger, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E., and Heinzel, T. (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF-κB activity. Genes Dev *20*, 473–485.

Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T.-O., Klümpers, V., Felekyan, S., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., and Pfeffer, K. (2016). Guanylate binding proteins directly attack Toxoplasma gondii via supramolecular complexes. Elife *5*.

Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., and Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination. Cell. Microbiol. *8*, 1611–1623.

Lang, C., Hildebrandt, A., Brand, F., Opitz, L., Dihazi, H., and Lüder, C.G.K. (2012). Impaired Chromatin Remodelling at STAT1-Regulated Promoters Leads to Global Unresponsiveness of Toxoplasma gondii-Infected Macrophages to IFN-γ. PLoS Pathog *8*.

LaRosa, D.F., Stumhofer, J.S., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Taylor, D.K., Hunter, C.A., and Turka, L.A. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 3855–3860.

Lee, Y.H., and Kasper, L.H. (2004). Immune responses of different mouse strains after challenge with equivalent lethal doses of Toxoplasma gondii. Parasite *11*, 89–97.

Lieberman, L.A., Banica, M., Reiner, S.L., and Hunter, C.A. (2004). STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. J. Immunol. *172*, 457–463.

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

Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J.S., and Suzuki, Y. (1996). Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii. J. Exp. Med. *184*, 597–607.

Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2009). Long-Term Survival of Toxoplasma gondii Sporulated Oocysts in Seawater. Journal of Parasitology *95*, 1019–1020.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 10626–10631.

Liu, B., Mink, S., Wong, K.A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P.W., Wu, H., and Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. Nature Immunology *5*, 891–898.

Liu, C.-H., Fan, Y., Dias, A., Esper, L., Corn, R.A., Bafica, A., Machado, F.S., and Aliberti, J. (2006). Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against Toxoplasma gondii infection in mice. J. Immunol. *177*, 31–35.

Lu, F., Huang, S., Hu, M.S., and Kasper, L.H. (2005). Experimental ocular toxoplasmosis in genetically susceptible and resistant mice. Infect. Immun. *73*, 5160–5165.

Lüder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M.J., and Gross, U. (2001). Toxoplasma gondii down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. Eur. J. Immunol. *31*, 1475–1484.

Lüder, C.G.K., Algner, M., Lang, C., Bleicher, N., and Gross, U. (2003). Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with Toxoplasma gondii facilitates parasite replication in activated murine macrophages. Int. J. Parasitol. *33*, 833–844.

Luft, B.J., and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis *15*, 211–222.

Luo, W., Aosai, F., Ueda, M., Yamashita, K., Shimizu, K., Sekiya, S., and Yano, A. (1997). Kinetics in parasite abundance in susceptible and resistant mice infected with an avirulent strain of Toxoplasma gondii by using quantitative competitive PCR. J. Parasitol. *83*, 1070–1074.

Ma, J.S., Sasai, M., Ohshima, J., Lee, Y., Bando, H., Takeda, K., and Yamamoto, M. (2014). Selective and strain-specific NFAT4 activation by the Toxoplasma gondii polymorphic dense granule protein GRA6. J Exp Med *211*, 2013–2032.

MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. Nat. Rev. Immunol. *12*, 367–382.

Marino, N.D., Panas, M.W., Franco, M., Theisen, T.C., Naor, A., Rastogi, S., Buchholz, K.R., Lorenzi, H.A., and Boothroyd, J.C. (2018). Identification of a novel protein complex essential for effector translocation across the parasitophorous vacuole membrane of Toxoplasma gondii. PLOS Pathogens *14*, e1006828.

Martens, E., and Demain, A.L. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. J. Antibiot. *70*, 520–526.

Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J.C. (2005). Disruption of Toxoplasma gondii Parasitophorous Vacuoles by the Mouse p47-Resistance GTPases. PLoS Pathog *1*.

Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., et al. (2011). CD8α+ dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites. Immunity *35*, 249–259.

McBride, K.M., McDonald, C., and Reich, N.C. (2000). Nuclear export signal located within theDNA-binding domain of the STAT1transcription factor. EMBO J. *19*, 6196–6206.

McFadden, G.I., and Roos, D.S. (1999). Apicomplexan plastids as drug targets. Trends Microbiol. *7*, 328–333.

McKee, A.S., Dzierszinski, F., Boes, M., Roos, D.S., and Pearce, E.J. (2004). Functional Inactivation of Immature Dendritic Cells by the Intracellular Parasite Toxoplasma gondii. The Journal of Immunology *173*, 2632–2640.

McKendry, R., John, J., Flavell, D., Müller, M., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1991). High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. Proceedings of the National Academy of Sciences *88*, 11455–11459.

McLeod, R., Eisenhauer, P., Mack, D., Brown, C., Filice, G., and Spitalny, G. (1989). Immune responses associated with early survival after peroral infection with Toxoplasma gondii. J. Immunol. *142*, 3247–3255.

Meermeier, E.W., Harriff, M.J., Karamooz, E., and Lewinsohn, D.M. (2018). MAIT cells and microbial immunity. Immunology and Cell Biology.

Melo, M.B., Kasperkovitz, P., Cerny, A., Könen-Waisman, S., Kurt-Jones, E.A., Lien, E., Beutler, B., Howard, J.C., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2010). UNC93B1 mediates host resistance to infection with Toxoplasma gondii. PLoS Pathog. *6*, e1001071.

Melo, M.B., Jensen, K.D.C., and Saeij, J.P.J. (2011). Toxoplasma gondii effectors are master regulators of the inflammatory response. Trends in Parasitology *27*, 487–495.

Melo, M.B., Nguyen, Q.P., Cordeiro, C., Hassan, M.A., Yang, N., McKell, R., Rosowski, E.E., Julien, L., Butty, V., Dardé, M.-L., et al. (2013). Transcriptional Analysis of Murine Macrophages Infected with Different Toxoplasma Strains Identifies Novel Regulation of Host Signaling Pathways. PLoS Pathogens *9*, e1003779.

Mercier, C., and Cesbron-Delauw, M.-F. (2015). Toxoplasma secretory granules: one population or more? Trends in Parasitology *31*, 60–71.

Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M.P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., 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.

Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., and Darnell, J.E. (2006). Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. Genes Dev. *20*, 3372–3381.

Micallef, M.J., Tanimoto, T., Torigoe, K., Nishida, Y., Kohno, K., Ikegami, H., and Kurimoto, M. (1999). Simultaneous exposure to interleukin-18 and interleukin-10 in vitro synergistically augments murine spleen natural killer cell activity. Cancer Immunol. Immunother. *48*, 109–117.

Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., and Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 Genome. Microbiol Mol Biol Rev *67*, 86–156.

Minot, S., Melo, M.B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S.S., and Saeij, J.P.J. (2012). Admixture and recombination among Toxoplasma gondii lineages explain global genome diversity. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 13458–13463.

Miranda, K., Pace, D.A., Cintron, R., Rodrigues, J.C.F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., de Haas, F., de Souza, W., et al. (2010). Characterization of a novel organelle in Toxoplasma gondii with similar composition and function to the plant vacuole. Mol. Microbiol. *76*, 1358–1375.

Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. Eur. J. Immunol. *25*, 1101–1104.

Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. Lancet *363*, 1965–1976.

Mordue, D.G., and Sibley, L.D. (2003). A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. J. Leukoc. Biol. *74*, 1015–1025.

Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M., and Sibley, L.D. (1999a). Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. J. Exp. Med. *190*, 1783–1792.

Mordue, D.G., Håkansson, S., Niesman, I., and David Sibley, L. (1999b). Toxoplasma gondii Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways. Experimental Parasitology *92*, 87–99.

Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A., and Sibley, L.D. (2001). Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. The Journal of Immunology *167*, 4574–4584.

Morger, J., Bajnok, J., Boyce, K., Craig, P.S., Rogan, M.T., Lun, Z.-R., Hide, G., and Tschirren, B. (2014). Naturally occurring Toll-like receptor 11 (TLR11) and Toll-like receptor 12 (TLR12) polymorphisms are not associated with Toxoplasma gondii infection in wild wood mice. Infect. Genet. Evol. *26*, 180–184.

Morrison, D.A. (2005). How old are the extant lineages of Toxoplasma gondii? Parassitologia *47*, 205–214.

Mowen, K., and David, M. (2000). Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. Mol. Cell. Biol. *20*, 7273–7281.

Naka, T., Fujimoto, M., and Kishimoto, T. (1999). Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. Trends Biochem. Sci. *24*, 394–398.

Nakao, M., and Konishi, E. (1991). Proliferation of Toxoplasma gondii in human neutrophils in vitro. Parasitology *103 Pt 1*, 23–27.

Nandan, D., and Reiner, N.E. (2005). Leishmania donovani engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. Clinical Immunology *114*, 266–277.

Naor, A., Panas, M.W., Marino, N., Coffey, M.J., Tonkin, C.J., and Boothroyd, J.C. (2018). MYR1-Dependent Effectors Are the Major Drivers of a Host Cell's Early Response to Toxoplasma, Including Counteracting MYR1-Independent Effects. MBio *9*.

Nathan, C. (2009). Taming Tuberculosis: A Challenge for Science and Society. Cell Host & Microbe *5*, 220–224.

Nezami, A., Kimura, T., Hidaka, K., Kiso, A., Liu, J., Kiso, Y., Goldberg, D.E., and Freire, E. (2003). High-affinity inhibition of a family of Plasmodium falciparum proteases by a designed adaptive inhibitor. Biochemistry *42*, 8459–8464.

Nichols, B.A., and Chiappino, M.L. (1987). Cytoskeleton of Toxoplasma gondii. J. Protozool. *34*, 217–226.

Nichols, B.A., Chiappino, M.L., and O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of Toxoplasma gondii during host-cell invasion. J. Ultrastruct. Res. *83*, 85–98.

Niedelman, W., Gold, D.A., Rosowski, E.E., Sprokholt, J.K., Lim, D., Farid Arenas, A., Melo, M.B., Spooner, E., Yaffe, M.B., and Saeij, J.P.J. (2012). The Rhoptry Proteins ROP18 and ROP5 Mediate Toxoplasma gondii Evasion of the Murine, But Not the Human, Interferon-Gamma Response. PLoS Pathogens *8*, e1002784.

Nishio, M., Tsurudome, M., Ito, M., Kawano, M., Komada, H., and Ito, Y. (2001). High Resistance of Human Parainfluenza Type 2 Virus Protein-Expressing Cells to the Antiviral and Anti-Cell Proliferative Activities of Alpha/Beta Interferons: Cysteine-Rich V-Specific Domain Is Required for High Resistance to the Interferons. J Virol *75*, 9165–9176.

Odaert, H., Soête, M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1996). Stage conversion of Toxoplasma gondii in mouse brain during infection and immunodepression. Parasitol. Res. *82*, 28–31.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell *87*, 953–959.

Ohshima, J., Lee, Y., Sasai, M., Saitoh, T., Su Ma, J., Kamiyama, N., Matsuura, Y., Pann-Ghill, S., Hayashi, M., Ebisu, S., et al. (2014). Role of Mouse and Human Autophagy Proteins in IFN- -Induced Cell-Autonomous Responses against Toxoplasma gondii. The Journal of Immunology *192*, 3328–3335.

