



**HAL**  
open science

# Modulation de l'activité des cellules dendritiques par la réponse UPR induite lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*

Anaïs Poncet

► **To cite this version:**

Anaïs Poncet. Modulation de l'activité des cellules dendritiques par la réponse UPR induite lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS038 . tel-02923628

**HAL Id: tel-02923628**

**<https://theses.hal.science/tel-02923628>**

Submitted on 27 Aug 2020

**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.

**UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE**  
École Doctorale Biologie-Santé  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR en Biologie Santé de l'Université Lille Nord de France**  
Discipline : Cancérologie, génétique, hématologie, immunologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Anaïs PONCET**

Le 16 Décembre 2019

---

**Modulation de l'activité des cellules dendritiques par la  
réponse UPR induite lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*.**

---

Composition du jury :

Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT, Président du jury  
Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, Rapporteur  
Monsieur le Docteur Arnaud MORIS, Rapporteur  
Madame le Docteur Muriel PICHAVANT, Examineur  
Monsieur le Docteur Étienne MEUNIER, Examineur  
Madame le Docteur Sabrina MARION, Directeur de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille  
Équipe 2 - Biologie des parasites Apicomplexes  
INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université de Lille  
1 rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex, FRANCE



**UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE**  
École Doctorale Biologie-Santé  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR en Biologie Santé de l'Université Lille Nord de France**  
Discipline : Cancérologie, génétique, hématologie, immunologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Anaïs PONCET**

Le 16 Décembre 2019

---

**Modulation de l'activité des cellules dendritiques par la  
réponse UPR induite lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*.**

---

Composition du jury :

Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT, Président du jury  
Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, Rapporteur  
Monsieur le Docteur Arnaud MORIS, Rapporteur  
Madame le Docteur Muriel PICHAVANT, Examineur  
Monsieur le Docteur Étienne MEUNIER, Examineur  
Madame le Docteur Sabrina MARION, Directeur de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille  
Équipe 2 - Biologie des parasites Apicomplexes  
INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université de Lille  
1 rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex, FRANCE





## Résumé

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un parasite intracellulaire obligatoire responsable d'une zoonose cosmopolite, la toxoplasmose. Chez les sujets sains, les parasites de type II persistent sous forme de kystes cérébraux, responsables de maladies mentales sévères et augmentant le risque d'apparition de maladies neurodégénératives. Le contrôle de la toxoplasmose chronique dépend de la sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire IL-12 par les cellules dendritiques (DCs) permettant l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LTs CD8<sup>+</sup>) cytotoxiques et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ . Les LTs CD8<sup>+</sup> jouent un rôle clé dans l'élimination des cellules parasitées durant la phase aigüe de l'infection, mais aussi dans l'établissement d'une immunité protectrice à long terme. Afin de survivre et persister, *T. gondii* sécrète de nombreux facteurs de virulence qui modulent les réponses immunitaires de son hôte. Des travaux récents ont mis en évidence le rôle clé de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) dans la régulation des réponses immunitaires. La réponse UPR est une réponse cytoprotectrice induite durant un stress cellulaire déclenché lors de variations dans l'homéostasie protéique et lipidique au sein du réticulum endoplasmique mais aussi lors d'un stress infectieux. Jusqu'à présent, l'influence de l'infection par *T. gondii* sur la réponse UPR n'est pas connue. Nous avons émis l'hypothèse que l'induction de l'UPR par *T. gondii* dans les DCs pourrait moduler leur capacité de présentation antigénique et la sécrétion de cytokines inflammatoires, impactant ainsi la dissémination et la persistance du parasite. En utilisant, des DCs déficientes pour certains effecteurs de l'UPR (IRE1 $\alpha$  et XBP1s), nous avons examiné l'impact de leur activité sur les DCs infectées. *In vitro*, nos résultats ont montré que *T. gondii* active la voie IRE1 $\alpha$  de l'UPR d'une manière dépendante de la voie MyD88 et contrôle ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 et la présentation antigénique d'antigènes parasitaires par le CMH-I. Dans les souris infectées, la voie IRE1 $\alpha$  est spécifiquement activée dans la sous-population de cDC1 et régule l'activation des LTs CD8<sup>+</sup>, essentiels à la production de l'IFN- $\gamma$ . De plus, les souris déficientes pour IRE1 $\alpha$  et XBP1 spécifiquement dans les DCs ne contrôlent pas la prolifération des parasites et succombent à l'infection aigüe. Notre étude révèle donc un rôle protecteur essentiel de cette voie dans les DCs pour combattre l'infection à *T. gondii*.



## Abstract

The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is one of the most common zoonotic pathogen invading all animals, including humans. In healthy individuals, type II parasite persists in cysts in the central nervous system leading to severe mental disorders and increasing the risk of developing neurodegenerative diseases. The control of chronic toxoplasmosis relies on dendritic cells (DCs) functions that activate the IL-12- induced T cell IFN- $\gamma$ -derived response. In order to survive, *T. gondii* secretes an arsenal of virulence factors that modulate host immune responses; however the interplay between DCs and *T. gondii* has been poorly explored. Recent studies highlighted the intricate molecular cross-talk between the Unfolded Protein Response (UPR) and the innate pathways. The UPR response is a cytoprotective response induced during a cellular stress triggered by an imbalance in protein and lipid homeostasis, but also during intracellular pathogen infection. So far, nothing is known about the influence of *T. gondii* infection on the UPR. We hypothesized that *T. gondii* induction of the UPR could modulate the antigenic presentation ability and cytokine secretion of DCs, thereby impacting parasite dissemination and persistence. Using, Bone-Marrow-derived DC (BMDCs) and mice deficient for the ER sensor IRE1 $\alpha$  and the transcription factor XBP1, we examined the impact of the UPR on DC responses and T cell activation. Our results demonstrated that *T. gondii* infection activates the IRE1 $\alpha$  arm of the UPR in BMDCs in a MyD88 dependent manner, thereby inducing a unique set of secreted pro-inflammatory cytokines. We also demonstrated that this pathway regulates MHC-I presentation of secreted parasite antigens. In infected mice, we found that the IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway is specifically activated in splenic cDC1s, regulates T CD8 $^{+}$  cell responses and thus, the IFN- $\gamma$  production. In addition, IRE1 $\alpha$ /XBP1 deficient mice do not control parasite proliferation and succumb during the acute phase of the infection. Therefore, our work revealed an essential protective role of the IRE1 $\alpha$  branch of the UPR in DCs to fight *T. gondii* infection.



*À mes parents, À mon grand-père Jacques,*

"Je suis de ceux qui pensent que la Science est d'une grande beauté... Un scientifique dans son laboratoire n'est pas seulement un technicien : c'est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées."

Marie Curie (1867-1934)



## Remerciements

Je remercie les institutions qui m'ont permis de réaliser mes travaux de thèse, l'Université de Lille qui a financé mes trois années de thèse, l'Institut Pasteur de Lille et le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'équipe Biologie des parasites Apicomplexes dirigée par le Docteur Jamal Khalife.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le Professeur El Moukhtar Aliouat pour la présidence du jury, le Professeur Isabelle Dimier-Poisson et le Docteur Arnaud Moris qui ont accepté avec enthousiasme d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de ma thèse et les Docteurs Muriel Pichavant et Etienne Meunier pour le temps qu'ils ont accordé à l'examen de ce mémoire.

Je tiens à remercier le Docteur Sabrina Marion de m'avoir donné ma chance pour le stage de master 2 et de m'avoir confié ce projet de thèse. Merci de m'avoir accordée toute votre confiance, vous m'avez permis de me dépasser au quotidien en mettant en place une nouvelle thématique au laboratoire, ce qui a vraiment été une expérience très enrichissante.

Ce projet n'aurait pas été possible sans l'aide technique et les nombreux conseils des collaborateurs, les Docteurs Sophie Janssens et Nicolas Blanchard que je remercie. Un grand merci également au Docteur Eik Hoffmann pour sa gentillesse et son aide durant ma thèse.

Au cours de ma thèse, j'ai fait de nombreuses rencontres et tissé des liens d'amitié. Je souhaite remercier Aline pour tous les tea-time scientifique/culinaire et son positivisme de tout instant. Bénédicte, merci pour ton dynamisme et ta disponibilité, je n'oublie pas nos soirées et week-ends au laboratoire. Je remercie également Cécilia pour toutes les discussions et les instants gourmandises. Merci à ces trois filles Plasmo pour tout ce que vous m'avez apporté. Je remercie Tom pour son sens de l'humour à toute épreuve. Ludo, merci pour ta bonne humeur et de m'avoir fait partager ton expertise transcriptomique. Je tiens à remercier Christine pour son écoute et sa bienveillance. Hélène, merci pour ton soutien et tous les moments passés devant tes cytomètres. Je remercie les autres membres de l'équipe 2 : Jamal, Mathieu, Emmanuel, Sophia, Caro, Véro, Syla et Sarah ainsi que Fabien et Arnaud de l'équipe voisine. Une petite pensée à tous les anciens du laboratoire et particulièrement Flavie, Maïka et Kannan.

Mention spéciale à mes amies de longue date : Delphine, Floriane, Mélany, Margaux et Pauline. Pendant 3 ans, vous avez essayé de comprendre mon projet mais le principal pour



moi c'est votre soutien et les moments formidables que nous avons passé ensemble malgré les kilomètres qui nous séparent. Un petit clin d'oeil à mes deux acolytes du master, les thésards Quentin et Mélo. Mélo (et Nico), merci pour les escapades shopping, jeux de société,... qui nous permettaient de nous échapper de nos thèses.

Pour finir, je voudrais particulièrement remercier mes parents et mon frère pour leur confiance et leur soutien durant toutes ces années. Vous avez fait le maximum pour moi et rien n'aurait été possible sans vous.

Les mots de la fin sont pour toi, Kevin. Je ne te remercierai jamais assez de ton amour, ta patience, ton soutien inconditionnel qui m'a permis de me dépasser et d'affronter la thèse. J'ai eu la chance de t'avoir à mes côtés que ça soit au niveau scientifique avec tes précieux conseils mais également de par ta bienveillance qui m'a permis d'être consolée et protégée lors des moments les plus difficiles.

# Sommaire

Dédicaces	vii
Remerciements	ix
Sommaire	xi
Liste des figures	xix
Liste des tableaux	xxiii
Abréviations	xxvii
Introduction	3
Problématique	79
Matériels et Méthodes	83
Résultats	103
Discussion et perspectives	127
Annexe	139
Références bibliographiques	163



# Table des matières

<b>Dédicaces</b>	<b>vii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>ix</b>
<b>Sommaire</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xix</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xxiii</b>
<b>Abréviations</b>	<b>xxvii</b>
<b>Introduction</b>	<b>3</b>
1 <i>Toxoplasma gondii</i> : agent de la toxoplasmose . . . . .	3
1.1 Histoire et taxonomie du Toxoplasme . . . . .	3
1.2 Les lignées de <i>T. gondii</i> . . . . .	3
1.3 Les différentes formes du parasite . . . . .	5
1.3.1 Le tachyzoïte . . . . .	6
1.3.2 Le bradyzoïte . . . . .	7
1.3.3 Conversion tachyzoïte-bradyzoïte . . . . .	8
1.3.4 Le sporozoïte . . . . .	9
1.4 Cycle de vie et de développement du parasite . . . . .	10
1.4.1 La phase de multiplication asexuée . . . . .	10
1.4.2 La phase de multiplication sexuée . . . . .	10
1.5 Modes de transmission du parasite à l'Homme . . . . .	11
1.6 Pathogénèse, diagnostic et traitements . . . . .	12
1.6.1 La toxoplasmose . . . . .	12
1.6.1.1 Toxoplasmose congénitale . . . . .	12

	1.6.1.2	Toxoplasmose chez les individus immunodéprimés	12
	1.6.2	Diagnostic . . . . .	13
	1.6.3	Traitements de la toxoplasmose . . . . .	13
1.7		Ultrastructure du tachyzoïte, organites de sécrétion et cycle lytique .	14
	1.7.1	Généralités . . . . .	14
	1.7.2	Organites de sécrétion spécifiques de <i>T. gondii</i> . . . . .	16
	1.7.2.1	Les micronèmes . . . . .	16
	1.7.2.2	Les rhoptries . . . . .	16
	1.7.2.3	Les granules denses . . . . .	19
	1.7.3	Cycle lytique de <i>T. gondii</i> . . . . .	24
2		Immunité contre l'infection à <i>T. gondii</i> . . . . .	26
2.1		La réponse immunitaire innée contre <i>T. gondii</i> . . . . .	26
	2.1.1	Réponse immunitaire au site d'infection . . . . .	26
	2.1.2	Rôle de l'IFN- $\gamma$ dans l'activité des cellules myéloïdes . . . . .	29
	2.1.3	Mécanismes de détection de <i>T. gondii</i> par les PRRs . . . . .	30
	2.1.3.1	Les PRRs . . . . .	30
	2.1.3.2	<i>T. gondii</i> PAMPs et mécanismes de détection . . . . .	34
2.2		La présentation antigénique . . . . .	35
	2.2.1	La présentation antigénique par le CMH-I et le CMH-II . . . . .	35
	2.2.1.1	La présentation antigénique par le CMH-I . . . . .	35
	2.2.1.2	La présentation antigénique par le CMH-II . . . . .	37
	2.2.1.3	La présentation antigénique croisée par le CMH-I . . . . .	37
	2.2.1.4	La formation de la synapse immunologique pour l'activation des LTs . . . . .	40
	2.2.2	Les antigènes spécifiques de <i>T. gondii</i> . . . . .	41
	2.2.3	La présentation antigénique dans le cadre de l'infection à <i>T. gondii</i> . . . . .	42
	2.2.3.1	La présentation par la molécule du CMH-I . . . . .	42
	2.2.3.2	La présentation par la molécule du CMH-II . . . . .	45
2.3		La réponse immunitaire adaptative . . . . .	46
	2.3.1	La réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire . . . . .	46
	2.3.1.1	Rôle des LTs CD8+ . . . . .	47
	2.3.1.2	Rôle des LTs CD4+ . . . . .	47
	2.3.2	La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale . . . . .	49
3		Cellules dendritiques et modulation par <i>T. gondii</i> . . . . .	51
3.1		Les DCs . . . . .	51
3.2		Modulation de l'activité des DCs par <i>T. gondii</i> . . . . .	52

3.2.1	Modulation de la maturation des DCs par <i>T. gondii</i> . . . . .	52
3.2.2	Modulation de la présentation antigénique lors de l'infection à <i>T. gondii</i> . . . . .	53
3.2.2.1	Modulation de la présentation antigénique par le CMH-I . . . . .	53
3.2.2.2	Modulation de la présentation antigénique par le CMH-II . . . . .	54
3.2.3	Modulation des fonctions des DCs migratoires par <i>T. gondii</i>	55
3.2.4	Réponses des DCs à l'infection et effecteurs parasitaires: Résumé . . . . .	57
4	Signalisation et rôles de la réponse UPR . . . . .	60
4.1	Les trois voies de la réponse UPR . . . . .	61
4.1.1	La voie ATF6 . . . . .	61
4.1.2	La voie PERK . . . . .	63
4.1.3	La voie IRE1 . . . . .	64
4.2	Liens fonctionnels entre l'UPR et l'immunité . . . . .	65
4.2.1	Induction de l'UPR par les PRRs et réponse cytokinique . . . . .	65
4.2.2	Induction de réponses inflammatoires par l'UPR indépen- damment des PRRs . . . . .	67
4.3	Induction de l'UPR lors d'une infection . . . . .	68
4.3.1	Infections bactériennes . . . . .	68
4.3.2	Infections virales . . . . .	69
4.3.3	Infections parasitaires . . . . .	71
4.4	L'impact de la réponse UPR dans l'activité des DCs . . . . .	71
4.4.1	Développement et survie . . . . .	72
4.4.2	Présentation antigénique . . . . .	72
4.4.3	Réponse cytokinique . . . . .	74
	<b>Problématique</b> . . . . .	<b>79</b>
	<b>Matériels et Méthodes</b> . . . . .	<b>83</b>
1	Animaux . . . . .	83
2	Expérimentation <i>in vitro</i> . . . . .	85
2.1	Culture cellulaire . . . . .	85
2.1.1	Fibroblastes humains . . . . .	85
2.1.2	Cellules J558 et production de GM-CSF . . . . .	86
2.1.3	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse murine	86
2.1.4	Hybridomes T B3Z . . . . .	87

2.2	Souches parasitaires et culture . . . . .	87
2.3	Stimulation ou infection des BMDCs . . . . .	88
2.4	Phénotype des BMDCs et mesure du taux d'infection par cytométrie en flux . . . . .	89
2.5	Analyse de la quantité de transcrits de gènes d'intérêt par RT-qPCR dans des BMDCs infectées . . . . .	89
2.6	WB sur extraits protéiques totaux de BMDCs infectées . . . . .	91
2.7	ELISA réalisé avec le surnageant de BMDCs infectées . . . . .	92
2.8	Mesure de la présentation antigénique de BMDCs infectées . . . . .	93
2.9	Immunofluorescence indirecte sur fibroblastes et BMDCs infectés . .	94
3	Expérimentation <i>in vivo</i> . . . . .	94
3.1	Infection des souris . . . . .	94
3.2	Analyse de la dissémination parasitaire et étude de l'expression de trans-crits murin . . . . .	94
3.2.1	Quantification du nombre de parasites dans la rate et le PEC	95
3.2.2	Analyse de la quantité de transcrits de gènes d'intérêt dans la rate de souris infectées . . . . .	96
3.3	Analyse des cytokines du sérum . . . . .	96
3.4	Extraction des splénocytes de la rate . . . . .	97
3.5	Analyse phénotypique des DCs et des LTs issus de la rate de souris infectées . . . . .	97
3.6	Analyse des DCs CD8 $\alpha$ -/+ dans les souris ERAI . . . . .	98
3.7	Tri des DCs CD8 $\alpha$ + issues de la rate . . . . .	99
4	Analyses statistiques . . . . .	99
<b>Résultats</b>		<b>103</b>
1	Modulation de la réponse UPR <i>in vitro</i> . . . . .	103
1.1	<i>T. gondii</i> induit le recrutement du RE de l'hôte à la VP . . . . .	103
1.2	<i>T. gondii</i> induit l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les BMDCs	103
2	Mécanismes liés à l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ <i>in vitro</i> . . . . .	106
2.1	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s régule la réponse cytokinique dans les BMDCs infectées . . . . .	106
2.2	L'activation de la réponse UPR et des réponses cytokiniques sont sous le contrôle de la signalisation des PRRs . . . . .	110
2.3	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s régule la présentation antigénique croisée d'anti- gènes sécrétés par le parasite . . . . .	116
3	Impact de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans l'infection <i>in vivo</i> . . . . .	117

3.1	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s est stimulée dans les cDC1s spléniques au cours de l'infection . . . . .	117
3.2	L'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s joue un rôle protecteur essentiel contre l'infection à <i>T. gondii</i> . . . . .	119
3.3	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s module l'activité des DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et LTs lors de l'infection par <i>T. gondii</i> . . . . .	121
4	Modèle . . . . .	123
<b>Discussion et perspectives</b>		<b>127</b>
<b>Annexe</b>		<b>139</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>163</b>





# Liste des figures

1	Classification des Apicomplexes. . . . .	4
2	Ultrastructure des différentes formes du parasite. . . . .	6
3	Schéma représentatif de la division par endodyogénie du parasite. . . . .	7
4	Facteurs liés à la conversion tachyzoïte-bradyzoïte. . . . .	9
5	Cycle de vie et de transmission de <i>T. gondii</i> chez les hôtes définitifs et intermédiaires. . . . .	11
6	Schéma de l'ultrastructure et du cytosquelette du tachyzoïte de <i>T. gondii</i> . . . . .	15
7	Représentation schématique du rôle des effecteurs parasitaires lors de l'invasion et de la formation de la VP. . . . .	17
8	Rôle des protéines ROPs dans la modulation de l'activité de la cellule hôte. . . . .	19
9	Rôle des protéines GRAs dans la modulation de l'activité de la cellule hôte. . . . .	22
10	Représentation schématique du mécanisme d'export et de trafic des GRAs à travers la MVP. . . . .	23
11	Cycle lytique de <i>T. gondii</i> . . . . .	24
12	Représentation schématique de l'importance des cellules immunitaires au site d'infection. . . . .	28
13	Mécanismes effecteurs médiés par l'IFN- $\gamma$ permettant l'élimination de <i>T. gondii</i> dans les cellules infectées. . . . .	31
14	Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de <i>T. gondii</i> et les voies de signalisation induites. . . . .	33
15	Mécanisme classique de présentation antigénique par la molécule du CMH-I. . . . .	36
16	Mécanisme classique de présentation antigénique par la molécule du CMH-II. . . . .	38
17	Mécanisme de présentation antigénique croisée par la molécule du CMH-I. . . . .	39
18	Schéma de la mise en place d'une synapse immunologique entre une DC et un LT. . . . .	41

19	Modèles proposés pour l'accès des antigènes et la présentation antigénique par le CMH-I de l'antigène OVA sécrété dans la VP et TgGRA6 localisée à la MVP lors de l'infection à <i>T. gondii</i> . . . . .	44
20	Représentation de la cinétique d'apparition des Igs anti-toxoplasmiques après une primo-infection. . . . .	50
21	Modulation de la présentation antigénique par le parasite. . . . .	54
22	Schéma résumant la modulation des fonctions des DCs dans les souris infectées par une souche de type I ou II. . . . .	57
23	Mécanismes de modulation des voies de signalisation dans les DCs infectées par <i>T. gondii</i> . . . . .	58
24	Schéma résumant l'activation et le rôle de la réponse UPR. . . . .	60
25	Les trois voies de la réponse UPR. . . . .	62
26	Schéma résumant le rôle de la réponse UPR dans la réponse cytokinique. . .	67
27	Représentation du rôle d'XBP1s dans la différenciation et la fonction des DCs.	73
28	Modèle de souris avec le système Cre-LoxP. . . . .	84
29	Modèle de souris ERAI. . . . .	85
30	Expériences réalisées <i>in vitro</i> sur les BMDCs. . . . .	87
31	Schéma expérimental de la mesure de la présentation antigénique des BMDCs.	93
32	Expériences réalisées <i>in vivo</i> . . . . .	95
33	Recrutement du hRE à la VP dans des BMDCs et des fibroblastes infectés par <i>T. gondii</i> . . . . .	104
34	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s est activée dans des BMDCs infectées par <i>T. gondii</i> .	105
35	Activation de la réponse UPR dans des BMDCs stimulées par la TN. . . . .	107
36	La modulation de la réponse UPR est similaire entre des BMDCs infectées par des parasites de type I ou de type II hormis pour la voie ATF6. . . . .	108
37	La sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 est dépendante de la voie IRE1 $\alpha$ dans des BMDCs infectées. . . . .	109
38	Vérification de l'expression protéique d'IRE1 $\alpha$ et XBP1s dans des BMDCs issues des souris XBP1 $\Delta$ DC et XBP1 $\Delta$ DC IRE1 <sup>trunc</sup> DC. . . . .	110
39	L'expression et la sécrétion d'IL-23 est spécifique aux BMDCs infectées par des parasites de type II. . . . .	111
40	Expression et sécrétion de l'IL-6, IL-12 et IL-23 dans des BMDCs infectées par des parasites vivants ou HK. . . . .	112
41	Les trois voies de la réponse UPR sont activées dans des BMDCs incubées avec des parasites PruHK. . . . .	113
42	Etude de l'expression protéique de certaines protéines de la réponse UPR dans des BMDCs. . . . .	114

43	Les réponses UPR et cytokinique sont sous le contrôle de la protéine MyD88 dans des BMDCs infectées par <i>T. gondii</i> . . . . .	115
44	La voie IRE1 $\alpha$ améliore la présentation antigénique par le CMH-I d'antigènes sécrétés par <i>T. gondii</i> . . . . .	117
45	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s est activée dans les cDC1s des souris infectées par <i>T. gondii</i> . . . . .	118
46	La voie IRE1 $\alpha$ protège l'hôte de l'infection aigüe. . . . .	120
47	L'inhibition de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les DCs ne module pas la concentration en cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des souris infectées.	121
48	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s impacte les DCs CD8 $\alpha$ + dans les souris infectées. . . . .	122
49	La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s impacte les LTs dans les souris infectées. . . . .	123
50	Schéma hypothétique de la modulation de la réponse UPR et de son rôle dans les BMDCs infectées par <i>T. gondii</i> . . . . .	124
51	L'augmentation du métabolisme lipidique est associée à la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans des BMDCs infectées par <i>T. gondii</i> . . . . .	132
52	Exemple d'un résultat de génotypage de souris C57BL/6 Xbp1 <sup>fl/fl</sup> IRE1 <sup>fl/fl</sup> . . . . .	156
53	Représentation du taux de différenciation des BMDCs et de leur pourcentage d'infection. . . . .	156
54	Graphique représentant le pourcentage de cellules infectées par la souche RH ou Pru à différentes MOI. . . . .	156
55	Exemple de la détection de la qualité de l'ARN par Bioanalyzer. . . . .	157
56	Courbe d'étalonnage représentant le nombre de Ct en fonction du log du nombre de parasites. . . . .	158
57	Représentation de la stratégie de gating des DCs CD8 $\alpha$ -/+ par cytométrie en flux. . . . .	159
58	Représentation de la stratégie de gating des LTs par cytométrie en flux. . . . .	159
59	Représentation de la stratégie de gating pour trier les DCs CD8 $\alpha$ -/+ par cytométrie en flux. . . . .	160



# Liste des tableaux

1	Classification taxonomique du parasite <i>T. gondii</i> . . . . .	4
2	Les différentes lignées de <i>T. gondii</i> utilisées en majorité dans les laboratoires. . . . .	5
3	Protéines spécifiques des stades tachyzoïte et bradyzoïte. . . . .	9
4	Résumé des caractéristiques des sous-populations majeurs de DCs. . . . .	51
5	Liste des primers de génotypage. . . . .	84
6	Liste des souches de <i>T. gondii</i> utilisées. . . . .	88
7	Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour les expériences <i>in vitro</i> . . . . .	89
8	Liste des primers utilisés en qPCR pour les expériences <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . . . . .	91
9	Liste des anticorps utilisés en WB. . . . .	92
10	Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour les expériences <i>in vivo</i> . . . . .	98



# Abréviations





# Abréviations

ABA	ABscisic Acid
ADCC	Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AMA	Apical Membrane Antigen
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AP-1	Activator Protein-1
ApiAP2	Apicomplexan APetela-2
APR	Apical Polar Ring
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ASP	ASpartyl Protease
ATF	Activating Transcription Factor
ATG	AuTophagy
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLOC1S1	Biogenesis of Lysosomal Organelles Complex 1 Subunit 1
BMDC	Bone Marrow-Derived primary Dendritic Cell
BMDM	Bone-Marrow-Derived Macrophage
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	basic leucine ZIPper
CAM	CAIModulin-like protein
CAMLG	CAlcium Modulating LiGand
CCL	C-C Ligand chemokine
CCR	C-C chemokine Receptors
CD	Cluster of Differentiation
CDA	Cell Division Autoantigen
cDC	conventional DC
CDPK	Calcium-Dependent Protein Kinase
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CHOP	C/EBP Homologous Protein

CLIP	Class II associated Ii Peptide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CREB	CAMP Response Element Binding
CXCL	C-X-C motif Ligand chemokine
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DC	Dendritic Cell
Derlin	Der1p-like protein
DGAT	DiacylGlycérol O-AcylTransferase
DL	Dose Létale
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	DiThioThréitol
EDEM	Er Degradation-Enhancing $\alpha$ -Mannosidase-like protein
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
eIF2	eukaryotic Initiation Factor 2
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERAAP	ER Aminopeptidase associated with Antigen Processing
ERAD	ER-Associated Degradation
ERAI	ER stress-Activated Indicator
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
ERN1	Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1
ERSE	ER Stress response Element
ESA	Excretory/Secretory Antigens
FLU	FLUridone
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GADD34	Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 34
GAP	Glideosome Associated Proteins
GBP	Guanylate Binding Protein
GCN2	General Control Non-derepressible 2
GD	Granule Dense
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI	GlycosylPhosphatidylnositol
GRA	GRAnule dense protein
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
GTP	Guanosine TriPhosphate
H-2	Histocompatibility-2
HAUSP	Herpes virus-Associated Ubiquitin Specific Protease
HCE	Host Cyclin E1
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonique acid
HERPUD1	Homocysteine inducible ER Protein with Ubiquitin like Domain 1
HFH	Human Foreskin Fibroblast
HK	Heat Killed
HLA	Human Leukocyte Antigen
H.O.S.T	Host Organelle-Sequestering Tubulostructures
hRE	Réticulum endoplasmique de la cellule hôte
HRI	Heme-Regulated Inhibitor kinase
HSP	Heat Shock protein
HSP90b1	HSP 90 beta member 1
ICAM	IntraCellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamine 2,3-DiOxygenase
IEL	IntraEpithelial Lymphocyte
IFA	ImmunoFluorescence Assay
IFN	InterFeroN
Ig	Immunoglobulin
IL	InterLeukine
IMC	Inner Membrane Complex

iNOS	inducible Nitric Oxyde Synthase
i.p	intrapéritonéale
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
IRF	Interferon Regulatory Factor
IRG	Immune Related GTPase
ISG	Interferon-Stimulated Gene
ISR	Integrated Stress Response
IST	Inhibitor of STAT Transcription
IVN	IntraVacuolar Network
JAK	JAnus Kinase
JM	Jonction Mobile
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KLRG1	Killer-like Lectin Receptor G1
KO	Knock-Out
LB	Lymphocyte B
LFA	Lymphocyte Functional Antigen
LT	Lymphocyte T
LTh	LT helper
LTreg	LT regulatory
MAF1	Mitochondrial Association Factor 1
MAG	Matrix AntiGen
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MIC	MICroneme protein
MIIC	MHC-II Compartment
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
moDC	monocyte-derived DC
MOI	Multiplicity Of Infection
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC	mTOR complex
mtROS	mitochondrial ROS
MVP	Membrane de la vavuole parasitophore
MyD88	Myeloid Differentiation primary response 88
MYR	MYc Regulation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural Killer
NLR	NOD Like Receptor
NLRP	NLR family Pyrin domain
NO	Oxide nitrique
NOX2	NADPH OXYdase 2
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related
NTPases	Nucleoside TriPhosphatase
NuRD	Nucleosome Remodeling Deacetylase
OVA	OVAAlbumin
PAF	PAraFormaldéhyde
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDC	plasmacytoid DC
PEC	Peritoneal Exudate Cells
PERK	PKR-Like ER protein Kinase
PKR	Protein Kinase R

PP1	Protein Phosphatase 1
PLP	Perforin Like Protein
Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRF	PRoFilin
PRR	Pattern Recognition Receptor
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RE	Réticulum Endoplasmique
RIDD	Regulated IRE1-Dependent Decay
RIG-I	Retinoid acid-Inducible Gene I
RLR	RIG-1 Like Receptor
ROI	Oxygen Reactive Intermediates
ROM	Rhomboid protease
RON	RhOptry Neck protein
ROP	RhOptry Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transcriptase
S1P	Site-1 Protease
S2P	Site-2 Protease
SAG	Surface Antigen
SCID	Severe Combited ImmunoDeficient
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéfience Acquis
SNARE	Soluble N-éthylmaleimie-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SPATR	Sporozoite Protein with an Altered Thrombospondin Repeat
SRS	SAG1 Related Sequences
STAg	Soluble Tachyzoite Antigen
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STING	STimulator of INterferon Genes
SUB	SUBtilisin
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAP	Transporters associated with Antigen Processing
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T Cell Receptor
TEEG	<i>Toxoplasma</i> E2F4-associated EZH2-inducing Gene regulator
TEXEL	<i>Toxoplasma</i> EXport ELe ment
TG	Thapsigargin
TGF	Transforming Growth Factor
Th1	T helper 1
TLN	ToxoLysiN
TLR	Toll Like Receptor
TN	Tunicamycin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon $\beta$
TXNIP	ThioredoXiN-Interacting Protein
uORFs	upstream Open Reading Frame
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	Unfolded Protein Response Element
VIH	Virus de l'ImmunoDéfience Humaine
VP	Vacuole Parasitophore
WB	Western Blot
XBP1	X-box Binding Protein 1

# Introduction



# Introduction

## 1 *Toxoplasma gondii* : agent de la toxoplasmose

### 1.1 Histoire et taxonomie du Toxoplasme

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un protozoaire intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexes responsable d'une anthroponose cosmopolite, la toxoplasmose. Ce phylum regroupe de nombreux pathogènes causant des pathologies humaines et vétérinaires ayant un impact sanitaire et économique considérable : *Plasmodium*, responsable du paludisme ; *Eimeria*, agent des coccidioses aviaires ; ou encore *Cryptosporidium* et *Babesia* (Figure 1 page suivante).

*T. gondii* a été découvert en 1908 de manière simultanée par les docteurs Charles Nicolle et Louis Manceaux en Afrique du Nord (Institut Pasteur de Tunis) chez le rongeur et par le docteur Alfonso Slendore chez le lapin au Brésil. En 1909, Nicolle et Monceux ont nommé ce nouveau pathogène *Toxoplasma* en référence à sa forme en arc (du grec "toxon" pour arc et "plasma" pour forme) et *gondii* pour l'hôte dans lequel il a été découvert le *Ctenodactylus gundi* (Ferguson 2009). La classification taxonomique de *T. gondii* disponible sur NCBI (Taxonomy ID : 5811) est proposée Table 1 page suivante.

### 1.2 Les lignées de *T. gondii*

Le genre *Toxoplasma* n'est composé que d'une seule espèce *gondii* comprenant trois génotypes majeurs : type I, II et III (Howe *et al.* 1995). Entre ces trois groupes, il existe seulement 1 à 2% de divergence dans leur séquence nucléotidique montrant ainsi une faible diversité génétique (Dardé 2008). Les génotypes varient selon la virulence observée lors de l'infection chez la souris et la capacité à former des kystes (Boothroyd *et al.* 2002; Howe *et al.* 1995; Saeij *et al.* 2005). Les souches de type I sont fortement virulentes étant donné que l'injection intrapéritonéale (i.p) d'un seul parasite est suffisante pour provoquer la mort



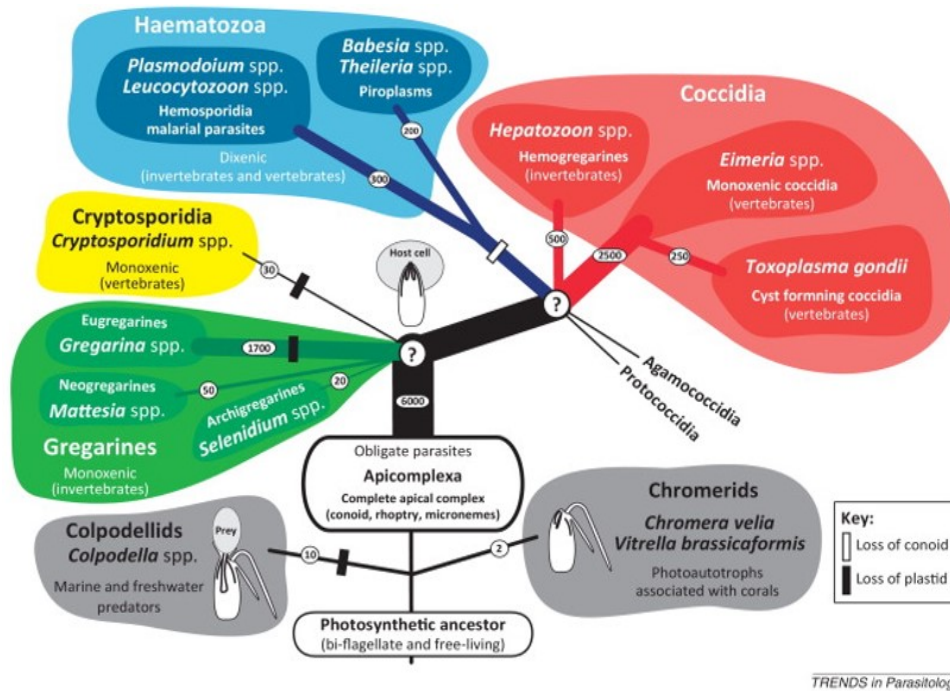


Figure 1 – Représentation schématique des différentes sous-classes dans le phylum des *Apicomplexa* (Portman *et al.* 2014).

Domaine	<i>Eukaryota</i>
Règne	<i>Alveolata</i>
Embranchement	<i>Apicomplexa</i>
Classe	<i>Conoidasida</i>
Sous-classe	<i>Coccidia</i>
Ordre	<i>Eucoccidiorida</i>
Sous-ordre	<i>Eimeriorina</i>
Famille	<i>Sarcocystidae</i>
Genre	<i>Toxoplasma</i>
Espèce	<i>gondii</i>

TABLE 1 – Classification taxonomique du parasite *T. gondii*.

de l'animal (Boothroyd *et al.* 2002; Saeij *et al.* 2005). De ce fait, les souches de type I ne produisent pas de kystes chez la souris. Cependant, il a été récemment démontré qu'elles peuvent former des kystes chez certains rongeurs sauvages, ceci étant probablement lié à des polymorphismes génétiques chez l'hôte au sein de gènes impliqués dans la résistance à l'infection (M. A. Hassan *et al.* 2019; Murillo-León *et al.* 2019). Les souches de type II et III sont quant à elles peu virulentes puisqu'il est nécessaire d'injecter plus de 1000

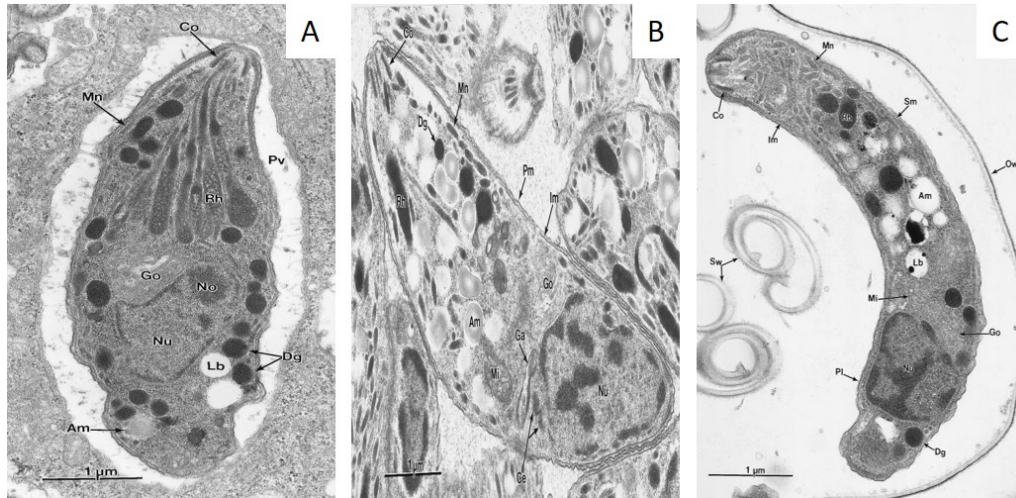
parasites pour conduire à la mort de la souris de laboratoire. Elles possèdent également un pouvoir kystogénique élevé (Boothroyd *et al.* 2002; Saeij *et al.* 2005). Les souches parasitaires utilisées majoritairement dans les laboratoires sont résumées dans la Table 2. Toutefois, les techniques de génotypage ont pu mettre en évidence la présence d'isolats ne correspondant pas aux trois lignées clonales décrites. En effet, douze halogroupes ont été identifiés et se différencient par leur virulence, prévalence et distribution géographique. Par ailleurs, d'autres souches qualifiées d'atypiques ne sont pas associées à ces halogroupes (Dardé 2008; A. Khan *et al.* 2007; Robert-Gangneux *et al.* 2012). En France, chez l'Homme et les animaux, la souche de type II représente plus de 90% des isolats identifiés (Howe *et al.* 1997; Robert-Gangneux *et al.* 2012). Les différences de virulence entre les souches sont corrélées par un polymorphisme allélique au sein de quelques gènes majeurs (cf 1.7.2.2 page 16 et 1.7.2.3 page 19) (Hunter *et al.* 2012). En effet, les souches de type I (I) sécrètent des effecteurs parasitaires qui inhibent la réponse pro-inflammatoire et les défenses des cellules infectées. Ainsi le parasite peut se disséminer rapidement et tuer son hôte. À l'inverse, les souches de type II (II) sécrètent des facteurs qui renforcent les réponses anti-parasitaires afin que l'infection soit rapidement contrôlée et que le parasite établisse une infection chronique chez un hôte préservé.

Génotypes	Type I	Type II	Type III
Souches en laboratoire	RH/GT1	Pru/ME49	CEP/VEG
Virulence	DL <sub>100</sub> =1	DL <sub>50</sub> =10 <sup>3</sup>	DL <sub>50</sub> =10 <sup>3</sup>
Formation kystes <i>in vivo</i>	Pas de kystes	Présence de kystes	Présence de kystes

**TABLE 2 – Les différentes lignées de *T. gondii* utilisées en majorité dans les laboratoires.** La Dose Létale (DL) correspond au nombre de parasites minimum nécessaire pour entraîner la mort. DL<sub>100</sub> et DL<sub>50</sub> représentent les doses létales permettant de tuer 100% et 50% des souris respectivement.

### 1.3 Les différentes formes du parasite

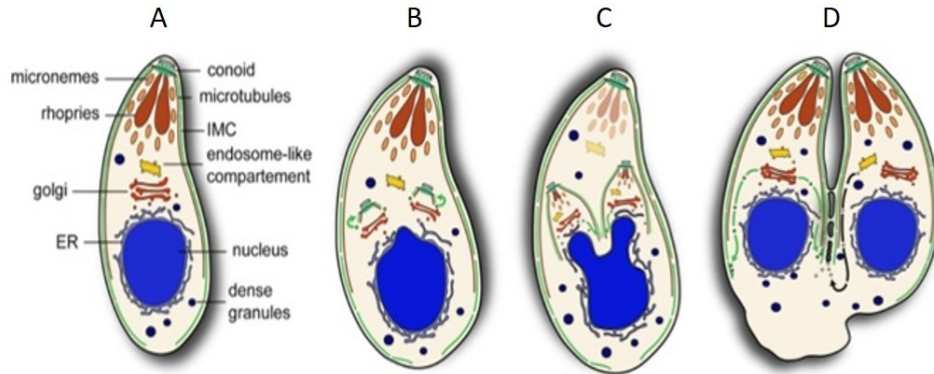
*T. gondii* existe sous trois formes infectieuses : les formes tachyzoïte et bradyzoïte, toutes deux résultant de la multiplication asexuée et la forme sporozoïte provenant de la multiplication sexuée. À ces trois stades, le parasite présente une morphologie très similaire avec une forme en croissant (ou arc), une extrémité apicale effilée et une extrémité postérieure basale arrondie (Figure 2 page suivante) (Dubey *et al.* 1998).



**Figure 2 – Ultrastructure des différentes formes du parasite en microscopie électronique à transmission (Dubey *et al.* 1998).** A/ Tachyzoïte. B/ Bradyzoïte. C/ Sporozoïte. (Am: Amylopectin granule; Ce: Centriole; Co: Conoid; Dg: Dense granule; Ga: Golgi adjunct (apicoplast); Go: Golgi complex; Im: Inner membrane complex; Lb: Lipid body; Mi: Mitochondrion; Mn: Microneme; No: Nucleolus; Nu: Nucleus; Ow: Oocyst wall; Pm: Plasmalemma; Pv: Parasitophorous vacuole; Rh: Rhoptry; Sm: Subpellicular microtubule; Sw: Sporocyst wall.)

### 1.3.1 Le tachyzoïte

Le tachyzoïte (6µm de long sur 2µm de large) est la forme de multiplication rapide du parasite responsable de sa dissémination dans l'organisme lors de la phase aiguë de l'infection (Dubey *et al.* 1998). Selon le mode de contamination, le tachyzoïte est le résultat de la conversion du bradyzoïte ou du sporozoïte. Le tachyzoïte est capable d'infecter toutes les cellules nucléées par un mécanisme d'invasion active permettant la formation de la vacuole parasitophore (VP) dans le cytoplasme de la cellule hôte, au sein de laquelle les parasites se multiplient (cf 1.7.3 page 24). Le tachyzoïte se multiplie par un mécanisme d'endodyogénie correspondant à la formation de deux cellules filles à l'intérieur de la cellule mère (Figure 3 page suivante). En fin de cytokinèse, les cellules filles restent attachées par leur pôle basal conduisant à la formation d'une structure en forme de rosette. Le cycle de division est composé de quatre phases : G1, S (duplication de l'ADN), M (Mitose) et C (Cytokinèse) et dure de 6 à 9h (Radke *et al.* 2001). Les parasites se divisent de façon synchronisée et exponentielle et peuvent effectuer jusqu'à 8 cycles (256 parasites par VP) dans des fibroblastes humains (Robert-Gangneux *et al.* 2012).



**Figure 3 – Schéma représentatif de la division par endodyogénie du parasite (adapté de (Agop-Nersesian *et al.* 2010)).** A/ Représentation de la structure et des organites du tachyzoïte en phase G1. B/ Lors de l'initiation de l'endodyogénie, la cellule mère augmente de volume pour permettre la duplication de l'appareil de Golgi et la formation des conoïdes et de l'IMC (Inner Membrane Complex) fils. Durant cette phase S, le génome haploïde se réplique. C/ Pendant la phase M, le RE (Réticulum Endoplasmique) et le noyau se positionnent en "fer à cheval" pour pouvoir être distribués dans les deux cellules filles. L'IMC et les microtubules s'étendent pour pouvoir séparer les deux tachyzoïtes fils. Les organites micronèmes, granules denses et rhoptries sont synthétisés *de novo*. D/ La fin du cycle correspond à la phase C où tous les organites des cellules filles sont séparés par les IMC. Les cellules filles seront toujours reliées à l'extrémité postérieure par le corps résiduel dans la VP (Blader *et al.* 2015; Radke *et al.* 2001; Striepen *et al.* 2007).

### 1.3.2 Le bradyzoïte

Le bradyzoïte (7µm de long sur 1,5µm de large) est la forme de latence du parasite responsable de la phase chronique de l'infection (Dubey *et al.* 1998). Sous cette forme, le parasite peut échapper à la détection et à la destruction par le système immunitaire et perdurer toute la vie de l'hôte en se multipliant lentement par endodyogénie au sein d'un kyste intracellulaire. Les kystes peuvent contenir jusqu'à des milliers de parasites et sont préférentiellement localisés dans les cellules musculaires, les neurones et la rétine mais peuvent également être détectés dans le foie, les poumons ou les reins (Dubey *et al.* 1998). Le kyste (5 à 100µm de diamètre) est une structure sphérique constituée d'une paroi dérivant de la membrane de la VP (MVP) composée d'une couche externe compacte et d'une deuxième couche plus souple s'étendant dans la matrice du kyste (Tu *et al.* 2018). La paroi kystique n'est perméable qu'aux molécules de faible poids moléculaire (10kDa maximum) suggérant une restriction des échanges avec la cellule hôte (Lemgruber *et al.* 2011). De plus, une étude récente a démontré que les neurones infectés par des tachyzoïtes présentent de manière efficace des antigènes parasitaires sur les molécules du CMH-I (Complexe Majeur

d'Histocompatibilité de type I) et sont donc reconnus par les lymphocytes T (LTs) CD8+ cytotoxiques, à l'inverse de neurones contenant des kystes (cf 2.2.3 page 42) (Salvioni *et al.* 2019).

### 1.3.3 Conversion tachyzoïte-bradyzoïte

Les tachyzoïtes (provenant des souches de type II peu virulentes) se convertissent en bradyzoïtes 6 à 9 jours après infection par voie orale chez la souris de laboratoire (Lueder *et al.* 2017). Cette conversion, qui est réversible, est induite par différents facteurs de l'environnement tissulaire et par des facteurs intrinsèques à la cellule hôte (Lueder *et al.* 2017; Lyons *et al.* 2002; Skariah *et al.* 2010). *In vitro*, des variations de pH et de température peuvent induire la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes au sein de différents types cellulaires (Figure 4 page suivante) (Lueder *et al.* 2017). Cependant, chez l'animal, la conversion est majoritairement stimulée par la réponse immunitaire ou des facteurs intrinsèques à la cellule hôte infectée. En effet, la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  (InterFeroN  $\gamma$ ), le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) ou des composés comme l'oxide nitrique (NO) favorise la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte (Figure 4 page ci-contre) (Lueder *et al.* 2017). De même, des privations en métabolites auxotrophes pour *T. gondii* tel que l'arginine ou le cholestérol peuvent suffire à induire la conversion (Lueder *et al.* 2017; Lyons *et al.* 2002). Par ailleurs, deux protéines humaines ont été montrées comme favorisant la conversion : la protéine CDA-1 (Cell Division Autoantigen-1) en inhibant la croissance de la cellule hôte et la protéine CD73 en augmentant la concentration en adénosine cellulaire (Lueder *et al.* 2017). Chez les patients immunodéprimés, une rétroconversion du bradyzoïte en tachyzoïte peut être observée suite à la diminution de la quantité de LTs et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 (Interleukine-12), le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (Figure 4 page suivante) (Lyons *et al.* 2002). La conversion du parasite d'un stade à un autre s'accompagne de changements morphologiques, moléculaires, épigénétiques et protéiques suite à la mise en place d'un programme génétique spécifique à chaque stade (Table 3 page ci-contre) (Lyons *et al.* 2002; Skariah *et al.* 2010; Tu *et al.* 2018). En effet, il a été montré que les facteurs de transcriptions de type ApiAP2 seraient impliqués dans la régulation de la conversion. Les protéines TgAP2IV-3, TgAP2Ib-1 et TgAP2XI-4 favoriseraient la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte alors que les protéines TgAP2IX-9, TgAP2IV-4 et TgAP2IX-4 réprimerait ce processus (Hong *et al.* 2017). Ainsi, les connaissances actuelles suggèrent que l'induction de la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes serait multifactorielle et impliquerait la contribution du cycle cellulaire et du métabolisme de l'hôte ainsi que des réponses immunitaires au sein de l'environnement tissulaire. Par ailleurs, l'invasion de neurones primaires en culture conduit à la conversion spontanée des tachyzoïtes en bradyzoïtes et la formation de kystes intracellulaires par des



mécanismes encore inconnus.

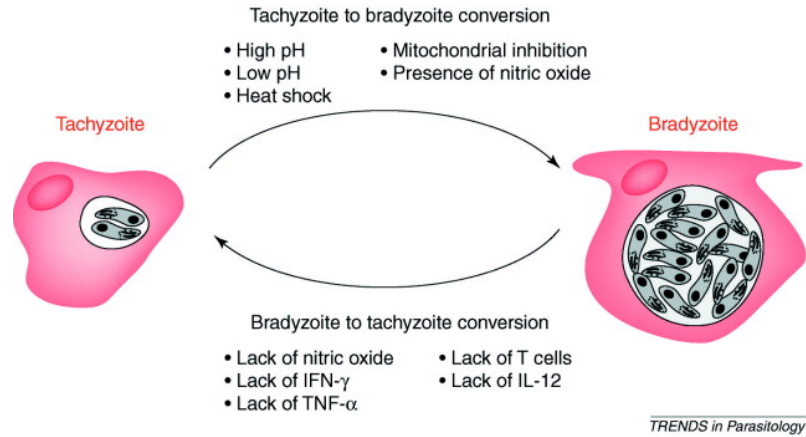


Figure 4 – Facteurs liés à la conversion tachyzoïte-bradyzoïte (Lyons *et al.* 2002).

Tachyzoïte	Bradyzoïte
SAG1, SAG2A, SAG2B, SAG3	SAG2C, SAG2D, SAG2X, SAG2Y, SAG3, SAG4A
SRS1, SRS3	SRS9, SRS44 (CST1)
ENO2	ENO1
PtdIns(t)	PtdIns(b)
LDH1	LDH2
	BAG1, BSR4
	MAG1
	P-type ATPase

TABLE 3 – Protéines spécifiques des stades tachyzoïte et bradyzoïte (Lyons *et al.* 2002; Tu *et al.* 2018). SAG: Surface AntiGen; SRS: SAG1-Related Sequences; BAG: Bradyzoite AntiGen; BSR: Bradyzoite Specific Recombinant; ENO: ENolase; PtdIns: Phosphatidylinositol; LDH: Lactate DeHydrogenase; MAG: Matrix AntiGen.

### 1.3.4 Le sporozoïte

Le sporozoïte, contenu dans l'oocyste, est la forme de résistance et de dissémination du parasite dans le milieu extérieur. L'oocyste (10x12 $\mu$ m de diamètre) correspond au produit de la multiplication sexuée qui a lieu dans l'intestin de l'hôte définitif (Montoya *et al.* 2004; Robert-Gangneux *et al.* 2012). Les oocystes immatures relargués dans l'environnement extérieur subissent alors une étape de sporulation. Lorsqu'un oocyste mature (ou sporulé) est ingéré par l'hôte intermédiaire, la destruction de sa paroi dans l'estomac permettra aux sporozoïtes d'infecter les cellules intestinales par un mécanisme probable (mais pas en-

core caractérisé) d'invasion actif ou de passage para-cellulaire observé pour les tachyzoïtes (Lambert *et al.* 2010).

## 1.4 Cycle de vie et de développement du parasite

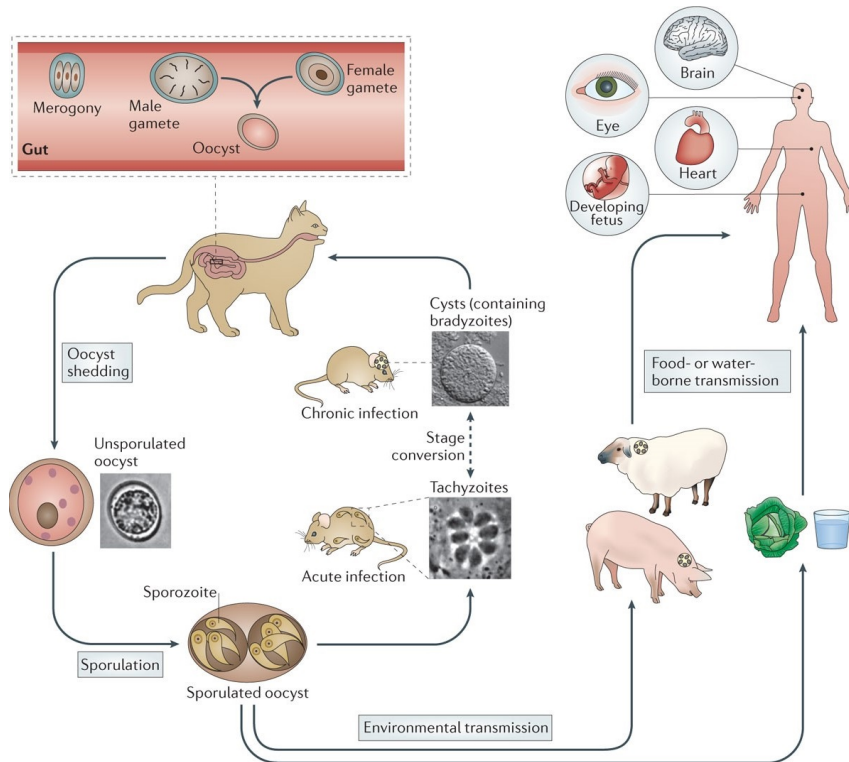
*T. gondii* est un parasite possédant un cycle de vie complexe. En effet, le cycle de ce parasite est hétéroxène facultatif composé d'une phase sexuée chez l'hôte définitif : les félinés dont le chat; et une phase asexuée chez l'hôte intermédiaire : tous les homéothermes dont l'Homme (Figure 5 page suivante) (Hunter *et al.* 2012; Montoya *et al.* 2004; Robert-Gangneux *et al.* 2012).

### 1.4.1 La phase de multiplication asexuée

La phase de multiplication asexuée a lieu chez l'hôte intermédiaire mais également chez l'hôte définitif uniquement durant le cycle extra-intestinal. La contamination se fait soit par ingestion d'animaux porteurs de kystes tissulaires, soit par ingestion d'oocystes matures disséminés dans l'environnement. Après ingestion par voie orale, la paroi des oocystes ou des kystes est rompue par les enzymes digestives et les parasites sont libérés pour infecter les entérocytes. Après passage de la paroi intestinale, les sporozoïtes, provenant des oocystes ou les bradyzoïtes, provenant des kystes se convertissent en tachyzoïtes qui vont rapidement se disséminer dans l'organisme (phase aigüe de l'infection). Sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes se convertissent en bradyzoïtes et forment des kystes définissant la phase chronique ou latente de l'infection (Figure 5 page ci-contre) (Hunter *et al.* 2012; Robert-Gangneux *et al.* 2012).

### 1.4.2 La phase de multiplication sexuée

La phase de multiplication sexuée a lieu uniquement chez l'hôte définitif durant un cycle exclusivement entéro-épithélial. Après ingestion de kystes ou d'oocystes matures par voie orale, la paroi est rompue par les enzymes digestives et les bradyzoïtes ou sporozoïtes sont libérés pour coloniser les cellules intestinales. Après plusieurs multiplications par schyzogonie, les schyzontes produisent des mérozoïtes qui se différencient en microgamète mâle ou macrogamète femelle durant la gamétogonie. La fécondation de la macrogamète femelle par le microgamète mâle permet de produire un oocyste immature qui est excrété dans les fèces du chat et libéré dans l'environnement durant 7 à 21 jours. Après sporulation dans le milieu extérieur, l'oocyste mature est infestant après son ingestion (Figure 5 page suivante) (Hunter *et al.* 2012; Montoya *et al.* 2004; Robert-Gangneux *et al.* 2012).



**Figure 5 – Cycle de vie et de transmission de *T. gondii* chez les hôtes définitifs et intermédiaires (Hunter *et al.* 2012).** Le cycle de vie du parasite débute lorsque le félin se contamine avec des kystes ou oocystes sporulés. La reproduction sexuée a alors lieu dans les entérocytes par la fusion d'un microgamète mâle et d'un macrogamète femelle aboutissant à la formation d'un zygote appelé oocyste. L'oocyste immature est alors libéré dans le milieu extérieur dans les fèces de l'animal pour sporuler sous l'effet de facteurs environnementaux et aboutir à la formation d'un oocyste mature infectieux. Les hôtes intermédiaires peuvent alors se contaminer par les oocystes présents dans l'environnement ou bien par l'ingestion d'animaux contaminés par des kystes tissulaires. Dans l'hôte intermédiaire, la paroi des kystes ou oocystes se rompt dans l'estomac, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes sont libérés et envahissent les entérocytes. Ils se transforment alors en tachyzoïtes pour réaliser une multiplication asexuée et se disséminer dans l'organisme. Suite à l'induction d'une réponse immunitaire, les tachyzoïtes se convertissent en bradyzoïtes pour former des kystes. Les kystes résident sous forme quiescente dans le cerveau, les yeux ou encore les muscles cardiaques et squelettiques durant toute la vie de l'hôte.

### 1.5 Modes de transmission du parasite à l'Homme

La transmission de *T. gondii* est possible selon deux voies (Figure 5) (Montoya *et al.* 2004; Robert-Gangneux *et al.* 2012) :

- **Horizontale** : en consommant des aliments ou de l'eau contaminés par des oocystes sporulés ou en ingérant de la viande crue ou peu cuite contenant des kystes tissulaires.



La contamination est également possible lors de transplantation d'organes ou de transfusions sanguines.

- **Verticale** : par transmission placentaire de tachyzoïtes d'une femme enceinte à son fœtus lors d'une primo-infection durant la grossesse.

## 1.6 Pathogénèse, diagnostic et traitements

### 1.6.1 La toxoplasmose

La toxoplasmose est une antrozoonose cosmopolite affectant 30 à 50% de la population mondiale (Pappas *et al.* 2009). Le nombre de personnes séropositives varie entre les pays en fonction des habitudes alimentaires, des conditions d'hygiène ainsi que de l'éthnie (Tenter *et al.* 2000). L'infection est le plus souvent asymptomatique sauf dans 10 à 20% des cas où une triade de symptômes caractérisée par de la fièvre, une adénopathie cervicale et une asthénie est observée (Montoya *et al.* 2004). La toxoplasmose est particulièrement grave pour le fœtus d'une femme primo-infectée durant la grossesse (cf 1.6.1.1) et chez l'individu immunodéprimé (cf 1.6.1.2). La toxoplasmose est également un problème vétérinaire et économique puisqu'elle touche un grand nombre d'animaux d'élevage entraînant des avortements, en particulier chez les ovins (Robert-Gangneux *et al.* 2012).

**1.6.1.1 Toxoplasmose congénitale** La toxoplasmose congénitale correspond à l'infection du fœtus par le passage du parasite dans le placenta lors d'une primo-infection de la femme enceinte. Il existe une relation inverse entre la fréquence de transmission du parasite et la gravité de l'infection (Dunn *et al.* 1999). En effet, le taux de transmission augmente au fur et à mesure de la grossesse mais l'infection est plus grave en début de grossesse puisqu'elle conduit généralement à la mort *in utero* du fœtus. Les conséquences cliniques d'une toxoplasmose congénitale peuvent être multiples et peuvent aboutir à des retards mentaux, des troubles psychomoteurs chez le nouveau-né ou des rétinochoroïdites plus bénignes jusqu'à l'adolescence. Un rapport indique que la prévalence de la toxoplasmose congénitale en France correspond à environ 3 naissances sur 10000 en 2007 (Robert-Gangneux *et al.* 2012). A l'heure actuelle, la prévention de la toxoplasmose congénitale est importante en France avec le dépistage sérologique des femmes enceintes non immunisées et l'information sur les règles hygiéno-diététiques (par exemple cuisson de la viande à 70°C, lavage des mains ...).

**1.6.1.2 Toxoplasmose chez les individus immunodéprimés** La réactivation de kystes latents provoque les toxoplasmoses les plus graves chez les individus immunodéprimés qui peut aboutir à une toxoplasmose disséminée où une atteinte multiviscérale est

observée. En effet, le système immunitaire affaibli ne peut contrôler l'infection engendrant différentes formes de toxoplasmose :

- la toxoplasmose cérébrale est la forme la plus répandue (Pueyo *et al.* 1993). Les symptômes peuvent être divers comme de la fièvre, des céphalées, un déficit moteur ou psychiatrique (Montoya *et al.* 2004).
- la toxoplasmose oculaire est caractérisée par des lésions oculaires troublant la vision suite à une réactivation locale de kystes dans la rétine (Montoya *et al.* 2004).
- la toxoplasmose pulmonaire est plus rare mais extrêmement grave puisqu'elle provoque une pneumopathie pouvant entraîner la mort en quelques jours (Rabaud *et al.* 1996).

### 1.6.2 Diagnostic

Le diagnostic de la toxoplasmose chez l'Homme est réalisé par des techniques sérologiques, moléculaires (PCR) et histologiques en raison de signes cliniques non spécifiques ou d'absence de symptômes (Hill *et al.* 2002; Montoya *et al.* 2004; Robert-Gangneux *et al.* 2012). Le diagnostic utilisé habituellement est basé sur les techniques de sérologie permettant de détecter les immunoglobulines (Ig) anti-toxoplasmiques dans le sérum des patients. Les IgA, IgE et IgM sont sécrétées au début de l'infection permettant donc d'indiquer une toxoplasmose récente. Les IgG apparaissent plus tardivement et persistent tout au long de la vie de l'hôte montrant ainsi une infection ancienne. L'examen sérologique comprend diverses techniques telles que l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), le test d'agglutination par immunocapture (ISAGA), le test d'hémagglutination indirecte, le Western Blot (WB) et le test d'avidité des IgG (Dard *et al.* 2016; Q. Liu *et al.* 2015). Les techniques histologiques sont utilisées pour isoler et identifier le parasite dans des prélèvements de fluides ou de tissus de patients. Enfin, la détection de l'ADN parasitaire peut être réalisée par PCR et s'effectue généralement sur le liquide amniotique pour diagnostiquer une contamination *in utero* (Q. Liu *et al.* 2015).

### 1.6.3 Traitements de la toxoplasmose

Les traitements disponibles contre la toxoplasmose ne sont utilisés que lors d'une toxoplasmose congénitale et dans les formes les plus graves de la maladie (cf 1.6.1.2 page précédente) (Hill *et al.* 2002; Montoya *et al.* 2004). Actuellement, seuls des antibiotiques sont utilisés et ils n'ont d'effets que pendant la phase aigüe de l'infection (tachyzoïtes réplicatifs disséminants). Ils ne permettent donc pas l'éradication des kystes intracellulaires latents. L'association de la sulphadiazine (inhibition de la déhydroptéroate synthétase) et de la pyriméthamine (inhibition de la dihydrofolate réductase) est le traitement qui a montré la

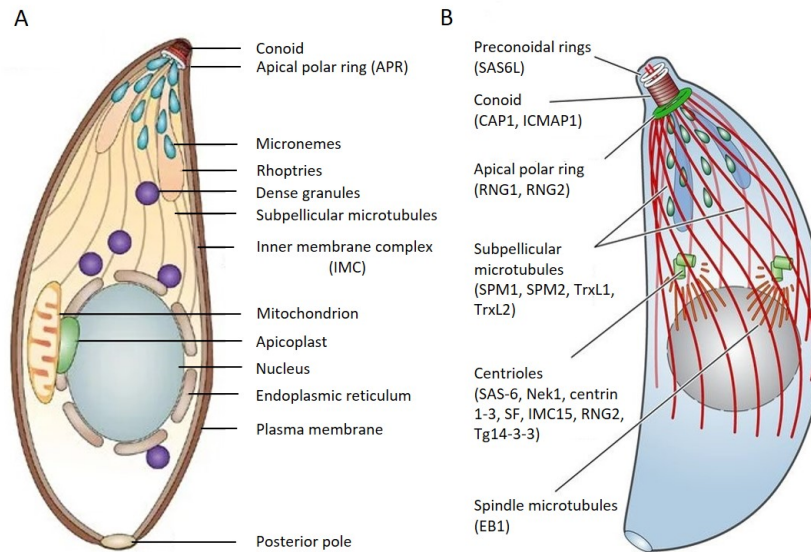
meilleure efficacité contre le parasite. Ces molécules agissent sur la voie de synthèse des folates nécessaire à la production des acides nucléiques. La spiramycine (inhibition de la synthèse protéique) est également utilisée lors d'une infection en début de grossesse jusqu'à pouvoir donner l'association sulphadiazine-pyriméthamine en fin de grossesse. À l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour éviter la réactivation des kystes latents et il n'y a pas de vaccin disponible pour l'Homme.

## 1.7 Ultrastructure du tachyzoïte, organites de sécrétion et cycle lytique

### 1.7.1 Généralités

*T. gondii* possède un génome haploïde de 63Mb réparti en 14 chromosomes qui coderait environ 8000 gènes soit 30% du génome (Reid *et al.* 2012). Le tachyzoïte en forme d'arc est une cellule asymétrique polarisée qui possède un "complexe apical" caractéristique des Apicomplexes indiquant la direction de la motilité parasitaire et jouant un rôle essentiel dans l'invasion des cellules hôtes (Figure 6 page ci-contre). Le complexe apical se compose des organites sécrétoires apicaux (cf 1.7.2.1 page 16 et 1.7.2.2 page 16) ainsi que du conoïde. Le conoïde est composé de 14 microtubules qui s'enroulent en spirale prenant leur origine au niveau de deux anneaux préconoïdaux situés à l'extrémité antérieure du conoïde qui les connectent à l'anneau polaire apicale (APR) (Figure 6 page suivante) (K. Hu *et al.* 2002). Le conoïde est une structure rétractile qui effectue un mouvement d'extrusion lors de la sortie (ou "egress") des parasites de la VP assurant ainsi l'adhésion, la motilité et donc la dissémination des parasites extracellulaires aux cellules voisines. Ce mouvement est induit par des flux calciques et régulé par des protéines de liaison au calcium localisées dans le conoïde (Figure 6 page ci-contre) (Monteiro *et al.* 2001; Morrissette 2014). À l'inverse, le conoïde se trouve sous forme rétractée lors de la répllication intravacuolaire des parasites.

Le tachyzoïte est délimité par un complexe membranaire appelé pellicule, permettant de maintenir sa forme et dans laquelle est ancré le cytosquelette cortical (Baum *et al.* 2006). La pellicule est formée de la membrane plasmique entourant le parasite et de l'IMC (Inner Membrane Complex) constitué de saccules (ou alvéoles) à double membrane lipidique bordant la face interne de la membrane plasmique (Figure 6 page suivante) (Anderson-White *et al.* 2012). Les alvéoles corticales sont une caractéristique spécifique du super-embranchement des *Alveolata*. Le parasite est donc délimité par une structure tri-membranaire d'une épaisseur de 60nm, qui régule les échanges avec le milieu extérieur (Anderson-White *et al.* 2012). Le cytosquelette cortical est constitué d'un réseau spiralé de 22 microtubules sous-pelliculaires ancrés à l'IMC, émanant de l'APR (Figure 6 page ci-contre) (Morrissette 2014). De plus, le parasite possède un cytosquelette cortical d'actine et de myosine, appelé "glideosome" localisé entre la membrane plasmique et l'IMC, qui as-



**Figure 6 – Schéma de l'ultrastructure et du cytosquelette du tachyzoïte de *T. gondii*.** A/ Représentation schématique des organites composant le tachyzoïte (Baum *et al.* 2006). B/ Représentation schématique du réseau de microtubules du tachyzoïte (Morrissette 2014).

sure la motilité parasitaire (Opitz *et al.* 2002). Il est constitué de la myosine A, de l'actine et de protéines d'ancrage à l'IMC appelées les protéines GAP (Glideosome Associated Proteins).

Par ailleurs, le tachyzoïte possède les organites classiques retrouvés dans les cellules eucaryotes : un noyau, une mitochondrie unique, un réticulum endoplasmique (RE), un appareil de Golgi et des ribosomes (Figure 6) (Baum *et al.* 2006). *T. gondii* dispose également d'organites sécrétoires spécifiques aux Apicomplexes appelés micronèmes (cf 1.7.2.1 page suivante), rhoptries (cf 1.7.2.2 page suivante) et granules denses (cf 1.7.2.3 page 19) mais aussi des acidocalcisomes, une vacuole et un apicoplaste (Figure 6). Les acidocalcisomes ont pour but de stocker et de réguler la concentration de calcium dans la cellule (Rohloff *et al.* 2011). La vacuole emmagasine également le calcium et présente une activité de transport du sodium protégeant le parasite du stress salin (Miranda *et al.* 2010). La vacuole est également impliquée dans la dégradation de molécules internalisées par le parasite via l'action de cathepsines (Parussini *et al.* 2010). La présence de cathepsines a conduit à considérer cet organe comme l'équivalent d'un lysosome ou d'une vacuole lytique participant au trafic et à la maturation dans les voies endo/exocytique de *T. gondii* (Parussini *et al.* 2010). L'apicoplaste est quant à lui le lieu des voies de biosynthèse indispensables à la réplication parasitaire telles que la synthèse des acides gras, des isoprénoïdes ou encore de l'hème (Amiar *et al.* 2016; Lévêque *et al.* 2017; Mazumdar *et al.* 2006).