Oldfield, C.J., Cheng, Y., Cortese, M.S., Romero, P., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2005). Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. Biochemistry *44*, 12454–12470.

Opitz, C., and Soldati, D. (2002). "The glideosome": a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. Mol. Microbiol. *45*, 597–604.

Papic, N., Hunn, J.P., Pawlowski, N., Zerrahn, J., and Howard, J.C. (2008). Inactive and Active States of the Interferon-inducible Resistance GTPase, Irga6, in Vivo. J Biol Chem *283*, 32143–32151.

Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M.E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. International Journal for Parasitology *39*, 1385–1394.

Pattenden, S.G., Klose, R., Karaskov, E., and Bremner, R. (2002). Interferon-gamma-induced chromatin remodeling at the CIITA locus is BRG1 dependent. EMBO J. *21*, 1978–1986.

Paulson, M., Press, C., Smith, E., Tanese, N., and Levy, D.E. (2002). IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. Nat. Cell Biol. *4*, 140–147.

Peixoto, L., Chen, F., Harb, O.S., Davis, P.H., Beiting, D.P., Brownback, C.S., Ouloguem, D., and Roos, D.S. (2010). Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. Cell Host Microbe *8*, 208–218.

Pellegrini, E., Palencia, A., Braun, L., Kapp, U., Bougdour, A., Belrhali, H., Bowler, M.W., and Hakimi, M.-A. (2017). Structural Basis for the Subversion of MAP Kinase Signaling by an Intrinsically Disordered Parasite Secreted Agonist. Structure *25*, 16–26.

Pepper, M., Dzierszinski, F., Wilson, E., Tait, E., Fang, Q., Yarovinsky, F., Laufer, T.M., Roos, D., and Hunter, C.A. (2008). Plasmacytoid dendritic cells are activated by Toxoplasma gondii to present antigen and produce cytokines. J. Immunol. *180*, 6229–6236.

Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., and Su, C. (2009). Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. Future Microbiol *4*, 1363–1379.

Perona-Wright, G., Mohrs, K., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Madan, R., Karp, C.L., Johnson, L.L., Smiley, S.T., and Mohrs, M. (2009). Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by Natural Killer cells. Cell Host Microbe *6*, 503–512.

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 908–912.

Poe, J.C., Wagner, D.H., Miller, R.W., Stout, R.D., and Suttles, J. (1997). IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1beta synthesis and rescue from apoptosis. J. Immunol. *159*, 846–852.

Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F., and Gaillard, J.L. (2001). Dendritic cells are early cellular targets of Listeria monocytogenes after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. Cell. Microbiol. *3*, 331–340.

Provinciali, M., Di Stefano, G., Muzzioli, M., Garzetti, G.G., Ciavattini, A., and Fabris, N. (1995). Relationship between 17-beta-estradiol and prolactin in the regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. J. Endocrinol. Invest. *18*, 645–652.

Radke, J.R., and White, M.W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of Toxoplasma gondii using the Herpes simplex virus thymidine kinase. Mol. Biochem. Parasitol. *94*, 237–247.

Ramsauer, K., Farlik, M., Zupkovitz, G., Seiser, C., Kröger, A., Hauser, H., and Decker, T. (2007). Distinct modes of action applied by transcription factors STAT1 and IRF1 to initiate transcription of the IFN-gamma-inducible gbp2 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 2849–2854.

Rane, S.G., and Reddy, E.P. (2002). JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. Oncogene *21*, 3334–3358.

Ray, M., Gam, A.A., Boykins, R.A., and Kenney, R.T. (2000). Inhibition of interferon-gamma signaling by Leishmania donovani. J. Infect. Dis. *181*, 1121–1128.

Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2011). A Conserved Non-canonical Motif in the Pseudoactive Site of the ROP5 Pseudokinase Domain Mediates Its Effect on Toxoplasma Virulence. Journal of Biological Chemistry *286*, 29366–29375.

Reese, M.L., Zeiner, G.M., Saeij, J.P.J., Boothroyd, J.C., and Boyle, J.P. (2011). Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in Toxoplasma virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 9625–9630.

Reese, M.L., Shah, N., and Boothroyd, J.C. (2014). The Toxoplasma Pseudokinase ROP5 Is an Allosteric Inhibitor of the Immunity-related GTPases. J Biol Chem *289*, 27849–27858.

Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Álvarez-García, G., Del Pozo, I., and Ortega-Mora, L.M. (2011). In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of Neospora caninum. Vet. Res. *42*, 41.

Reid, M.A., Wang, W.-I., Rosales, K.R., Welliver, M.X., Pan, M., and Kong, M. (2013). The B55α subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation. Mol. Cell *50*, 200–211.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J. Exp. Med. *186*, 1819–1829.

Robben, P.M., Mordue, D.G., Truscott, S.M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L.D. (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with Toxoplasma gondii depends on the parasite genotype. J. Immunol. *172*, 3686–3694.

Robben, P.M., LaRegina, M., Kuziel, W.A., and Sibley, L.D. (2005). Recruitment of Gr-1 $^{+}$ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. The Journal of Experimental Medicine *201*, 1761–1769.

Rodriguez, J.J., Parisien, J.-P., and Horvath, C.M. (2002). Nipah Virus V Protein Evades Alpha and Gamma Interferons by Preventing STAT1 and STAT2 Activation and Nuclear Accumulation. J Virol *76*, 11476–11483.

Rosen, H., and Gordon, S. (1987). Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. J. Exp. Med. *166*, 1685–1701.

Rosowski, E.E., and Saeij, J.P.J. (2012). Toxoplasma gondii Clonal Strains All Inhibit STAT1 Transcriptional Activity but Polymorphic Effectors Differentially Modulate IFNγ Induced Gene Expression and STAT1 Phosphorylation. PLoS ONE *7*, e51448.

Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D.C., and Saeij, J.P.J. (2011). Strain-specific activation of the NF-κB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein. J Exp Med *208*, 195–212.

Rosowski, E.E., Nguyen, Q.P., Camejo, A., Spooner, E., Saeij, J.P.J., and Adams, J.H. (2014). Toxoplasma gondii Inhibits Gamma Interferon (IFN-)- and IFN- -Induced Host Cell STAT1 Transcriptional Activity by Increasing the Association of STAT1 with DNA. Infection and Immunity *82*, 706–719.

Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., and Murray, P.J. (2001). Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. J. Immunol. *166*, 2173–2177.

Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in Drosophila. J. Immunol. *168*, 1542–1546.

Sadzak, I., Schiff, M., Gattermeier, I., Glinitzer, R., Sauer, I., Saalmüller, A., Yang, E., Schaljo, B., and Kovarik, P. (2008). Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 8944–8949.

Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis. Science *314*, 1780–1783.

Saeij, J.P.J., Coller, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature *445*, 324–327.

Sakamoto, S., Potla, R., and Larner, A.C. (2004). Histone Deacetylase Activity Is Required to Recruit RNA Polymerase II to the Promoters of Selected Interferon-stimulated Early Response Genes. Journal of Biological Chemistry *279*, 40362–40367.

Saridakis, V., Sheng, Y., Sarkari, F., Holowaty, M.N., Shire, K., Nguyen, T., Zhang, R.G., Liao, J., Lee, W., Edwards, A.M., et al. (2005). Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. Mol. Cell *18*, 25–36.

Scallan, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., and Hoekstra, R.M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. Emerg Infect Dis *17*, 16–22.

Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. J. Immunol. *168*, 5997–6001.

Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection. J. Immunol. *157*, 4045–4054.

Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., and Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii. J. Exp. Med. *185*, 1261–1273.

Schindler, C., and Darnell, J.E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. Annu. Rev. Biochem. *64*, 621–651.

Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma *109*, 365–371.

Schlüter, D., Deckert, M., Hof, H., and 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.

Schmitz, J.L., Carlin, J.M., Borden, E.C., and Byrne, G.I. (1989). Beta interferon inhibits Toxoplasma gondii growth in human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun. *57*, 3254–3256.

Scholze, H., and Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. Curr. Opin. Microbiol. *14*, 47–53.

Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. Cell *140*, 821–832.

Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T., and Yoneda, Y. (1996). Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. J. Biol. Chem. *271*, 31017–31020.

Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W., MacMicking, J.D., and Sibley, L.D. (2013). Guanylate-binding Protein 1 (Gbp1) Contributes to Cell-autonomous Immunity against Toxoplasma gondii. PLoS Pathog *9*.

Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J., and Hunter, C.A. (2002). Suppression of NF-kappaB activation by infection with Toxoplasma gondii. J. Infect. Dis. *185 Suppl 1*, S66-72.

Shea, M., Jäkle, U., Liu, Q., Berry, C., Joiner, K.A., and Soldati-Favre, D. (2007). A Family of Aspartic Proteases and a Novel, Dynamic and Cell-Cycle-Dependent Protease Localization in the Secretory Pathway of Toxoplasma gondii. Traffic *8*, 1018–1034.

Shen, B., and Sibley, L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. Curr Opin Microbiol *15*, 449–455.

Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R., and Darnell, J.E. (1992). Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. Science *258*, 1808–1812.

Shuai, K., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Sadowski, H.B., Gilman, M.Z., and Darnell, J.E. (1993). Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. Nature *366*, 580–583.

Sibley, L.D. (2010). How Apicomplexan Parasites Move In and Out of Cells. Curr Opin Biotechnol *21*, 592–598.

Sibley, L.D. (2011). Invasion and Intracellular Survival by Protozoan Parasites. Immunol Rev *240*, 72–91.

Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of Toxoplasma gondii comprise a single clonal lineage. Nature *359*, 82–85.

Sims, J.E., and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol. *10*, 89–102.

Speer, C.A., and Dubey, J.P. (1998). Ultrastructure of early stages of infections in mice fed Toxoplasma gondii oocysts. Parasitology *116 (Pt 1)*, 35–42.

Spekker, K., Leineweber, M., Degrandi, D., Ince, V., Brunder, S., Schmidt, S.K., Stuhlsatz, S., Howard, J.C., Schares, G., Degistirici, O., et al. (2013). Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against Toxoplasma gondii and Neospora caninum: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). Medical Microbiology And Immunology *202*, 197–206.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat. Rev. Immunol. *13*, 145–149.

Steinfeldt, T., Könen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2010). Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent Toxoplasma gondii. PLoS Biology *8*, e1000576.

Stephen, C., Haines, D., Bollinger, T., Atkinson, K., and Schwantje, H. (1996). Serological evidence of toxoplasma infection in cougars on Vancouver Island, British Columbia. Can. Vet. J. *37*, 241.

Stutz, A., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2009). Inflammasomes: too big to miss. J. Clin. Invest. *119*, 3502–3511.

Stutz, A., Kessler, H., Kaschel, M.-E., Meissner, M., and Dalpke, A.H. (2012). Cell invasion and strain dependent induction of Suppressor of Cytokine Signaling-1 by Toxoplasma gondii. Immunobiology *217*, 28–36.

Su, C., Howe, D.K., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., and Sibley, L.D. (2002). Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in Toxoplasma gondii. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 10753–10758.

Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., and Sibley, L.D. (2003). Recent expansion of Toxoplasma through enhanced oral transmission. Science *299*, 414–416.

Subauste, C. (2012). Animal models for Toxoplasma gondii infection. Curr Protoc Immunol *Chapter 19*, Unit 19.3.1-23.