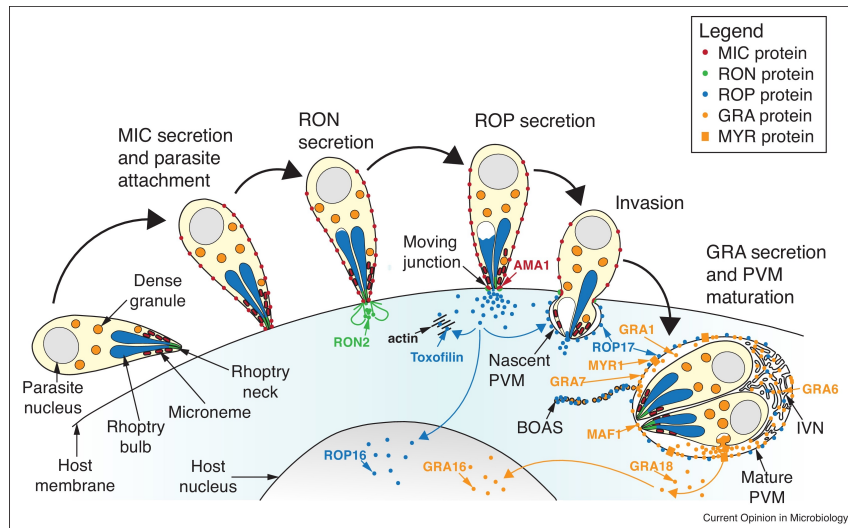
### 1.7.2 Organites de sécrétion spécifiques de *T. gondii*

Les trois organites de sécrétion spécifiques de *T. gondii* sont essentiels au cycle lytique en régulant l'étape d'invasion de la cellule hôte mais également la survie du parasite au sein de la VP.

**1.7.2.1 Les micronèmes** Les micronèmes localisés au pôle apical du tachyzoïte, ont une forme de bâtonnets de 250x50nm et sont les plus petits organites spécifiques du parasite (Figure 6 page précédente). Le nombre de micronèmes peut atteindre une centaine par tachyzoïte. Cependant la quantité peut varier selon les stades de développement et l'activité du parasite (Carruthers *et al.* 2008). Les protéines de micronèmes (MICs) sont sécrétées suite à l'étape précoce de reconnaissance de la cellule hôte. Elles assurent ainsi l'attachement et la motilité parasitaire, ainsi que l'initiation du processus d'entrée dans la cellule hôte. Certaines MICs, qui sont des perforines (comme TgPLP1), induisent la lyse de la MVP à l'étape de sortie (Carruthers *et al.* 2008). Actuellement, 19 MICs ont été identifiées et partiellement caractérisées : TgMIC1 à TgMIC12, TgAMA1, TgM2AP, TgSUB1, TgROM1, TgSPATR, TgPLP1 et TgTLN4 (Y. Wang *et al.* 2015). Les MICs existent sous forme soluble ou avec un domaine transmembranaire et s'associent pour certaines d'entre elles en complexes fonctionnels d'adhésion. En effet, ces protéines possèdent des domaines d'adhésion présentant de fortes similarités avec ceux des cellules eucaryotes supérieurs (Sheiner *et al.* 2010). En particulier, le complexe **TgMIC2/TgM2AP** permet l'attachement du parasite à la cellule hôte et assure sa motilité tandis que **TgAMA1** initie la formation de la jonction mobile (JM) assurant l'entrée du parasite au sein de la VP (cf 1.7.3 page 24) (D. L. Alexander *et al.* 2005; Huynh 2003; Lamarque *et al.* 2014; Shen *et al.* 2012).

**1.7.2.2 Les rhoptries** Les rhoptries sont des organites de 2 à 3µm en forme de bulbe ou "massue inversée" ancrées au pôle apical du parasite (Figure 6 page précédente) (Boothroyd *et al.* 2008; Dubey *et al.* 1998). Chaque tachyzoïte possèdent 8 à 12 rhoptries qui sont constituées de deux régions : une zone longiforme, "le cou", qui permet l'ancrage de l'organite au pôle apical du parasite et qui contient les protéines RONS (RhOptry Neck proteins) (Dubey *et al.* 1998). Les protéines RONS (**TgRON2**, **TgRON4**, **TgRON5** et **TgRON8**) sont sécrétées juste après les protéines MICs et participent au processus d'invasion en association avec la protéine TgAMA1 par la formation de la JM (Figure 7 page suivante) (cf 1.7.3 page 24) (D. L. Alexander *et al.* 2005). Le bulbe des rhoptries contient les protéines ROPs (RhOptry Proteins) qui sont sécrétées dans un deuxième temps, soit de manière précoce au sein du cytoplasme de la cellule hôte, soit de manière plus tardive au sein de la VP en formation (Figure 7 page suivante) (Bradley *et al.* 2007; Dubremetz

2007; Hakansson 2001).



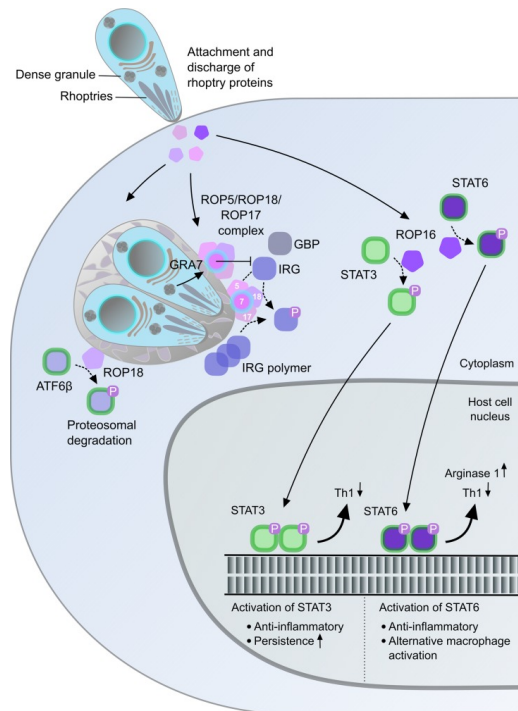
**Figure 7 – Représentation schématique du rôle des effecteurs parasites lors de l’invasion et de la formation de la VP (Rastogi *et al.* 2019).** Les protéines RONs (en vert) sont libérées après l’attachement du parasite à la cellule hôte pour s’associer à la protéine TgAMA1 (en rouge) et former la JM permettant l’invasion parasitaire. Durant l’invasion, la structure protectrice enveloppant le parasite (la MVP) est générée. Lors de cette étape, les protéines ROPs (en bleu) sont injectées dans le cytosol de la cellule hôte et se retrouvent associées à la MVP (TgROP17) ou à l’actine cytosolique de l’hôte (TgToxofiline). D’autres, comme TgROP16, s’accumulent directement dans le noyau de la cellule hôte. Une fois les parasites complètement internalisés dans la cellule hôte, la maturation de la MVP se produit de manière concomitante avec la sécrétion des protéines GRAs débutée dès l’invasion. Ainsi, les GRAs sont retrouvées à la MVP, dans l’espace intravacuolaire, au niveau du réseau intravacuolaire nanotubulaire (IVN) ou sont transloquées à travers la MVP vers le cytosol ou le noyau de la cellule hôte via la protéine TgMYR1 (en orange).

À l’heure actuelle, il a été dénombré une quarantaine de protéines ROPs et leur découverte est en constante augmentation (Boothroyd *et al.* 2008; Peixoto *et al.* 2010). Les protéines ROPs sont, pour la majorité, des kinases ou pseudo-kinases qui ciblent des protéines de l’hôte afin de bloquer la destruction de la VP et d’assurer un environnement cellulaire favorable à la réplication parasitaire (Boothroyd *et al.* 2008; Hakimi *et al.* 2017). Les protéines ROPs de la famille TgROP2 sont les mieux caractérisées *in vitro* suite à l’infection de fibroblastes humains ou de macrophages et *in vivo* dans des souris (Boothroyd *et al.* 2008; Hajj *et al.* 2006). Elles sont en majorité transmembranaires et localisées au niveau de la MVP et possèdent un domaine kinase-like en région C-terminale. **TgROP2** a été identifiée comme favorisant le recrutement des mitochondries et du RE de la cellule hôte (hRE) à la VP (Sinai *et al.* 2001, 1997). Le rôle du recrutement de ces deux organites n’est pas encore compris mais il pourrait favoriser l’import de lipides nécessaires à la crois-

sance parasitaire. Le complexe **TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18** localisé à la MVP induit la phosphorylation de plusieurs résidus thréonine au sein du domaine GTPase des Immune-Related GTPases (IRGs) empêchant ainsi leur oligomérisation, leur accumulation à la VP et donc la lyse de la VP (Figure 8 page ci-contre) (cf 2.1.2 page 29) (Etheridge *et al.* 2014; Fleckenstein *et al.* 2012). L'inhibition de l'activité des IRGs est spécifique des souches virulentes de type I. En effet, les souches de type II possèdent un polymorphisme au sein du gène codant pour TgROP5, rendant ce facteur inactif et ne permettant donc pas de bloquer l'élimination des parasites par les IRGs (Behnke *et al.* 2011). En plus de TgROP5<sub>(I)</sub>, la pseudokinase **TgROP54** a été montrée comme diminuant le recrutement de la protéine guanylate binding protein 2 (GBP2) à la VP protégeant ainsi la VP de la lyse (E. W. Kim *et al.* 2016). TgROP18 phosphoryle également le facteur de transcription ATF6 $\beta$  impliqué dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et induit sa dégradation par le protéasome provoquant une plus forte susceptibilité à l'infection (Figure 8 page ci-contre) (M. Yamamoto *et al.* 2011). Par ailleurs, des études de transcriptomique menées dans des cellules infectées par des parasites mutants délétés pour le facteur **TgROP38** suggèrent qu'il serait impliqué dans la régulation des voies de l'apoptose et des fonctions mitochondriales (Peixoto *et al.* 2010).

À la différence des protéines ROPs énoncées précédemment, la kinase **TgROP16** et la phosphatase 2C (**TgPP2C**) sont transloquées dans le noyau de la cellule hôte. Le rôle de TgPP2C n'est pas élucidé mais une diminution de la croissance des parasites a été observée *in vitro* en absence de cette protéine (Gilbert *et al.* 2006). À l'inverse, TgROP16<sub>(I)</sub> est bien caractérisée. La sérine/thréonine kinase phosphoryle les facteurs de transcription STAT3 et STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) entraînant une forte diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et TNF- $\alpha$  et par conséquent de la réponse Th1 dans des souris infectées (Figure 8 page suivante) (Butcher *et al.* 2011; Ong *et al.* 2010; Saeij *et al.* 2006). L'activation de STAT6 stimule l'expression de l'arginase 1 induisant la diminution des ROS (Reactive Oxygen Species) et protège ainsi le parasite des conséquences d'un stress oxydatif (Figure 8 page ci-contre) (Butcher *et al.* 2011). L'activité kinase de TgROP16 n'est pas active dans les souches de type II dû à un polymorphisme au sein du gène codant pour cette protéine (M. Yamamoto *et al.* 2009).





**Figure 8 – Rôle des protéines ROPs dans la modulation de l’activité de la cellule hôte (Hakimi *et al.* 2017).** Suite à l’attachement du parasite à la membrane plasmique de la cellule hôte, les protéines ROPs sont sécrétées dans le cytoplasme de la cellule où elles s’associent à la VP ou bien sont transloquées dans le noyau de l’hôte. Le complexe TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18 phosphoryle les IRGs empêchant leur accumulation à la MVP. TgGRA7 seul peut également inhiber les IRGs mais il peut également s’associer au complexe TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18. TgROP18 phosphoryle le facteur de transcription ATF6β induisant sa dégradation via le protéasome. TgROP16<sub>(I)</sub> phosphoryle STAT3 et STAT6 induisant des réponses anti-inflammatoires.

**1.7.2.3 Les granules denses** Les granules denses (GDs) sont des petites structures sphériques de 200nm de diamètre dispersées dans le cytoplasme du parasite (Figure 6 page 15) (Dubey *et al.* 1998; Mercier *et al.* 2015). Contrairement aux micronèmes et aux rhoptries, les GDs sont présents uniquement chez les Apicomplexes formant des kystes comme *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Hammondia*, *Besnoitia* et *Frankelia* (Mercier *et al.* 2015). Les protéines de granules denses (GRAs) sont massivement sécrétées à la fin de la formation de la VP afin d’initier la formation du réseau intravacuolaire nanotubulaire (IVN) puis de manière continue durant les répliquations successives du parasite (Carruthers *et al.* 1997). Actuellement, une vingtaine de GRAs sont décrites et présentent de multiples rôles essentiels à la survie intracellulaire du parasite (Mercier *et al.* 2015). En effet, certaines GRAs localisées au sein de l’espace vacuolaire et de la MVP assurent le maintien de la structure de la VP (Masatani *et al.* 2013) et de l’IVN (Mercier *et al.* 2002). D’autres



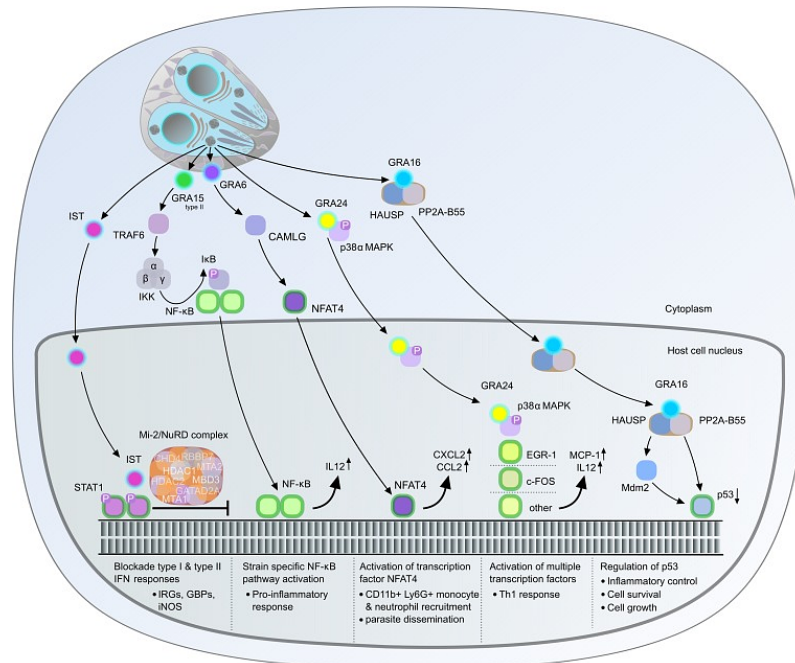
protéines GRAs localisées à la MVP stimulent le recrutement d'organites de l'hôte à la VP (Ahn *et al.* 2006; Coppens *et al.* 2018; Deffieu *et al.* 2019; Gold *et al.* 2015). Enfin, des GRAs sont sécrétées au-delà de la MVP et atteignent le noyau de la cellule hôte afin de moduler la réponse transcriptionnelle induite par l'infection (Hakimi *et al.* 2017). Les fonctions des différentes protéines GRAs caractérisées sont détaillées ci-dessous :

- Import de nutriments : **TgGRA2** et **TgGRA6** induisent la formation des tubules membranaires constituant l'IVN et maintiennent ce réseau assurant notamment la synchronicité des divisions successives du parasite (Mercier *et al.* 2002; Travier *et al.* 2008). L'IVN facilite également l'échange de nutriments avec la cellule hôte (Caffaro *et al.* 2011). **TgGRA7** induit la formation des structures H.O.S.T (Host Organelle Sequestering Tubulostructures) qui stimulent l'internalisation des endolysosomes de la cellule hôte dans la VP afin de promouvoir l'import de cholestérol essentiel à la croissance parasitaire (Coppens *et al.* 2006). Il est à noter que cette protéine s'associe également au complexe TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18 pour cibler Irga-6 par un mécanisme distinct de TgROP18 mais synergique. TgGRA7 a également la capacité de se lier directement au dimère actif Irga-6 pour induire son désassemblage (Figure 8 page précédente) (cf 2.1.2 page 29) (Alaganaan *et al.* 2014; Hermanns *et al.* 2015). Il a été également suggéré que l'import de lipides de la cellule hôte vers le parasite pourrait être médié par le recrutement des organites de l'hôte tels que le RE, l'appareil de Golgi et les mitochondries. En particulier, **TgGRA3** et **TgGRA5** interagissent avec la protéine CAMLG (CALcium Modulating LiGand). Cette interaction pourrait stimuler le recrutement du hRE à la VP, même si cette hypothèse n'a pas encore été directement démontrée (Ahn *et al.* 2006; J. Y. Kim *et al.* 2008). De plus, TgGRA3 interagit avec l'appareil de Golgi de l'hôte et induit la formation de tubules permettant l'internalisation de fragments golgiens dans la VP (Deffieu *et al.* 2019). De la même manière, **TgMAF1** (Mitochondrial Association Factor 1) stimule le recrutement des mitochondries de l'hôte à la VP modulant ainsi de manière indirecte le profil cytokinique de la cellule hôte infectée (Pernas *et al.* 2014).
- Modulation transcriptionnelle de la cellule hôte : De manière similaire à TgGRA3 et TgGRA5, TgGRA6<sub>(I)</sub> présente à la MVP, interagit avec CAMLG. Cependant, l'interaction TgGRA6/CAMLG semble aboutir à l'activation du facteur de transcription NFAT4 (Nuclear Factor of Activated T cells 4) induisant ainsi la production des chimiokines CXCL2 et CCL2 (Figure 9 page 22) (Ma *et al.* 2014). Ces cytokines chimiotactiques vont permettre le recrutement des monocytes et neutrophiles au site d'infection (Ma *et al.* 2014). La protéine TgGRA6<sub>(II)</sub> possède un polymorphisme au niveau de sa région C-terminale ne permettant pas l'activation efficace de NFAT4

(Ma *et al.* 2014). À la MVP, **TgGRA15<sub>(II)</sub>** est capable d'interagir avec les facteurs TRAFs (TNF Receptor-Associated Factors) pour induire l'activation, la translocation nucléaire du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) et la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 (Figure 9 page suivante) (Jensen *et al.* 2011; Rosowski *et al.* 2011; Sangaré *et al.* 2019). À l'inverse, les souches de type I possèdent un allèle de TgGRA15 inactif et n'induisent donc pas ce mécanisme (Rosowski *et al.* 2011). **TgGRA16** est exportée dans le noyau de la cellule hôte puis forme un complexe avec les enzymes de l'hôte PP2A-B55 (Protein Phosphatase 2A) et HAUSP (Herpes virus-Associated Ubiquitin Specific Protease) pour moduler l'expression des gènes associés à la voie p53 et donc au cycle cellulaire (Figure 9 page suivante) (Bougdour *et al.* 2013). **TgGRA24** induit l'autophosphorylation de la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) p38 $\alpha$  qui active une réponse pro-inflammatoire médiée par l'IL-12 (Figure 9 page suivante) (Braun *et al.* 2013). **TgIST** (Inhibitor of STAT1 transcriptional activity) migre dans le noyau de la cellule hôte pour inhiber STAT1 et donc l'expression des ISGs (Interferon-Stimulated Genes) dans les macrophages stimulés par l'IFN- $\gamma$  (Figure 9 page suivante) (Gay *et al.* 2016; Matta *et al.* 2019). Le parasite bloque ainsi de nombreuses voies impliquées dans l'immunité cellulaire autonome ("cell-autonomous" immunity) dont l'expression des IRGs. L'effecteur **TgTEEG** (*Toxoplasma* E2F4-associated EZH2-inducing Gene regulator) forme un complexe avec les facteurs de transcription cellulaire E2F3 et E2F4 et active ainsi EZH2 qui régule négativement l'activité de la voie NF $\kappa$ B résultant en la répression de la transcription de cytokines tels que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Braun *et al.* 2019). Il est à noter que ces trois derniers facteurs parasitaires sont sécrétés par les souches de type I et de type II. La modulation globale de la réponse de l'hôte est donc complexe. En effet certains facteurs renforcent la réponse pro-inflammatoire, comme TgGRA24, alors que d'autres inhibent cette réponse (TgTEEG) ou bloquent les mécanismes de défense intrinsèques permettant la destruction des parasites. L'ensemble des résultats obtenus l'ont été *in vitro* dans des fibroblastes ou macrophages infectés et chaque facteur a été examiné de manière indépendante. Il est fort probable que ces facteurs agissent de concert ou individuellement selon le type cellulaire considéré, l'environnement tissulaire ou le moment de l'infection, dans la finalité d'assurer la transmission du parasite entre les hôtes intermédiaires ou vers l'hôte définitif. Il serait donc important de pouvoir caractériser l'activité des différents facteurs parasitaires connus, au sein d'un même type cellulaire, lors de l'infection aiguë ou chronique de la souris afin de mieux comprendre leur rôle et mode d'action collectif.

Finalement, le rôle des GRAs dans la formation des kystes et l'établissement de l'infection chronique a été montré. En effet, l'injection de tachyzoïtes mutant pour **TgGRA2**, **Tg-**

**GRA3, TgGRA4, TgGRA6, TgGRA7, TgGRA8, TgGRA9, TgGRA12** ou **TgGRA14** inhibe fortement la formation des kystes chez la souris infectée (Fox *et al.* 2011, 2019).



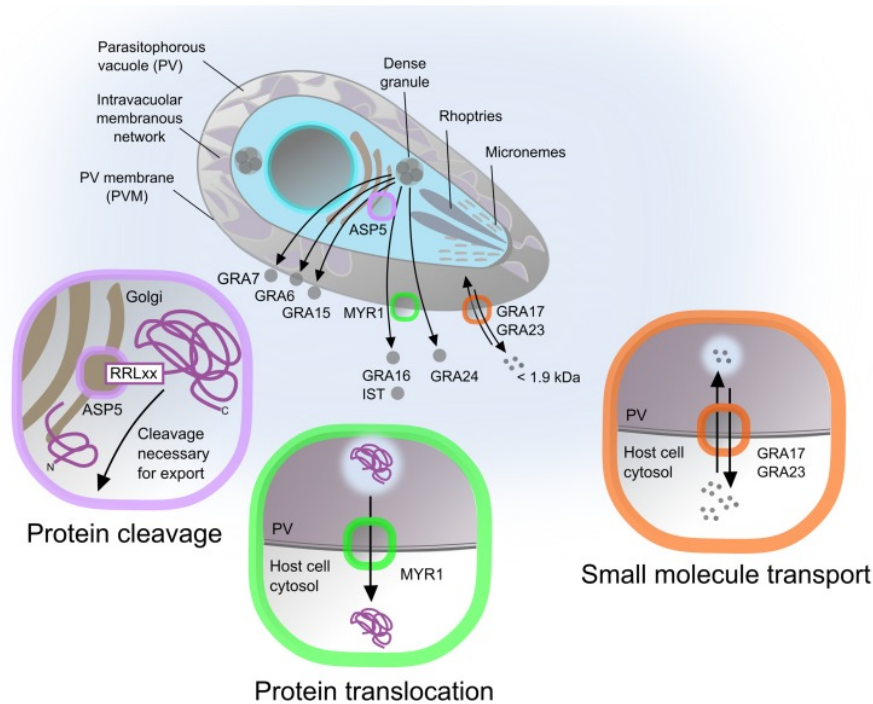
**Figure 9 – Rôle des protéines GRAs dans la modulation de l’activité de la cellule hôte (Hakimi *et al.* 2017).** Les GRAs sont soit transloquées dans le noyau de la cellule hôte (TgIST, TgGRA24, TgGRA16), soit localisées à la MVP (TgGRA15) ou bien résident à la VP tout en interagissant avec le cytosol de la cellule hôte (TgGRA6). TgIST inhibe la réponse IFN en recrutant le complexe Mi-2/NuRD réprimant la fixation de STAT1 sur les promoteurs associés. TgGRA24 forme un complexe avec p38α MAPK activant des facteurs de transcription tels que EGR-1, c-FOS pour induire une réponse Th1. TgGRA16 forme un complexe avec HAUSP et PP2A-B55 pour réguler négativement p53. Dans la souche de type II, TgGRA15<sub>(II)</sub> active TRAF6 qui induit l’activation de la voie NFκB responsable d’une réponse pro-inflammatoire. Dans la souche de type I, TgGRA6<sub>(I)</sub> interagit avec CAMLG pour stimuler le facteur de transcription NFAT4 qui induit la sécrétion de chemokines tels que CXCL2, CCL2 stimulant le recrutement de cellules immunitaires au site d’infection.

Pour que les protéines effectrices GRAs puissent être exportées dans le cytoplasme de la cellule hôte, il est nécessaire qu’elles traversent la MVP. Depuis quelques années, certains des processus permettant l’export de ces protéines ainsi que l’échange de nutriments ont été élucidés (Figure 10 page suivante) :

- L’aspartyl protéase **TgASP5** localisée dans l’appareil de Golgi du parasite clive les

protéines contenant un motif TEXEL (*Toxoplasma* EXport ELeMENT) telles que TgGRA6, TgGRA7, TgGRA15, TgGRA16 et TgIST induisant leur maturation et leur export (Coffey *et al.* 2015; Curt-Varesano *et al.* 2015; Hsiao *et al.* 2013).

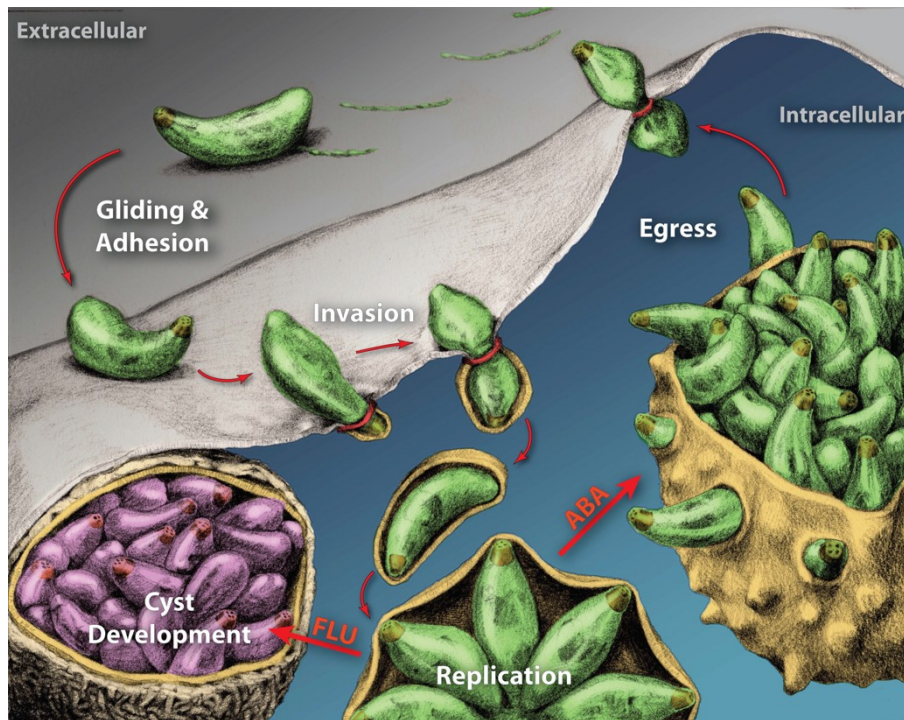
- La protéine **TgMYR1** (MYc Regulation 1) localisée à la MVP est un translocon qui assure l'export d'une grande partie des protéines GRAs (TgGRA16, TgGRA24, TgIST et TgHCE1 (Host Cyclin E1)) modulant ainsi l'activité de la cellule hôte durant l'infection (Franco *et al.* 2016; Naor *et al.* 2018; Panas *et al.* 2019).
- Le complexe protéique **TgGRA17/TgGRA23** localisé à la MVP permet le transport passif de petites molécules telles que des nutriments entre la cellule hôte et la VP (Gold *et al.* 2015).



**Figure 10 – Représentation schématique du mécanisme d'export et de trafic des protéines GRAs à travers la MVP (Hakimi *et al.* 2017).** Dans l'appareil de Golgi, l'aspartyl protéase TgASP5 clive les protéines TgGRA6, TgGRA7, TgGRA15, TgGRA16 et TgIST pour permettre leur export. À la MVP, TgMYR1 permet l'export de TgGRA16, TgGRA24 et TgIST à travers la MVP vers le cytosol de l'hôte. Les protéines TgGRA17 et TgGRA23 localisées à la MVP sont responsables du transport de petites molécules entre la VP et le cytosol de la cellule hôte.

### 1.7.3 Cycle lytique de *T. gondii*

*T. gondii* a mis en place un mécanisme complexe pour envahir activement la cellule hôte, s'y développer au sein de la VP et s'en échapper pour infecter d'autres cellules et ainsi se disséminer de manière efficace chez l'hôte intermédiaire. Le cycle lytique du parasite comporte quatre étapes majeures : la motilité et l'attachement, l'invasion, la réplication et la sortie ou "egress" des parasites (Figure 11).



**Figure 11 – Cycle lytique de *T. gondii* (Billker *et al.* 2009).** Le tachyzoïte extracellulaire se déplace à la surface des cellules par glissement puis adhère à la membrane de la cellule hôte grâce à la sécrétion des MICs. L'étape d'invasion peut alors commencer avec la formation de la jonction mobile (JM; anneau rouge) permettant l'entrée du parasite et en parallèle la formation de la VP. Le parasite se réplique dans la VP conduisant à une accumulation d'acide abscissique (ABA) déclenchant la sortie du parasite par lyse cellulaire. La production d'ABA peut être bloquée par le fluridone (FLU) inhibant la sortie des parasites mais induisant la développement de kystes.

Le parasite extracellulaire se déplace à la surface de la cellule hôte par glissement (ou "gliding"). Cette motilité se définit par trois formes de déplacements possibles : circulaire, hélicoïdal ou en spirale (Håkansson *et al.* 1999). Par la suite, le processus d'invasion en lui-même est décrit en six étapes : l'attachement initial du parasite à la membrane plasmique, l'attachement du pôle apical, la formation de la JM, la décharge des ROPs, la formation de la VP et enfin la séparation de la VP de la membrane plasmique de l'hôte

(Carruthers *et al.* 2007). Tout d'abord, l'attachement initial du parasite à la cellule hôte implique la reconnaissance de récepteurs cellulaires par des protéines de surface de *T. gondii* telles que les SAGs (Surface AntiGens) ou les SRS (SAG1-Related Sequence). Suite à ce premier contact, la sécrétion des MICs est induite par une augmentation du calcium intracellulaire du parasite. Les MICs s'accumulent alors au pôle apical et peuvent former des complexes d'adhésion pouvant se lier aux récepteurs de la cellule hôte (cf 1.7.2.1 page 16) (Huynh 2003). Au point d'attachement entre le parasite et la cellule, la JM se forme grâce à la sécrétion des RONs qui s'associent à TgAMA1. Le complexe moléculaire TgRON2/TgRON4/TgRON5/TgRON8/TgAMA1 forme une structure ponctuelle en cercle qui crée une adhésion intime entre le complexe apical du parasite et la surface de la cellule hôte (Shen *et al.* 2012). Une fois la JM formée, les ROPs sont injectées dans le cytoplasme de l'hôte sous forme de vésicules qui fusionneront avec la MVP ou sous forme de protéines solubles qui ciblent directement certaines voies de signalisation de la cellule hôte (cf 1.7.2.2 page 16). Ensuite, le parasite se propulse activement dans la cellule grâce aux forces exercées par son cytosquelette d'actino-myosine sous-cortical. Cette propulsion induit une invagination de la membrane plasmique de l'hôte qui forme la VP à laquelle va s'associer certaines des ROPs secrétées puis les protéines GRAs rendant cette structure non-fusogénique pour les lysosomes de la cellule hôte. La VP assure la protection du parasite face aux mécanismes de défense de la cellule hôte mais possède également un rôle d'échange comme indiqué dans les parties 1.7.2.2 page 16 et 1.7.2.3 page 19. Après l'entrée totale du tachyzoïte, la JM se ferme et la fission entre la membrane plasmique de l'hôte et la MVP a lieu. Le parasite peut alors se répliquer par endodyogénies successives (Figure 3 page 7). Après plusieurs cycles de réplication, le parasite sort activement de la cellule hôte en lysant la VP par la formation de pores suite à la sécrétion de la protéine TgPLP1 (Perforin Like Protein 1) dans la MVP (Roiko *et al.* 2014). La sortie des parasites induit obligatoirement la mort de la cellule hôte. Ce processus de sortie peut être induit par différents stimuli tels que l'accumulation d'acide abscissique ou par le système immunitaire de l'hôte après induction des voies dépendantes des perforines ou des récepteurs de mort cellulaire Fas/FasL qui provoquent des lésions dans la membrane plasmique de la cellule hôte (Nagamune *et al.* 2008; Persson *et al.* 2007).



## 2 Immunité contre l'infection à *T. gondii*

L'infection par *T. gondii* conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire robuste de type Th1 qui aboutit à l'élimination rapide du parasite pour des souches de faible virulence. Cette réponse est complexe due à la multitude de types cellulaires infectés et l'établissement d'une forme chronique de l'infection. Les réponses immunitaires innée et adaptative déclenchées contre le parasite au niveau local et systémique permettent de contrôler la dissémination parasitaire tout en établissant une immunité protectrice à long terme face à une réinfection.

### 2.1 La réponse immunitaire innée contre *T. gondii*

#### 2.1.1 Réponse immunitaire au site d'infection

Suite à l'ingestion de kystes ou d'oocystes par l'hôte, leur paroi est dégradée dans l'estomac par l'action des enzymes digestives et de l'acidité gastrique permettant la libération des bradyzoïtes ou des sporozoïtes. L'infection va alors débiter au niveau gastro-intestinal par l'invasion des cellules épithéliales intestinales (ou entérocytes). Une réponse immunitaire locale se met alors en place dans l'épithélium intestinal constituant la première barrière de défense de l'hôte (Figure 12 page 28) (Gregg *et al.* 2013). Les entérocytes limitent la répllication du parasite en produisant des molécules toxiques comme le NO et en appauvrissant le milieu en fer (Dimier *et al.* 1998; Miller *et al.* 2009). En parallèle, ces cellules sécrètent des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 et TNF- $\alpha$ ) et chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2) qui stimulent le recrutement des cellules immunitaires et leur activation sur le lieu de l'infection (Figure 12 page 28) (Mennechet *et al.* 2002).