Sukhumavasi, W., Egan, C.E., Warren, A.L., Taylor, G.A., Fox, B.A., Bzik, D.J., and Denkers, E.Y. (2008). Toll-Like Receptor Adaptor MyD88 is Essential for Pathogen Control During Oral Toxoplasma gondii Infection but not Adaptive Immunity Induced by a Vaccine Strain of the Parasite. J Immunol *181*, 3464–3473.

Sumyuen, M.H., Garin, Y.J., and Derouin, F. (1995). Early kinetics of Toxoplasma gondii infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. J. Parasitol. *81*, 327–329.

Sutterland, A.L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M.W.J., Lutter, R., van Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Leboyer, M., and de Haan, L. (2015). Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. Acta Psychiatrica Scandinavica *132*, 161–179.

Suzuki, Y. (2002). Host resistance in the brain against Toxoplasma gondii. J. Infect. Dis. *185 Suppl 1*, S58-65.

Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L.E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H., and Gufwoli, E. (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. The Journal of Immunology *164*, 5375–5382.

Suzuki, Y., Wang, X., Jortner, B.S., Payne, L., Ni, Y., Michie, S.A., Xu, B., Kudo, T., and Perkins, S. (2010). Removal of Toxoplasma gondii cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells. Am. J. Pathol. *176*, 1607–1613.

Taboas, W., McKay, D., and Taylor, S. (2012). Does Toxoplasma gondii play a role in obsessive–compulsive disorder? Psychiatry Research *198*, 176–177.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell *140*, 805–820.

Tardieux, I., and Baum, J. (2016). Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. J. Cell Biol. *214*, 507–515.

Tarr, P.I., Aline, R.F., Smiley, B.L., Scholler, J., Keithly, J., and Stuart, K. (1988). LR1: a candidate RNA virus of Leishmania. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 9572–9575.

Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L.S., Eagleson, B., Secrest, L., Southon, E.A., Reid, S.W., et al. (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 751–755.

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., et al. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen Toxoplasma gondii. Science *314*, 1776–1780.

Tirera, S., Ginouves, M., Donato, D., Caballero, I.S., Bouchier, C., Lavergne, A., Bourreau, E., Mosnier, E., Vantilcke, V., Couppié, P., et al. (2017). Unraveling the genetic diversity and phylogeny of Leishmania RNA virus 1 strains of infected Leishmania isolates circulating in French Guiana. PLOS Neglected Tropical Diseases *11*, e0005764.

Tiwari, S., Choi, H.-P., Matsuzawa, T., Pypaert, M., and MacMicking, J.D. (2009). Targeting of the GTPase Irgm1 to the phagosomal membrane via PtdIns(3,4)P(2) and PtdIns(3,4,5)P(3) promotes immunity to mycobacteria. Nat. Immunol. *10*, 907–917.

Torchy, M.P., Hamiche, A., and Klaholz, B.P. (2015). Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. Cellular and Molecular Life Sciences *72*, 2491–2507.

Torgerson, P.R., and Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bull World Health Organ *91*, 501–508.

Torpier, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J., Darde, M.L., and Capron, A. (1993). Toxoplasma gondii: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. Exp. Parasitol. *77*, 13–22.

Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Müller, M., and Decker, T. (2003). Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-γ-dependent innate immunity. Immunity *19*, 793–802.

Virreira Winter, S., Niedelman, W., Jensen, K.D., Rosowski, E.E., Julien, L., Spooner, E., Caradonna, K., Burleigh, B.A., Saeij, J.P.J., Ploegh, H.L., et al. (2011). Determinants of GBP Recruitment to Toxoplasma gondii Vacuoles and the Parasitic Factors That Control It. PLoS One *6*.

Vitaliano, S.N., Soares, H.S., Minervino, A.H.H., Santos, A.L.Q., Werther, K., Marvulo, M.F.V., Siqueira, D.B., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Su, C., et al. (2014). Genetic characterization of Toxoplasma gondii from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife *3*, 276–283.

Vivier, E., and Petitprez, A. (1969). [The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in Toxoplasma gondii]. J. Cell Biol. *43*, 329–342.

Vossenkämper, A., Struck, D., Alvarado-Esquivel, C., Went, T., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I., et al. (2004). Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. European Journal of Immunology *34*, 3197–3207.

Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J.C., and Sapolsky, R.M. (2007). Behavioral changes induced by Toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 6442–6447.

Walker, W., Roberts, C.W., Ferguson, D.J., Jebbari, H., and Alexander, J. (1997). Innate immunity to Toxoplasma gondii is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. Infect. Immun. *65*, 1119–1121.

Wang, Y., Gao, B., Xu, W., and Xiong, S. (2011). BRG1 is indispensable for IFN-γ-induced TRIM22 expression, which is dependent on the recruitment of IRF-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *410*, 549–554.

Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell *82*, 241–250.

Wilson, D.C., Matthews, S., and Yap, G.S. (2008). IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during Toxoplasma gondii Infection. J. Immunol. *180*, 5935–5945.

Wilson, D.C., Grotenbreg, G.M., Liu, K., Zhao, Y., Frickel, E.-M., Gubbels, M.-J., Ploegh, H.L., and Yap, G.S. (2010). Differential regulation of effector- and central-memory responses to Toxoplasma gondii Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. PLoS Pathog. *6*, e1000815.

Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. J. Mol. Biol. *293*, 321–331.

Xiao, J., Kannan, G., Jones-Brando, L., Brannock, C., Krasnova, I.N., Cadet, J.L., Pletnikov, M., and Yolken, R.H. (2012). Sex-specific changes in gene expression and behavior induced by chronic Toxoplasma infection in mice. Neuroscience *206*, 39–48.

Xu, D., Trajkovic, V., Hunter, D., Leung, B.P., Schulz, K., Gracie, J.A., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2000). IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. European Journal of Immunology *30*, 3147–3156.

Xu, X.-X., Wan, H., Nie, L., Shao, T., Xiang, L.-X., and Shao, J.-Z. (2018). RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. Protein Cell *9*, 246–253.

Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., et al. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. The Journal of Experimental Medicine *206*, 2747–2760.

Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., et al. (2012). A Cluster of Interferon-γ-Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against Toxoplasma gondii. Immunity *37*, 302–313.

Yang, E., Henriksen, M.A., Schaefer, O., Zakharova, N., and Darnell, J.E. (2002). Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. J. Biol. Chem. *277*, 13455–13462.

Yang, L., Boldin, M.P., Yu, Y., Liu, C.S., Ea, C.-K., Ramakrishnan, P., Taganov, K.D., Zhao, J.L., and Baltimore, D. (2012). miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. J. Exp. Med. *209*, 1655–1670.

Yap, G.S., and Sher, A. (1999). Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function. Immunobiology *201*, 240–247.

Yap, G., Pesin, M., and Sher, A. (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. J. Immunol. *165*, 628–631.

Yap, G.S., Scharton-Kersten, T., Charest, H., and Sher, A. (1998). Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. J. Immunol. *160*, 1340–1345.

Yarovinsky, F. (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. Science *308*, 1626–1629.

Zediak, V.P., and Hunter, C.A. (2003). IL-10 fails to inhibit the production of IL-18 in response to inflammatory stimuli. Cytokine *21*, 84–90.

Zhang, J.J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C.M., and Darnell, J.E. (1996). Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 15092–15096.

Zhao, Y.O., Khaminets, A., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2009). Disruption of the Toxoplasma gondii Parasitophorous Vacuole by IFNγ-Inducible Immunity-Related GTPases (IRG Proteins) Triggers Necrotic Cell Death. PLoS Pathog *5*.

Zhao, Z., Fux, B., Goodwin, M., Dunay, I.R., Strong, D., Miller, B.C., Cadwell, K., Delgado, M.A., Ponpuak, M., Green, K.G., et al. (2008). Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. Cell Host Microbe *4*, 458–469.

Zhou, C.-X., Elsheikha, H.M., Zhou, D.-H., Liu, Q., Zhu, X.-Q., and Suo, X. (2016). Dual Identification and Analysis of Differentially Expressed Transcripts of Porcine PK-15 Cells and Toxoplasma gondii during in vitro Infection. Front Microbiol *7*.

Zhu, M., John, S., Berg, M., and Leonard, W.J. (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. Cell *96*, 121–130.

Zimmermann, S., Murray, P.J., Heeg, K., and Dalpke, A.H. (2006). Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-γ signaling. The Journal of Immunology *176*, 1840–1847.

(2008). The global burden of disease: 2004 update (Geneva).

(2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance (Geneva, Switzerland: World Health Organization).

Annexes

Research Article

TRANSPARENT PROCESS OPEN ACCESS

EMBO Molecular Medicine

Targeting *Toxoplasma gondii* CPSF3 as a new approach to control toxoplasmosis

Andrés Palencia[1,2,*,†], Alexandre Bougdour[1,**,†], Marie-Pierre Brenier-Pinchart[1], Bastien Touquet[1], Rose-Laurence Bertini[1], Cristina Sensi[2], Gabrielle Gay[1], Julien Vollaire[3], Véronique Josserand[3], Eric Easom[4], Yvonne R Freund[4], Hervé Pelloux[1], Philip J Rosenthal[5], Stephen Cusack[2] & Mohamed-Ali Hakimi[1,***]

Abstract

Toxoplasma gondii **is an important food and waterborne pathogen causing toxoplasmosis, a potentially severe disease in immunocompromised or congenitally infected humans. Available therapeutic agents are limited by suboptimal efficacy and frequent side effects that can lead to treatment discontinuation. Here we report that the benzoxaborole AN3661 had potent *in vitro* activity against *T. gondii*. Parasites selected to be resistant to AN3661 had mutations in *TgCPSF3*, which encodes a homologue of cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 (CPSF-73 or CPSF3), an endonuclease involved in mRNA processing in eukaryotes. Point mutations in *TgCPSF3* introduced into wild-type parasites using the CRISPR/Cas9 system recapitulated the resistance phenotype. Importantly, mice infected with *T. gondii* and treated orally with AN3661 did not develop any apparent illness, while untreated controls had lethal infections. Therefore, *Tg*CPSF3 is a promising novel target of *T. gondii* that provides an opportunity for the development of anti-parasitic drugs.**

Keywords benzoxaborole; CPSF3; drug discovery; mRNA processing; *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis

Subject Categories Microbiology, Virology & Host Pathogen Interaction; Pharmacology & Drug Discovery

DOI 10.15252/emmm.201607370 | Received 22 November 2016 | Accepted 22 December 2016 | Published online 1 February 2017

EMBO Mol Med (2017) 9: 385–394

Introduction

Toxoplasma gondii chronically infects about 30–50% of the human population (Pappas *et al*, 2009; Flegr *et al*, 2014; Parlog *et al*, 2015). Toxoplasmosis is usually an unapparent or mild disease in immunocompetent individuals, but it is a serious threat in immunocompromised patients, who can experience lethal or chronic cardiac, pulmonary or cerebral pathologies. Moreover, congenital toxoplasmosis can cause a range of problems including foetal malformations and retinochoroiditis. Current therapies for toxoplasmosis are reasonably effective, but they require long durations of treatment, often with toxic side effects (Farthing *et al*, 1992; Fung & Kirschenbaum, 1996), underlining the need for new classes of drugs to treat this infection (Neville *et al*, 2015).