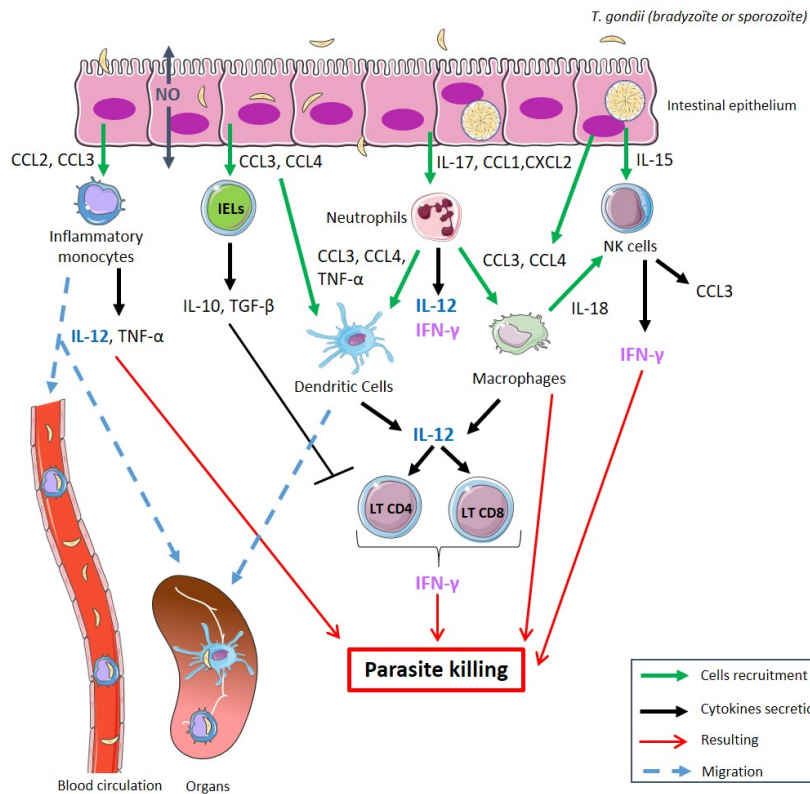
Par l'action des chimiokines CCL1 et MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2 ou également appelée CXCL2), les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au lieu de l'infection (I. A. Khan *et al.* 2001; Ohtsuka *et al.* 2001; Rio *et al.* 2001). Les neutrophiles ont la capacité de détruire les parasites soit directement par phagocytose soit via la production de facteurs microbicides (NO, ROI,...) ou encore par la production de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) qui est un réseau de fibres extracellulaires piégeant les microorganismes (Abdallah *et al.* 2011; Konishi *et al.* 1992; Miller *et al.* 2009). Cependant, ces cellules peuvent être également envahies par le parasite qui n'est alors pas éliminé. L'invasion active des neutrophiles a été montrée comme favorisant la propagation du parasite dans l'intestin grêle (Coombes *et al.* 2013). Les neutrophiles sécrètent de l'IL-12, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  pouvant initier la maturation des cellules dendritiques (DCs) immatures ainsi que les chimiokines MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (appelées CCL3 et CCL4 respectivement) contribuant aux recrutements des DCs, monocytes, macrophages et lymphocytes (Figure 12 page 28)

(Bliss *et al.* 1999; Sturge *et al.* 2013). Au cours de l'infection, la sécrétion de CCL3, CCL4 et CCL5 permet la migration rapide des DCs dans l'intestin (Cohen *et al.* 2015; Miller *et al.* 2009). Elles jouent un rôle clé dans l'activation des réponses dépendantes de l'IFN- $\gamma$  grâce à la production d'IL-12 qui active les cellules NK (Natural Killer) et les LTs (Dupont *et al.* 2012). Le sensing de motifs parasitaires par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) est crucial pour activer la maturation des DCs, leur sécrétion d'IL-12 (cf 2.1.3 page 30) et leur activité de présentation antigénique (cf 2.2 page 35) afin de mettre en place la réponse immunitaire adaptative (cf 2.3 page 46). Les cellules NK recrutées au site de l'infection par l'IL-15 et l'IL-18 participent à l'élimination du parasite par leur activité cytotoxique (sécrétion de perforines-granzymes) et la sécrétion précoce d'IFN- $\gamma$  (French *et al.* 2006; Gazzinelli *et al.* 1993; Schulthess *et al.* 2012). Elles produisent également du CCL3 qui stimule la migration d'autres cellules immunitaires comme les monocytes inflammatoires (Schulthess *et al.* 2012). Les monocytes inflammatoires GR-1<sup>+</sup> recrutés par les chimiokines MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1 ou également appelée CCL2) et CCL3 ont un rôle essentiel dans l'immunité mucosale en contrôlant la multiplication parasitaire limitant ainsi les dommages tissulaires et la dissémination rapide du parasite dans l'organisme (Dunay *et al.* 2008, 2010; Mordue *et al.* 2003; Robben *et al.* 2005; Schulthess *et al.* 2012). Les monocytes et les macrophages ont la faculté de sécréter de l'IL-12 et du TNF- $\alpha$ . Ils peuvent également activer des mécanismes spécifiques anti-microbiens suite à leur activation par l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules NK, les neutrophiles et les LTs (cf 2.1.2 page 29) (Yarovinsky 2014). De plus, les monocytes/macrophages sont les cellules phagocytaires les plus importantes pour l'élimination du parasite et participent à la réponse immunitaire adaptative en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les LTs (Figure 12 page suivante) (cf 2.2 page 35) (Buzoni-Gatel *et al.* 2006; Dunay *et al.* 2010). Pour finir, les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) migrent en réponse à la sécrétion de CCL3 et CCL4 et agissent localement en présentant une activité cytotoxique contre les entérocytes infectés (Luangsay *et al.* 2003). Ils ont également un rôle primordial de régulation de la réponse inflammatoire. En effet, ils sécrètent les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$  provoquant une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  par les LTs CD4<sup>+</sup> intestinaux, ce qui protège le tissu intestinal d'une inflammation aiguë délétère (Figure 12 page suivante) (Mennechet *et al.* 2004).

Le caractère migratoire des cellules immunitaires et leur infection pourraient stimuler la dissémination rapide du parasite dans l'organisme. En effet, des études ont suggéré que les DCs et monocytes pouvaient être utilisés comme "cheval de Troie" en participant au transport du parasite du site primaire de l'infection vers des organes distants tel que le cerveau (Courret *et al.* 2006) (partie 3.2.3 page 55). En particulier, des cellules CD11b<sup>+</sup> infectées ont pu être détectées dans la circulation sanguine (Courret *et al.* 2006). De



plus, le parasite se dissémine également de manière extracellulaire dans les circulations lymphatique et sanguine et une étude récente suggère que cette voie serait importante pour l'entrée dans le système nerveux central. En effet, les auteurs ont démontré que les tachyzoïtes se multiplient au sein des cellules endothéliales cérébrales des souris infectées et la lyse de ces cellules permettrait le passage du parasite vers le parenchyme cérébral (Konradt *et al.* 2016). Ces résultats suggèrent donc l'existence de plusieurs mécanismes de dissémination parasitaire agissant simultanément (Drewry *et al.* 2019).



**Figure 12 – Représentation schématique de l'importance des cellules immunitaires au site d'infection.** Les entérocytes infectés sécrètent de l'oxyde nitrique (NO) ainsi que de nombreuses cytokines et chimiokines permettant le recrutement des cellules immunitaires. En plus des entérocytes, les neutrophiles aident au recrutement des DCs et des macrophages qui sécrètent de l'IL-12 activant ainsi la production de l'IFN- $\gamma$  par les LTs. Les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) régulent la réponse inflammatoire locale en sécrétant les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$ . Les neutrophiles, LTs CD4<sup>+</sup>, LTs CD8<sup>+</sup> et les cellules Natural Killer (NK) sécrètent de l'IFN- $\gamma$  qui active des mécanismes effecteurs (appelés "cell autonomous immunity") détruisant le parasite. Les monocytes et DCs infectés ainsi que les parasites extracellulaires peuvent migrer par la circulation sanguine pour coloniser les organes distants du site premier d'infection, tel que le cerveau.

### 2.1.2 Rôle de l'IFN- $\gamma$ dans l'activité des cellules myéloïdes

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine majeure dans la réponse immunitaire innée, requise pour la résistance de l'hôte à l'infection. L'IFN- $\gamma$  active trois voies connues d'immunité cellulaire autonome induisant la clairance parasitaire dans les cellules myéloïdes tels que les macrophages. Ces trois mécanismes sont liés à l'activation de protéines effectrices que sont les enzymes IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygenase), iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) et les protéines de la famille des IRGs et GBPs (Figure 13 page 31).

Les enzymes IDO et iNOS entraînent toutes les deux une inhibition de la réplication du parasite en dégradant des nutriments qui y sont essentiels à la réplication parasitaire. L'enzyme IDO dégrade le tryptophane alors que l'enzyme iNOS consomme l'arginine pour synthétiser du NO (Figure 13 page 31) (Adams *et al.* 1990; Fox *et al.* 2004; I. A. Khan *et al.* 1997; Pfefferkorn 1984; Pfefferkorn *et al.* 1986). *T. gondii* étant auxotrophe pour ces deux acides aminés, leur diminution ou absence dans la cellule hôte va induire l'arrêt de sa croissance. En outre, il a été montré que l'effecteur TgGRA15 peut induire de manière indirecte une forte réduction de l'expression de l'enzyme IDO1 permettant au parasite d'accéder librement au tryptophane disponible dans les cellules humaines *in vitro* (Bando *et al.* 2018a). L'enzyme IDO1 est également une cible de l'effecteur TgIST puisqu'en inhibant le facteur de transcription STAT1, le parasite bloque la production d'IDO1 et favorise sa multiplication dans les cellules humaines *in vitro* (Bando *et al.* 2018b).

L'IFN- $\gamma$  induit également l'expression des IRGs et GBPs responsables de la destruction de la VP dans de nombreux types cellulaires (Figure 13 page 31) (Saeij *et al.* 2017). Les IRGs sont une large famille de protéines composée de 21 protéines chez la souris et de 2 protéines chez l'humain (Bekpen *et al.* 2005). À l'inverse des IRGs murines, l'expression des IRGs humaines est indépendante de l'IFN- $\gamma$  (Niedelman *et al.* 2012). Les IRGs sont des GTPases qui ont la faculté de s'associer aux membranes comme par exemple Irga6 avec la membrane du RE et de l'appareil de Golgi. Après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , de nombreuses IRGs (Irgm2, Irgm3, Irga6, Irgb6 et Irgd) sont recrutées à la MVP et s'assemblent pour induire la rupture de la MVP suivie de la dégradation des parasites par les autophagosomes montrant ainsi l'importance des IRGs dans la résistance à l'infection (Butcher *et al.* 2005; Ling *et al.* 2006; Taylor 2007). Cependant, les souches de type I de *T. gondii* sécrètent des effecteurs (TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18/TgGRA7) qui, une fois assemblés en complexes actifs, induisent la phosphorylation des IRGs empêchant leur accumulation à la MVP (Etheridge *et al.* 2014). Les souches de type II présentent un polymorphisme au sein de l'allèle TgROP5, rendant cette protéine inactive. Ainsi le complexe parasitaire TgROP5<sub>(II)</sub>/TgROP17/TgROP18/TgGRA7 n'est pas assemblé à la MVP, ne perturbant donc pas le recrutement des IRGs. Par ailleurs, l'expression de gènes codant pour des IRGs est dépendante du facteur de transcription STAT1 en présence d'IFN- $\gamma$  (Collazo

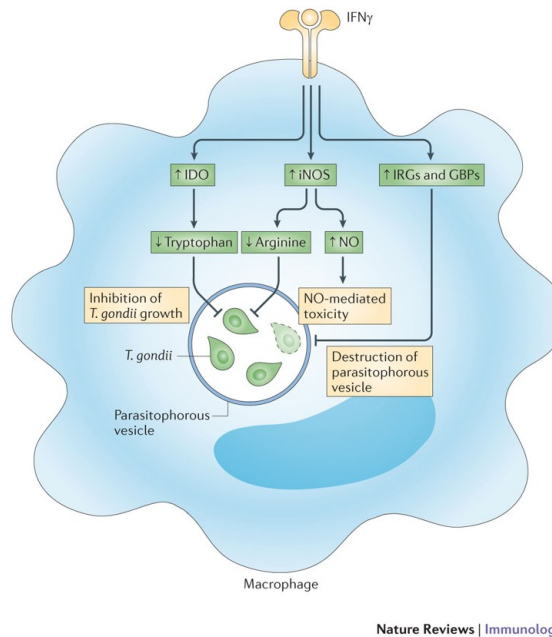
*et al.* 2002). Toutes les souches clonales de *T. gondii* induisent la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT1 mais inhibent son activité transcriptionnelle et donc la transcription des ISGs (Rosowski *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2013). Ce processus est médié par l'effecteur parasitaire TgIST sécrété puis transloqué dans le noyau de la cellule hôte. Deux mécanismes d'inhibition de la transcription ont été proposés. Le premier favoriserait un changement de l'environnement de la chromatine par le recrutement du complexe répresseur Mi-2/NuRD par TgIST au niveau des promoteurs des gènes dépendants de STAT1 (Olias *et al.* 2016). Le deuxième, quant à lui, s'orienterait vers une séquestration de p-STAT1 médiée par TgIST au niveau du promoteur cible bloquant ainsi la transcription des gènes en aval (Gay *et al.* 2016). À l'inverse de TgIST, l'effecteur TgGRA15<sub>(II)</sub> régulerait positivement la transcription d'ISGs de manière dépendante de NF $\kappa$ B et indépendante de STAT1 (Rosowski *et al.* 2011, 2012).

Les protéines GBPs, au nombre de 13 chez la souris et de 7 chez l'humain, jouent également un rôle dans la réponse immunitaire médiée par l'IFN- $\gamma$  en coopération avec les IRGs (Yarovinsky 2014). Les GBPs (1, 2, 3, 5 et 7) ont un rôle crucial dans le contrôle de la réplication et la destruction du parasite et ce, de manière dépendante de l'activation de Irgb6 (Degrandi *et al.* 2012; Selleck *et al.* 2013; M. Yamamoto *et al.* 2012). Il a également été montré qu'après l'action des IRGs sur la MVP, la protéine GBP2 cible la membrane du parasite et favorise sa destruction (Kravets *et al.* 2016).

### 2.1.3 Mécanismes de détection de *T. gondii* par les PRRs

**2.1.3.1 Les PRRs** Les PRRs sont des récepteurs cellulaires reconnaissant des motifs microbiens associés aux pathogènes nommés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). La signalisation liée aux PRRs influence de nombreux processus biologiques comme la production de cytokines, la présentation antigénique, la survie cellulaire et les réponses antimicrobiennes. Plusieurs catégories de PRRs sont définies en fonction de leur localisation cellulaire et de la nature des motifs reconnus :

- les TLRs (Toll Like Receptors) localisés à la surface des cellules (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) ou à la membrane des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11 et TLR12) reconnaissent des composés microbiens exogènes et les acides nucléiques, respectivement.
- les NLRs (NOD Like Receptors) localisés dans le cytosol reconnaissent des composants bactériens (peptidoglycane), des ARN microbiens ainsi que des signaux de dangers endogènes (efflux de potassium, rupture de la membrane des lysosomes ou encore la présence de radicaux libres oxygénés).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 13 – Mécanismes effecteurs médiés par l'IFN- $\gamma$  permettant l'élimination de *T. gondii* dans les cellules infectées (Yarovinsky 2014).** L'IFN- $\gamma$  induit des effets pléiotropes sur les cellules myéloïdes infectées entraînant une inhibition de la répllication parasitaire par l'induction des enzymes IDO et iNOS. L'enzyme IDO appauvrit le milieu en tryptophane alors que l'enzyme iNOS le prive de l'arginine, deux acides aminés essentiels pour la croissance du parasite. De plus, iNOS génère du NO hautement toxique. L'IFN- $\gamma$  induit également l'expression des protéines IRGs et GBPs responsables de la destruction de la VP. Les parasites sont alors détruits dans le cytoplasme de la cellule hôte.

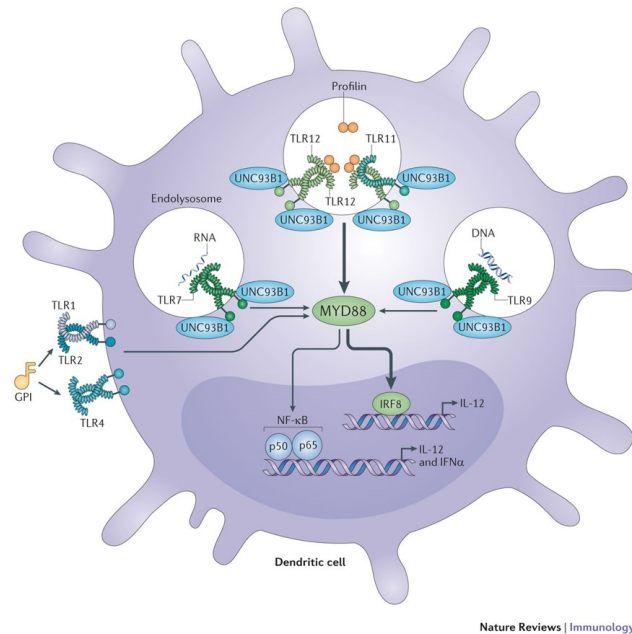
- les RLRs (RIG-1 Like Receptors) localisés dans le cytosol reconnaissent des ARN viraux.
- le capteur cGAS localisé dans le cytosol détecte de l'ADN double brin de l'hôte et des pathogènes ce qui permet d'activer les récepteurs STING présents à la membrane du RE.

Les TLR2 et TLR4 représentent les principaux TLRs de surface des mammifères reconnaissant les lipoprotéines et lipopolysaccharides dérivés de bactéries, virus, champignons et parasites. Dans les macrophages murins, les TLR2 et TLR4 détectent les ancrs GPI (GlycosylPhosphatidylInositol) des protéines de surface du parasite, ce qui induit la production de TNF- $\alpha$  (Figure 14 page 33) (Debierre-Grockiego *et al.* 2007). Cette activation semble dépendante du type cellulaire puisque la production d'IL-12 n'est pas modifiée dans les DCs spléniques issus de souris TLR2<sup>-/-</sup> et TLR4<sup>-/-</sup> stimulées avec des antigènes de tachyzoïte solubles (STAg) (Scanga *et al.* 2002). Toutefois, il a été récemment démontré que les adhésines de surface TgMIC1 et TgMIC4 stimulent la sécrétion d'IL-12 de façon

TLR2-dépendante dans les macrophages et les DCs dérivés de la moelle osseuse (BMDMs et BMDCs), suggérant un rôle de ce TLR dans la reconnaissance de lectines présentes à la surface des parasites (Sardinha-Silva *et al.* 2017). Les TLR11 et TLR12 jouent un rôle majeur dans la sécrétion de l'IL-12 par les DCs et les pDCs suite à la détection de la profiline parasitaire (TgPRF) et sont donc essentiels pour le déclenchement de la réponse IFN- $\gamma$  par les LTs et les NK (Figure 14 page suivante) (Koblansky *et al.* 2013; Plattner *et al.* 2008; Yarovinsky *et al.* 2005). Il est important de souligner que la reconnaissance de TgPRF par les TLR11 et TLR12 ne s'effectue que chez les souris et non chez l'Homme, chez qui les gènes orthologues pour ces deux récepteurs ne sont pas fonctionnels. L'activation des TLRs endosomaux, y compris des TLR11 et TLR12, est dépendante de l'homologue B1 de l'UNC93 (l'adaptateur UNC93 B1), protéine résidente du RE qui médie la translocation de ces TLRs du RE aux endosomes. Cet adaptateur joue donc un rôle essentiel dans la résistance à l'infection par *T. gondii* (Figure 14 page ci-contre) (Melo *et al.* 2010; Pifer *et al.* 2010). Il est important de noter que contrairement aux TLR11 et TLR12, la triple délétion des TLR3, TLR7 et TLR9 chez la souris infectée par injection en i.p induit une faible augmentation de la susceptibilité à l'infection, suggérant que la détection d'ARN et d'ADN parasites ne joue pas un rôle prépondérant dans ce contexte d'infection (Andrade *et al.* 2013). Cependant, les mécanismes de détection du parasite et leurs conséquences sur la réponse immunitaire peuvent changer selon la voie d'infection. En effet, lors d'une infection orale, et contrairement à une infection en i.p, les souris TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> ou TLR9<sup>-/-</sup> montrent une forte sensibilité à l'infection (Andrade *et al.* 2013; Benson *et al.* 2009; Debierre-Grockiego *et al.* 2007; Minns *et al.* 2006). L'absence de ces trois TLRs est corrélée à un défaut de production d'IFN- $\gamma$  par les LTs probablement causé par une altération de l'activation des CPAs (Benson *et al.* 2009; Minns *et al.* 2006). De plus, les dommages de la muqueuse intestinale induits par les parasites diminuent chez les souris TLR4<sup>-/-</sup> et chez les souris traitées avec des antibiotiques à large spectre, ce qui suggère que la réponse immunitaire des muqueuses contre le parasite repose également sur la stimulation indirecte des DCs par le microbiote intestinal (Heimesaat *et al.* 2007). Il est donc possible qu'en absence de TLR11 et TLR12 fonctionnels chez l'Homme, les TLRs endosomaux jouent un rôle essentiel dans la détection du parasite (probablement après phagocytose de parasites vivants (Subauste *et al.* 2000; Tosh *et al.* 2015)) et donc dans l'établissement de la réponse Th1.

Tous les TLRs reconnaissant des motifs parasites induisent l'activation de la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88) qui active en aval le facteur de transcription NF $\kappa$ B essentiel à la production de différentes cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- $\alpha$  par les macrophages et les DCs (Hou *et al.* 2010; Koblansky *et al.* 2013; Melo *et al.* 2010; Pifer *et al.* 2010; Plattner *et al.* 2008; Scanga *et al.*

2002). Cependant, il a également été montré que la production de l'IL-12 par les DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> n'était pas dépendante de la voie NF $\kappa$ B mais du facteur de transcription IRF8 (Interferon Regulatory Factor 8) (Figure 14) (C.-H. Liu *et al.* 2006; Raetz *et al.* 2013).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 14 – Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de *T. gondii* et les voies de signalisation induites (Yarovinsky 2014).** Les TLRs endosomaux (TLR11 et TLR12) reconnaissent la profiline de *T. gondii* alors que le TLR7 et le TLR9 détectent l'ARN et l'ADN parasitaire, respectivement. Ces TLRs sont stimulés de manière dépendante d'UNC93B1. Les TLRs de surface TLR2 et TLR4 sont impliqués dans la détection des ancrages GPI des protéines de surface du parasite. Ces détections vont permettre d'activer des voies dépendantes de MyD88 comme la voie NF $\kappa$ B et le facteur de transcription IRF8 permettant la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IFN- $\alpha$ .

Par ailleurs, l'activation de l'inflammasome via les récepteurs NLRs est particulièrement intéressante puisqu'elle aboutit à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 mais également au déclenchement d'une mort cellulaire programmée appelée pyroptose (Schlee *et al.* 2016). Le récepteur NLRP1 a été montré comme particulièrement important dans l'expression des interleukines IL-1 $\beta$ , IL-12 et IL-18 lors de l'infection de monocytes humains par *T. gondii* (Witola *et al.* 2010). Des expériences réalisées dans des macrophages et dans des souris infectées ont montré que la prolifération du parasite est contrôlée après l'activation des protéines NLRP1, NLRP3 (NLR family Pyrin domain containing) et la protéase caspase 1 ainsi que ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain) permettant la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 sans induire la mort cellulaire (Chu *et al.* 2016; Ewald *et al.* 2013; Gorfu *et al.* 2014; Gov *et al.* 2013). L'activation de l'inflammasome et

la sécrétion de ces cytokines seraient sous la dépendance de l'activation des MAPKs dans les souris infectées par une souche de type I (S. Wang *et al.* 2016). De manière importante, la production d'IL-1 $\beta$  dépend de la souche utilisée et plus précisément de la sécrétion de TgGRA15<sub>(II)</sub> qui active la voie NF $\kappa$ B requise pour la première étape de production des pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (Bando *et al.* 2018a; Gov *et al.* 2013). L'inflammasome joue donc un rôle limité comparé au TLR11 mais en absence de ce dernier, les caspases 1 et 11 permettraient la production d'une réponse Th1 efficace pour protéger l'hôte du parasite (López-Yglesias *et al.* 2019).

**2.1.3.2 *T. gondii* PAMPs et mécanismes de détection** Il a été montré chez la souris que les DCs spléniques voisines de DCs infectées produisent de grandes quantités d'IL-12 par effet "bystander" suggérant que la protéine TgPRF serait internalisée par les DCs dans des endolysosomes contenant les TLR11 et TLR12 (Christian *et al.* 2014; Pifer *et al.* 2010). La détection de TgPRF pourrait donc être due à l'internalisation de corps apoptotiques ou de débris nécrotiques de cellules infectées mais aussi d'exosomes sécrétés par les parasites. En effet, deux études indépendantes ont récemment démontré *in vitro* le rôle des exosomes libérés par les tachyzoïtes de souches de type I et II dans la stimulation de la production d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  par les macrophages (Y. Li *et al.* 2018; Silva *et al.* 2018). De plus, l'injection d'exosomes provenant de cultures de cellules infectées par des tachyzoïtes dans des souris est capable d'induire une réponse humorale anti-toxoplasmique et une immunité à médiation cellulaire T CD8 suggérant que l'internalisation de ces exosomes contribue à la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-I et CMH-II (Y. Li *et al.* 2018). Cependant, les processus moléculaires permettant la détection de composés parasitaires contenus dans la VP ne sont pas encore élucidés. La possible stimulation des PRRs cytosoliques nécessiterait une lyse partielle de la vacuole qui permettrait l'export d'acides nucléiques parasitaires vers le cytoplasme de la cellule hôte. Bien que spéculatif, il se pourrait que ce processus soit facilité par la dégradation de la MVP après le recrutement des IRGs/GBPs dans le cas d'une infection par une souche de type II (cf 2.1.2 page 29) (Hakimi *et al.* 2017; Saeij *et al.* 2017). Cette hypothèse est appuyée par une étude démontrant que dans les cellules infectées par une souche de type II et stimulées à l'IFN- $\gamma$ , le recrutement des Irgm1, Irgm3 et GBPs déclenche une rupture partielle de la MVP (sans aboutir à l'élimination des parasites) et induit le recrutement de l'ubiquitine et du séquestrosome p62 (ou SQSTM1) en association avec des protéines de l'autophagie (ATG3, ATG5, ATG7 et ATG16L1). L'accumulation de la protéine p62 à la MVP contribue à la libération cytosolique d'antigènes de *T. gondii* pouvant activer les LTs CD8+ (Y. Lee *et al.* 2015). Par conséquent, les mécanismes de rupture de la VP spécifiques de la souche pourraient entraîner des mécanismes de détection innée spécifiques. D'autre



part, des interactions fréquentes ont lieu entre le RE et les endosomes/lysosomes tardifs où résident les TLRs endosomaux et il a été récemment montré que la VP interagit avec divers compartiments endosomaux (Romano *et al.* 2017). Par conséquent, des mécanismes distincts des dommages de la MVP pourraient favoriser la libération de PAMPs provenant de parasites vacuolaires dans les compartiments intracellulaires impliqués dans la détection innée. En accord avec cette hypothèse, une étude récente a démontré l'activation de la voie cGAS/STING par TgGRA15. Cette activation dépendante de la protéine adaptatrice TRAF régule la transcription de gènes tels que *Ifnb*, *Isg15* et *Il12* (P. Wang *et al.* 2019). Pour conclure, les différents mécanismes de détection de *T. gondii* par les PRRs pourraient réguler de manière différentielle la sécrétion de cytokines mais aussi impacter d'autres fonctions importantes des CPAs comme leur activité de présentation antigénique modulant ainsi l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative efficace (Blander 2018; Iwasaki *et al.* 2010; Nair-Gupta *et al.* 2014).

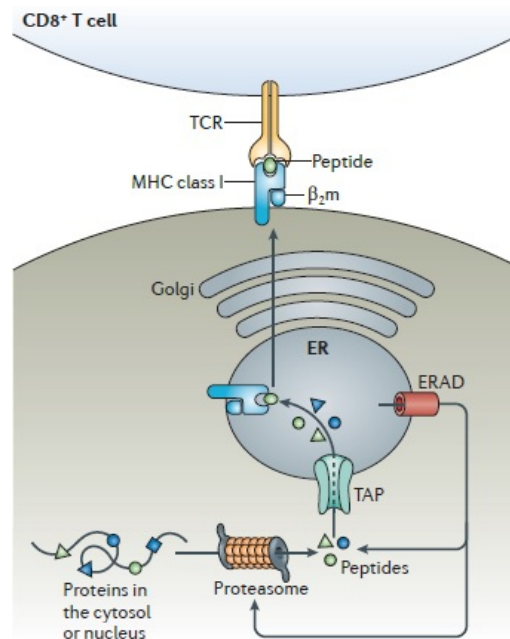
## 2.2 La présentation antigénique

### 2.2.1 La présentation antigénique par le CMH-I et le CMH-II

Les mécanismes de présentation antigénique permettent la présentation d'antigènes immunogènes par des molécules du CMH à la surface de la cellule. Ce processus conduit à la formation de la synapse immunologique qui permet l'activation des LTs, cellules essentielles dans la protection contre l'infection par *T. gondii*. Les peptides endogènes sont présentés par les molécules du CMH-I aux LTs CD8<sup>+</sup> (cf 2.2.1.1) alors que les peptides exogènes le sont par les molécules du CMH-II aux LTs CD4<sup>+</sup> (cf 2.2.1.2 page 37). Le CMH-I a également la particularité de pouvoir apprêter des peptides exogènes par le mécanisme de présentation antigénique croisée (cf 2.2.1.3 page 37). Toutes les cellules nucléées ont la capacité de présenter des antigènes endogènes par le CMH-I mais seules les CPA professionnelles telles que les DCs, macrophages et LBs peuvent apprêter des peptides exogènes sur les molécules du CMH-I et CMH-II. Chez l'humain, le CMH s'appelle HLA (Human Leukocyte Antigen) alors que chez la souris, il se nomme H-2 (Histocompatibility-2).

**2.2.1.1 La présentation antigénique par le CMH-I** Les molécules du CMH-I sont composées d'une chaîne lourde  $\alpha$  (composée de trois domaines immunoglobulines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) ancrée à la membrane et associée à une chaîne légère  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2m$ ) (Wieczorek *et al.* 2017). Le polymorphisme de la chaîne  $\alpha$  assure la diversité d'antigènes peptidiques présentés. Les gènes codant la chaîne  $\alpha$  sont classiquement au nombre de trois : A, B et C chez l'Homme et D, K et L chez la souris (HLA-B, HLA-C, HLA-A / H2-K, H2-D et H2-L).





**Figure 15 – Mécanisme classique de présentation antigénique par la molécule du CMH-I (Neefjes *et al.* 2011).** Les antigènes sont dégradés par le protéasome pour former des peptides qui sont transloqués dans la lumière du RE via un transporteur TAP puis les peptides sont chargés sur les molécules du CMH-I. Le complexe peptide/CMH-I est transporté via l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique pour présenter l'antigène aux LTs CD8+.

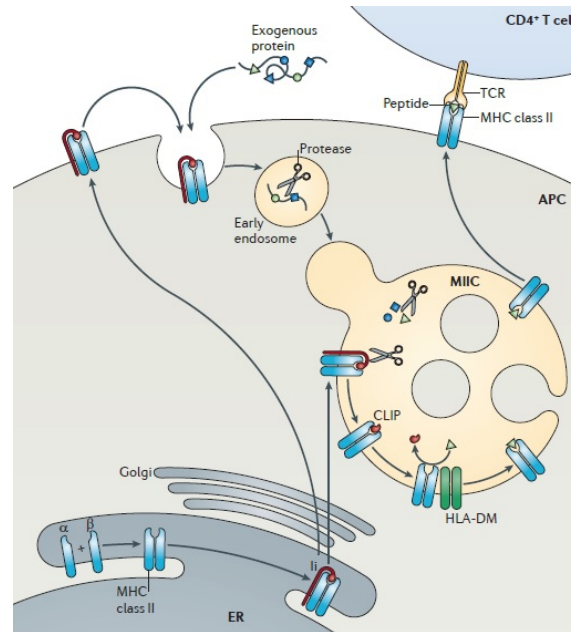
Les molécules du CMH-I sont assemblées dans le RE à l'aide de plusieurs protéines. Tout d'abord, la calnexine aide la chaîne  $\alpha$  à se replier et à s'associer avec la  $\beta_2m$  puis la calréticuline stabilise l'association entre les deux chaînes afin d'accueillir de courts peptides antigéniques compris entre 8 et 10 acides aminés au sein du sillon formé par les régions  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  (Peaper *et al.* 2008). L'association des protéines transmembranaires TAP1 et TAP2 forme un canal appelé transporteur TAP (Transporters associated with Antigen Processing) localisé à la membrane du RE qui sert de plateforme pour la formation du complexe peptide/CMH-I (Momburg *et al.* 1994). De plus, la tapasine se lie au transporteur TAP avec le chaperon ERp57 pour maintenir le complexe préformé jusqu'au chargement du peptide (Cresswell *et al.* 2005; Peaper *et al.* 2008). Le mécanisme classique de présentation antigénique par la molécule du CMH-I débute par l'apprêtement des antigènes suivi de la translocation des peptides dans la lumière du RE pour finir par le chargement de ces derniers dans le sillon du CMH-I. L'apprêtement des antigènes consiste en la dégradation des protéines en petits peptides par le protéasome 26S, l'immunoprotéasome, les lysosomes et les aminopeptidases du RE (ERAAP par exemple) (Figure 15) (Adiko *et al.* 2015; Cascio 2001; Kloetzel 2004). Les peptides sont transloqués dans la lumière du RE par

le transporteur TAP et vont se fixer sur le sillon de la molécule du CMH-I (Figure 15 page précédente). Si le peptide se fixe dans le sillon avec une forte affinité, le complexe peptide/CMH-I est stabilisé puis exporté jusqu'à la surface de la cellule pour permettre l'induction ("priming") des LTs CD8+ (Figure 15 page ci-contre). Par contre, si le peptide est long (supérieur à 10 acides aminés) ou ne se lie pas au sillon du CMH-I, le système ERAD (ER-Associated Degradation) induit leur transfert du RE au cytosol afin qu'il soit dégradé par le protéasome ou bien transféré une nouvelle fois dans le RE via TAP.

**2.2.1.2 La présentation antigénique par le CMH-II** Les molécules du CMH-II sont composées de deux chaînes lourde  $\alpha$  et  $\beta$  ancrées à la membrane (Wieczorek *et al.* 2017). Chaque chaîne contient deux régions ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ). Les gènes codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont classiquement au nombre de trois chez l'humain, DP, DQ et DR (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) et de deux chez la souris, A et E (H2-A (ou I-A) et H2-E (ou I-E)). L'association des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  avec la chaîne invariante (Ii ou CD74) dans le RE permet l'assemblage de la molécule du CMH-II avec la fermeture du site de liaison (Mantegazza *et al.* 2012). Le complexe Ii/CMH-II est alors transporté dans l'appareil de Golgi depuis le RE ou en provenance de la membrane plasmique où a lieu l'endocytose du complexe. Dans le compartiment MIIC (MHC-II Compartment), la chaîne Ii est dégradée par des protéases et le peptide résultant nommé CLIP (Class II associated Ii Peptide) reste dans le sillon jusqu'à l'échange avec un peptide (Figure 16 page suivante) (Neefjes *et al.* 2011). Ce peptide exogène provient d'une protéine dégradée dans la voie endosomale. L'échange entre le peptide CLIP et le peptide antigénique est effectué à l'aide de la molécule HLA-DM (pour l'humain) ou H2-DM (pour la souris). Le complexe peptide/CMH-II formé est ensuite transporté vers la membrane plasmique de la CPA permettant alors la présentation du peptide aux LTs CD4+ (Figure 16 page suivante) (Neefjes *et al.* 2011).

**2.2.1.3 La présentation antigénique croisée par le CMH-I** Pour permettre la présentation antigénique de peptides exogènes par les molécules du CMH-I, deux modèles ont été décrits : la voie vacuolaire et la voie cytosolique (Embgenbroich *et al.* 2018; Joffre *et al.* 2012; Segura *et al.* 2011). Quelque soit la voie utilisée, la première étape consiste toujours en l'internalisation des antigènes exogènes par des processus d'endocytose tels que la phagocytose, l'endocytose, la pinocytose ou la macropinocytose.