Benzoxaboroles are boron-containing compounds that have demonstrated efficacy in a number of clinical indications in recent years (Baker *et al*, 2009; Liu *et al*, 2014). Notably, Kerydin is an FDA-approved benzoxaborole that inhibits fungal leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) and is used for the treatment of onychomycosis. Related compounds are being developed as LeuRS inhibitors of other human pathogens (Hernandez *et al*, 2013; Palencia *et al*, 2016a,b). Other benzoxaboroles inhibit phosphodiesterase-4 (Freund *et al*, 2012), Rho kinase (Akama *et al*, 2013) and bacterial β-lactamases (Xia *et al*, 2011). Overall, these compounds are synthetically tractable and show excellent drug-like properties without significant safety liabilities.

In this study, we report that the benzoxaborole AN3661 inhibits *T. gondii* growth in human cells at low micromolar concentrations. Resistant parasites had mutations in a previously unexploited protein target, *Tg*CPSF3. Importantly, all mice treated orally with

1 Institute for Advanced Biosciences (IAB), Team Host-Pathogen Interactions & Immunity to Infection, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France
2 European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Grenoble Outstation and Unit of Virus Host-Cell Interactions, University of Grenoble-EMBL-Centre National de la Recherche Scientifique, Grenoble Cedex 9, France
3 Institute for Advanced Biosciences (IAB), OPTIMAL Small Animal Imaging Facility, Grenoble, France
4 Anacor Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA, USA
5 Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA
*Corresponding author. Tel: +33 476 63 71 09; andres.palencia@univ-grenoble-alpes.fr
**Corresponding author. Tel: +33 476 63 71 14; alexandre.bougdour@univ-grenoble-alpes.fr
***Corresponding author. Tel: +33 476 63 74 69; mohamed-ali.hakimi@univ-grenoble-alpes.fr
†These authors contributed equally to this work

© 2017 The Authors. Published under the terms of the CC BY 4.0 license

AN3661 survived an otherwise lethal *T. gondii* infection and developed protective immunity to subsequent infections. Our results suggest *Tg*CPSF3 is a promising novel target for the generation of new drugs to treat toxoplasmosis.

Results

A benzoxaborole with potent *in vitro* activity against *Toxoplasma gondii*

Human foreskin fibroblasts (HFFs) were infected with tachyzoites of the virulent RH strain and treated with benzoxaboroles, pyrimethamine, the standard of care to treat toxoplasmosis, or vehicle (DMSO). We screened a group of 20 representative benzoxaboroles that were previously shown to have activity against bacteria, fungi or other eukaryotic parasites (Rock *et al*, 2007; Xia *et al*, 2011; Hernandez *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2013; Palencia *et al*, 2016b). Some of these compounds were known to target leucyl-tRNA synthetase (LeuRS). From this group of benzoxaboroles, only two compounds, AN6426 and AN3661, showed activity against *Toxoplasma*. AN6426 is a LeuRS inhibitor with moderate activity against *Toxoplasma* and is described in a separated article (Palencia *et al*, 2016a). However, AN3661 demonstrated very good activity (IC_{50} = 0.9 μM), with potency comparable to that of pyrimethamine, and without apparent detrimental effects to host cells (Fig 1).

Selection of *Toxoplasma gondii* parasite lines resistant to AN3661 and target identification

To explore the mechanism of action of AN3661, resistant parasites were generated with 7 mM ethyl methanesulphonate (EMS) in four independent chemical mutagenesis experiments, followed by selection in the presence of 5 μM AN3661 (> sixfold the IC_{50} value) over approximately 4 weeks. This is a useful approach to increase the frequency of mutations in *Toxoplasma*, which is otherwise very low (Farrell *et al*, 2014). The resistant parasite lines were then cloned by serial dilution. In a concomitant study, *Plasmodium falciparum* parasites that were resistant to AN3661 harboured mutations in two genes, *pfcpsf3* and *pfmdr1* (Sonoiki *et al*, 2017). *CPSF3* encodes a homologue of the metal-dependent endonuclease, subunit 3, of the mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor complex (CPSF-73) (Ryan *et al*, 2004; Xiang *et al*, 2014), and *pfmdr1* encodes for an ABC transporter. Based on previous benzoxaboroles binding to proteins containing bimetal centres, we first decided to sequence *Toxoplasma CPSF3* (*TGGT1_285200; TgCPSF3*), because it has a putative MBL domain with bimetal centre (two zinc ions). In all the AN3661-resistant *T. gondii* lines that we isolated, we invariably found three single nucleotide polymorphisms (SNPs) leading to one of the following amino acid substitutions: E545K, Y328C and Y483N (Fig 2A).

In humans, CPSF-73 co-assembles in the nucleus into a large complex, including other cleavage/polyadenylation or stimulatory factors and polyadenylate polymerase (PAP). The complex cleaves

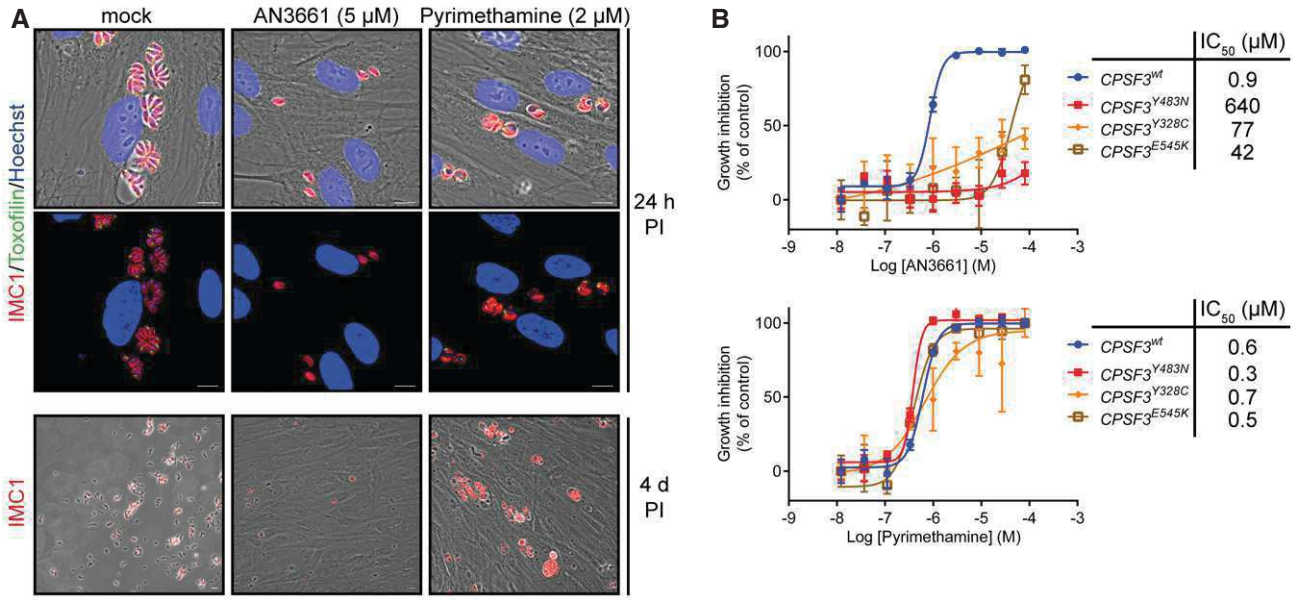


Figure 1. AN3661 demonstrates potent activity against *Toxoplasma gondii in vitro*.

A Activity of AN3661 against *Toxoplasma gondii* parasites growing intracellularly on human foreskin fibroblasts (HFFs). HFF cells were infected with tachyzoites and incubated with 5 μM AN3661, 2 μM pyrimethamine or 0.1% DMSO (mock control). Cells were fixed at 24 h and 4 days post-infection and then stained with antibodies against the *T. gondii* inner membrane complex protein 1 (IMC1, red) and rhoptry protein toxofilin (green) to define the parasite periphery and apical complex, respectively. Nuclei were labelled with Hoechst dye (blue). Scale bars represent 10 μm.

B Determination of IC_{50}s against wild-type and engineered *T. gondii* mutant strains. Dose–response curves are shown for the indicated *T. gondii* clones treated with AN3661 (top) or pyrimethamine (bottom). Parasitic vacuoles were counted by using anti-GRA1 *Toxoplasma* antibodies and parasite nuclei by Hoechst.

Data information: In (B), IC_{50}s were determined with GraphPad Prism as the average of three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars represent the standard errors.

 © 2017 The Authors

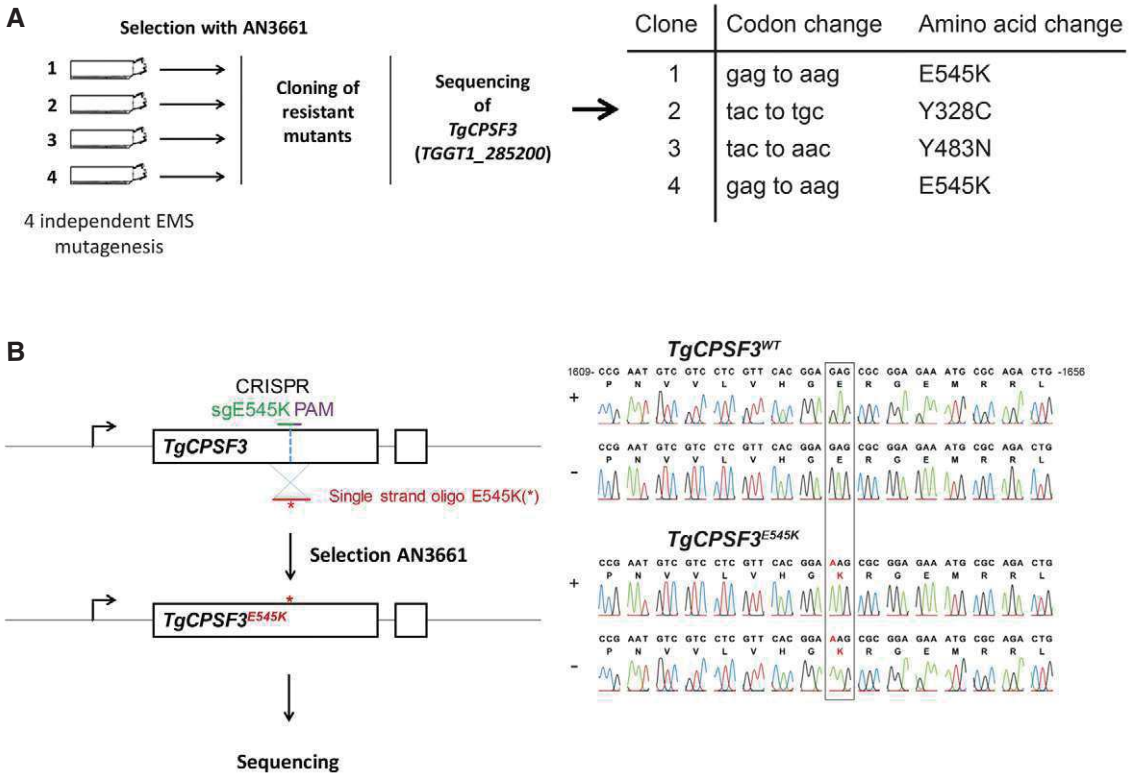


Figure 2. Resistance to AN3661 is mediated by gene variations in *TgCPSF3*.

A Strategy used to obtain *Toxoplasma gondii* resistant lines. The mutations in *Tg*CPSF3 found in four independent resistant mutants are shown.

B *CPSF3* gene editing strategy to introduce mutations into a wild-type parasite. With this methodology, the guide RNA targets the CAS9 editing enzyme to a 20-base pair site on *TgCPSF3* in wild-type parasites (green line); after cleavage by CAS9 (vertical dashed line in blue) three nucleotides downstream of the PAM NGG motif (in violet), homology-dependent repair from a 120-base donor oligonucleotide resulted in incorporation of the specific SNP (E545K, Y483N or Y328C). Only E545K (red asterisk) is shown for clarity. The corresponding chromatograms are shown on the right. Nucleotide positions relative to the ATG start codon on genomic DNA are indicated.

the 3′-end of pre-mRNAs, which is subsequently polyadenylated (Xiang *et al*, 2014; Schönemann *et al*, 2014) before the mRNA is exported into the cytoplasm for translation (Fig EV1A). CPSF-73 provides the endonuclease activity for this complex (Ryan *et al*, 2004; Dominski *et al*, 2005; Mandel *et al*, 2006). When we monitored *Tg*CPSF3 in a *T. gondii* line expressing the endogenous protein tagged with an HA-FLAG, we found that *Tg*CPSF3 accumulates in the parasite nucleus (Fig EV1B), consistent with a similar function to that of its human counterpart.

CRISPR/Cas9-mediated point mutations in *Tg*CPSF3 confer resistance to AN3661

To confirm that *Tg*CPSF3 mutations account for resistance to AN3661, we introduced each of the mutations identified in AN3661-resistant parasites into the *T. gondii* parental strain using CRISPR/Cas9 gene editing (Fig 2B). After co-transfection with oligonucleotides containing the desired mutations, resistant parasites were selected in the presence of 5 μM AN3661 (> sixfold the IC_{50} value). Emergent resistant parasites were cloned, and DNA sequencing confirmed that the mutations were correctly introduced into *TgCPSF3* (Figs 2B and EV2). No resistant parasite lines emerged following transfection with the CRISPR/Cas9 control vectors alone. Compared to wild-type parasites, mutant lines (each containing only one of the above mutations) had markedly decreased susceptibility to AN3661 (Fig 1B). To corroborate that *Tg*CPSF3 is the *bona fide* target of AN3661, we expressed a mutated copy of *TgCPSF3* ($TgCPSF3^{E545K}$) in wild-type parasites and evaluated whether the transgene would restore parasite growth in the presence of AN3661. The $TgCPSF3^{E545K}$ cassette was inserted by homologous recombination into the locus coding for the surface antigen protein 1 (*SAG1*), a non-essential gene, using CRISPR/Cas9 gene editing (Fig EV3A). All the resultant transgenic lines contained the $TgCPSF3^{E545K}$ cassette correctly inserted into the *SAG1* locus, as confirmed by both immunofluorescence and genomic analysis (Fig EV3A and B). This extra copy efficiently restored parasite growth in the presence of 5 μM AN3661, indicating that the ectopic expression of mutant $TgCPSF3^{E545K}$ conferred resistance to AN3661.

Mutations conferring resistance are clustered at the endonucleolytic site of *Tg*CPSF3

We built a structural homology model of *Tg*CPSF3 with a pre-mRNA substrate bound into the catalytic site using structures of mammalian CPSF-73 and bacterial J/Z RNases that contained a metallo-β-lactamase (MBL) domain (Fig 3A). Similar to eukaryotic

© 2017 The Authors

homologues, *Tg*CPSF3 contained an MBL domain, a β-CASP domain and a C-terminal domain with a putative endonuclease site at the interface between the MBL and β-CASP domains (Fig 3A). *Tg*CPSF3 showed strict conservation of the catalytic motifs, including highly conserved histidine and aspartic/glutamic acid residues, which coordinate the two zinc atoms involved in the cleavage of the 3′-end of pre-mRNAs (Fig EV4). The three mutated residues associated with AN3661 resistance (Y328C, Y483N and E545K) clustered to one side of the catalytic site, which, by homology to other CPSF-73 or bacterial RNases, binds the 3′-end of pre-mRNAs (Fig 3A–C). In fact, one of the mutated residues, Y483, was described as important for positioning of the 3′-end of the pre-mRNA by forming the closing gate at the catalytic site of human CPSF-73 (Mandel *et al*, 2006). To investigate the binding of the inhibitor, we performed *in silico* molecular docking of AN3661 into the homology model of *Tg*CPSF3, and found that AN3661 favourably fits (docking Glide score ~6 kcal/mol) into the catalytic site of *Tg*CPSF3, and the placement mimics the position of the 3′-end of the mRNA substrate (Fig 3C and D). More specifically, the tetrahedral boron atom of AN3661 occupies the position of the cleavage site phosphate (second to last, P_{i-1}) of the mRNA substrate near the catalytic site, with one hydroxyl group interacting with a zinc atom (Fig 3C and D). This is consistent with structures for other benzoxaboroles that were shown to bind to the bimetal centres of beta-lactamases and phosphodiesterase-4 (Xia *et al*, 2011; Freund *et al*, 2012). In this conformation, the aromatic ring AN3661 favourably binds into the inverted V-shape pocket formed by the aromatic residues Y328 and Y483. In addition, the carboxylic group of AN3661 establishes hydrogen bonds to the side chains of Y366 and S519, and to the main chain backbone atoms of Y483 and A520. Considering the clustered position of the mutations conferring resistance to AN3661 in the catalytic site of *Tg*CPSF3, it is likely that the compound binds into this site and perturbs the pre-mRNA processing activity that is essential for parasite growth.

We then extended this structural analysis to understand how the mutations confer resistance to AN3661. This analysis shows that rather than clashing with AN3661, the mutations Y483N and Y328C distort the geometry of the drug binding pocket and would lead to loss of contacts between the protein and AN3661 that decrease the affinity (Fig 3D–F). The mutation E545K has an indirect effect on the drug binding pocket that is mediated by Y483, again likely via the perturbation of the drug binding pocket (Fig 3D–G). The side chain of E545 is in a favourable conformation at 4.6 Å of Y483. The change to lysine introduces a positive charge and a bulky side chain that would clash to Y483 as it gets as close as 1.8 Å. Therefore, it is likely that the rearrangement of Y483 to prevent the clash with K545 impacts negatively on the affinity of AN3661. As the mutated residues in *Plasmodium* (Y406, D470) are equivalent to the ones we found in *T. gondii* (Fig 3B), it is very much possible that the resistance mechanism is shared. It is also interesting to note that all the mutated residues are conserved among other apicomplexan parasites (Fig 3B).

In vivo efficacy of AN3661 in a murine model of acute toxoplasmosis and development of protective immunity

In mice, type I *T. gondii* strains are virulent and lethal whereas type II strains are less virulent, but can establish chronic infections (Sibley & Ajioka, 2008). We studied type I and II strains to gain insights into the efficacy of AN3661 in both acute and chronic murine models of toxoplasmosis. Mice were infected intraperitoneally with the highly virulent type I (RH) strain and then treated once a day for 7 days with AN3661 or sulphadiazine starting 24 h after infection. Untreated mice succumbed and were euthanized within 7 days (Fig 4A), while all mice administered AN3661 at 20 mg/kg orally for 7 days demonstrated no apparent signs of illness, such as lethargy, ruffled fur or hunched posture. In contrast, after infection with the resistant $TgCPSF3^{E545K}$ line, both untreated mice and mice treated with the same regimen of AN3661 described above succumbed to infection (Fig 4A), consistent with the conclusion that AN3661 acts *in vivo* by inhibiting *Tg*CPSF3.

We also tested AN3661 against *T. gondii* type II strains by infecting mice intraperitoneally with a type II (76K) strain containing a luciferase-encoding reporter gene that is ubiquitously expressed in both acute (tachyzoite) and chronic (bradyzoite) *T. gondii* stages. We found a drastic reduction in the population size of parasites imaged in AN3661-treated mice compared to untreated mice. Differences between treated and control mice were seen as early as day

Figure 3. Structural homology model of *Tg*CPSF3 and analysis of resistance mutations.

A Domain architecture and structural model of *Tg*CPSF3 with a pre-mRNA substrate bound into the catalytic site. *Tg*CPSF3 residues are shown in cartoon and surface representation, with the following colour code: metallo-β-lactamase in turquoise, β-CASP domain in yellow and C-terminal domain in pink. A pre-mRNA substrate (5-mer) is shown for reference as green sticks, and the two catalytic zinc atoms are shown as spheres. Mutations identified in AN3661-resistant strains of *Toxoplasma gondii* are in the *Tg*CPSF3 catalytic site and are shown as red sticks. The protein model was built using the structures of eukaryotic/archaeal CPSF homologues [Protein Data Bank (PDB) accession codes: 3AF5, 2I7V] and bacterial RNases Z/J (PDB codes: 3A4Y, 3IEM and 3AF5).

B Comparison of sequences in homologous proteins near the residues mutated in *Tg*CPSF3. The mutated positions found in *T. gondii* and *Plasmodium falciparum* parasites that were resistant to AN3661 are pointed by arrows. Sequences shown are from *T. gondii* (*Tg*), *Hammondia hamondi* (*Hh*), *Neospora caninum Liverpool* (*Nc*), *Cryptosporidium parvum Iowa II* (*Cp*), *Babesia bigemina* (*Bb*), *Theileria equi strain WA* (*Te*) and *P. falciparum 3D7* (*Pf*).

C Zoomed-in view of the *Tg*CPSF3 mRNA cleavage site showing the three residues which are changed in the resistant mutants: Y328, Y483 and E545. The 3′-mRNA substrate (shown as green sticks) was docked in the catalytic site by using as templates bacterial RNase complexes with RNA (PDB codes: 3IEM and 5A0T). mRNA phosphates are labelled (P_i) and P_{i-1} corresponds to the position of cleavage. The zinc atoms (shown as spheres) were modelled by using the metallo-β-lactamase and β-CASP domains of RNase J (PDB code: 5A0T).

D *In silico* docking of AN3661 into the catalytic site of the *Tg*CPSF3. The docking position was calculated with Glide in Maestro. Protein surface, resistant mutants and Zn ions are colour-coded as in (A), and AN3661 is shown in sticks-surface-overlapped representation, with carbon in purple sticks, oxygen in red sticks and boron in pink sticks. Protein residues interacting with AN3661 are shown as sticks, and hydrogen bonds are depicted are green-dashed lines.

E–G Modelling of resistance mutations Y328C (F), Y483N (E) and E545K (G). The position of the mutations was modelled in Coot by using the most favourable rotamer conformation. In the case of the mutant Y483N, two rotamers (rot1 and rot2) were similarly favourable. The expected rearrangements as a consequence of the mutations are represented by curved arrows.