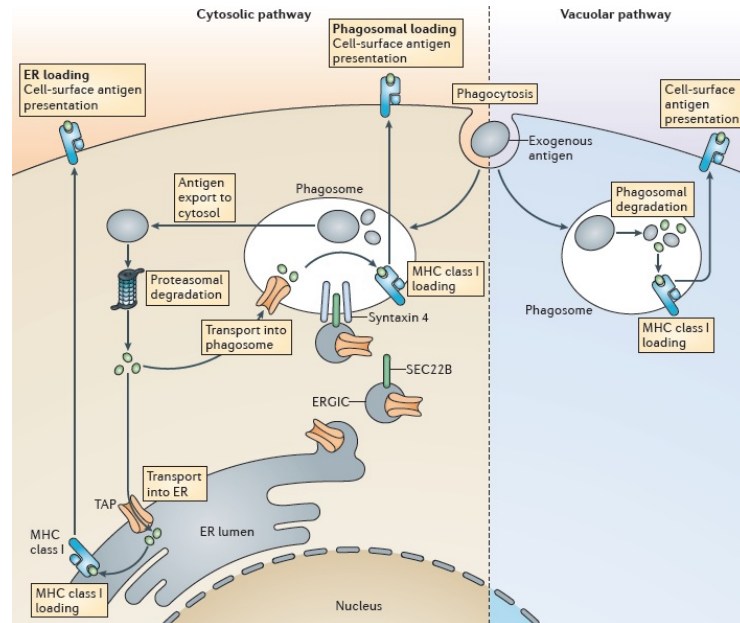
La voie "vacuolaire" correspond à la dégradation des protéines par des enzymes des compartiments endocytaires telle que la cathepsine S, permettant aux peptides d'être chargés sur les molécules du CMH-I directement dans l'endosome ou dans le phagosome et ceci de manière indépendante du transporteur TAP, du protéasome, du RE et du complexe permettant le chargement du peptide sur le CMH-I (Figure 17 page 39) (Embgenbroich *et al.* 2018; Joffre *et al.* 2012). L'apport des molécules du CMH-I au compartiment con-



**Figure 16 – Mécanisme classique de présentation antigénique par la molécule du CMH-II (Neefjes *et al.* 2011).** Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule du CMH-II s'assemblent dans le RE et forment un complexe avec la chaîne invariante Ii. Le CMH-II est transporté dans le compartiment MIIC dans l'appareil de Golgi depuis la membrane plasmique ou le RE. Les protéines exogènes endocytées et la chaîne Ii sont dégradées par des protéases. Le peptide de la chaîne Ii nommé CLIP reste dans le sillon du CMH-II jusqu'à l'échange avec un peptide antigénique à l'aide du chaperon HLA-DM pour l'humain ou H2-DM pour la souris. Le complexe peptide/CMH-II est transporté vers la membrane plasmique pour présenter l'antigène aux LTs CD4+.

tenant les protéines exogènes dégradées se ferait par fusion avec des endosomes de la voie de recyclage contenant des complexes peptide/CMH-I. De plus, il est supposé que les peptides pourraient être échangés selon l'affinité avec le sillon peptidique du CMH-I (Pucchio *et al.* 2008). Le complexe peptide/CMH-I formé est ensuite transporté vers la membrane plasmique pour présenter le peptide aux LTs CD8+ (Figure 17 page ci-contre).

Dans la voie "cytosolique", les protéines internalisées au sein des compartiments endocytiques sont transloquées vers le cytosol pour induire leur dégradation. Cette translocation est dépendante de la machinerie ERAD puisque l'inhibition du canal de rétrotranslocation Sec61 ou de l'enzyme AAA ATPase p97 empêchent la présentation antigénique croisée (Ackerman *et al.* 2006; Zehner *et al.* 2015). Il a également été proposé que les protéines pourraient être exportées vers le cytosol par un mécanisme de fuite suite au recrutement de gouttelettes lipidiques qui déstabiliseraient la membrane des phagosomes induisant ainsi la sortie de protéines (Bougnères *et al.* 2009). Cependant, une autre étude a montré que des souris déficientes dans la biogenèse des gouttelettes lipidiques ne présentent pas de



**Figure 17 – Mécanisme de présentation antigénique croisée par la molécule du CMH-I (Joffre *et al.* 2012).** Après phagocytose ou endocytose, les antigènes exogènes peuvent être exportés dans le cytosol pour y être dégradés (voie "cytosolique") ou bien dégradés directement dans le compartiment endosomal (voie "vacuolaire"). La voie cytosolique permet l'export des antigènes par le système de rétrotranslocation ERAD induisant la dégradation des protéines par le protéasome. Ensuite les peptides sont transportés et chargés sur les molécules du CMH-I dans le RE ou dans le phagosome par le transporteur TAP. Ce mécanisme est possible dans le phagosome grâce à la SNARE Sec22B localisée dans le compartiment ERGIC qui interagit avec la syntaxine 4 sur les phagosomes pour permettre le recrutement de composants du RE au phagosome tel que le transporteur TAP. Les peptides sont chargés sur les molécules du CMH-I et le complexe peptide/CMH-I est transporté à la surface de la cellule. Dans la voie vacuolaire, le peptide est chargé sur la molécule du CMH-I directement à l'intérieur du phagosome pour ensuite présenter le complexe peptide/CMH-I aux LTs CD8<sup>+</sup> à la surface de la cellule.

problème majeur dans l'export des protéines vers le cytosol (Mantegazza *et al.* 2012). Une fois l'antigène dans le cytosol, il est dégradé par le protéasome puis deux possibilités existent. Soit les peptides sont transportés dans le RE, soit ils sont redirigés vers le phagosome/endosome par le transporteur TAP pour pouvoir être chargés sur le CMH-I (Figure 17) (Embgenbroich *et al.* 2018; Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1995). La présence de protéines du RE telle que TAP au niveau des phagosomes est expliquée par la fusion du compartiment ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) avec le phagosome via la protéine v-SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) Sec22b (Cebrian *et al.* 2011). En effet, Sec22b qui est localisée au niveau du RE, est impliquée dans le transport vésiculaire antérograde du RE en fusionnant avec

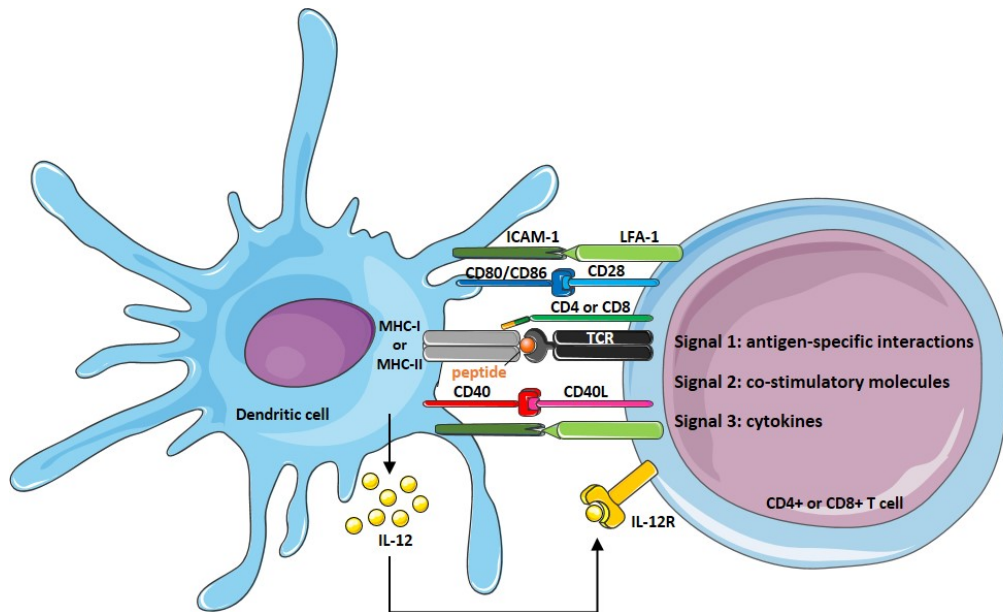
la t-SNARE synthaxine 4 présente au niveau du phagosome (Figure 17 page précédente). L'inactivation de Sec22b dans les DCs entraîne une diminution de la quantité des protéines TAP2, tapasine et calréticuline recrutées dans les phagosomes suivi d'un défaut de présentation antigénique via le CMH-I (Cebrian *et al.* 2011). La contribution des protéines du RE et de la machinerie de présentation antigénique semble essentielle à la voie cytosolique associée à la phagocytose puisqu'environ 20% de la membrane phagosomale est composée de protéines résidentes du RE (Campbell-Valois *et al.* 2012). Au final, les peptides présents dans le RE ou dans le phagosome sont chargés sur les molécules du CMH-I puis le complexe peptide/CMH-I est transporté à la surface de la cellule pour être présenté aux LTs CD8+ (Figure 17 page précédente).

Les DCs sont particulièrement efficaces dans le processus de présentation antigénique croisée dû à une activité protéolytique faible et une acidification lente des endosomes ou phagosomes qui permettent un apprêtement efficace des antigènes exogènes comparé aux macrophages (Delamarre *et al.* 2005; Joffre *et al.* 2012).

#### 2.2.1.4 La formation de la synapse immunologique pour l'activation des LTs

L'interaction entre la CPA et le LT dans les organes lymphoïdes secondaires est essentielle pour l'activation des LTs naïfs. La zone de contact est appelée synapse immunologique.

Elle débute par l'interaction non spécifiques des CPAs et LTs par des molécules d'adhérence comme par exemple la protéine LFA-1 (Lymphocyte Functional Antigen-1) à la membrane du LT qui se lie à ICAM-1 (InterCellulaire Adhesion Molecules-1 ou CD54) à la surface de la CPA (Figure 18 page ci-contre) (Dustin 2014). Par la suite, l'activation des LTs repose sur trois signaux (Dustin 2014). Le premier, correspond à la reconnaissance du complexe peptide/CMH par le TCR (T Cell Receptor) et les molécules CD8 (Cluster de Différenciation 8) ou CD4 se fixent à des régions conservées du CMH-I ou CMH-II, respectivement (Figure 18 page suivante). Le second signal est caractérisé par la liaison des récepteurs de co-stimulation (CD28, CD40L par exemple) à la surface des LTs aux molécules CD80, CD86, CD40 sur les CPAs (Figure 18 page ci-contre). La stimulation de CD28 prolonge et augmente l'activation des LTs en induisant la sécrétion d'IL-2 et prévient l'induction de la tolérance. Le dernier signal, est la différenciation des LTs en fonction de l'environnement cytokinique; par exemple, la sécrétion de l'IL-12 induit une différenciation de type Th1 (Figure 18 page suivante). Ainsi, la disponibilité de l'antigène, l'expression de molécules co-stimulatrices et la libération de cytokines sont des facteurs essentiels à l'activation des LTs et à l'établissement de la réponse mémoire.



**Figure 18 – Schéma de la mise en place d’une synapse immunologique entre une DC et un LT.** Pour activer un LT, il est nécessaire que la CPA (comme la DC) expose l’antigène à sa surface et qu’une interaction s’effectue entre les deux cellules. Pour cela, différents signaux sont requis. Le TCR reconnaît le complexe peptide/CMH et les molécules CD8 ou CD4 se fixent à la molécule de CMH-I ou CMH-II, respectivement. De plus, des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80/86 présentes sur la DC interagissent avec les molécules CD40L et CD28 respectivement, à la surface du LT. Ces interactions sont stabilisées par les molécules d’adhésion comme ICAM-1 reconnaissant LFA-1. Le dernier signal est la sécrétion d’IL-12 par la CPA pour la différenciation des LTs.

### 2.2.2 Les antigènes spécifiques de *T. gondii*

À l’heure actuelle, six antigènes de *T. gondii* ont été identifiés chez la souris dont cinq présentés par les molécules du CMH-I :

- L’épitope HF10 (HPGSVNEFDF) est dérivé de la protéine TgGRA6<sub>(II)</sub> ancrée à la MVP et est présenté par la molécule H-2L<sup>d</sup> (Blanchard *et al.* 2008). La forte immunodominance de ce peptide s’explique par son positionnement à l’extrémité C-terminale de la protéine qui lui permet d’être directement exposé vers le cytosol de la cellule hôte mais également par la sécrétion abondante de TgGRA6 durant l’infection de la cellule hôte (Feliu *et al.* 2013).
- Les épitopes IF9 (IPAAAGRFF) et SM9 (SPMNGGYM) dérivant de TgROP7 et TgGRA4 respectivement, sont présentés par la molécule H-2L<sup>d</sup> (Frickel *et al.* 2008).
- L’épitope SVL8 (SVLAFRRL) est dérivé de TgdO57 (protéine parasitaire de fonction



inconnue) et est présenté par la molécule H-2K<sup>b</sup> (D. C. Wilson *et al.* 2010).

- L'épitope YAL9 (YAVANYFFL) est dérivé de TgROP5 et est présenté par la molécule H-2D<sup>b</sup>. Des expériences ont montré que ce peptide peut protéger efficacement de l'infection lorsqu'il est localisé en C-terminal de la protéine TgGRA6 (de manière similaire au positionnement de HF10) montrant ainsi l'importance du mode de sécrétion et de l'orientation de l'épitope pour induire une présentation antigénique efficace (Grover *et al.* 2014).
- L'épitope AS15 (AVEIHRPVPGTAPPS) est dérivé de la protéine TgCD4Ag28m et est présenté par la molécule H-2IA<sup>b</sup>. L'immunisation avec le peptide AS15 réduit la charge parasitaire et le nombre de kystes dans le cerveau de souris infectées démontrant le rôle des LTs CD4<sup>+</sup> dans le contrôle de l'infection chronique cérébrale (Grover *et al.* 2012).

### 2.2.3 La présentation antigénique dans le cadre de l'infection à *T. gondii*

**2.2.3.1 La présentation par la molécule du CMH-I** Les mécanismes permettant la présentation d'antigènes de *T. gondii* par le CMH-I sont essentiels pour induire les réponses T CD8 protectrices contrôlant l'infection à *T. gondii*.

De manière générale, les mécanismes de présentation antigénique des pathogènes contenus dans une vacuole intracellulaire sont peu connus. Plus précisément les mécanismes permettant l'export des protéines du pathogène dans le cytoplasme de la cellule hôte pour accéder à la voie de présentation antigénique par le CMH-I ne sont que partiellement élucidés (Blanchard *et al.* 2010; Gros *et al.* 2019). Les molécules du CMH-I peuvent présenter des peptides antigéniques d'origine extracellulaire mais également ceux contenus dans un phagosome ou une vacuole par le mécanisme de présentation croisée. Afin de comprendre ces processus lors de l'infection à *T. gondii*, les études réalisées ont le plus souvent utilisé des parasites transgéniques exprimant l'antigène modèle OVA sécrété de manière constitutive sous forme soluble dans l'espace vacuolaire. Cependant, des études ont également été menées sur les antigènes naturels de *T. gondii* (Blanchard *et al.* 2008; Frickel *et al.* 2008; Pepper *et al.* 2004; Salvioni *et al.* 2019; Schaeffer *et al.* 2009).

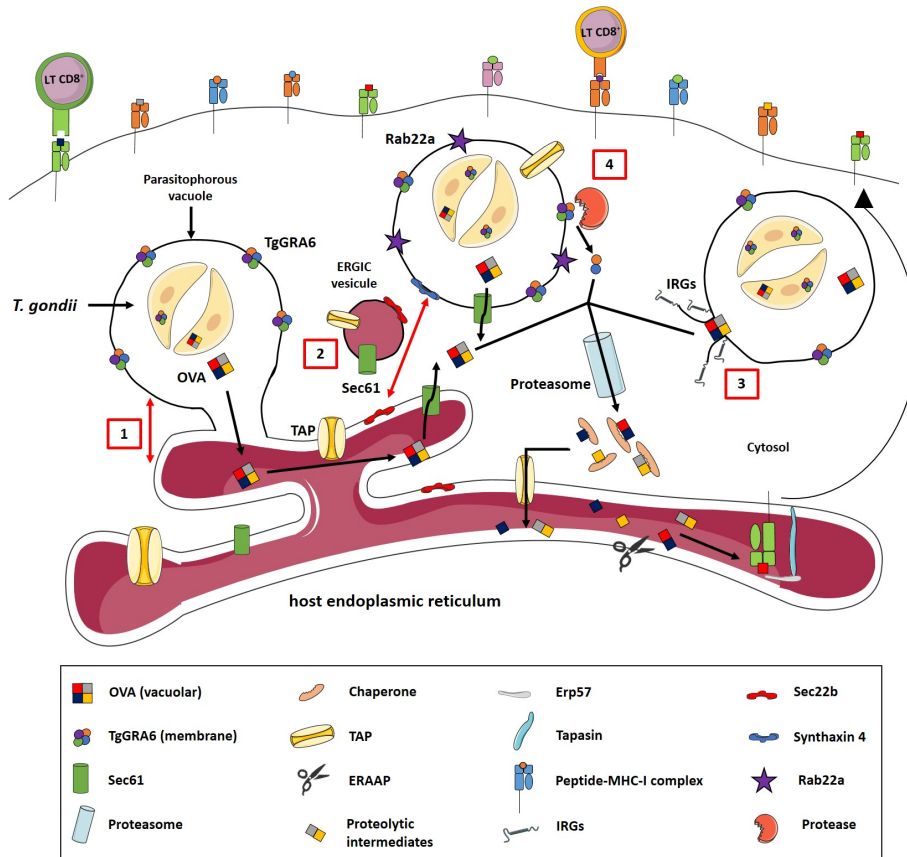
La présentation d'antigènes parasitaires par le CMH-I dépend du mode d'infection de la cellule hôte, du mode de sécrétion de l'antigène ainsi que de sa localisation. En effet, l'activation de la réponse médiée par les LTs CD8<sup>+</sup> contre *T. gondii* ne peut avoir lieu que si le tachyzoïte vivant envahit activement les cellules (Dupont *et al.* 2014; Goldszmid *et al.* 2009; Gubbels *et al.* 2005). Ainsi, la phagocytose de parasites morts ou opsonisés n'induit pas la présentation des peptides antigéniques sur les molécules du CMH-I (Dupont *et al.* 2014; Dzierszynski *et al.* 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'antigène devait être

sécrété dans la VP pour permettre une présentation antigénique efficace (Dupont *et al.* 2014; Gregg *et al.* 2011; Grover *et al.* 2014; Kwok *et al.* 2003). De plus, le clivage de peptides localisés à la MVP et accessibles au cytosol de la cellule hôte (tel que HF10 de la protéine TgGRA6) induit également une réponse protectrice. Néanmoins, une étude suggère que la présentation antigénique croisée par les DCs non infectées mais voisines ("bystander") de DCs infectées joue également un rôle important dans l'induction de la réponse T CD8 (John *et al.* 2009).

D'autre part, l'efficacité des réponses T CD8 spécifiques à *T. gondii* est modulée par le mode de sécrétion des antigènes. En effet, il a été montré que la protéine TgROP5 sécrétée de manière transitoire au début de l'invasion induit une réponse T CD8 faible et non protectrice alors que TgGRA6, considéré comme l'antigène le plus immunogène, est sécrétée de manière constitutive pendant la réplication parasitaire (Grover *et al.* 2014). Dans cette étude, l'utilisation de parasites transgéniques a permis de montrer que l'adressage des protéines TgROP5 aux GDs induit l'augmentation de la réponse T CD8 spécifique et inversement quand TgGRA6 est adressée aux rhoptries, la réponse diminue (Grover *et al.* 2014). La sécrétion constitutive de l'antigène, probablement corrélée à son abondance dans le cytosol de l'hôte, est donc déterminante pour l'immunogénicité du parasite qui ne serait donc pas liée à la nature de l'antigène et de ses épitopes. Comme précédemment mentionné, le positionnement de l'épitope est aussi essentiel. En effet, l'antigène TgGRA6 doit être localisé à la MVP et son épitope (positionné à l'extrémité C-terminale) doit être exposé du côté cytosolique pour une présentation efficace (Buailon *et al.* 2017; Feliu *et al.* 2013; Lopez *et al.* 2015). D'ailleurs, le remplacement de l'épitope HF10 de TgGRA6 par l'épitope SM9 sous-dominant de TgGRA4 permet à SM9 d'être fortement immunodominant (Feliu *et al.* 2013).

Les antigènes sécrétés constitutivement peuvent être localisés dans la lumière de la vacuole ou ancrés à la MVP, suggérant l'existence de mécanismes d'export différents. L'apprêtement et la présentation antigénique d'épitopes de la protéine OVA intravacuolaire est dépendante du canal de translocation Sec61, du transporteur TAP et du protéasome (Goldszmid *et al.* 2009; Gubbels *et al.* 2005). Les études menées ont suggéré que les précurseurs antigéniques seraient exportés dans le cytosol via Sec61 pour être dégradés par le protéasome avant que les peptides soient importés par TAP dans le hRE pour être chargés sur la molécule du CMH-I (Figure 19 page suivante) (Goldszmid *et al.* 2009; Gubbels *et al.* 2005). Ce processus implique le recrutement voire la fusion du hRE à la MVP pour permettre le passage des antigènes directement dans la voie de présentation antigénique par le CMH-I (Figure 19 page suivante) (Goldszmid *et al.* 2009). De plus, il a été montré que des vésicules du compartiment ERGIC de l'hôte fusionnent avec la VP via un mécanisme dépendant de la protéine Sec22b favorisant le recrutement de composants





**Figure 19 – Modèles proposés pour l'accès des antigènes et la présentation antigénique par le CMH-I de l'antigène OVA sécrété dans la VP et TgGRA6 localisée à la MVP lors de l'infection à *T. gondii*.** Actuellement, quatre modèles sont proposés pour l'accès des antigènes à la voie de présentation antigénique par le CMH-I. Le premier (1) correspond à la fusion du hRE avec la VP permettant le passage de la protéine OVA sécrétée par le parasite dans le hRE. La protéine serait alors exportée dans le cytosol de la cellule hôte via Sec61. Le deuxième (2) correspond à la fusion de la VP à une vésicule ERGIC médiée par Sec22b contenant des composants du hRE permettant ensuite l'export de la protéine OVA via Sec61 dans le cytosol. Le troisième (3) propose un export de protéines parasitaires lors de la rupture partielle de la MVP par l'action des IRGs. Enfin le quatrième (4) soumet l'idée qu'une protéase clive la partie C-terminale de TgGRA6 localisée à la MVP permettant ainsi sa libération dans le cytosol. Pour ces quatre modèles, la protéine exportée dans le cytosol est dégradée en peptides par le protéasome puis les peptides sont transloqués dans le hRE pour être chargés sur les molécules du CMH-I. Enfin les complexes peptide/CMH-I sont transportés à la surface de la cellule pour activer les LTs CD8+.

de la machinerie ERAD au niveau de la MVP pour la rétrotranslocation des antigènes dans le cytosol de la cellule hôte (Figure 19) (Cebrian *et al.* 2011). En absence de la protéine Sec22b, la présentation antigénique croisée de peptides OVA est fortement altérée dans les

DCs infectées *in vitro* (Cebrian *et al.* 2011). Une autre étude a montré que la VP interagit avec des compartiments d'endocytose entraînant le recrutement de la GTPase Rab22a à la VP lors de l'infection de DCs *in vitro* favorisant ainsi la présentation antigénique croisée des antigènes dérivés du parasite (Figure 19 page précédente) (Cebrian *et al.* 2016). Rab22a joue un rôle central dans le trafic endocytique du CMH-I expliquant la forte diminution de la présentation antigénique dans les cellules déficientes en Rab22a (Cebrian *et al.* 2016; Mayorga *et al.* 2018). La présentation antigénique de l'épitope immunodominant HF10 de TgGRA6 est également dépendante du protéasome, de l'aminopeptidase ERAAP (ER Aminopeptidase associated with Antigen Processing) et du transporteur TAP (Blanchard *et al.* 2008). Ceci indique que le précurseur du peptide HF10 est dégradé par le protéasome dans le cytosol de la cellule hôte puis transloqué dans le hRE par TAP pour subir l'apprêtement par ERAAP (Figure 19 page ci-contre) (Blanchard *et al.* 2008). Ce processus ne requière pas le recrutement de composants du hRE à la MVP médié par Sec22b (Buailion *et al.* 2017). Les auteurs de cette étude ont donc proposé l'idée qu'une protéase cytosolique pourrait cliver directement le peptide antigénique de TgGRA6 exposé à la surface de la MVP (Figure 19 page précédente) (Buailion *et al.* 2017). Pour conclure, l'accès des antigènes au cytosol pourrait s'effectuer par différents processus selon la localisation de l'antigène. Les antigènes sécrétés dans la VP pourraient accéder au cytosol suite à la fusion de composants du hRE à la MVP mais également par l'action des IRGs permettant la rupture partielle de la MVP et l'échappement de protéines parasitaires. Pour les antigènes membranaires, seule l'hypothèse qu'une protéase clive une partie de la protéine à la MVP existe (Figure 19 page ci-contre).

Pour finir, il reste à déterminer si la présentation antigénique par le CMH-I est modulée pendant la phase chronique de l'infection par *T. gondii*. Récemment, il a été montré que la présentation d'antigènes dérivés de tachyzoïtes sur les molécules du CMH-I par les neurones est essentielle au contrôle, par les LTs CD8+, de la prolifération parasitaire dans le cerveau (Salvioni *et al.* 2019). De manière intéressante, les bradyzoïtes contenus dans les kystes neuronaux ne semblent pas permettre la présentation d'antigènes. Il serait donc intéressant de rechercher si des effecteurs parasitaires sécrétés par le bradyzoïte pourraient interférer avec les voies de présentation antigénique dans les cellules neuronales cibles.

**2.2.3.2 La présentation par la molécule du CMH-II** Lors de l'infection à *T. gondii*, la réponse T CD4 est également induite mais peu de données sont disponibles sur ce processus. Deux antigènes de *T. gondii* sont décrits comme induisant une réponse T CD4 protectrice, le peptide AS15 (dérivant de la protéine sécrétée TgCD4Ag28m) et un peptide dérivant de TgPRF (une protéine du cytosquelette localisée dans le cytosol du parasite) (Grover *et al.* 2012; Yarovinsky *et al.* 2006). L'immunogénécité de TgPRF a été montrée

comme dépendante de sa reconnaissance par le TLR11 dans les DCs CD8 $\alpha$ + (Yarovinsky *et al.* 2006). Le peptide AS15 est présenté par le CMH-II dans les DCs infectées par des parasites vivants ou tués par la chaleur (Heat Killed, HK) suggérant que les antigènes parasitaires ont accès aux compartiments de dégradation où le peptide est chargé sur les molécules du CMH-II (Goldszmid *et al.* 2009; Grover *et al.* 2012). Les mécanismes qui pourraient assurer l'entrée de l'antigène dans les compartiments endosomaux alors que le parasite réside dans une vacuole sont encore indéterminés. Néanmoins, dans des DCs déficientes pour la protéine ATG5, il a été constaté une diminution de l'activation des LTs CD4+ producteur d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  après infection par une souche de type II *in vitro* et *in vivo* (H. K. Lee *et al.* 2010; E. Liu *et al.* 2015). Ce défaut d'activation des LTs CD4+ ne s'accompagne pas de différences dans l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD86 et du CMH-II, ni d'une altération de la production d'IL-12, d'IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ , ce qui suggère qu'il pourrait être lié à une diminution de la libération d'antigènes dans la voie de présentation antigénique par le CMH-II, un processus qui semble donc dépendant de la machinerie d'autophagie (H. K. Lee *et al.* 2010; E. Liu *et al.* 2015).

### 2.3 La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative se divise en deux parties : une réponse à médiation cellulaire essentielle lors d'une infection par un pathogène intracellulaire et une réponse à médiation humorale permettant la production d'anticorps spécifiques contre ce pathogène.

#### 2.3.1 La réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire

Les lymphocytes sont les acteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire protégeant l'hôte à long terme. Les cellules, stimulées lors d'une primo-infection, ont pour rôle de réagir rapidement lors d'une infection secondaire. Dans le cas d'une infection à *T. gondii*, elles protègent à long terme contre la réactivation des kystes latents chez les animaux infectés chroniquement. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* de déplétions des LTs CD4+, LTs CD8+ et/ou de l'IFN- $\gamma$  ont montré l'importance de ces trois composants pour l'établissement d'une immunité protectrice contre le parasite (Gazzinelli *et al.* 1992). Les LTs CD8+ et l'IFN- $\gamma$  sont considérés comme les principaux effecteurs de cette réponse durant les phases aiguë et chronique de l'infection. Néanmoins, les LTs CD4+ jouent un rôle synergique avec les LTs CD8+ pour empêcher la réactivation de l'infection chronique (Gazzinelli *et al.* 1991; Lutjen *et al.* 2006). Ce rôle des LTs CD4+ est illustré chez les patients atteints du SIDA qui sont à risques pour le développement d'une toxoplasmose cérébrale ou disséminée. En effet, il a été montré que le risque de réactivation des kystes est particulièrement élevé lorsque le nombre de LTs CD4+ se situe en dessous de 100 cellules/mm<sup>3</sup> (Pereira-Chioccola *et al.* 2009).

**2.3.1.1 Rôle des LTs CD8+** Les LTs CD8+ ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire protectrice en limitant la réactivation des kystes tissulaires de par leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  et leur activité cytotoxique (Brown *et al.* 1990; Suzuki *et al.* 1990a,b). En effet, le transfert de LTs CD8+ provenant de souris immunisées à des souris naïves montrent que les LTs CD8+ protègent de l'infection aiguë (I. A. Khan *et al.* 1994). De plus, l'injection de LTs CD8+ provenant de souris immunisées prévient de la réactivation de kystes latents dans des souris infectées immunodéprimées (I. A. Khan *et al.* 1999). Cette réponse protectrice est également dépendante de la sécrétion de l'IL-12 par les DCs et les macrophages. L'IL-12 joue un rôle essentiel dans la différenciation des LTs CD8+ effecteurs et la production d'IFN- $\gamma$  lors de l'infection (Jordan *et al.* 2009; D. C. Wilson *et al.* 2008). En effet, la production d'IFN- $\gamma$  est fortement réduite dans les souris infectées déficientes en IL-12 diminuant ainsi la protection contre le parasite, qui est rétablie lors de l'administration d'IFN- $\gamma$  (Ely *et al.* 1999). De plus, des expériences de vaccination avec la souche CPS (souche non virulente et non répliquative) ont montré que le développement de sous populations de LTs CD8+ effecteurs (mais pas des LTs CD8+ mémoires) au site d'infection et au niveau de la rate est dépendant de l'IL-12 (Jordan *et al.* 2009; D. C. Wilson *et al.* 2008). Ces populations lymphocytaires se caractérisent par l'expression des marqueurs CD62L (marqueur d'activation des LTs) et KLRG1 (marqueur de différenciation des LTs en LTs cytotoxiques LTc). La cytotoxicité des LTs CD8+ permet de lutter contre la dissémination parasitaire même si cet effet est moindre comparé à l'action de l'IFN- $\gamma$  qui active les fonctions effectrices des monocytes et macrophages ou des cellules gliales et astrocytes dans le cerveau (cf 2.1.2 page 29). *In vitro*, il a été montré que les LTc sécrètent des granules lysant les macrophages infectées pour limiter la réplication parasitaire (Nakano *et al.* 2001). En particulier, la perforine et le système Fas-FasL contribuent à l'activité cytotoxique des LTs CD8+ (Jongert *et al.* 2010; Jordan *et al.* 2009). Cependant, cette activité dépendante de la perforine ne joue pas un rôle majeur lors de la phase aiguë de l'infection mais serait essentielle au contrôle de la phase chronique (Denkers *et al.* 1997; X. Wang *et al.* 2004) puisque des souris déficientes en perforine présentent un nombre plus élevé de kystes cérébraux. De plus, le transfert de LTs CD8+ spécifiques de *T. gondii* à des souris SCID infectées chroniquement permet l'élimination des kystes par l'activité cytotoxique dépendante de la perforine (Denkers *et al.* 1997; Suzuki *et al.* 2010; Tiwari *et al.* 2019).

**2.3.1.2 Rôle des LTs CD4+** Les LTs CD4+ sont divisés en deux populations: les LTs régulateurs (LTreg) et les LTs auxiliaires ou LTh (LT helper) eux-mêmes divisés en sous-population LTh1, LTh2 et LTh17 (Zenewicz *et al.* 2009).

**Les lymphocytes Th1** Une réponse de type Th1 est très fortement induite lors de l'infection à *T. gondii* par comparaison aux réponses Th2 et Th17. La différenciation des LTs naïfs en Th1 est sous la dépendance de l'IL-12. Les LTh1 ainsi produits ont la capacité de sécréter de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 (Gazzinelli *et al.* 1991; Zenewicz *et al.* 2009). Comme indiqué précédemment, l'IFN- $\gamma$  est la cytokine majeure impliquée dans la protection de l'hôte contre une infection aigüe et chronique. L'IL-2 contribue également à l'induction de la réponse T CD8 et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  sous jacente. En effet, des souris déficientes en IL-2 meurent après une infection par une souche de type II dû à un défaut dans la production d'IFN- $\gamma$  ne permettant pas le contrôle de l'infection (Villegas *et al.* 2002). Le deuxième rôle attribué à l'IL-2 correspond à la régulation des LTreg. Il a été montré que la diminution d'IL-2 entraîne une diminution importante du nombre de LTreg induisant la mort des souris infectées par une souche de type II dû à une hyper-inflammation tissulaire (Oldenhove *et al.* 2009). Les LTh1 sont donc important pour la mise en place d'une réponse T CD8 protectrice contre le parasite et régulatrice par les Treg.

**Les lymphocytes Th2** Une réponse de type Th2 induit une action anti-inflammatoire par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 par les LTh2 (Zenewicz *et al.* 2009). L'IL-10 joue un rôle régulateur très important lors de la toxoplasmose. En effet, des souris infectées déficientes en IL-10 meurent de nécrose intestinale alors que l'injection d'anticorps contre les LTs CD4<sup>+</sup> ou l'IFN- $\gamma$  les protègent (Suzuki *et al.* 2000). De façon similaire, les cerveaux de souris infectées déficientes en IL-10 montrent une forte inflammation (E. H. Wilson *et al.* 2005). L'IL-10 sécrétée par les LTh2 limite la sécrétion d'IFN- $\gamma$  mais également de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  protégeant ainsi la souris d'une inflammation létale (Suzuki *et al.* 2000; E. H. Wilson *et al.* 2005). L'IL-4 présente un rôle similaire à l'IL-10 puisque la susceptibilité des souris en phase aigüe de l'infection est plus importante lors d'une infection orale par des kystes dans des souris déficientes en IL-4 (J. Alexander *et al.* 1998). En plus, d'une forte inflammation tissulaire, ces souris présentent un nombre de kystes cérébraux plus important comparé aux souris sauvages (Suzuki *et al.* 1996). Ceci suggère donc un rôle de protection joué par l'IL-4 contre un effet délétère de l'hyper-inflammation des tissus durant la phase aigüe de l'infection mais également lors de la toxoplasmose chronique (J. Alexander *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 1996).

**Les lymphocytes Th17** Les LTh17 produisent de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22 (Zenewicz *et al.* 2009). Actuellement, le rôle des LTh17 dans l'infection parasitaire n'est pas encore clair. En effet, une étude a montré que les souris déficientes en IL-17 sont plus susceptibles à une infection orale dû à un défaut de migration des neutrophiles au site d'infection (Kelly *et al.* 2004). Une autre étude indique que l'IL-17 aurait un rôle

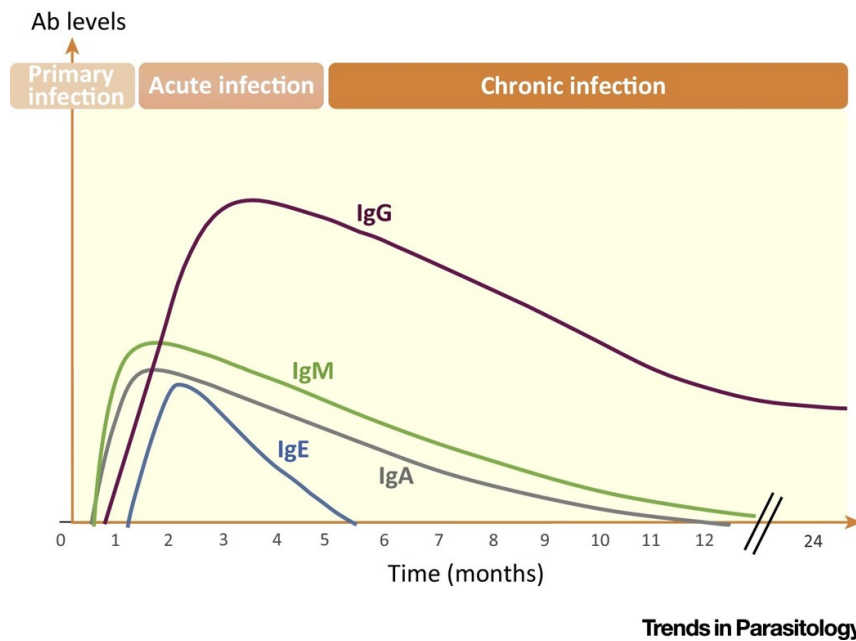
protecteur lors de l'infection aiguë en diminuant l'expression de la protéine parasitaire TgHSP70 et la production d'IFN- $\gamma$  limitant ainsi le risque de lésions tissulaires et de choc anaphylactique (Moroda *et al.* 2017). En revanche, une étude contradictoire montre que l'absence d'IL-17 protège les souris infectées par voie orale en diminuant la réponse inflammatoire (Guiton *et al.* 2010). Dans le contexte de la toxoplasmose oculaire, l'IL-17 serait également délétère et induirait la formation de lésions ophtalmiques suite à une inflammation des tissus (Amadi-Obi *et al.* 2007; Gaddi *et al.* 2007; Sauer *et al.* 2012). Concernant le rôle de l'IL-22, deux études ont montré son importance dans la protection de l'intestin contre la nécrose tissulaire déclenchée par l'inflammation au cours d'une infection orale par des kystes (Couturier-Maillard *et al.* 2018; Ryffel *et al.* 2019).

**Les lymphocytes Treg** La différenciation des LTreg est induite par la combinaison de l'IL-6 et du TGF- $\beta$  (Zenewicz *et al.* 2009). Ces cellules sécrètent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  et ont pour rôle d'inhiber l'action des autres LTs CD4+. Des études montrent qu'une infection par voie orale induit une diminution du nombre de LTreg au niveau de la muqueuse intestinale et de la rate, qui pourrait donc entraîner une plus forte réponse Th1 et une inflammation locale (Oldenhove *et al.* 2009; Olguin *et al.* 2015; Tenorio *et al.* 2011). Des données suggèrent également que la diminution des LTreg pourrait être impliquée dans l'avortement des souris provoqué par l'infection parasitaire (Ge *et al.* 2008).

### 2.3.2 La réponse immunitaire adaptative à médiation humorale

La réponse immunitaire à médiation humorale correspond à la production d'Igs (IgA, IgM, IgE et IgG) spécifiques de *T. gondii* par les lymphocytes B (LB) tout au long de la vie de l'individu (Figure 20 page suivante).

Cette réponse permet de dépister l'infection à *T. gondii* par la détection des Igs sériques. Lors de la toxoplasmose, la réponse humorale est faible mais essentielle pour résister à l'infection (Figure 20 page suivante). En effet, des souris  $\mu$ MT (déficiente en LBs) infectées survivent à la phase aiguë mais meurent 3 à 4 semaines après l'infection due à une prolifération incontrôlée des tachyzoïtes et une augmentation du nombre de kystes dans le cerveau, bien que la réponse IFN- $\gamma$  soit normale (Kang *et al.* 2000). Les LTs CD4+ participent à la stimulation des réponses LBs et la production d'anticorps. Ainsi, des souris infectées déficientes en LTs CD4+ meurent 4 semaines après l'infection et présentent des concentrations d'Igs plus faibles que les souris sauvages. La sensibilité de ces souris est améliorée par le transfert d'anticorps anti-toxoplasmiques (Johnson *et al.* 2002). Les LBs contribuent également à l'activation des LTs CD4+ produisant de l'IFN- $\gamma$  *in vivo* (Menard *et al.* 2007). Ces études montrent que les Igs dirigés contre le parasite sont essentielles pour la survie de la souris uniquement lors de la phase chronique de l'infection et qu'elles



**Figure 20 – Représentation de la cinétique de production des Igs anti-toxoplasmiques après une primo-infection (Dard *et al.* 2016).** La primo-infection induit une réponse humorale avec la production de différents isotypes d'Igs. Les IgM et IgA apparaissent durant la première semaine et atteignent un pic à environ 1 mois post-infection avant de disparaître progressivement. Les IgE sont produites précocement et atteignent leur maximum 3 mois post-infection avant de disparaître rapidement. Les IgG sont produites tardivement mais sont détectables tout au long de la vie de l'individu.

contribuent au contrôle de la réplication parasitaire. De plus, des anticorps anti-ESA (Excretory/Secretory Antigens) de *T. gondii* induisent l'agglutination et la destruction des parasites extracellulaires en participant aux voies du complément et de l'ADCC (Antibody-Dependent Cell mediated Cytotoxicity) *in vitro* (Costa-Silva *et al.* 2008). De même, les IgM anti-toxoplasmiques ont la capacité de bloquer l'invasion cellulaire *in vitro* et peuvent limiter la dissémination parasitaire *in vivo* (Couper *et al.* 2005).



### 3 Cellules dendritiques et modulation par *T. gondii*

#### 3.1 Les DCs

Les DCs ont été identifiées et caractérisées par Ralph Steinman et Zanvil Cohn en 1973 (Steinman *et al.* 1973). Leur nom est associé à leur particularité morphologique de posséder des prolongements cytoplasmiques équivalents à des dendrites (Steinman *et al.* 1973). Dans les tissus de l'organisme où elles résident, les DCs immatures exercent des fonctions de sentinelles. En réponse à la capture d'antigènes, elles subissent un programme de maturation impliquant la régulation de l'expression des molécules du CMH et de co-stimulations à la surface des cellules. Elles deviennent alors des CPA professionnelles activant les LTs naïfs (Banchereau *et al.* 1998). Elles adoptent également un phénotype migratoire dépendant de CCR7 et se déplacent du site de capture des antigènes vers les zones riches en LTs des organes lymphoïdes secondaires. Elles sont donc à l'interface entre l'immunité innée et adaptative d'où leur importance dans la modulation de la réponse immunitaire. Les DCs représentent une population cellulaire très hétérogène possédant des fonctions diverses et résidant aussi bien dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus non lymphoïdes (Merad *et al.* 2013; Satpathy *et al.* 2012). Classiquement, les DCs existent sous forme de quatre sous-ensembles majeurs distincts sur le plan fonctionnel : les DCs conventionnelles 1 et 2 (cDCs), les DCs plasmacytoïdes (pDCs) et les DCs dérivant des monocytes (moDCs) (Dalod *et al.* 2014; Satpathy *et al.* 2012). Les caractéristiques de ces sous-ensembles de DCs sont résumées brièvement dans la Table 4 (Dalod *et al.* 2014; Ganguly *et al.* 2013; Merad *et al.* 2013; Swiecki *et al.* 2015).

DC subsets	moDC	cDC1	cDC2	pDC
<b>DC type</b>	Induced by inflammation	Lymphoid resident (CD8 $\alpha^+$ ) or migratory (CD103 $^+$ )	Lymphoid resident	Lymphoid resident
<b>Mouse markers</b>	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ Ly6C $^{hi/lo}$ CD64 $^+$	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^-$ CD8 $\alpha^+$ (or CD103 $^+$ ) XCR1 $^+$ CLEC9A $^+$ CD205 $^+$	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ CD8 $\alpha^-$ CD24 $^+$ CD172a $^+$ CD205 $^-$	CD11c $^{int}$ MHC-II $^{int}$ B220 $^+$ PDCA1 $^+$ SiglecH $^+$ Lyc6C $^+$
<b>Mediators produced</b>	TNF/iNOS/ROI	IL-12/IFN- $\lambda$	IL-12/TNF- $\alpha$ /IL-6	IFN-I/IFN-III/IL-12 TNF- $\alpha$ /IL-6
<b>Antigen presentation</b>	Present peptide by MHC-II	Present and cross-present peptide	Present peptide by MHC-II	Present and cross-present peptide

TABLE 4 – Résumé des caractéristiques des sous-populations majeures de DCs.



### 3.2 Modulation de l'activité des DCs par *T. gondii*

Actuellement, les mécanismes de modulation des réponses de l'hôte par les effecteurs parasitaires ont été principalement étudiés dans les fibroblastes et les macrophages mais peu d'informations sont connues sur la modulation des fonctions des DCs par *T. gondii* (Hakimi *et al.* 2017). Pourtant, les interactions entre ces cellules et le parasite peuvent avoir un impact important sur leurs fonctions immuno-régulatrices et sur leur capacité à présenter des antigènes et donc sur la mise en place d'une réponse T spécifique et efficace contre l'infection. Récemment, les docteurs Nicolas Blanchard, Sabrina Marion et moi-même avons écrit et publié une revue répertoriant les connaissances sur les interactions DCs/*T. gondii*. Cette revue vise également à mettre en lumière certaines questions encore non explorées (cf Annexe) (Poncet *et al.* 2019). Dans ce chapitre, la modulation de l'activité des DCs par *T. gondii* sera présentée en détail pour leur activité de présentation antigénique et de migration ainsi que pour leur processus de maturation. Les connaissances relatives aux autres aspects de l'interaction DC/*T. gondii* sont également résumées à la fin de ce chapitre dans un schéma (Figure 23 page 58).

#### 3.2.1 Modulation de la maturation des DCs par *T. gondii*

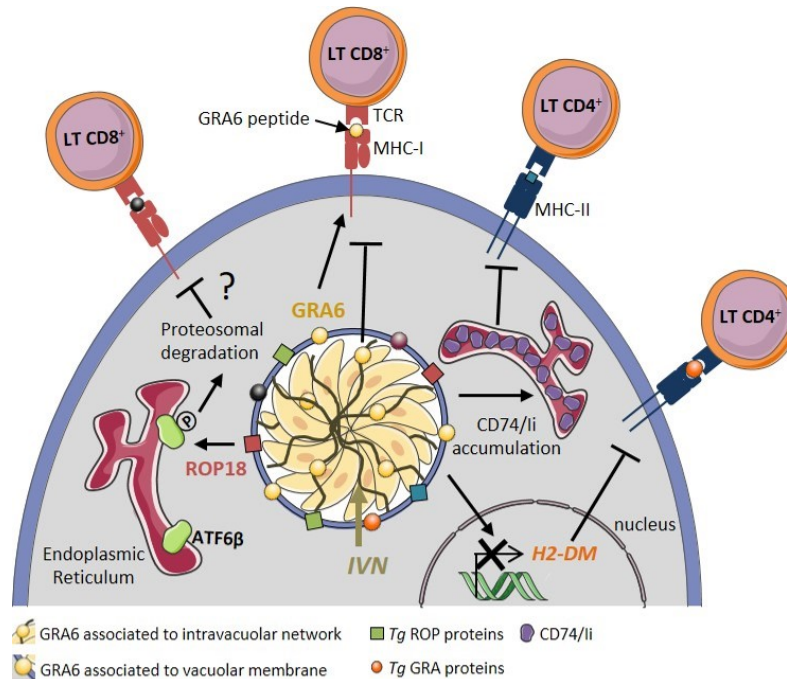
Des résultats contrastés ont été obtenus sur la modulation de l'expression de molécules de co-stimulation suite à l'infection par *T. gondii* *in vitro*. L'infection par une souche de type I conduit à l'activation des DCs humaines en augmentant l'expression de CD40, CD80, CD86 et HLA-DR (Séguin *et al.* 1999; Subauste *et al.* 2000). En revanche, les BMDCs murines immatures sont activées après une exposition à des parasites HK ou des STAG mais pas après l'invasion par une souche de type I (McKee *et al.* 2004). *In vivo*, Tait *et al.* ont montré que l'infection de souris par une souche de type I est corrélée avec une diminution du nombre de DCs dans le PEC et les ganglions lymphatiques par rapport à une infection par une souche de type II ce qui induit une diminution de l'activation des LTs CD8<sup>+</sup> (Figure 22 page 57) (Tait *et al.* 2010). Ce phénomène pourrait être le résultat d'une mort cellulaire déclenchée par le parasite de type I ou d'une diminution du recrutement des DCs suite à une réponse cytokinique altérée. Ce résultat suggère donc que la virulence plus importante des souches de type I comparée à celle des souches de type II chez la souris pourrait être liée à un meilleur contrôle des souches de type II par les DCs murines. Supportant cette hypothèse, une infection systémique par une souche de type II chez la souris entraîne une augmentation de l'expression des molécules CD40, CD80, CD86 et CMH-II et une production élevée d'IL-12 par les DCs spléniques CD8 $\alpha$ - et CD8 $\alpha$ + (Figure 22 page 57) (Straw *et al.* 2003). De plus, les interactions CD40/CD154 ont été montrées comme essentielles pour le maintien de l'activation des DCs spléniques

au cours de l'infection (Straw *et al.* 2003). En accord avec ce résultat, la quantité de CD40 augmente dans les cDC1s après injection de STAg chez la souris (Schulz *et al.* 2000). Par conséquent, la modulation de la maturation des DCs dépendante de la souche parasitaire semble un paramètre important pour la modulation des réponses LTs spécifiques et donc pour déterminer l'issue de l'infection chez la souris (Figure 22 page 57).

### 3.2.2 Modulation de la présentation antigénique lors de l'infection à *T. gondii*

**3.2.2.1 Modulation de la présentation antigénique par le CMH-I** Deux mécanismes liés aux effecteurs parasitaires ont été montrés comme contribuant à la modulation de la présentation antigénique par le CMH-I. Cependant très peu d'études ont adressé cet aspect de l'infection si bien qu'aucun mécanisme de ciblage direct de la voie de présentation du CMH-I n'a été mis en évidence jusqu'à maintenant.

L'effecteur parasitaire TgROP18<sub>(I)</sub> sécrété dans la cellule hôte lors du processus d'invasion joue un rôle crucial dans la virulence du parasite. En effet, des parasites déficients en TgROP18 sont avirulents chez la souris. Il a été montré que TgROP18<sub>(I)</sub> est capable d'induire la dégradation du facteur de transcription ATF6 $\beta$ , impliqué dans l'induction de la réponse UPR (cf Chapitre 4 page 60) (Figure 21 page suivante) (M. Yamamoto *et al.* 2011). Or, les DCs isolées de souris déficientes pour le gène *Atf6 $\beta$*  montrent une capacité réduite à restimuler des LTs CD8<sup>+</sup> isolés de souris sauvages infectées (mais pas les LTs CD4<sup>+</sup>), suggérant une fonction encore inconnue d'ATF6 $\beta$  dans la présentation antigénique par le CMH-I. Cependant, les populations de LTs CD4<sup>+</sup> et LTs CD8<sup>+</sup> produisent une plus forte quantité d'IFN- $\gamma$  chez les souris infectées par une souche déficiente en TgROP18<sub>(I)</sub> comparé à une souche sauvage suggérant l'implication de TgROP18<sub>(I)</sub> dans d'autres mécanismes modulant la réponse Th1 (M. Yamamoto *et al.* 2011). Par conséquent, des études complémentaires seraient nécessaires pour comprendre précisément l'impact de TgROP18 et le rôle précis d'ATF6 $\beta$  dans la régulation de la voie de présentation antigénique par le CMH-I (Figure 21 page suivante). Comme discuté dans la partie 2.2.3.1 page 42, la localisation des antigènes parasitaires au sein de la VP est essentielle pour induire une présentation antigénique efficace par le CMH-I. Il a été constaté qu'en absence de l'IVN, la protéine TgGRA6 est localisée en plus grande quantité à la MVP entraînant une présentation accrue de l'antigène HF10 par le CMH-I ce qui améliore la réponse T CD8 (Lopez *et al.* 2015). Cette étude montre donc que des structures parasitaires peuvent réguler des phénomènes immunologiques en piégeant des antigènes au sein de la vacuole et en diminuant leur exposition vers le cytosol de la cellule hôte (Figure 21 page suivante) (Lopez *et al.* 2015).



**Figure 21 – Modulation de la présentation antigénique par le parasite (Poncet *et al.* 2019).** TgROP18<sub>(I)</sub> diminue fortement l'activation des LTs CD8<sup>+</sup> par un mécanisme inconnu pouvant être lié à la phosphorylation et la dégradation d'ATF6 $\beta$  par TgROP18<sub>(I)</sub>. L'IVN réduit la localisation de TgGRA6 à la MVP impactant l'accès du fragment C-terminal dans le cytosol de la cellule hôte ce qui réduit la présentation du peptide antigénique HF10 de TgGRA6 par le CMH-I. L'infection par *T. gondii* réprime l'expression de la molécule H2-DM et induit l'accumulation de la protéine CD74/Ii dans le RE. Ainsi la présentation antigénique par le CMH-II est compromise ce qui empêche l'activation des LTs CD4<sup>+</sup>.

**3.2.2.2 Modulation de la présentation antigénique par le CMH-II** Des mécanismes d'inhibition de la présentation antigénique par les molécules du CMH-II ont été caractérisés dans les DCs naïves ou pré-stimulées par l'IFN- $\gamma$ . D'une part, il a été montré que le parasite induit l'accumulation de CD74 (ou Ii) dans le RE des cellules infectées et réduit la transcription du gène codant pour la protéine H2-DM (essentielle au chargement de l'antigène sur la molécule du CMH-II) par des mécanismes encore inconnus. Ces effets combinés entraînent une inhibition de la présentation d'antigènes parasitaires par le CMH-II (Figure 21) (Leroux *et al.* 2015). L'accumulation de CD74, qui est induite par des souches de types I et II, nécessite une invasion active des DCs par des parasites vivants (mais pas leur réplication) suggérant que ce processus est régulé par des effecteurs parasitaires sécrétés au sein de la cellule hôte (Leroux *et al.* 2015). Ce phénomène a été observé dans les cDC1s mais également dans les macrophages isolés des ganglions lymphatiques de

souris infectées (Lang *et al.* 2006; Lüder *et al.* 2003). D'autre part, l'infection à *T. gondii* est connue pour empêcher l'augmentation de la quantité de molécules CMH-II induites après stimulation par l'IFN- $\gamma$  et ceci dans les DCs et les macrophages. Ce phénomène est dû à la capacité du parasite à bloquer l'activité du facteur de transcription STAT1 par un remodelage de la chromatine au locus CIITA du transactivateur de classe II (S.-K. Kim *et al.* 2007; Lang *et al.* 2012). TgIST, qui réprime l'expression de gènes dépendants de STAT1, est donc un candidat potentiel à la répression de l'expression des molécules du CMH-II (Gay *et al.* 2016; Olias *et al.* 2016). En inhibant l'augmentation de la quantité de CMH-II à la surface des DCs infectées, le parasite altère l'activation des LTs CD4+ *in vivo* limitant ainsi le contrôle de l'infection (Figure 21 page précédente) (McKee *et al.* 2004). En effet, des souris déficientes en CD74 et H2-DM ne parviennent pas à contrôler l'infection par des souches de type II et présentent un nombre élevé de kystes cérébraux (Leroux *et al.* 2015). Ce résultat montre donc l'importance de la présentation antigénique par le CMH-II au cours de l'établissement de la toxoplasmose chronique. Par ailleurs, des DCs déficientes pour la protéine ATG5 montrent une diminution de l'activation des LTs CD4+ et de la production d'IFN- $\gamma$  après infection par une souche de type II suggérant que l'autophagie pourrait stimuler la délivrance d'antigènes présentés par la voie du CMH-II (H. K. Lee *et al.* 2010; Q. Liu *et al.* 2015).

### 3.2.3 Modulation des fonctions des DCs migratoires par *T. gondii*

Des expériences pionnières ont suggéré que les DCs et les monocytes participent au transport du parasite à partir du site primaire d'infection et sont utilisés comme "cheval de Troie" afin de stimuler la dissémination du parasite vers des organes distants (Courret *et al.* 2006). En effet, des BMDCs infectées par une souche de type I présentent une capacité accrue de dissémination dans la souris par rapport à des tachyzoïtes libres (Lambert *et al.* 2006). En revanche, la phagocytose de parasites HK ou l'incubation d'une fraction sécrétée du parasite n'améliore pas la migration des DCs *in vitro* suggérant ainsi une modulation de la signalisation de la cellule hôte par des effecteurs parasitaires sécrétés (Lambert *et al.* 2006, 2009). De plus, les DCs infectées par une souche de type II migrent sur des distances beaucoup plus longues que des DCs infectées par une souche de type I dans une matrice 3D, suggérant un mécanisme dépendant de la souche (Kanatani *et al.* 2015). De manière intéressante, l'infection de monocytes, NK, LBs et LTs n'induit pas ce phénotype d'hypermigration (Lambert *et al.* 2011). Ces résultats indiquent donc une modulation spécifique des DCs par le parasite via des mécanismes de régulation partiellement découverts (Bhandage *et al.* 2019). En effet, *in vitro*, il a été montré que l'infection des BMDCs par une souche de type I ou par une souche de type II induit la sécrétion de GABA (Gamma-AminoButyric Acid). L'activation des récepteurs au GABA<sub>A</sub> active la

migration chimiotactique (dépendant de CCR7) des BMDCs (Fuks *et al.* 2012; Kanatani *et al.* 2017). Le calcium joue également un rôle central dans l'activation de la migration puisque la transduction du signal suite à l'activation GABAergique est médiée par le canal calcique Cav1.3 dépendant du voltage de type L (Kanatani *et al.* 2017). Plus récemment, le laboratoire du docteur Barragan a identifié un axe de signalisation TIMP-1-CD63-ITGB1-FAK détourné par le parasite et participant à l'induction d'une migration rapide de type amiboïde des BMDCs infectées (Olafsson *et al.* 2018). Par ailleurs, l'induction de la migration chimiotactique des DCs infectées par des parasites de type II est précédée par des changements morphologiques. En effet, les cellules subissent un remodelage de leur cytosquelette d'actine accompagné de la dissolution des podosomes et d'une redistribution des intégrines CD18 et CD11c (Weidner *et al.* 2013). Ces premiers changements sont quant à eux indépendants de la signalisation GABAergique et de CCR7 (Kanatani *et al.* 2015). Néanmoins, les effecteurs parasitaires stimulant la capacité migratoire des DCs ne sont pas encore caractérisés. TgGRA5, sécrétée et insérée dans la MVP au cours de la réplication, a été identifiée comme un facteur stimulant la migration des DCs humaines *in vitro* (Persat *et al.* 2012). Dans cette étude, les auteurs ont identifié un peptide hydrophile dérivé de la région N-terminale de TgGRA5<sub>(I)</sub> qui, après internalisation par micropinocytose, déclenche l'expression de CCR7 et stimule la migration des DCs via une signalisation dépendante de JNK (Persat *et al.* 2012). En plus de TgGRA5, la protéine Tg14-3-3, située dans l'espace vacuolaire, induit une hypermotilité des DCs *in vitro* et une augmentation du chimiotactisme par un mécanisme encore inconnu pouvant impliquer la séquestration de la protéine 14-3-3 de la cellule hôte au niveau de la MVP (Weidner *et al.* 2016). Ainsi, il est probable qu'un effet synergique de plusieurs effecteurs parasitaires contribue à la modulation des voies de signalisation et aux réponses transcriptionnelles modulant la migration des DCs après infection par *T. gondii*.

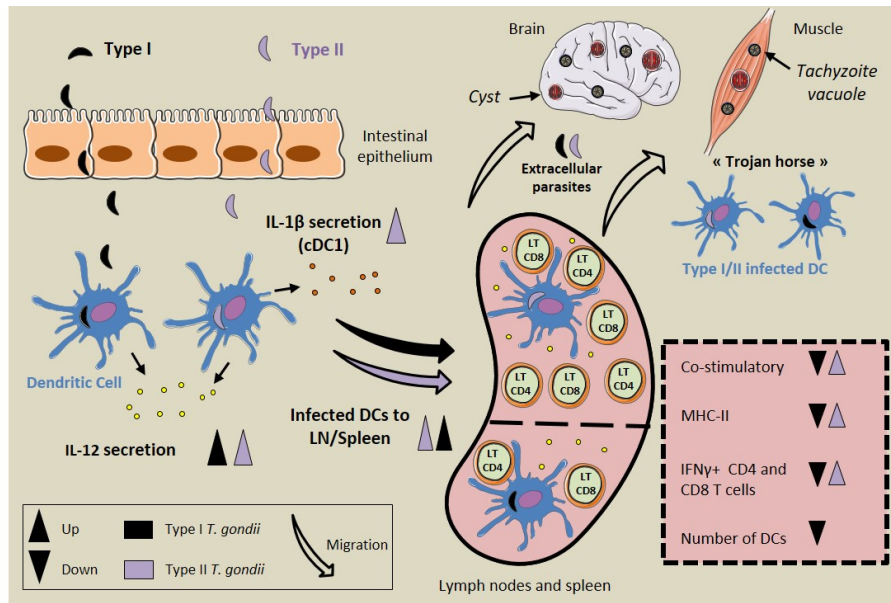


Figure 22 – Schéma résumant la modulation des fonctions des DCs dans les souris infectées par une souche de type I ou II (Poncet *et al.* 2019).

### 3.2.4 Réponses des DCs à l'infection et effecteurs parasitaires: Résumé

Ce schéma (Figure 23 page suivante) résume d'une part les voies de signalisation induites dans les DCs lors de l'infection (ou celles qui pourraient l'être) suite à différents mécanismes de détection des motifs microbiens ("innate sensing": détaillé dans la partie 2.1.3 page 30) lors de la phagocytose ou de l'invasion active de parasites de type I ou de type II. D'autre part, ce schéma illustre la modulation, démontrée ou probable, de certaines voies induites dans les DCs infectées par les effecteurs parasitaires sécrétés.

La modulation des voies de signalisation dans les DCs infectées sont distinctes selon la stimulation de la cellule. En effet, les DCs peuvent endocyter ou capter des débris/protéines parasitaires mais également phagocyter des parasites ou encore être envahies activement par des parasites de type I ou de type II. L'internalisation de débris parasitaire, de STAg, de protéines (TgPRF) ou d'exosomes contenant du matériel parasitaire active les TLR11 et TLR12 qui induisent la production d'IL-12 médiée par le facteur de transcription IRF8 de manière dépendante de la voie MyD88 (Figure A 23 page suivante) (Koblansky *et al.* 2013; Melo *et al.* 2010; Pifer *et al.* 2010; Plattner *et al.* 2008; Raetz *et al.* 2013; Yarovsky *et al.* 2005). La phagocytose de parasites vivants ou morts résulte en l'activation des TLR11 et TLR12 jouant un rôle majeur dans le déclenchement des réponses cytokiniques. Cependant d'autres TLRs endosomaux comme les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 peuvent aussi stimuler cette réponse après fusion avec le phagosome (Tosh *et al.* 2015). La destruction partielle de la membrane du phagosome pourrait permettre la libération d'ADN/ARN parasitaire



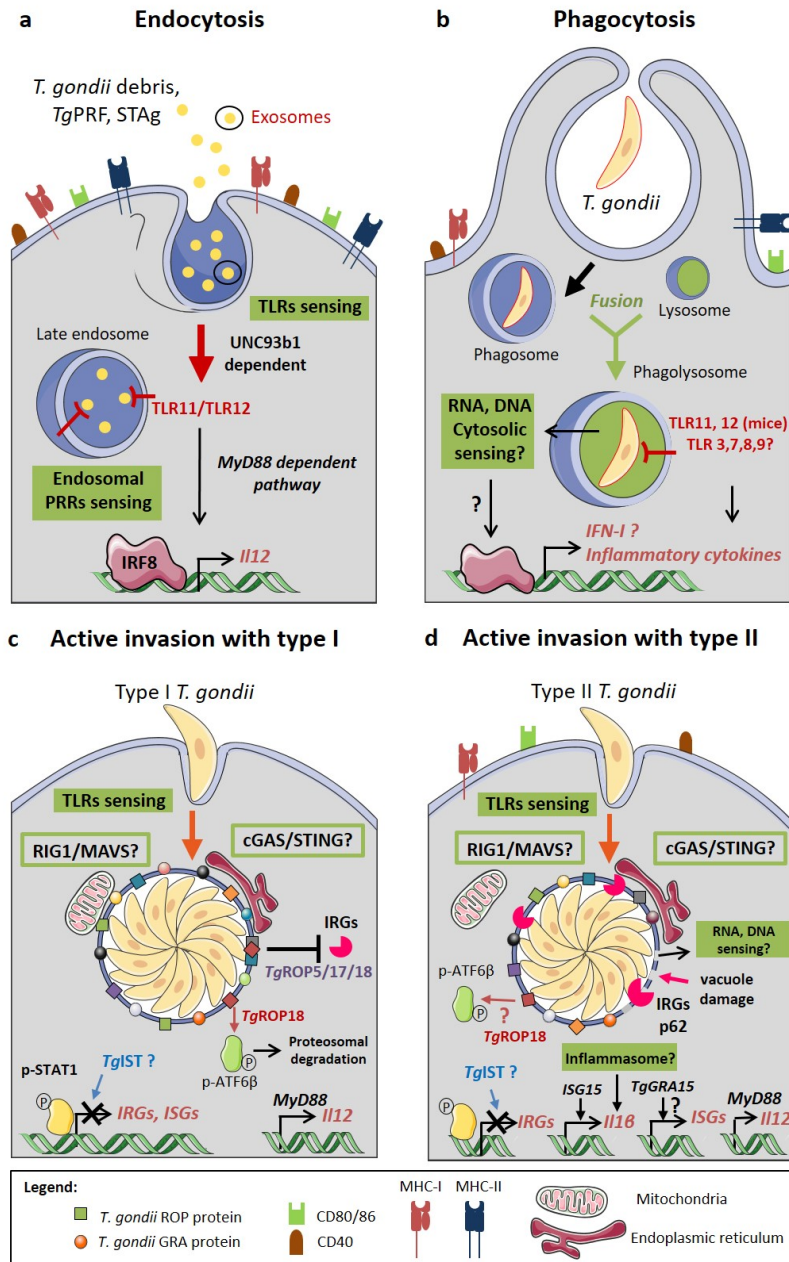


Figure 23 – Mécanismes de modulation des voies de signalisation dans les DCs infectées par *T. gondii* (Poncet *et al.* 2019).

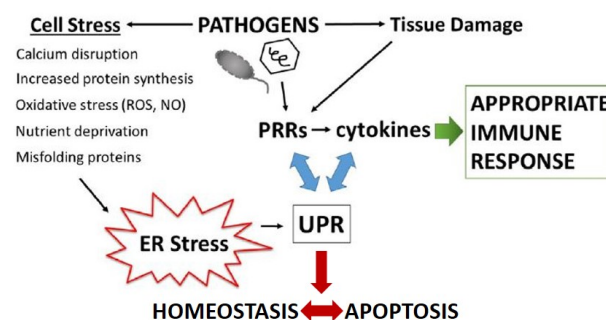
détekté par les PRRs cytosoliques induisant la production d'IFN-I (Pauwels *et al.* 2017) (Figure B 23). Les parasites de type I envahissent activement les DCs et sont reconnus par les TLRs de façon dépendante de la voie MyD88. Les capteurs RIG-I et STING localisés au niveau de la mitochondrie et du hRE respectivement pourraient également être activés suite au recrutement actif de ces organites à la VP (Figure C 23) (Schlee *et al.* 2016).

De plus, les effecteurs TgROP5<sub>(I)</sub>/TgROP17/TgROP18 bloquent l'association des IRGs à la VP empêchant ainsi sa lyse et la dégradation des parasites (Etheridge *et al.* 2014). TgROP18<sub>(I)</sub> induit aussi la phosphorylation et la dégradation d'ATF6 $\beta$  diminuant ainsi l'activation des LTs CD8+ (Figure C 23 page précédente) (M. Yamamoto *et al.* 2011). La reconnaissance des parasites de type II dépend également de la voie MyD88 activée par les TLRs. De plus, des mécanismes distincts propres aux parasites de type II peuvent être induits après destruction partielle de la VP. Après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , la destruction de la VP et l'échappement des antigènes parasitaires sont médiés par les protéines de l'autophagie et les IRGs recrutées à la MVP ce qui pourraient permettre l'activation de PRRs cytosoliques (Figure D 23 page ci-contre) (Y. Lee *et al.* 2015). L'expression de certains ISGs pourraient être également induite par TgGRA15<sub>(II)</sub> comme démontré dans des fibroblastes infectés (Rosowski *et al.* 2011). De plus, la protéine ISG15 (molécule pro-inflammatoire stimulée par les IFN-I) stimule le recrutement des cDC1s au site d'infection et induit la production d'IL-1 $\beta$  (Figure D 23 page précédente) (Napolitano *et al.* 2018). Cependant, une potentielle implication de l'inflammasome dans la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  n'a pas été étudiée dans les DCs. L'infection par une souche de type II induit aussi la phosphorylation de STAT1 et donc l'expression des IRGs/GBPs qui pourrait être réduite par l'effecteur parasitaire TgIST exprimé par les souches de type I et de type II (Figure D 23 page ci-contre) (Schneider *et al.* 2013).



## 4 Signalisation et rôles de la réponse UPR

Le RE est le lieu de la synthèse, du repliement et de l'assemblage des protéines. Elles y subissent un contrôle qualité qui permettra leur bon acheminement vers l'appareil de Golgi ou bien leur dégradation via le système ERAD pour les protéines non conformes (Sitia *et al.* 2003). Le repliement des protéines nécessite des protéines résidentes du RE appelées chaperons (BiP, GRP94) (Hetz *et al.* 2015; Wickner *et al.* 1999). Elles interagissent avec les protéines pour les protéger des erreurs de repliement et éviter leur accumulation dans le RE. Étant donné qu'une cellule traduit jusqu'à  $4.10^6$  protéines par minute, le contrôle de l'homéostasie du repliement des protéines (ou protéostase) est essentiel (Princiotta *et al.* 2003). Une perturbation de la protéostase a été observée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurologiques (Parkinson, Alzheimer), endocrinologiques (diabète de type II) ou bien inflammatoires (maladie de Crohn) induisant un stress du RE délétère (M. Wang *et al.* 2016). Les situations conduisant à un dysfonctionnement et un stress du RE peuvent être dues à l'accumulation de protéines mal repliées, une carence en nutriments ou bien l'infection par un pathogène, provoquant alors le déclenchement d'une réponse cytoprotectrice appelée réponse UPR (Figure 24) (Walter *et al.* 2011). Cette réponse, par l'activation de plusieurs voies de signalisation, a pour but de restaurer l'homéostasie du RE ou bien d'induire la mort cellulaire si le stress est prolongé (Figure 24). La réponse UPR est également impliquée dans la régulation des réponses immunitaires (Figure 24) (Grootjans *et al.* 2016; Ron *et al.* 2007; Smith 2018; M. Wang *et al.* 2016).



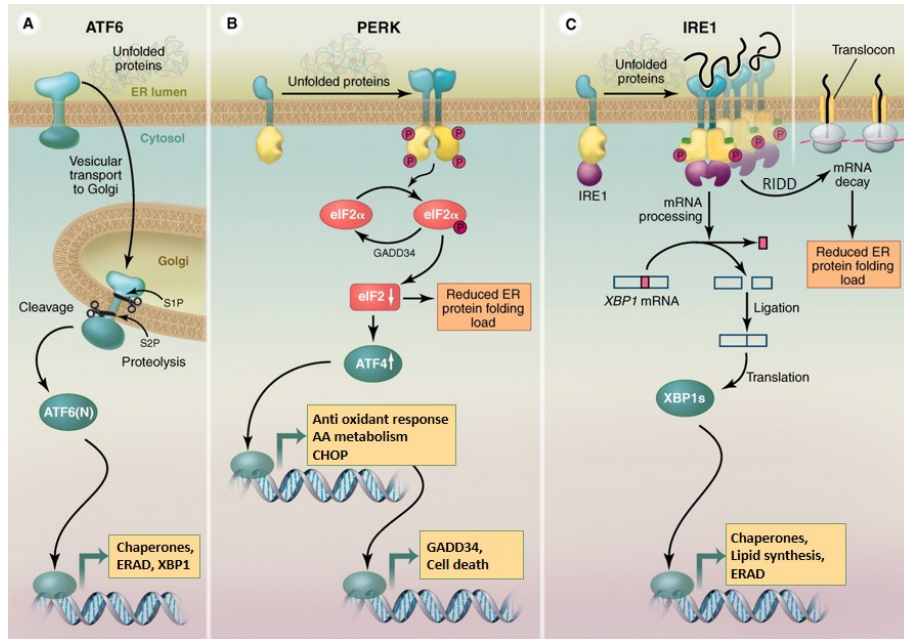
**Figure 24 – Schéma résumant l'activation et le rôle de la réponse UPR (adapté de (Smith 2018)).** La réponse UPR est activée suite à un stress du RE. Ce stress peut résulter de différents processus tels qu'une accumulation de protéines mal repliées, un stress oxydatif, une carence en nutriments, ... qui peuvent être induits pendant l'infection par un pathogène. La réponse UPR permet de restaurer l'homéostasie du RE mais si le stress est prolongé, elle peut induire l'apoptose de la cellule. L'UPR et les PRRs peuvent mutuellement s'activer et réguler la réponse cytokinique et ainsi moduler la réponse immunitaire.