 © 2017 The Authors

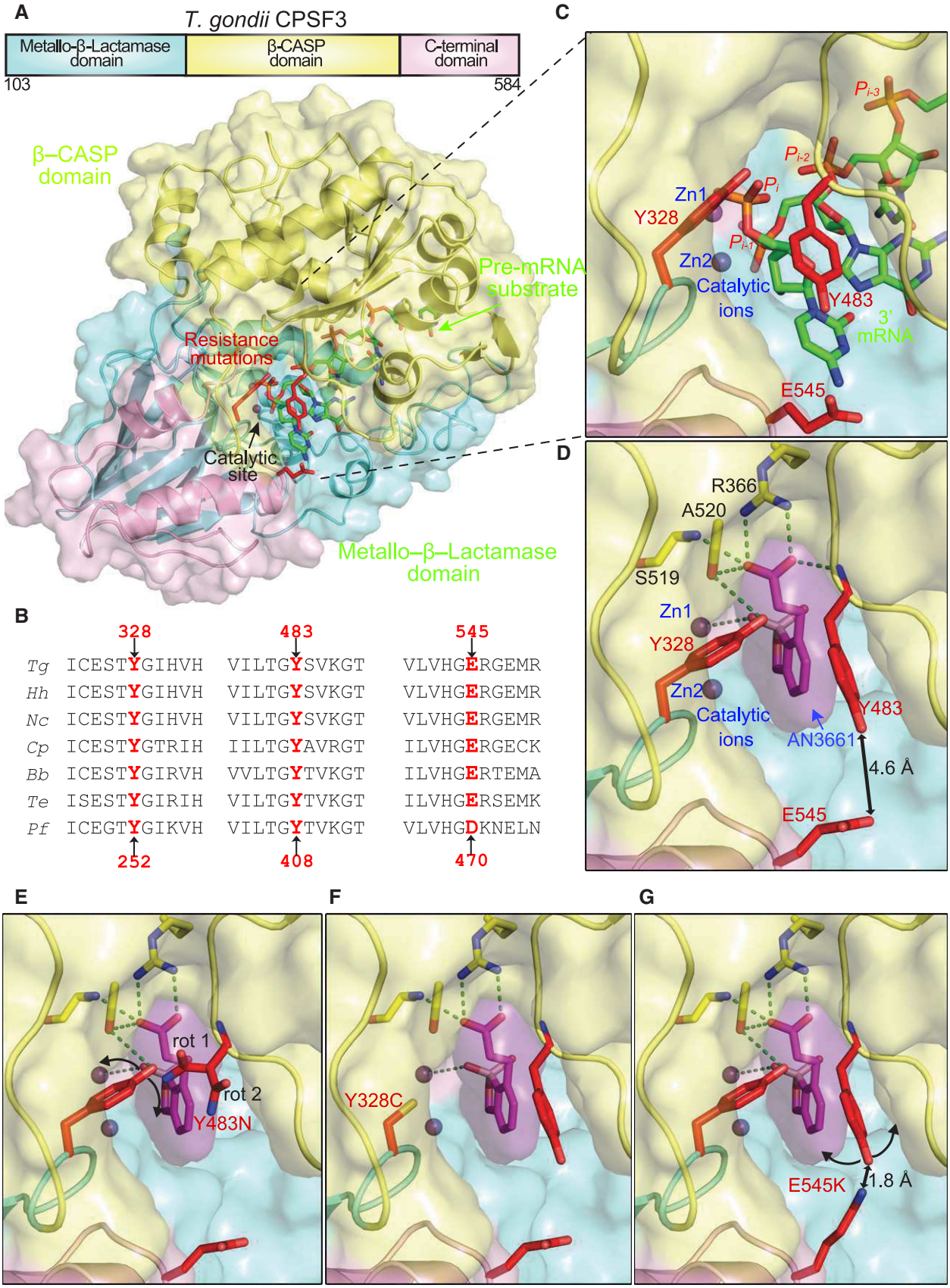


Figure 3.

© 2017 The Authors

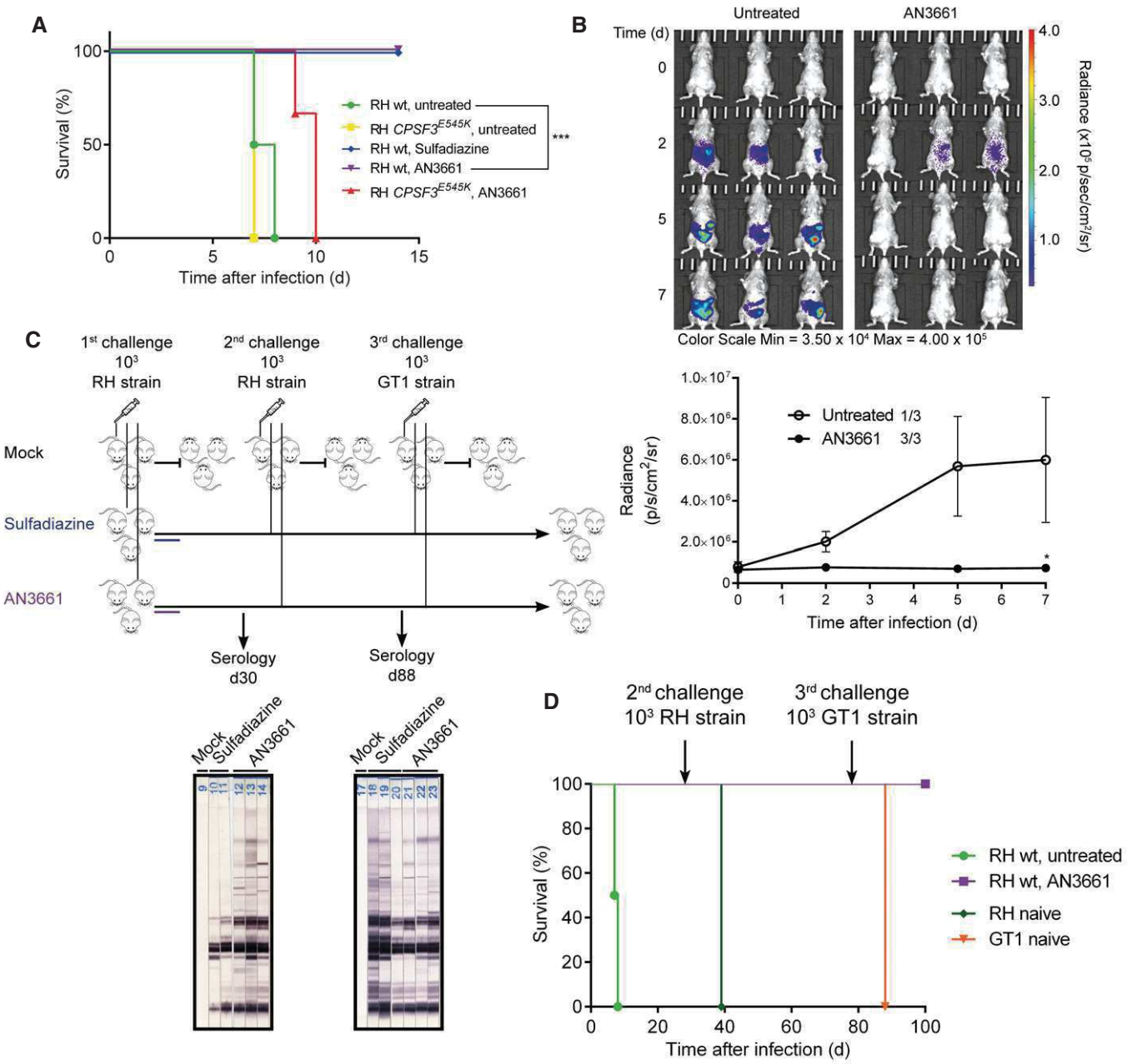


Figure 4. Action of AN3661 against murine toxoplasmosis.

A Acute toxoplasmosis. Survival curves of CBA/JRj mice infected intraperitoneally with 10^3 tachyzoites of type I RH wild-type (wt) or *TgCPSF3*^{E545K} mutant strains. Mice were treated orally with 20 mg/kg AN3661 or 200 mg/kg sulphadiazine once daily beginning 1 day post-infection (three independent experiments, each with three mice per experimental group. A similar scheme is indicated in the flow diagram in (C).

B Chronic toxoplasmosis. CBA/JRj mice were infected intraperitoneally with luciferase expressing type II *T. gondii* (76K strain) (three animals per group for each experiment). Mice were treated with AN3661 as in (A). The top panel depicts live-animal imaging analysis of treated and control animals. The lower panel shows average whole-animal radiance in untreated mice (1/3) or treated mice (3/3) that survived from 0 to 7 days post-infection. Error bars represent mean ± SEM.

C Flow diagram used to study the immunity to *Toxoplasma* and the serological status of mice. Untreated mice succumbed to infection, and thus new groups of healthy CBA/JRj mice (N = 3, naïve) were used for the challenges with RH and GT1 strains. The serological status was determined by immunoblot analysis of sera harvested at the indicated time points.

D Survival curves of the CBA/JRj mice challenged with RH strain after the primary infection with RH strain shown in (A), and challenged a third time with the GT1 strain as indicated in (C).

Data information: In (A), significance was tested using log-rank (Mantel–Cox) test (***P-value = 0.0009) and Gehan–Breslow–Wilcoxon test (P-value = 0.0015). In (B, lower panel), significance was assessed by unpaired Student's t-test (*P = 0.020).

 © 2017 The Authors

2 post-infection and persisted over 7 days of monitoring (Fig 4B). We next explored whether AN3661 treatment could confer protective immunity to secondary infection. First, serologic analyses of animals treated with AN3661 revealed enriched levels of anti-*Toxoplasma*-specific antibodies (30 days after infection), suggesting the development of immunity to toxoplasmosis (Fig 4C). Then, by providing lethal challenges of the hypervirulent RH and GT1 strains to the same mice, we confirmed that the initial 7-day treatment with AN3661 enhanced an immune response in 100% of mice, which was capable of protecting them from subsequent *Toxoplasma* infections (Fig 4C and D).

Taken together, AN3661 possesses all of the attributes of a highly promising future drug against *T. gondii*. Indeed, the compound is rapidly parasiticidal after oral administration, prevents dissemination of parasites in deep tissues and enables protective immunity against toxoplasmosis in mice.

Discussion

Available drugs to treat toxoplasmosis have limitations in efficacy and can cause serious adverse effects. Moreover, toxoplasmosis is now recognized as a leading cause of foodborne illness in the United States (Scallan *et al*, 2011). Since a *Toxoplasma* vaccine for use in humans is not currently available, new classes of drugs, preferably directed against novel targets, are needed. Here we report that the benzoxaborole AN3661 inhibits *Toxoplasma* growth *in vitro* and, when orally administered to mice, is not only effective against otherwise lethal infections but also enables protective immunity against subsequent *Toxoplasma* infections. Genetic evidence reported herein supports the conclusion that AN3661 acts via the inhibition of a novel target of *T. gondii*, *Tg*CPSF3, which is homologous to the endonuclease subunit (CPSF-73) within the human CPSF complex that cleaves 3′-mRNAs (Ryan *et al*, 2004; Mandel *et al*, 2006).

In another study, it is shown that AN3661 is also active against the human malaria parasite *P. falciparum* (Sonoiki *et al*, 2017). Interestingly, *T. gondii* and *P. falciparum* parasite lines selected for resistance to AN3661 both harboured mutations in residues located in the active site of CPSF3. Indeed, two out of the three SNPs selected in *T. gondii,* Y483N and E545K, correspond to SNPs selected in *P. falciparum,* Y408S and D470N. Importantly, knock-in of these mutations using CRISPR/Cas9 gene editing recapitulated resistance to AN3661 in *T. gondii* and *P. falciparum* parasites *in vitro*. In addition, mice infected with the resistant $TgCPSF3^{E545K}$ line and then treated with AN3661 did not survive to infection, whereas mice infected with wild-type strain and treated did, thus validating CPSF3 as the *Toxoplasma* target of AN3661 *in vivo*. Combined, these studies strongly support the conclusion that AN3661 acts via the inhibition of CPSF3 in these apicomplexan parasites.

To our knowledge, CPSF3 has not previously been proposed as a target for drug discovery; however, in very recent study on *T. gondii* genome-wide gene-knockout screenings, CPSF3 was identified as an essential gene for the life of the parasite (Sidik *et al*, 2016). Given that CPSF3 has an essential function during 3′-mRNA processing and is conserved among eukaryotes, structural and mechanistic studies to identify key differences in CPSF3 between humans and pathogens are warranted. Similar to its human homologue, *Tg*CPSF3 accumulates in the nucleus of *T. gondii* (Fig EV1B) and presumably forms a complex with other CPSF subunits whose genes are present in the *Toxoplasma* genome. Indeed, genes encoding CPSF3 homologues are also conserved in other protozoans (Fig 3D), providing an opportunity to inhibit multiple parasites with the same or related compounds.

After acute infection characterized by fast asexual reproduction, *T. gondii* parasites disseminate into tissues (including brain, lungs and heart) and form cysts where they reproduce slowly, often for the lifetime of the host. In immunocompromised hosts, dormant infections can reactivate, causing encephalitis, pneumonitis, myocarditis and other serious sequelae for which available therapies offer suboptimal efficacy (Crespo *et al*, 2000). Our *in vivo* experiments demonstrating activity of AN3661 against *Toxoplasma* infections in murine models of infection suggest a new avenue in toxoplasmosis drug discovery and should encourage new studies to evaluate the activity of this CPSF3 inhibitor and related compounds against slow-growing bradyzoites in cysts, which are so far untreatable. Furthermore, the appearance of full protective immunity against *Toxoplasma* in mice that were treated with AN3661 is noteworthy and could have implications for vaccine development or other preventive therapies.

Materials and Methods

Parasite strains and cell culture

The parasites used were *T. gondii* type I RH strain wild type or mutant *ku80* for gene editing by homologous recombination, and the *T. gondii* type II 76K strain expressing green fluorescent protein (GFP) and luciferase (provided by Michael E. Grigg, National Institute of Health, Bethesda). The *T. gondii* strains were maintained by serial passage in HFF monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FBS (Invitrogen), 25 mM Hepes buffer, pH 7.2, and 50 mg/ml each of penicillin and streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 5% CO_2 in humidified air.

Toxoplasma gondii random mutagenesis

Parasites were chemically mutagenized according to a previously published protocol (Coleman & Gubbels, 2012; Farrell *et al*, 2014). Briefly, ~10^7 tachyzoites growing intracellularly in HFF cells (18–25 h post-infection) in a T25 flask were incubated at 37°C for 4 h in 0.1% FBS DMEM growth medium containing either 7 mM ethyl methanesulphonate (EMS, Sigma, diluted from a 1 M stock solution in DMSO) or the appropriate vehicle controls. Plaque assays revealed that 7 mM EMS induced ~70% killing of the parasite population, theoretically leading to ~20 SNPs per genome (Farrell *et al*, 2014). After exposure to mutagen, parasites were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and the mutagenized population was allowed to recover in a fresh T25 flask containing an HFF monolayer in the absence of drug for 3–5 days. Released tachyzoites were then inoculated into fresh cell monolayers in medium containing 5 μM AN3661 and incubated until viable extracellular tachyzoites emerged 8–10 days later. Surviving parasites were passaged once more under continued AN3661 treatment and cloned by limiting dilution. Four cloned mutants were isolated each from four independent mutagenesis experiments. Each flask

© 2017 The Authors

therefore contained unique SNP pools. *TgCPSF3* (*TGGT1_285200*) was amplified by PCR using primers TGGT1_285200_F and TGGT1_285200_R (Appendix Table S1). The resulting PCR products were sequenced to identify putative SNPs.

Plasmids

The bicistronic vectors expressing the Cas9 genome editing enzyme and specific sgRNAs targeting the *CPSF3* coding sequence were constructed as described previously (Curt-Varesano *et al*, 2016). Briefly, oligonucleotides CPSF3^{E545K}-CRISPR-FWD and CPSF3^{E545K}-CRISPR-REV, CPSF3^{Y328C}-CRISPR-FWD and CPSF3^{Y328C}-CRISPR-REV, and CPSF3^{Y483N}-CRISPR-FWD and CPSF3^{Y483N}-CRISPR-REV (Appendix Table S1) were annealed and ligated into the pTOXO_Cas9CRISPR plasmid to create vectors used for construction of *T. gondii* recombinant for *CPSF3^{E545K}*, *CPSF3^{Y328C} and CPSF3^{Y483N}*, respectively. The plasmid used for targeting *SAG1* coding sequence was constructed as above using the oligonucleotides SAG1-CRISPR-FWD and SAG1-CRISP-REV.

Toxoplasma gondii genome editing

For construction of the recombinant parasites harbouring allelic replacement for *CPSF3^{Y328C}*, *CPSF3^{Y483N}* and *CPSF3^{E545K}*, the *T. gondii* RH strain was transfected by electroporation using parameters established previously (Bougdour *et al*, 2013) with pTOXO_Cas9CRISPR vectors targeting the *CPSF3* coding sequence (sgCPSF3^{Y328C}, sgCPSF3^{Y483N} and sgCPSF3^{E545K}) and their respective 120-base donor oligonucleotides (CPSF3^{Y328C}_(s), CPSF3^{Y483N}_(s) and CPSF3^{E545K}_(s); Appendix Table S1) for homology-directed repair. Recombinant parasites were selected with 5 μM AN3661 prior to subcloning by limited dilution, and allelic replacement was verified by sequencing of *TgCPSF3* genomic DNA as described above.

For construction of the *SAG1* insertional mutant, *T. gondii* RH *ku80* parasites were co-transfected with a mixture of the pTOXO_Cas9CRISPR vector targeting the *SAG1* coding sequence with a repair template corresponding to a purified amplicon containing the *CPSF3^{E545K}* cassette with homology arms of 60 nucleotides flanking the site of alteration targeted by sgSAG1 and cleaved by Cas9 (5:1 mass ratio). These amplicons were generated by PCR amplification of the *CPSF3^{E545K}* cassette using primers HRSAG1-5UTR-CPSF3_F and HRSAG1-3UTR-CPSF3_R (Appendix Table S1) and genomic DNA extracted from the *CPSF3^{E545K}* recombinant parasites as template. As a negative control, a PCR amplicon was generated using genomic DNA from wild-type RH parasites. Stable recombinants were selected in the presence of 5 μM AN3661, single cells were cloned by limiting dilution, and sequences were verified by PCR analysis as described in Fig EV3 using the primers 5UTR-SAG1_F and SAG1_R (Appendix Table S1). The constructed *TgCPSF3^{E545K}* line represents a new and highly efficient selection cassette that expands the current genome editing toolbox for *T. gondii*.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown on coverslips were fixed in 3% formaldehyde for 20 min at room temperature, permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100 for 5 min and blocked in PBS containing 3% (w/v) BSA. The cells were then incubated for 1 h with primary antibodies (mouse anti-IMC1, IMC1 = inner membrane complex protein 1; and rabbit anti-toxofilin) followed by the addition of secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 594 (Molecular Probes) to detect intracellular parasites. Nuclei were stained for 10 min at room temperature with Hoechst 33258. Coverslips were mounted on a glass slide with Mowiol mounting medium, and images were acquired with an Axio Imager M2 fluorescence microscope with ApoTome 2 module (Carl Zeiss, Inc.).

Determination of IC_{50}s against *Toxoplasma gondii* by fluorescence imaging assays

The *in vitro* inhibitory activity of AN3661 on *T. gondii* proliferation was determined by high-content fluorescence imaging as follows; HFFs at a density of 10,000 cells per well in 96-well plates were infected with 4×10^4 parasites. Invasion was synchronized by briefly centrifuging the plate at 400 rpm, and plates were placed at 37°C for 2 h. Infected cells were then washed three times with PBS followed immediately by the addition of the test compounds diluted at the indicated final concentrations in culture medium. Pyrimethamine was used as a positive control. After 24 h of growth, nuclei were stained with Hoechst 33342 at 5 μg/ml for 20 min. Cells were washed with PBS and fixed with pre-warmed 3.7% formaldehyde for 10 min at 37°C. Fixed cells were permeabilized in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100. Parasite vacuoles were immunostained by incubating in blocking solution (3% BSA in PBS) for 1 h followed by incubation with anti-GRA1 primary antibody (specific to *Toxoplasma*) and Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher). Images were automatically acquired using the ScanR microscope system (Olympus) with a 20× objective. Twenty fields per well were acquired and analysed using the ScanR analysis module. Parasitophorous vacuoles were analysed as follows: a background subtraction was applied in all sets of images and an intensity algorithm module was used with a minimum of 50 pixels size to segment the smallest vacuoles corresponding to those containing a single tachyzoite. Parasite nuclei were discriminated from host cell nuclei by using an edge segmentation module by ScanR analysis. A gating procedure was used to hierarchically filter the selected data points with precise boundaries (e.g. number of vacuoles vs. number of parasites/vacuole). Experiments were done in triplicate, and data were processed using the GraphPad Prism software to determine the IC_{50}s.

Homology model

The *Tg*CPSF3 model was built by homology modelling using the X-ray crystallographic coordinates of eukaryotic/archaeal CPSF homologues (PDB codes: 3AF5, 2I7V) and bacterial RNases Z/J [Protein Data Bank (PDB) accession codes: 3A4Y, 3IEK and 3AF5] with I-TASSER (Zhang, 2008). The position of the zinc atoms was modelled by aligning to the metallo-β-lactamase and β-CASP domains of RNase J (PDB code: 5A0T) and manually adjusted in Coot using local refinements (Emsley & Cowtan, 2004). The 3′-mRNA substrate was modelled in the catalytic site of *Tg*CPSF3 using as templates bacterial RNase complexes with RNA (PDB codes: 3IEM and 5A0T). Manual adjustments, mutagenesis and local energy refinements were carried out in Coot. The PyMOL Molecular Graphics System (v.1.6.0, Schrodinger, LLC) was used to prepare figures.

 © 2017 The Authors

In silico docking of AN3661 into the catalytic site of *Tg*CPSF3

The three-dimensional structure of AN3661, with the boron atom in tetrahedral configuration, was built using Maestro interface in the Schrodinger suite (Maestro, version 9.5, Schrodinger, LLC, New York, NY, USA, 2013). The ligand was prepared using the LigPrep module of Maestro (LigPrep, version 2.7, Schrodinger, LLC) and was minimized using OPLS-2005 force field.