## 4.1 Les trois voies de la réponse UPR

La réponse UPR restaure l'homéostasie du RE en induisant un programme transcriptionnel visant à diminuer la synthèse protéique globale pour empêcher l'accumulation d'autres protéines dans la lumière du RE, augmenter la synthèse des chaperons pour favoriser le repliement protéique, éliminer des protéines mal repliées (par l'induction du système ERAD) et déclencher l'apoptose que si le stress est trop intense ou de longue durée. La réponse UPR est caractérisée par l'activation de trois voies de signalisation induites en aval de trois détecteurs localisés dans la membrane du RE : ATF6 (Activating Transcription Factor 6), IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) et PERK (PKR-Like ER protein Kinase) (Figure 25 page suivante) (Smith 2018; Walter *et al.* 2011). L'activation de ces trois protéines nécessite leur dissociation du chaperon BiP (Binding Immunoglobulin Protein) qui les maintient dans un état inactif. La présence de protéines mal repliées va séquestrer les protéines BiP et ainsi activer les trois voies. L'activation d'IRE1 pourrait également être déclenchée par la présence de brins peptidiques mal repliés détectés par le domaine luminal de la protéine IRE1 (Gardner *et al.* 2013; A. Korennykh *et al.* 2012). De plus, des études ont montré que les protéines IRE1 et PERK (et non ATF6) détectent des changements dans la composition lipidique du RE (provenant de variations dans l'homéostasie lipidique cellulaire) (Kitai *et al.* 2013; Volmer *et al.* 2013). L'activation de la réponse UPR est donc déclenchée par plusieurs paramètres cellulaires qui ne se limitent pas à la détection de protéines mal repliées, comme nous allons le détailler dans les chapitres suivants.

### 4.1.1 La voie ATF6

À l'état basal, les protéines oligomériques ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  sont exprimées constitutivement sous forme de précurseurs transmembranaires dans le RE. Suite à un stress du RE, les protéines migrent du RE vers l'appareil de Golgi pour subir un double clivage par les protéases S1P (Site-1 Protease) et S2P (Site-2 Protease) libérant le domaine cytosolique d'ATF6 (extrémité N-terminale) correspondant à un facteur de transcription de la famille CREB (CAMP Response Element Binding)/ATF avec un domaine bZIP (basic leucine ZIPper) (Figure A 25 page suivante) (Bailey *et al.* 2007; Haze *et al.* 1999; Ye *et al.* 2000). Les facteurs de transcription p50ATF6 $\alpha$  et p60ATF6 $\beta$  sont transportés vers le noyau pour se fixer sur des séquences ERSE (ER Stress response Element) déclenchant la synthèse de gènes codant pour des protéines cibles telles que des chaperons (BiP, GRP94), des acteurs du système ERAD (HERPUD1) et le facteur de transcription XBP1s (Figure A 25 page suivante) (Haze *et al.* 1999; Shoulders *et al.* 2013; Wu *et al.* 2007; K. Yamamoto *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2001). Les souris déficientes en ATF6 $\alpha$  ou ATF6 $\beta$  se développent normalement. Cependant la double déficience montre une forte létalité embryonnaire suggérant



**Figure 25 – Les trois voies de la réponse UPR (adapté de (Walter *et al.* 2011)).** Les protéines mal repliées déclenchent l’activation des trois protéines transmembranaires résidentes du RE responsables de la réponse UPR en séquestrant le chaperon BiP. A/ L’activation d’ATF6 entraîne sa translocation vers l’appareil de Golgi pour être clivée par les protéases S1P et S2P libérant le domaine cytosolique dans le cytoplasme. Le facteur de transcription est alors transloqué dans le noyau pour cibler des gènes codant pour des chaperons, *Xbp1* et des acteurs du système ERAD. B/ Durant un stress du RE, la protéine PERK s’oligomérisse et s’autophosphoryle. PERK peut alors phosphoryler eIF2 $\alpha$  qui induit une diminution de la traduction protéique sauf pour certains ARNm comme *Atf4*. Ce facteur de transcription déclenche l’expression de gènes cibles codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, la réponse antioxydante, ... Il peut également restaurer la traduction protéique par activation de GADD34. Durant un stress fort ou continu, ATF4 induit la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP qui conduira à la mort cellulaire. C/ Durant un stress du RE, la protéine IRE1 s’oligomérisse et s’autophosphoryle. La protéine clive l’ARNm *Xbp1* pour générer un ARNm épissé codant pour le facteur de transcription XBP1s impliqué dans la synthèse lipidique, la production de chaperons et le système ERAD. IRE1 peut également activer un mécanisme appelé RIDD permettant la dégradation des ARNm au niveau du RE.

des fonctions essentielles dans des processus de développement cellulaire (K. Yamamoto *et al.* 2007). Seule la protéine ATF6 $\alpha$  serait responsable de l’induction transcriptionnelle des chaperons du RE et pourrait s’hétérodimériser avec XBP1s pour induire la production de composants du système ERAD (Shoulders *et al.* 2013; Therauf *et al.* 2004; K. Yamamoto *et al.* 2007). Ces études démontrent que la protéine ATF6 $\alpha$  agit comme un régulateur essentiel du contrôle de la protéostase en condition basale et lors d’un stress (Shoulders *et al.*

2013; K. Yamamoto *et al.* 2007). En revanche, le rôle de la protéine ATF6 $\beta$  a été peu étudié. Il a été montré qu'ATF6 $\beta$  posséderait un rôle de répresseur transcriptionnel en inhibant l'induction de la transcription des ERSE par ATF6 $\alpha$  en bloquant la liaison d'ATF6 $\alpha$  sur ses séquences cibles (Thuerauf *et al.* 2007, 2004). Ces résultats suggèrent donc qu'ATF6 $\beta$  régulerait l'intensité et la durée de l'activation des ERSE par ATF6 $\alpha$  durant un stress du RE.

#### 4.1.2 La voie PERK

La protéine PERK est une sérine/thréonine kinase transmembranaire du RE possédant un domaine luminal se liant à BiP et un domaine kinase du côté cytosolique (C. Y. Liu *et al.* 2000). À l'état basal, le domaine luminal forme un complexe stable avec le chaperon BiP. Au cours d'un stress du RE, la dissociation de BiP induit l'oligomérisation et l'autophosphorylation de la protéine PERK qui active alors la réponse au stress intégrée (ISR) (Figure B 25 page précédente) (Bertolotti *et al.* 2000; Wakabayashi *et al.* 2013). La protéine activée phosphoryle le résidu Ser51 de la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) empêchant la formation du complexe de pré-initiation de la traduction (composé des protéines eIF2, de GTP et de la méthionyl-ARNt synthétase) (Harding *et al.* 1999; Jackson *et al.* 2010; Scheuner *et al.* 2001). Hormis PERK, trois autres kinases, GCN2 (General Control Non-derepressible 2), HRI (Heme-Regulated Inhibitor kinase) et PKR (double-stranded RNA-activated Protein Kinase) peuvent phosphoryler eIF2 $\alpha$  suite à différents stress comme la privation en acides aminés/glucose/fer et les infections virales (Way *et al.* 2016). Le ralentissement de la traduction protéique permet de réduire l'afflux de protéines dans le RE (Harding *et al.* 2000b). Paradoxalement, la diminution de la synthèse protéique est accompagnée de la traduction sélective de certains ARNm possédant un cadre de lecture ouvert (uORFs, upstream Open Reading Frame) dans la région non traduite en 5' de l'ARNm (Harding *et al.* 2000a; Palam *et al.* 2011; Vattem *et al.* 2004). Parmi ces ARNm, celui codant le facteur de transcription ATF4 permet de réguler de nombreux aspects de l'ISR tels que la régulation du métabolisme des acides aminés, la réponse anti-oxydante, la traduction protéique et la mort cellulaire (Figure B 25 page ci-contre) (Walter *et al.* 2011). ATF4 est impliqué dans l'induction du facteur pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein) qui va permettre l'activation de voies impliquées dans l'apoptose et la production de ROS (Harding *et al.* 2000a; H. Hu *et al.* 2019; Palam *et al.* 2011). ATF4 et CHOP induisent également la production de la protéine GADD34 (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 34) une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase PP1 (Novoa *et al.* 2001). Le complexe PP1/GADD34 déphosphoryle eIF2 $\alpha$  pour réinitialiser la traduction protéique (Figure B 25 page précédente) (Han *et al.* 2013; Kojima *et al.* 2003; Novoa *et al.* 2001). Bien que la

restauration de la traduction soit cruciale pour la survie de la cellule, il est également essentiel d'éliminer l'agent responsable du stress du RE pour éviter les effets délétères à long terme que sont le stress oxydatif et la mort cellulaire (Han *et al.* 2013). En particulier, la phosphorylation de PERK permet de dissocier le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor) de la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) permettant à Nrf2 de migrer vers le noyau pour améliorer les réponses anti-oxydantes et induire la survie de la cellule (Cullinan *et al.* 2003).

### 4.1.3 La voie IRE1

IRE1 est une sérine/thréonine kinase transmembranaire du RE possédant un domaine luminal pouvant se lier à BiP (C. Y. Liu *et al.* 2000). Cette protéine possède deux activités enzymatiques distinctes puisqu'elle est à la fois une kinase et une endoribonucléase de par son domaine cytosolique (Sidrauski *et al.* 1997). Deux paralogues d'IRE1 ont été découverts : IRE1 $\alpha$  exprimée de manière ubiquitaire et IRE1 $\beta$  exprimée uniquement dans l'épithélium pulmonaire et intestinal (Bertolotti *et al.* 2001). En absence de stress, la protéine BiP interagit avec le domaine N-terminal de IRE1 pour la maintenir sous forme de monomère inactif (Bertolotti *et al.* 2000). Pendant un stress du RE, la protéine IRE1 libérée de BiP se dimérise et s'autophosphoryle permettant ainsi l'activation de son domaine endoribonucléasique (Figure C 25 page 62)(Aragón *et al.* 2008; A. V. Korennykh *et al.* 2008). L'endoribonucléase reconnaît et clive les ARNm *Xbp1* (X-box binding protein 1) (Calfon *et al.* 2002). Les brins d'ARNm coupés sont assemblés par la ligase tRNA RrtB éliminant ainsi un intron de 26 paires de bases (Kosmaczewski *et al.* 2014; Lu *et al.* 2014). L'épissage non conventionnel induit par IRE1 conduit à un changement du cadre de lecture produisant une nouvelle extrémité C-terminale et la traduction d'un facteur de transcription CREB/ATF contenant un domaine bZIP appelé XBP1s (s pour spliced) (Figure C 25 page 62)(Yoshida *et al.* 2001). La protéine XBP1s se fixe sur des séquences ERSE et UPRE (Unfolded Protein Response Element) pour activer l'expression des gènes codant pour des chaperons (BiP, GRP94) et des protéines impliquées dans la voie ERAD (EDEEM, Derlin) (Figure C 25 page 62) (A.-H. Lee *et al.* 2003; Oda *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2003, 2001, 2006). XBP1s induit également l'expression de gènes codant des enzymes régulant la synthèse de phospholipides et d'acides gras permettant notamment l'expansion du RE mais également la modulation de manière plus générale de l'homéostasie lipidique de la cellule (Figure C 25 page 62) (Sriburi *et al.* 2007, 2004). De manière intéressante, la protéine XBP1 produite à partir de l'ARNm non épissé inhibe la réponse dépendante d'XBP1s en se fixant sur le facteur de transcription (Yoshida *et al.* 2006).

L'activité endoribonucléasique de la protéine IRE1 induit également l'activité RIDD (Regulated IRE1 Dependent Decay) qui entraîne la dégradation des ARNm (par exemple

*Bloc1s1*) et atténue ainsi la traduction protéique (Figure C 25 page 62) (Hollien *et al.* 2009). Les fonctions d'IRE1 sont importantes pour la différenciation cellulaire, les réponses immunitaires et l'homéostasie (cf partie 4.2 et 4.4 page 71). Cependant XBP1s favoriserait la survie alors que l'activité RIDD conduirait à la mort cellulaire révélant une modulation complexe des activités de IRE1 (Coelho *et al.* 2014; Maurel *et al.* 2014; Tam *et al.* 2014).

## 4.2 Liens fonctionnels entre l'UPR et l'immunité

La réponse UPR possède un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire en particulier pour les cellules présentant une forte activité de sécrétion mais aussi suite à un stress infectieux (Galluzzi *et al.* 2017; Grootjans *et al.* 2016; Reverendo *et al.* 2018; Smith 2018).

L'adaptation du RE à son environnement est cruciale pour les cellules à forte capacité sécrétrice comme les cellules  $\beta$  du pancréas ou bien les LBs. La voie IRE1 et le facteur de transcription XBP1s ont été montrés comme indispensables à la maturation de plusieurs types cellulaires. En effet, XBP1s permet la maturation des cellules B en plasmocytes et la sécrétion de l'IL-6 (Iwakoshi *et al.* 2003; Reimold *et al.* 2001). De plus, les plasmocytes déficients en XBP1 montre une forte activité RIDD qui induit le clivage des ARNm de la chaîne lourde  $\mu$  des IgM conduisant à un défaut de sécrétion des anticorps (Benhamron *et al.* 2013). En parallèle, la protéine IRE1 $\alpha$  joue un rôle clé dans la lymphopoïèse à partir du stade pro-LBs (K. Zhang *et al.* 2005). De la même manière, l'activation d'XBP1s permet la maturation des éosinophiles (Bettigole *et al.* 2015). L'activité des cellules de Paneth et de Goblet dépendent également d'XBP1s puisque l'absence de cette protéine induit une entérite spontanée associée à une forte activation de la voie NF $\kappa$ B et une susceptibilité accrue à la colite provoquée par des inducteurs de maladies inflammatoires de l'intestin (Adolph *et al.* 2013; Kaser *et al.* 2008).

### 4.2.1 Induction de l'UPR par les PRRs et réponse cytokinique

Durant ces dix dernières années, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence un lien fonctionnel intime entre l'UPR et l'inflammation. Par exemple, les réponses induites après stimulation des PRRs, en particulier la sécrétion des cytokines associées, peuvent être modulées par la réponse UPR. Cette dernière peut également induire l'activation des PRRs aboutissant dans les deux cas à un effet synergique, en particulier lors d'un stress infectieux (cf partie 4.3 page 68).

Dans les macrophages, la stimulation des TLR2 et TLR4 par des agonistes induit l'activation d'IRE1 $\alpha$  via la molécule adaptatrice MyD88 ou TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon  $\beta$ ) et le recrutement de TRAF6. Le facteur de transcription XBP1s induit par IRE1 $\alpha$  peut alors se fixer aux promoteurs des gènes codant pour



l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$  sans favoriser pour autant la transcription de ses gènes cibles "classiques" (chaperons, protéines du système ERAD) (Figure 26 page ci-contre) (Martinson *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2010). TRAF6 joue un rôle clé en catalysant l'ubiquitylation de p-IRE1 $\alpha$  pour empêcher sa déphosphorylation par PP2A dans les fibroblastes stimulés avec du LPS (Qiu *et al.* 2013). Cependant, dans les macrophages traités avec la tunicamycin (TN; inhibiteur de la N-glycosylation induisant la réponse UPR) en présence de LPS, IRE1 $\alpha$  active la kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) qui induit la production d'IL-1 $\beta$  (Figure 26 page suivante) (S. Kim *et al.* 2015). Simultanément, GSK3 $\beta$  inhibe l'épissage d'*Xbp1* ce qui entraîne une réduction de l'expression du TNF- $\alpha$  (Figure 26 page ci-contre) (S. Kim *et al.* 2015). Ainsi la réponse cytokinique ne sera pas la même si la cellule immunitaire stimulée est en état de stress. En relation avec ces résultats, la stimulation des TLR3 ou TLR4 (par leur ligand poly(I:C) et LPS, respectivement) dans les macrophages induit la déphosphorylation d'eIF2B par la molécule adaptatrice TRIF empêchant l'activation d'ATF4 et de CHOP et permet la synthèse ininterrompue de protéines dans la cellule tout en favorisant la synthèse de GADD34 qui augmente alors la production de l'IFN- $\beta$  et de l'IL-6 (Figure 26 page suivante) (Clavarino *et al.* 2012b; Woo *et al.* 2009, 2012). L'expression de GADD34 est sous la dépendance du facteur de transcription IRF3 qui est induit après stimulation par du poly(I:C) (Figure 26 page ci-contre) (Dalet *et al.* 2017). Ceci pourrait donc expliquer l'activation de GADD34 indépendamment d'ATF4. Par ailleurs, les voies PERK et ATF6 ne sont pas activées suite à la stimulation des TLR2 et TLR4 dans les macrophages.

À l'inverse des exemples cités précédemment, la réponse UPR peut induire la stimulation des PRRs et des réponses en aval. Par exemple, dans les macrophages stimulés par la thapsigargine (TG; inhibiteur de l'ATPase calcique SERCA induisant chimiquement la réponse UPR), IRE1 $\alpha$  forme un complexe avec TRAF2 résultant de l'activation des PRRs NOD1/2 et induit la production de l'IL-6 (Keestra-Gounder *et al.* 2016). Ce complexe peut également recruter la kinase ASK1 induisant alors la phosphorylation de JNK, ce qui entraîne une expression accrue de gènes pro-inflammatoires par l'intermédiaire du facteur de transcription AP-1 (Urano *et al.* 2000). Ce phénomène a été observé dans les cellules épithéliales intestinales déficientes en XBP1 où l'hyperactivation d'IRE1 $\alpha$  entraîne une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kaser *et al.* 2008). IRE1 $\alpha$  peut également activer l'inflammasome NLRP3 via la protéine TXNIP (ThioredoXiN-Interacting Protein) conduisant à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et la mort des cellules par pyroptose lors de l'induction d'un stress chimique par la TN ou la TG (Figure 26 page suivante) (Lerner *et al.* 2012; Menu *et al.* 2012). En accord avec ces résultats, l'inhibition de la voie IRE1 $\alpha$ /TXNIP activée par le mauvais repliement de la pro-insuline réduit la mortalité des cellules  $\beta$  pancréatiques et limite le diabète chez la souris (Lerner *et al.* 2012).

### 4.2.2 Induction de réponses inflammatoires par l'UPR indépendamment des PRRs

Dans l'encéphalomyélite auto-immune, la protéine PERK activée interagit avec la protéine JAK1 qui phosphoryle STAT3 qui induit la transcription des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6 (Figure 26) (Meares *et al.* 2014). L'activation de la voie PERK dans les fibroblastes traitées avec des stimulateurs chimiques induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  qui provoque l'augmentation du rapport protéique NF $\kappa$ B sur I $\kappa$ B et favorise la transcription des gènes dépendant de la voie NF $\kappa$ B (Deng *et al.* 2004; Tam *et al.* 2012). La voie NF $\kappa$ B est également activée suite à l'interaction d'IRE1 $\alpha$  avec TRAF2 dans les lignées tumorales traitées avec de la TN ou de la TG (P. Hu *et al.* 2006).

D'autre part, le stress du RE ne serait pas uniquement impliqué dans la régulation des réponses cytokiniques mais semblerait également lié à l'autophagie puisqu'il a été démontré que l'activation de la voie PERK induit l'expression de molécules impliquées dans l'autophagie dont la protéine ATG12 (Kouroku *et al.* 2006). De plus, les kinases JNK et GSK3 $\beta$  activées en aval d'IRE1 $\alpha$  inhibent respectivement mTORC1 et mTORC2, faisant d'IRE1 $\alpha$  un inhibiteur de la voie mTOR durant un stress du RE (Appenzeller-Herzog *et al.* 2012). En parallèle, la voie PERK peut être inhibée par la voie Akt. Cependant, lors d'un stress prolongé, CHOP bloque l'action d'Akt pour induire la voie mTORC1 qui induira une augmentation de la synthèse protéique renforçant la réponse UPR (Appenzeller-Herzog *et al.* 2012). La protéine ATF6, quant à elle, active Akt (pour inhiber mTORC1) qui peut alors inhiber TRAF2 pour éviter l'activation de la voie IRE1/ASK1/JNK (Appenzeller-Herzog *et al.* 2012).

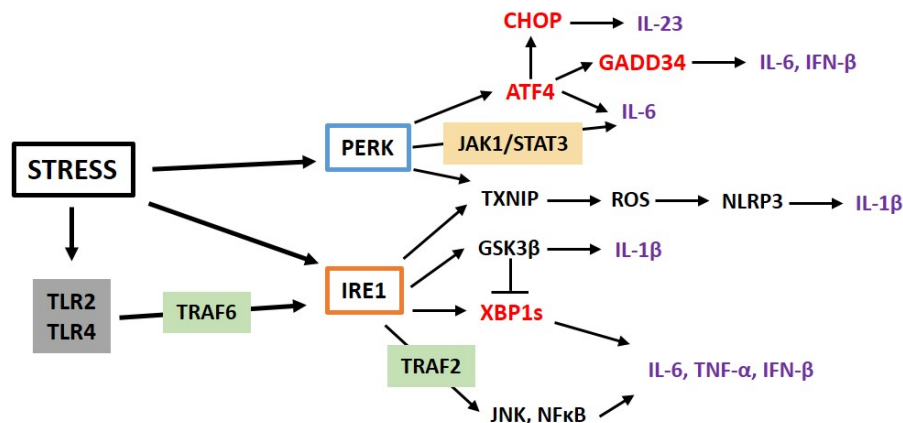


Figure 26 – Schéma résumant le rôle de la réponse UPR dans la réponse cytokinique.



### 4.3 Induction de l'UPR lors d'une infection

Les pathogènes peuvent interférer avec les fonctions du RE de l'hôte durant leur cycle infectieux et peuvent donc activer la réponse UPR. Cette activation peut être bénéfique pour l'hôte en activant des réponses immunitaires contre le pathogène mais peut également avoir l'effet inverse de par leur capacité à subvertir la machinerie et les défenses cellulaires afin de promouvoir leur survie et leur dissémination (Celli *et al.* 2014; Galluzzi *et al.* 2017; Smith 2018).

#### 4.3.1 Infections bactériennes

Les bactéries intracellulaires modulent les fonctions de l'hôte de par leur sécrétion importante d'effecteurs bactériens aussi appelés facteurs de virulence. De manière intéressante, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des facteurs de virulence dans la modulation de la réponse UPR. Par exemple, des facteurs sécrétés par *Pseudomonas aeruginosa* induisent fortement l'activation de la réponse UPR (XBP1s, BiP, CHOP, GADD34) dans les cellules épithéliales bronchiques (Richardson *et al.* 2010; Wout *et al.* 2015). L'infection par cette bactérie ou l'incubation avec des toxines formant des pores (PFT) induit l'activation de la protéine p38 MAPK qui déclenchent la voie IRE1/XBP1s protégeant l'hôte d'une létalité accrue (Bischof *et al.* 2008; Richardson *et al.* 2010). Dans le cas d'une infection par *Listeria monocytogenes*, la listériolysine O active les trois voies de l'UPR favorisant dans un premier temps l'infection jusqu'à ce que le stress soit trop fort et induise dans un second temps l'apoptose des cellules infectées (Pillich *et al.* 2012). La cytotoxine subtilase AB produite par des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines clive spécifiquement la protéine BiP activant ainsi les trois voies de la réponse UPR. Cette activation stimule la voie NF $\kappa$ B via ATF6 et aboutit à long terme à la mort cellulaire (Morinaga *et al.* 2008; Nakajima *et al.* 2011; Paton *et al.* 2006; Wolfson *et al.* 2008; Yamazaki *et al.* 2009). De façon similaire, l'effecteur VceC sécrété par *Brucella abortus* se fixe sur BiP et active la réponse UPR provoquant la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dans les macrophages (Jong *et al.* 2013). Il a été également montré que la protéine TcpB induit les trois voies de la réponse UPR mais que seule la voie IRE1 a un rôle bénéfique pour la survie de *Brucella melitensis* (Qin *et al.* 2008; Smith *et al.* 2013). Lors d'une l'infection par *Helicobacter pylori*, l'activation de la voie PERK par la cytotoxine VacA a été corrélée à une forte apoptose et à la carcinogénèse gastrique (Akazawa *et al.* 2013; Baird *et al.* 2012).

D'autres études ont mis en évidence l'effet de la réponse UPR dans la qualité de la réponse immunitaire. Par exemple, une infection par *Francisella tularensis* induit l'épissage d'*Xbp1*, en aval de la stimulation du TLR2, conduisant à la production de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dans les macrophages (sans activer les voies PERK et ATF6). De plus, une plus forte

multiplication bactérienne dans les organes des souris déficientes en XBP1 a été observée démontrant ainsi le rôle essentiel d'XBP1s dans le contrôle de l'infection (Martinon *et al.* 2010). Par ailleurs, une charge bactérienne plus importante a été observée dans le foie de souris déficientes en XBP1 infectées par *L. monocytogenes* ainsi qu'une entérite provoquée par la phosphorylation de JNK induite par l'hyperactivation d'IRE1 (Kaser *et al.* 2008). L'infection de macrophages et de DCs par *Chlamydia trachomatis* stimule le TLR4 pour activer la voie IRE1/XBP1s ce qui induit l'activation de PKR permettant la sécrétion d'IFN- $\beta$  (Webster *et al.* 2016). Cette bactérie induit également l'expression de CHOP qui contribue à la production d'IL-23 par les DCs (Goodall *et al.* 2010). Pour finir, *Simkania negevensis* induit le stress du RE durant le début du cycle infectieux lorsque la vacuole bactérienne entre en contact avec le hRE des cellules HeLa. La bactérie régule ensuite négativement la réponse UPR pour améliorer sa prolifération (Mehlitz *et al.* 2014).

En résumé, l'induction de la voie IRE1 semble promouvoir la survie de la cellule infectée et, de ce fait, a un effet bénéfique sur l'hôte. La voie PERK est induite de manière transitoire ou plus tardive et conduit le plus souvent à la mort cellulaire qui peut faciliter la dissémination bactérienne ou induire une forte inflammation. Cependant, il est impossible de proposer un mécanisme unique d'action et la réponse UPR semble être modulée de manière spécifique selon la bactérie considérée, son tropisme tissulaire et son mode de dissémination.

### 4.3.2 Infections virales

En raison de la production d'une multitude de virions par la machinerie cellulaire de l'hôte, de nombreuses protéines virales peuvent conduire à une accumulation de protéines non repliées dans le RE qui va induire l'UPR. Les virus ont donc développé des mécanismes pour limiter les conséquences néfastes de l'activation de l'UPR (S. Li *et al.* 2013; Mehrbod *et al.* 2019). En particulier, l'activation des voies ATF6 et IRE1 favorise la répllication virale en augmentant la production de chaperons, l'expansion du RE et l'inhibition simultanée de la voie PERK qui permet d'éviter un blocage traductionnel et/ou l'apoptose de la cellule hôte. Plusieurs virus utilisent ce processus comme le virus du chikungunya qui active spécifiquement les voies ATF6 et IRE1 et réprime la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par la protéine NSP4 (NonStructural Protein 4) (Rathore *et al.* 2013). Le virus de la grippe A active la voie IRE1 et promeut l'épissage d'*Xbp1* avec peu ou pas d'induction des voies PERK et ATF6 (I. Hassan *et al.* 2011). L'infection par le virus de la dengue DEN2 déclenche les trois voies de la réponse UPR mais à différents moments du stade infectieux. Cette modulation dans l'induction des différentes voies permet d'éviter l'inhibition de la traduction, de prévenir l'apoptose et de prolonger le cycle viral notamment grâce à l'interaction de la protéine d'enveloppe DENV E avec la protéine BiP (Limjindaporn *et al.*

2009; Pena *et al.* 2011). Au début de l'infection, la voie PERK est brièvement activée alors que les voies IRE1 et ATF6 sont activées pour l'adaptation au stress. Cependant, des virus du même groupe peuvent moduler différemment la réponse UPR suggérant que l'induction des voies de l'UPR serait dépendante du sérotype viral (Umareddy *et al.* 2007). Dans le cas de l'infection avec le virus respiratoire syncytial, les voies ATF6 et IRE1 sont activées et IRE1 $\alpha$  a un effet inhibiteur sur la réplication virale par l'activité RIDD (I. Hassan *et al.* 2014). Une nouvelle stratégie virale a également été montrée avec la protéine M50 du cytomégalovirus qui se fixe à la protéine IRE1 $\alpha$  pour induire sa dégradation, ce qui pourrait bloquer l'effet délétère de RIDD sur la réplication virale (Stahl *et al.* 2013). Concernant l'infection par le virus de l'herpes simplex de type I, seule la voie ATF6 est activée. En effet, ce virus bloque l'activation de la voie PERK en associant la glycoprotéine virale gB au domaine luminal de PERK alors que la protéine UL41 supprime l'induction de l'épissage de *Xbp1*, ce qui pourrait limiter l'induction de la machinerie de dégradation ERAD (Mulvey *et al.* 2007; P. Zhang *et al.* 2016). Cependant, à la fin du cycle, la voie PERK est activée et initie l'apoptose pour faciliter la libération des particules virales de la cellule hôte (Burnett *et al.* 2012). De façon étonnante, le virus de l'encéphalite japonaise, quant à lui, utilise l'activité RIDD pour dégrader les ARNs de l'hôte sans affecter ses propres ARNs entraînant un effet bénéfique de cette activité dans les cellules neuronales infectées (Bhattacharyya *et al.* 2013). Pour finir, la réponse UPR a également été étudiée sur certains prélèvements de tissus humains infectés par le VIH ou le virus de l'hépatite C. L'activation des protéines XBP1s et CHOP a été détectée dans des biopsies duodénales de patients atteints du VIH et pourrait potentiellement contribuer aux perturbations intestinales constatées (Maingat *et al.* 2011). De même, *in vitro* et *in vivo*, le virus de l'hépatite C induit l'activation des trois voies de l'UPR selon une cinétique spécifique assurant une réplication virale efficace (Asselah *et al.* 2010; Merquiol *et al.* 2011; Tardif *et al.* 2004).

L'induction de la réponse UPR peut également avoir un rôle crucial dans l'induction de l'immunité anti-virale. En effet, dans des fibroblastes infectés par le virus du Chikungunya ou le VSV (Virus de la Stomatite Vésiculaire), l'activation de GADD34 induit la production d'IL-6 et d'IFN- $\beta$  (Clavarino *et al.* 2012b; Dalet *et al.* 2017). Des fibroblastes ou souris déficientes en GADD34 sont particulièrement sensibles à l'infection montrant un pouvoir anti-viral de GADD34 (Clavarino *et al.* 2012b). De plus, la surexpression d'XBP1s permet d'augmenter fortement la production d'IFN- $\beta$  dans les DCs infectées par le virus de la stomatite vésiculaire limitant ainsi l'infection virale (F. Hu *et al.* 2011).

Pour conclure, les exemples présentés montrent que les virus ont adopté des stratégies différentes de modulation de la réponse UPR leur permettant dans la plupart des cas de détourner cette réponse protectrice afin d'assurer leur réplication et dissémination.

### 4.3.3 Infections parasitaires

Le rôle et la modulation de la réponse UPR ont été particulièrement caractérisés lors d'infections bactériennes et virales mais peu d'études ont rapporté l'induction de l'UPR lors d'infections parasitaires.

Une étude menée sur *Plasmodium berghei* a montré une induction des trois voies de la réponse UPR dans les hépatocytes *in vitro*. *In vivo*, l'infection de souris déficientes en XBP1 est corrélée à une diminution de la quantité de parasites dans le foie suggérant un effet bénéfique de cette voie pour le développement intra-hépatique du parasite (Inacio *et al.* 2015). Dans un modèle de neuropaludisme, les trois voies de l'UPR sont également activées dans le cerveau de souris infectées et l'augmentation de l'expression du gène codant pour CHOP est corrélée à la mort cellulaire neuronale (Anand *et al.* 2013). L'infection à *T. gondii* induit également l'apoptose des cellules souches neurales murines suite à l'activation de CHOP, JNK et de la caspase-12 (Wan *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2015). L'effecteur sécrété TgROP18 contribuerait à ce processus (Wan *et al.* 2015). TgROP18 cible aussi ATF6 $\beta$  en le phosphorylant induisant ainsi sa dégradation par le protéasome. Des souris déficientes en ATF6 $\beta$  présentent une forte sensibilité à l'infection liée à une diminution de la mise en place de la réponse Th1, indiquant son rôle clé dans la résistance à l'infection (cf partie 3.2.2.1 page 53) (M. Yamamoto *et al.* 2011). TgGRA15 $\Pi$  est également un facteur parasitaire qui, s'il est exprimé de manière transitoire dans des cellules choriocarcinomes, active certains acteurs de la réponse UPR tels que BiP, XBP1s (voie TRAF2/Ask1/JNK) et CHOP aboutissant à l'apoptose des cellules (Wei *et al.* 2018). Dans le cas de l'infection à *Cryptosporidium parvum*, le parasite induit l'augmentation de plusieurs marqueurs de l'UPR tels que p-eIF2 $\alpha$ , CHOP et BiP ce qui permettrait d'augmenter l'expression du gène codant pour l'enzyme ornithine décarboxylase nécessaire au développement du parasite (Morada *et al.* 2013). Dans les macrophages infectés par *Leishmania amazonensis*, la voie IRE1 $\alpha$  est activée via le TLR2 et induit l'activation d'XBP1s, la sécrétion d'IFN- $\beta$  et la diminution des ROS aboutissant à un effet bénéfique pour la survie du parasite (Dias-Teixeira *et al.* 2016). De même, l'infection avec la souche *L. infantum* induit une légère activation des marqueurs de l'UPR (BiP, CHOP, ATF4, XBP1s) suggérant que le parasite favoriserait sa survie par l'activation d'une faible réponse UPR (Galluzzi *et al.* 2016).

## 4.4 L'impact de la réponse UPR dans l'activité des DCs

La réponse UPR possède de nombreux rôles dans la modulation des activités spécifiques des DCs.