The three-dimensional structure of a *Tg*CPSF3 protein model, built using the PBD entry 3IEM as a template, was refined using the Protein Preparation Wizard of Maestro. All of the crystallographic water molecules, except that in the binding site, were removed from the three-dimensional structure of the protein. Following these steps, a minimization step of the protein was carried out in Maestro. In order to perform virtual docking experiments, the receptor grid for CPSF3 was set up and generated from a Receptor Grid Generation panel: a cubic box of 10 Å per side was built and centred on the zinc ion cluster to define the active site of the protein. Docking of AN3661 was performed using the extra precision (XP) method of Glide with default settings (Friesner *et al*, 2006).

In vivo mouse therapeutic efficacy assays

All animal procedures were conducted under pathogen-free conditions in compliance with established institutional guidance and approved protocols from the European Directive 2010/63/EU. We used randomization and blinding to treatment assignment to reduce bias in mice selection and outcome assessment. Three independent experiments were performed with three mice per treatment group (female CBA/JRj mice, Janvier, Le Genest-Dt-Isle, France; 7–9 weeks old). Mice were infected intraperitoneally with 10^3 tachyzoites of the type I virulent RH wild-type and CPSF3^{E545K} mutant strains, 10^3 tachyzoites of the type I GT1, or with 10^5 tachyzoites of the type II 76K GFP Luc strain. These inocula routinely resulted in high mortality in control mice at 6–12 days post-infection. All treatments were initiated at day 1 post-infection and were continued for seven consecutive days. Treated mice were orally administered 20 mg/kg AN3661 or 200 mg/kg sulphadiazine (Sigma), as previously described (Romand *et al*, 1993), both suspended in 1% (w/v) methylcellulose and 0.1% (v/v) Tween-80. Parasitemias of mice infected by the type II 76K GFP Luc strain were monitored using the *in vivo* Imaging System (IVIS Kinetic; Perkinelmer, USA) to acquire bioluminescence signals at days 0, 2, 5 and 7 after infection. Day 0 corresponds to the signal at 12 h after infection, which is considered the optimal time point 0 because parasites are not detectable before 12–24 h after infection. Five minutes before imaging, mice received an intraperitoneal injection of 150 μg/g of D-luciferin (Promega, France) and were then anesthetized (isoflurane 4% for induction and 1.5% thereafter) and placed in the optical imaging system for image acquisition. This allowed localization of luciferase-positive parasites and evaluation of the parasite load. Bioluminescence signals were expressed as photons/seconds (p/s). The mice serological status for toxoplasmosis was determined by Western blot analysis using the LDBio-Toxo II IgG test (LDBIO Diagnostics, Lyon, France) with an anti-mouse IgG–alkaline phosphatase conjugate. Mice sera were extracted at days 30 and 88 after infection.

The paper explained

Problem
Toxoplasmosis is a widespread foodborne infection in humans that poses significant public health problems. Caused by the protozoan apicomplexa parasite *T. gondii*, toxoplasmosis, a usually mild disease, can turn into a major threat during pregnancy or in immunocompromised patients who experience lethal or chronic cardiac, pulmonary or cerebral pathologies. Current drugs to treat toxoplasmosis including sulphadiazine and pyrimethamine require long courses of therapy and are often limited by side effects. Therefore, new classes of drugs, preferably directed against novel targets, are needed.

Results
Benzoxaboroles are boron-containing compounds effective against a wide range of infectious pathogens. This study reports the potent activity of the benzoxaborole AN3661 against *Toxoplasma* growth *in vitro*. Importantly, when orally administered to mice, the compound is not only effective against otherwise lethal infections but also enables protective immunity against subsequent *Toxoplasma* infections and without signs of toxicity. AN3661-resistant parasites have been readily selected *in vitro* and the resistance-causing mutations were identified in residues of the active site of CPSF3, the endonuclease that cleaves the 3′-end of immature mRNAs in eukaryotes. Knock-in of the mutations using CRISPR/Cas9 gene editing recapitulated the phenotype resistance to AN3661 both *in vitro* and in the murine model of toxoplasmosis, thus validating CPSF3 as the primary target of AN3661.

Impact
The discovery of CPSF3 as the target of AN3361 opens a new avenue to rationally design inhibitors with improved drug-like properties against *Toxoplasma* and related parasites of the phylum including *Plasmodium* spp that cause malaria.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements
This work was supported by the Laboratoire d'Excellence (LabEx) ParaFrap [ANR-11-LABX-0024], the European Research Council [ERC Consolidator Grant No. 614880 Hosting TOXO to M.A.H.], the grant ANR Blanc 2012 TOXOHDAC [ANR-12-BSV3-0009-01], and the grant ANR Jeune Chercheur 2012 ToxoEffect [ANR- 12-JSV3–0004-01].

Author contributions
AP, AB, SC and M-AH conceived and designed the experiments; AP, AB, M-PB-P, BT, R-LB, CS, JV, VJ, GG, EE, HP and M-AH acquired data. AP, AB and M-AH analysed and interpreted data; AP and AB prepared the manuscript with main input by PJR, YRF, SC and M-AH; all authors provided comments and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest
E.E. and Y.R.F. are employees of Anacor Pharmaceuticals, Inc. The other authors declare that they have no conflict of interest.

References

Akama T, Dong C, Virtucio C, Sullivan D, Zhou Y, Zhang Y-K, Rock F, Freund Y, Liu L, Bu W *et al* (2013) Linking phenotype to kinase: identification of a novel benzoxaborole hinge-binding motif for kinase inhibition and

© 2017 The Authors

development of high-potency rho kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 347: 615 – 625

Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang Y-K, Hernandez V, Xia Y (2009) Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem* 1: 1275 – 1288

Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart M-P, Ortet P, Barakat M, Kieffer S, Curt-Varesano A, Curt-Bertini R-L, Bastien O, Coute Y *et al* (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

Coleman BI, Gubbels M-J (2012) A genetic screen to isolate *Toxoplasma gondii* host-cell egress mutants. *J Vis Exp* 60: e3807

Crespo M, Quereda C, Pascual J, Rivera M, Clemente L, Cano T (2000) Patterns of sulfadiazine acute nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 54: 68 – 72

Curt-Varesano A, Braun L, Ranquet C, Hakimi M-A, Bougdour A (2016) The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells: TgASP5 is essential for GRA16 and GRA24 export. *Cell Microbiol* 18: 151 – 167

Dominski Z, Yang X-C, Purdy M, Wagner EJ, Marzluff WF (2005) A CPSF-73 homologue is required for cell cycle progression but not cell growth and interacts with a protein having features of CPSF-100. *Mol Cell Biol* 25: 1489 – 1500

Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2126 – 2132

Farrell A, Coleman BI, Benenati B, Brown KM, Blader IJ, Marth GT, Gubbels M-J (2014) Whole genome profiling of spontaneous and chemically induced mutations in *Toxoplasma gondii*. *BMC Genom* 15: 354

Farthing C, Rendel M, Currie B, Seidlin M (1992) Azithromycin for cerebral toxoplasmosis. *Lancet* 339: 437 – 438

Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (2014) Toxoplasmosis – a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9: e90203

Freund YR, Akama T, Alley MRK, Antunes J, Dong C, Jarnagin K, Kimura R, Nieman JA, Maples KR, Plattner JJ *et al* (2012) Boron-based phosphodiesterase inhibitors show novel binding of boron to PDE4 bimetal center. *FEBS Lett* 586: 3410 – 3414

Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT (2006) Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 49: 6177 – 6196

Fung HB, Kirschenbaum HL (1996) Treatment regimens for patients with toxoplasmic encephalitis. *Clin Ther* 18: 1037 – 1056; discussion 1036

Hernandez V, Crépin T, Palencia A, Cusack S, Akama T, Baker SJ, Bu W, Feng L, Freund YR, Liu L *et al* (2013) Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 1394 – 1403

Liu CT, Tomsho JW, Benkovic SJ (2014) The unique chemistry of benzoxaboroles: current and emerging applications in biotechnology and therapeutic treatments. *Bioorg Med Chem* 22: 4462 – 4473

Mandel CR, Kaneko S, Zhang H, Gebauer D, Vethantham V, Manley JL, Tong L (2006) Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3′-end-processing endonuclease. *Nature* 444: 953 – 956

Neville AJ, Zach SJ, Wang X, Larson JJ, Judge AK, Davis LA, Vennerstrom JL, Davis PH (2015) Clinically available medicines demonstrating anti-Toxoplasma activity. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 7161 – 7169

Palencia A, Li X, Bu W, Choi W, Ding CZ, Easom EE, Feng L, Hernandez V, Houston P, Liu L *et al* (2016b) Discovery of novel oral protein synthesis inhibitors of Mycobacterium tuberculosis that target leucyl-tRNA synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 6271 – 6280

Palencia A, Liu R-J, Lukarska M, Gut J, Bougdour A, Touquet B, Wang E-D, Li X, Alley MRK, Freund YR *et al* (2016a) Cryptosporidium and Toxoplasma parasites are inhibited by a benzoxaborole targeting leucyl-tRNA synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 5817 – 5827

Pappas G, Roussos N, Falagas ME (2009) Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39: 1385 – 1394

Parlog A, Schlüter D, Dunay IR (2015) *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol* 37: 159 – 170

Rock FL, Mao W, Yaremchuk A, Tukalo M, Crépin T, Zhou H, Zhang Y-K, Hernandez V, Akama T, Baker SJ *et al* (2007) An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science* 316: 1759 – 1761

Romand S, Pudney M, Derouin F (1993) In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2371 – 2378

Ryan K, Calvo O, Manley JL (2004) Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3′ processing endonuclease. *RNA* 10: 565 – 573

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States–major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7 – 15

Schönemann L, Kühn U, Martin G, Schäfer P, Gruber AR, Keller W, Zavolan M, Wahle E (2014) Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes Dev* 28: 2381 – 2393

Sibley LD, Ajioka JW (2008) Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol* 62: 329 – 351

Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh M-H, Wang T, Nasamu AS, Thiru P, Saeij JPJ, Carruthers VB, Niles JC *et al* (2016) A genome-wide CRISPR screen in Toxoplasma identifies essential apicomplexan genes. *Cell* 166: 1423 – 1435.e12

Sonoiki E, Ng CL, Lee MCS, Guo D, Zhang Y-K, Zhou Y, Alley MRK, Ahyong V, Sanz-Alonso LM, Monasterio MJL *et al* (2017) A potent antimalarial benzoxaborole targets a Plasmodium falciparum cleavage and polyadenylation specificity factor homologue. *Nat Commun* in press

Xia Y, Cao K, Zhou Y, Alley MRK, Rock F, Mohan M, Meewan M, Baker SJ, Lux S, Ding CZ *et al* (2011) Synthesis and SAR of novel benzoxaboroles as a new class of β-lactamase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 2533 – 2536

Xiang K, Tong L, Manley JL (2014) Delineating the structural blueprint of the Pre-mRNA 3′-end processing machinery. *Mol Cell Biol* 34: 1894 – 1910

Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40

Zhang F, Du J, Wang Q, Hu Q, Zhang J, Ding D, Zhao Y, Yang F, Wang E, Zhou H (2013) Discovery of N-(4-sulfamoylphenyl)thioureas as *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors. *Org Biomol Chem* 11: 5310 – 5324

License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

 © 2017 The Authors