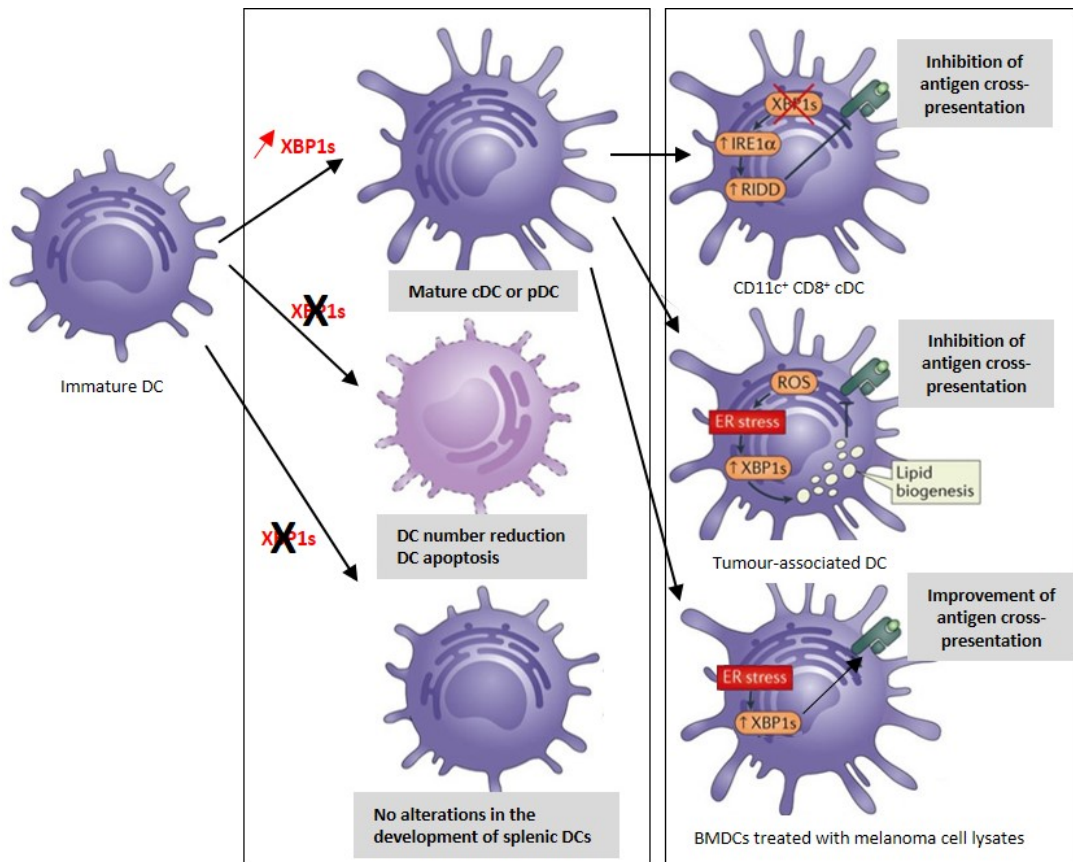
#### 4.4.1 Développement et survie

*In vivo*, dans des DCs non stimulées, l'ARNm *Xbp1* est épissé de manière constitutive pour permettre le développement et la survie des cellules (Iwakoshi *et al.* 2007). En effet, dans les souris déficientes en XBP1, une diminution du nombre de cDCs et pDCs a été observée dans la rate corrélée avec des taux d'apoptose plus élevés (Figure 27 page ci-contre). De plus, les DCs sauvages résistent mieux à l'activation des TLR4 et TLR9 après stimulation par leurs ligands que les souris déficientes en XBP1. De façon intéressante, l'expression ectopique d'XBP1 dans les cellules progénitrices hématopoïétique FLT3+ déficientes en XBP1 peut limiter le phénotype apoptotique des DCs (Iwakoshi *et al.* 2007). Une deuxième étude contradictoire menée par nos collaborateurs a démontré que l'activation constitutive à l'état basal de la voie IRE1 $\alpha$  dans les DCs de la rate est restreinte à la sous-population des cDC1s (Osorio *et al.* 2014). De plus, les souris déficientes pour les protéines IRE1 $\alpha$  ou XBP1 ne montrent pas d'altérations dans le développement des DCs spléniques (Figure 27 page suivante) (Osorio *et al.* 2014). Cependant, l'activité endoribonucléasique d'IRE1 contribue à la survie des cDC1s intestinales et pulmonaires de façon dépendante d'ATF4 et d'XBP1s (Tavernier *et al.* 2017). En effet, la délétion d'XBP1 entraîne l'apoptose des cDC1s pulmonaires (sans activer CHOP ou JNK) alors que dans les cDC1s intestinales, l'apoptose est dépendante de l'activité RIDD et d'une régulation négative de la synthèse protéique par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Tavernier *et al.* 2017). Ces études montrent donc que la voie IRE1 est cruciale pour le contrôle du développement des cDC1s selon le contexte tissulaire (Osorio *et al.* 2014; Tavernier *et al.* 2017).

#### 4.4.2 Présentation antigénique

Le travail de nos collaborateurs a montré que les cDC1s déficientes pour XBP1 présentent une hyperactivation de la protéine IRE1 $\alpha$  qui induit un défaut de présentation antigénique croisée d'antigènes du soi (provenant de cellules apoptotiques) (Osorio *et al.* 2014). Ce défaut est dû à la dégradation des ARNm d'acteurs clés de la machinerie de présentation antigénique par le CMH-I (comme la tapasine) de façon dépendante de l'activité RIDD (Figure 27 page ci-contre) (Osorio *et al.* 2014). Ce processus n'est pas observé dans les cellules déficientes pour IRE1 $\alpha$ , confirmant ainsi le rôle de l'activité RIDD dans ce processus (Osorio *et al.* 2014). Au contraire de IRE1 $\alpha$ , la protéine XBP1s a été montrée comme pouvant promouvoir l'activité de présentation antigénique par le CMH-I en activant l'expression de protéines impliquées dans le processus de présentation antigénique (par exemples Sec, calnexine, calréticuline) (Osorio *et al.* 2018; Shoulders *et al.* 2013).

La capacité de présentation antigénique des DCs a été étudiée dans différents contextes pour tenter de comprendre l'impact de la réponse UPR sur cette fonction, en particu-



**Figure 27 – Représentation du rôle d’XBP1s dans la différenciation et la fonction des DCs (adapté de (Grootjans *et al.* 2016)).** Plusieurs études proposent différents rôles d’XBP1s dans les DCs. XBP1s aurait un rôle essentiel pour la différenciation des progéniteurs immatures en cDCs et pDCs. En l’absence d’XBP1, la maturation et la survie des DCs diminue alors qu’il a également été montré qu’il n’y avait pas d’altération du développement des DCs spléniques (encadré du milieu). De plus, cette délétion entraîne l’hyperactivation de la protéine IRE1 $\alpha$  conduisant à la dégradation de composants de la machinerie de présentation antigénique croisée (activité RIDD) dans les cDCs matures (en haut à droite). En revanche, dans les tumeurs ovariennes, l’induction de XBP1s résultant de la production de ROS induits par des facteurs tumoraux entraîne une forte synthèse de lipides dont l’accumulation aurait un effet néfaste sur l’activité de présentation antigénique croisée d’antigènes tumoraux par les DCs (au milieu à droite). Au contraire, XBP1s permet d’améliorer la présentation d’antigènes tumoraux par le CMH-I (mais pas le CMH-II) dans les BMDCs traités avec le lysat de cellules de mélanomes (en bas à droite).

lier dans le contexte tumoral. L’injection de DCs transgéniques surexprimant XBP1s et un antigène tumoral aboutit à l’amélioration de la réponse T CD8 spécifique lors de la vaccination par des antigènes tumoraux (Tian *et al.* 2012). Au contraire, au sein de tumeurs ovariennes, il a été montré que des facteurs tumoraux déclenchent la production

de ROS ce qui entraîne un stress du RE et l'activation d'XBP1s (Cubillos-Ruiz *et al.* 2015). L'induction de XBP1s entraîne une forte synthèse de gouttelettes lipidiques qui inhibent la présentation antigénique croisée par le CMH-I d'antigènes tumoraux par les DCs (Figure 27 page précédente) (Cubillos-Ruiz *et al.* 2015). Le dysfonctionnement de la présentation antigénique suite à l'accumulation des lipides avait déjà été décrit dans une autre étude (Herber *et al.* 2010). Conformément à ces résultats, la délétion de XBP1 dans les DCs supprime l'accumulation des lipides et augmente l'immunité anti-tumorale médiée par les LTs, entraînant une diminution de la charge tumorale (Cubillos-Ruiz *et al.* 2015). Une seconde étude menée sur des BMDCs a montré que l'internalisation d'extraits solubles tumoraux conduit à l'induction de la voie IRE1 $\alpha$  et l'activation d'XBP1s sans stimuler l'activité RIDD (Medel *et al.* 2019). L'activation de cette voie facilite la présentation antigénique croisée des antigènes tumoraux sans affecter la présentation antigénique par le CMH-II (Figure 27 page précédente) (Medel *et al.* 2019). Dans ce cas, la stimulation de la voie IRE1 $\alpha$  dans les BMDCs améliore la réponse T CD8 dirigée contre des antigènes solubles tumoraux (Medel *et al.* 2019). XBP1s favoriserait l'expression de composants de la machinerie de présentation antigénique par le CMH-I et de l'homéostasie du RE.

Ces études suggèrent que selon l'environnement tissulaire et la présence d'effecteurs (tumoraux ou infectieux) modulant les fonctions des DCs, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  aboutit à un effet bénéfique ou délétère sur la présentation antigénique.

#### 4.4.3 Réponse cytokinique

La stimulation des DCs par différents stimuli peut activer la réponse UPR et moduler leur activité cytokinique. En réponse au poly(I:C) qui active le TLR3, l'expression de XBP1s et GADD34 est induite aboutissant à la production d'IL-6 et d'IFN- $\beta$  (Clavarino *et al.* 2012a; F. Hu *et al.* 2011). Contrairement aux situations impliquant l'activation d'un seul PRR, l'activation de plusieurs PRRs dans des cellules soumises à un stress du RE entraîne la production synergique de certaines cytokines, notamment l'IL-23. En effet, une forte sécrétion d'IL-23 est induite suite à la stimulation simultanée des DCs par la TN et le LPS alors que la stimulation par l'un ou l'autre n'induit pas ou peu cette sécrétion (Goodall *et al.* 2010). Dans ce cas, la production d'IL-23 est dépendante de l'induction du facteur de transcription CHOP (Goodall *et al.* 2010). L'induction de l'UPR, via l'activation des TLRs, est très souvent liée à des changements métaboliques. Ainsi, la sécrétion de l'IL-23 a été montrée comme dépendante de la voie IRE1 $\alpha$  dans des DCs humaines stimulées simultanément par du LPS et du glucose (Márquez *et al.* 2017). Récemment, une autre étude a montré que la stimulation simultanée des DCs par l'imiquinone (agoniste des TLR7 et TLR8) et le palmitate (acides gras prédominant retrouvé dans les régimes alimentaires gras) résulte en une forte production d'IL-23 (Mogilenko *et al.* 2019). La sécrétion cette cy-



tokine est directement régulée par la réponse UPR (activation d'XBP1s et CHOP), induite suite à un mécanisme d'inhibition de la glycolyse et de production de ROS mitochondriaux (mtROS) (Mogilenko *et al.* 2019). En accord avec ces résultats obtenus *in vitro* dans des BMDCs, l'inhibition de la formation des mtROS ou la délétion spécifique d'XBP1 dans des DCs atténue l'expression de l'IL-23 et l'inflammation de la peau dans un modèle murin de psoriasis (Mogilenko *et al.* 2019). La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s est également importante dans la sécrétion des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-10 lors de l'internalisation d'extraits solubles tumoraux dans des BMDCs (Medel *et al.* 2019).

Pour conclure, la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s a un rôle important dans l'activité de présentation antigénique et la sécrétion cytokinique des DCs. L'impact de cette voie peut être différent selon le contexte étudié ce qui ne permet pas de proposer un mécanisme d'action unique.





# Problématique



# Problématique

Les DCs jouent un rôle majeur dans plusieurs étapes de l'infection par *T. gondii* telles que la dissémination précoce du parasite vers le cerveau, la mise en place d'une réponse cytokinique pro-inflammatoire et l'induction d'une immunité protectrice médiée par les LTs CD8<sup>+</sup> (Poncet *et al.* 2019). Lors de l'infection à *T. gondii*, peu d'informations sont connues sur les voies modulées dans les DCs qui pourraient faciliter la survie du parasite, ou au contraire son contrôle précoce afin de préserver l'hôte. La réponse UPR et plus particulièrement la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s module des fonctions essentielles des DCs comme la présentation antigénique et la sécrétion de cytokines (Osorio *et al.* 2018; Smith 2018). Actuellement, aucune information est connue sur l'influence de l'infection par *T. gondii* sur la réponse UPR dans les DCs et ses conséquences sur les réponses immunitaires.

Ce projet de thèse a donc eu pour but d'examiner si l'infection par *T. gondii* induit la réponse UPR dans les DCs. Plus particulièrement, nous avons cherché à déterminer si un lien fonctionnel existe entre l'induction d'une réponse au stress du RE et la régulation des activités de sécrétion cytokinique et de présentation antigénique de DCs infectées. Pour mener à bien ce projet et disséquer les mécanismes mis en jeu, nous avons utilisé des approches *in vitro* utilisant des DCs murines dérivés de la moelle osseuse murine. De plus, en collaboration avec le laboratoire de S. Janssens (IRC/VIB, Ghent University), nous avons également examiné la contribution de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s *in vivo* lors de l'infection de souris transgéniques déficientes pour les protéines IRE1 $\alpha$  et XBP1 dans les cellules CD11c<sup>+</sup>. Nous nous sommes plus précisément intéressés à la possible contribution de cette voie dans le contrôle de l'infection et la mise en place de la réponse Th1, en particulier l'activation des LTs. Les différents résultats obtenus lors de ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle de la réponse UPR et plus particulièrement de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la régulation des fonctions des DCs infectées par *T. gondii* et le contrôle de l'infection.



# Matériels et Méthodes



# Matériels et Méthodes

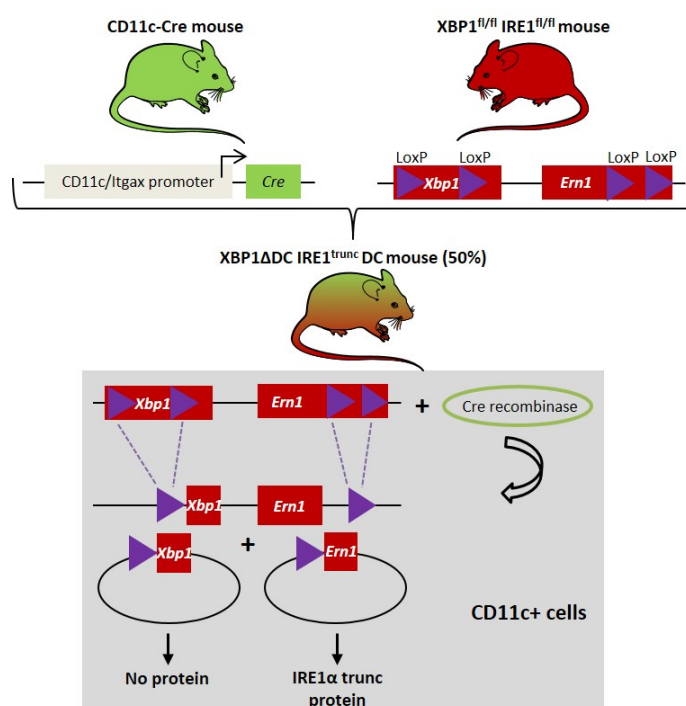
## 1 Animaux

Les souris sauvages C57BL/6 proviennent de l'élevage de Janvier Labs<sup>®</sup> et sont utilisées à l'âge de 8-10 semaines pour nos expériences. L'équipe de B. Lambrecht (VIB, Ghent) nous a généreusement fourni des tibias et fémurs de souris C57BL/6 MyD88KO pour réaliser nos expériences. Les souris C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup> (A.-H. Lee *et al.* 2008), C57BL/6 XBP1 $\Delta$ DC (Osorio *et al.* 2014), C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup> IRE1<sup>fl/fl</sup> (Iwawaki *et al.* 2009) et C57BL/6 XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC (Tavernier *et al.* 2017) proviennent du laboratoire de S. Janssens (IRC/VIB, Ghent University). Les souris ont été produites en suivant la stratégie du système Cre-LoxP. Les souris homozygotes <sup>fl/fl</sup> ("floxées") ont été générées en flanquant le gène d'intérêt par deux sites LoxP localisés dans le premier et deuxième introns pour le gène *Xbp1* et encadrant les exons 20 et 21 pour le gène *Ern1* (codant pour la protéine IRE1 $\alpha$ ) (Figure 28 page suivante). Ensuite, les souris<sup>fl/fl</sup> Itgax-Cre sont obtenues en couplant les souris <sup>fl/fl</sup> avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur CD11c/Itgax (Figure 28 page suivante). Les souris C57BL/6 XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC (XBP1<sup>fl/fl</sup> IRE1<sup>fl/fl</sup> Itgax-Cre) expriment une isoforme tronquée de la protéine IRE1 $\alpha$  qui a perdu son activité d'endoribonucléase.

Les souris sont élevées à l'Institut Pasteur de Lille selon le protocole (référéncé sous le numéro APAFIS#12804-2017122111233479v2) approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale N°075 et le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. Les animaux sont génotypés à partir de 4 semaines pour identifier les souris Cre positive par extraction de l'ADN provenant d'une fraction d'oreille ou de queue à l'aide du kit KAPA Mouse Genotyping Kit (KAPABIOSYSTEMS). La réaction d'amplification de l'ADN est réalisée en suivant le protocole du ALLin<sup>™</sup> Red Taq Mastermix (highQu) avec les primers référencés dans la Table 5 page suivante avec le cycle PCR suivant : 95°C 1min, [95°C 15sec, 62°C 15sec, 72°C 30sec]<sub>x40</sub>, 72°C 5min. Les échantillons sont migrés



dans un gel à 2% agarose (Annexe Figure 52 page 156).



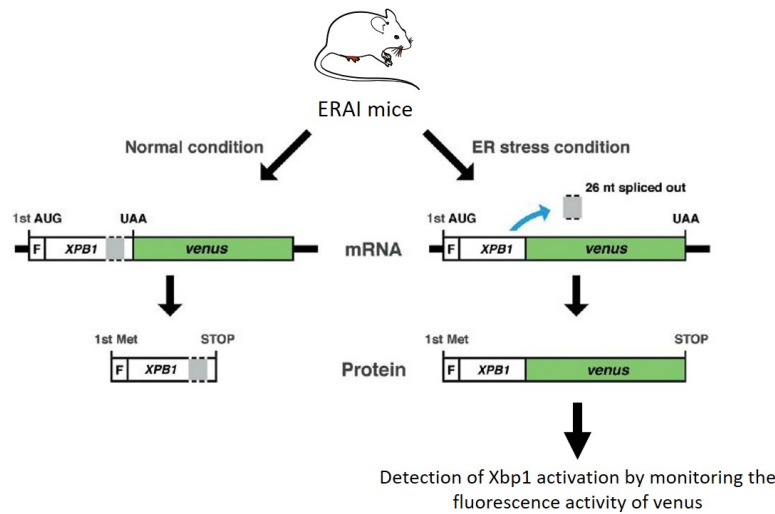
**Figure 28 – Modèle de souris avec le système Cre-LoxP.** Une souris possédant le gène *Cre* sous le promoteur CD11c/Itgax est accouplée avec une souris détenant des séquences LoxP dans le gène d'intérêt à déléter, ici les gènes *Xbp1* (séquences LoxP dans le premier et deuxième introns) et *Ern1* (séquences LoxP encadrent les exons 20 et 21). La moitié de la génération possède la Cre recombinase qui provoque la recombinaison de l'ADN entre les sites LoxP pour éliminer une partie du gène *Xbp1* uniquement dans les cellules CD11c+ et une partie du gène *Ern1* pour la production d'une protéine IRE1α tronquée qui a perdu son activité endoribonucléase.

Réf NCBI	Primer	5' Séquence 3'
NC_000076.6	A20 Fwd	ACATGTGGGGTGTTCAGGAT
NC_000076.6	A20 Rev	TCTCCCTCCCATCAGTTTTG
NC_005856.1	Cre Fwd	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG
NC_005856.1	Cre Rev	CAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGC

**TABLE 5 – Liste des primers de génotypage des souris C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup>, C57BL/6 XBP1ΔDC, C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup> IRE1<sup>fl/fl</sup> et C57BL/6 XBP1ΔDC IRE1<sup>trunc</sup>DC.**

Les souris ERAI (ER stress-Activated Indicator) provenant du laboratoire de S. Janssens ont également été utilisées dans l'étude. Ces souris génétiquement modifiées surexpriment

une version partielle du gène *Xbp1* humain fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente Venus (VenusFP) (Iwawaki *et al.* 2003). En condition de stress du RE, la protéine IRE1 $\alpha$ , via son activité endoribonucléasique, induit l'épissage non conventionnel de l'ARNm *Xbp1* qui conduit à un changement du cadre de lecture et à la traduction d'une protéine chimérique XBP1s-VenusFP. Ceci permet donc de détecter l'épissage des transcrits *Xbp1* dans les cellules et donc l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  par cytométrie en flux (Figure 29).



**Figure 29 – Modèle de souris ERAI (adapté de (Iwawaki *et al.* 2003)).** En condition normale, le transcrite du gène *Xbp1* n'est pas épissé. Lors d'un stress du RE, le transcrite du gène *Xbp1* est épissé par l'activité endoribonucléasique de IRE1 $\alpha$  conduisant à la formation d'une protéine chimérique XBP1s-VenusFP.

## 2 Expérimentation *in vitro*

### 2.1 Culture cellulaire

#### 2.1.1 Fibroblastes humains

La lignée primaire de fibroblastes humains (Human Foreskin Fibroblast; HFF) (CCD-1112Sk (ATCC®CRL-2429™)) est cultivée dans des flasques à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide dans du DMEM complet contenant du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose GlutaMAX™ (Gibco™ by LifeTechnologies) complété avec 10% de sérum de veau fœtal SVF (Gibco™ by LifeTechnologies) et 1% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco™ by LifeTechnologies). Les cellules sont entretenues par passages successifs du tapis cellulaire confluent décollé avec une solution à 0,25% de trypsine EDTA (Gibco™ by

LifeTechnologies) pendant 5min à 37°C. Afin de maintenir une lignée cellulaire non contaminée, les fibroblastes sont régulièrement testés pour la présence de mycoplasmes à l'aide du kit MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza).

### 2.1.2 Cellules J558 et production de GM-CSF

Les cellules de myélome J558 permettent de produire du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) contenu dans leur surnageant pour différencier les cellules de la moelle osseuse de souris en BMDCs (Winzler *et al.* 1997). Les cellules J558 sont cultivées dans du RPMI complet contenant du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 GlutaMAX™ (Gibco™ by LifeTechnologies) supplémenté avec 10% de SVF (Gibco™ by LifeTechnologies), 1% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco™ by LifeTechnologies), 1% de pyruvate de sodium (Gibco™ by LifeTechnologies) et 0,2% de 2-Mercaptoéthanol (Gibco™ by LifeTechnologies). Les cellules sont mises en culture à raison de  $5 \cdot 10^5$  hybridomes dans 40mL de RPMI complet avec 1mg/mL de généticine (InvivoGen) pour sélectionner les cellules exprimant le GM-CSF pendant 2 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules adhérentes sont ensuite grattées et centrifugées 10min à 1500rpm puis mises en culture comme précédemment pendant deux cycles de sélection. Pour produire le GM-CSF,  $3,5 \cdot 10^6$  cellules préalablement sélectionnées par la généticine sont mises en culture dans 70mL de RPMI complet pendant 7 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en absence de généticine. Le surnageant de culture contenant le GM-CSF est alors récupéré, centrifugé 10min à 1500rpm, filtré à 0,22µm et congelé à -80°C.

### 2.1.3 Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse murine

Les cellules de la moelle osseuse sont extraites à partir de tibias et de fémurs de souris femelles C57BL/6 âgées de 8 à 10 semaines. Les extrémités des os sont coupées et du RPMI complet est injecté à l'aide d'une seringue de 1mL munie d'une aiguille de 26,5 Gauge pour récupérer les cellules. Ces dernières sont reprises après centrifugation (5min à 1500rpm) dans 1mL de tampon de lyse (1,45M NH<sub>4</sub>Cl; 120mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,26mM C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>; pH7,3) pendant 1min à température ambiante. Les cellules sont lavées, centrifugées et comptées dans une cellule de Malassez en présence de bleu de trypan (Gibco™ by LifeTechnologies). Une fois comptées, ces cellules sont mises en culture dans des boîtes de Pétri 92x16mm à  $5 \cdot 10^6$  cellules/boîtes dans 10mL de RPMI complet supplémenté de 10% de GM-CSF à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. À jours 4 et 7, les cellules faiblement adhérentes en suspension sont récupérées par aspiration-refoulement puis lavées avec du PBS-2mM EDTA (SIGMA-ALDRICH®) pendant 3min à 37°C. Ces cellules sont ensuite mises en culture dans les mêmes conditions que précédemment. À jour 10, les BMDCs sont récoltées par aspiration-refoulement et lavées au PBS froid. Elles sont comptées en présence de bleu de trypan et

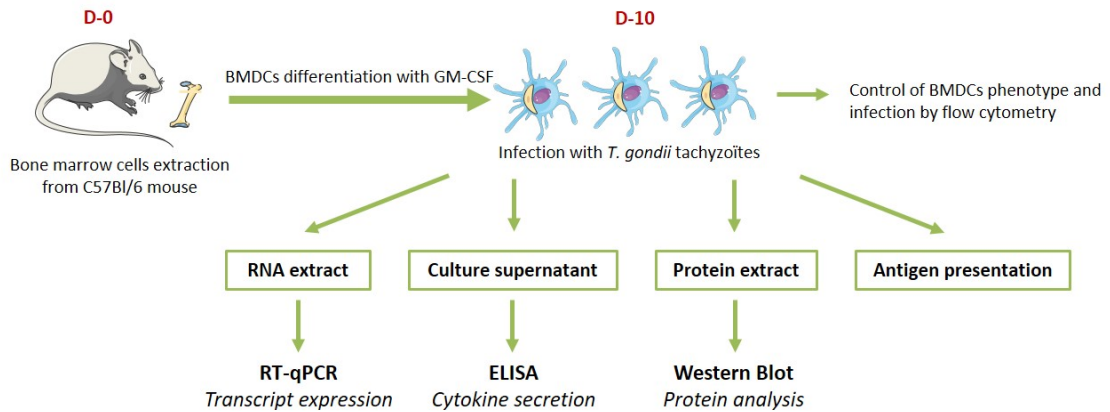


Figure 30 – Expériences réalisées *in vitro* sur les BMDCs.

préparées pour les différentes expériences (Figure 30). Leur bonne différenciation (pourcentage de cellules CD11c+ CMH-II+ supérieur à 80%) est vérifiée par cytométrie en flux avant de les utiliser pour nos expériences (Annexe Figure 53 page 156).

#### 2.1.4 Hybridomes T B3Z

Les hybridomes T B3Z rapporteurs sont des LTs CD8+ exprimant un TCR qui reconnaît spécifiquement le peptide OVA (257-264) appelé SIINFELK (SKL8) présenté par la molécule H-2K<sup>b</sup> caractéristique de la présentation antigénique par le CMH-I. La détection de l'activation du TCR suite à la liaison avec le peptide SKL8 présenté par la molécule H-2K<sup>b</sup> est possible grâce à l'induction du gène rapporteur lacZ (codant pour la  $\beta$ -galactosidase) sous le contrôle du promoteur de l'IL-2 (Hosken *et al.* 1990; Karttunen *et al.* 1992). L'ajout du substrat de la  $\beta$ -galactosidase (CPRG : ChloroPhenol Red- $\beta$ -D-Galactopyranoside) permet de quantifier l'activation du TCR par dosage colorimétrique. Ces hybridomes B3Z permettent donc de mesurer la présentation de l'épitope SKL8 par la molécule H-2K<sup>b</sup> à la surface des CPAs telles que les DCs.

Ces cellules non-adhérentes sont cultivées dans des flasques contenant du RPMI complet à une concentration de  $5 \cdot 10^4$  hybridomes/mL à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et sont maintenues en culture par dilution au 1/10<sup>e</sup> tous les deux jours.

## 2.2 Souches parasitaires et culture

Dans ce projet, les parasites utilisés sont de type I RH ou de type II Pru au stade tachyzoïte. Les parasites sont cultivés par infections successives de cellules HFF confluentes dans du DMEM complet à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide. Les tachyzoïtes sont récoltés soit après lyse naturelle des cellules HFF ou bien par lyse mécanique du tapis cellulaire en

grattant les cellules infectées puis en les passant successivement dans une seringue munie d'une aiguille 18 Gauge et d'une autre de 27 Gauge pour lyser les HFF et rompre la MVP. La solution est ensuite filtrée grâce à une membrane en polycarbonate de 3µm de porosité (GE Healthcare) et les parasites sont comptés en cellule de Malassez pour réaliser les infections *in vitro* ou *in vivo*. Les cultures parasitaires sont régulièrement testées pour la présence de mycoplasmes à l'aide du kit MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza). Le détail des génotypes des souches utilisées est répertorié dans la Table 6.

Souche	Génotype	Origine
RH Luc GFP	RHΔ <i>Hxgprt</i> GFP <sup>prom gra2</sup> FLUC <sup>prom tub1</sup>	J.Boothroyd
Pru Luc GFP	Pru A7 Δ <i>Hxgprt</i> GFP <sup>prom gra2</sup> FLUC <sup>prom tub1</sup>	J.Boothroyd
Pru Tomato SAG1-Ova	PruΔ <i>Hxgprt</i> <i>tdTOMATO</i> <sup>prom tub</sup> <i>SAG1ΔGPI-</i> <i>Ova</i> <sub>[140-386]</sub> <sup>prom tub/3'utr dhfr</sup> + <i>BLE</i>	Schaeffer et al 2009

TABLE 6 – Liste des souches de *T. gondii* utilisées.

- Les souches RH Luc GFP et Pru Luc GFP expriment constitutivement la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) et l'enzyme luciférase.
- La souche Pru Tomato SAG1-Ova a été génétiquement modifiée pour exprimer et sécréter de manière constitutive la protéine soluble OVA dans la lumière de la VP (Schaeffer *et al.* 2009). Le parasite exprime également constitutivement la protéine fluorescente tdTomato (tandem Tomato).

Les parasites tués par la chaleur appelés Heat Killed (HK) correspondent aux parasites Pru Tomato SAG1-Ova incubés 20 min à 56°C.

### 2.3 Stimulation ou infection des BMDCs

Les BMDCs sont déposées 4h avant l'infection en boîte de Pétri, plaques 6 puits ou 96 puits selon l'expérience réalisée. Après 16h d'incubation, différentes MOI (Multiplicity Of Infection, nombre de parasites pour une cellule) ont été testées. Une MOI de 4 aboutit à un taux d'infection de 80% pour les souches de type II sans mort cellulaire des BMDCs alors qu'une MOI de 2 pour la souche de type I aboutit à ce même taux d'infection de 80% (Annexe Figure 53 page 156 et 54 page 156). Ce taux d'infection est donc optimal pour tester la modulation des réponses des BMDCs à l'infection et a donc été choisi pour l'ensemble des expériences *in vitro* présentées dans ce manuscrit.

Comme contrôle positif d'activation de la réponse UPR, les BMDCs ont été incubées avec de la tunicamycine (TN) (SIGMA-ALDRICH®) à une concentration finale de 1µg/mL pendant 16 heures.

L'inhibiteur 4 $\mu$ 8C (4-methyl umbelliferone 8-Carbaldehyde) (SIGMA-ALDRICH®) permet d'inhiber les activités de la protéine IRE1 en bloquant l'épissage de l'ARNm *Xbp1* et l'activité RIDD. Les BMDCs ont été incubées avec du 4 $\mu$ 8C à une concentration finale de 10 $\mu$ M final (Cross *et al.* 2012).

## 2.4 Phénotype des BMDCs et mesure du taux d'infection par cytométrie en flux

Ces expériences sont réalisées à 4°C à l'abri de la lumière. Après infection, les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X/1% BSA (Bovine Serum Albumin; SIGMA-ALDRICH®) froid puis les culots cellulaires sont repris dans 50 $\mu$ L de PBS 1X/1% BSA/1% Fc Block (BD Pharmingen™). Après 10min d'incubation, une solution de PBS 1X contenant un marqueur de viabilité cellulaire (Aqua LIVE/DEAD émettant à 405 nm, 1/100<sup>ème</sup>, Molecular Probes® by life technologies™), l'anticorps anti-CD11c, un anticorps détectant les molécules de co-stimulation ou de présentation antigénique (anti-CD80, anti-CD86, anti-CMH I, anti-I-A/I-E PE) est ajouté (Table 7). La plaque est incubée 30min puis lavée trois fois avec 200 $\mu$ L de PBS 1X/0,1% BSA froid avant la fixation des cellules (Fixation buffer BioLegend®) pendant 20min. Par la suite, la plaque est centrifugée 3min à 400g et lavée deux fois avec 200 $\mu$ L de PBS 1X/0,1% BSA froid. Les culots cellulaires sont repris dans 200 $\mu$ L de PBS 1X/0,1% BSA froid et la plaque est conservée à 4°C jusqu'à l'analyse. Le cytomètre utilisé est l'Attune NxT™ (ThermoFisher SCIENTIFIC) et l'analyse est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo10.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Dilution	Origine
Anti-mouse CD11c	APC	N418	1/500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD80	PE ou FITC	16-10A1	1/1500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD86	PE ou FITC	GL-1	1/1500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse H-2K <sup>b</sup>	PE ou FITC	AF6-88.5.5.3	1/500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse I-A/I-E	PE ou FITC	M5/114.15.2	1/1500 <sup>ème</sup>	BioLegend®

TABLE 7 – Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour les expériences *in vitro*.

## 2.5 Analyse de la quantité de transcrits de gènes d'intérêt par RT-qPCR dans des BMDCs infectées

Afin d'estimer la quantité relative de transcrits de gènes d'intérêt au sein de BMDCs infectées ou ayant subi différents traitements, une approche de RT-qPCR est utilisée. Pour cela, l'ARN total de cellules est extrait à partir de 5.10<sup>6</sup> BMDCs avec le kit RNeasy®

Mini kit (QIAGEN). Après dosage au NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™), une quantité identique d'ARN pour chaque condition est traitée à la DNase I (SIGMA-ALDRICH®) 6min à température ambiante pour éliminer toute contamination ADN. La qualité des ARN est alors vérifiée au Bioanalyzer 2100 (Agilent) à l'aide du kit Agilent RNA 6000 Nano Chips kit (Agilent technologies) (Annexe Figure 55 page 157) et les échantillons sont stockés à -80°C. Pour réaliser les PCR quantitatives (qPCR), l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir de l'ARN traité à la DNase I en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™ by life technologies) selon les recommandations du fabricant. Les primers utilisés pour les réactions de qPCR ont été générés à l'aide du programme informatique Primer3Plus (<https://primer3plus.com/>) ou tirés de la bibliographie et sont répertoriés dans la Table 8 page suivante. La spécificité des primers est vérifiée par alignement de séquences sur NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les réactions de qPCR sont réalisées en présence de SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™ by life technologies), 2µM de primers Forward et Reverse et 50ng d'ADNc sur le QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems™ by life technologies) avec le cycle PCR suivant : 50°C 2min, 95°C 10min, [95°C 15sec, 60°C 1min]<sub>x40</sub>, 95°C 15sec, 60°C 1min, 95°C 15sec. Pour chaque gène étudié dans une condition donnée, la réaction de qPCR est réalisée en dupliqua techniques et la modulation de la quantité relative de transcrits est étudiée avec un minimum de trois expériences biologiques indépendantes. La quantité relative de transcrits d'un gène donné est normalisée au gène de ménage *Gapdh*.

Réf NCBI	Transcrit	Primer	5' Séquence 3'
NM_009716.3	Activating Transcription	Atf4 Fwd	ATGGCCGGCTATGGATGAT
	Factor 4	Atf4 Rev	CGAAGTCAAACCTCTTTCAGATCCATT
NM_001081304.1	Activating Transcription	Atf6 Fwd	TGGGTTCGGATATCGCTGTG
	Factor 6	Atf6 Rev	GGTTCTCTGACACCACCTCG
NM_015740.3	Biogenesis of lysosomal	Bloc1s1 Fwd	CACCCAGCCAGACTCGAC
	organelles complex-1, sub-unit 1	Bloc1s1 Rev	GCAGCGATAGCTTCTCTCCTC
NM_007837.4	DNA Damage Inducible	Ddit3 Fwd	CCACCACACCTGAAAGCAG
	Transcript 3	Ddit3 Rev	TCCTGCAGATCCTCATACCAG
NM_013760.4	DnaJ heat shock protein	Dnajb9 Fwd	TAAAAGCCCTGATGCTGAAGC
	family (Hsp40) member B9	Dnajb9 Rev	TCCGACTATTGGCATCCGA
NM_023913.2	Endoplasmic reticulum	Ern1 Fwd	GCCGAAGTTCAGATGGAATC
	to nucleus signalling 1	Ern1 Rev	ATCAGCAAAGGCCGATGA
NM_001289726.1	GlycerAldehyde 3 Phos-	Gapdh Fwd	ACAAAATGGTGAAGGTCCGGT
	phate DeHydrogenase	Gapdh Rev	TGGCAACAATCTCCACTTTGC



NM_001163434.1	Heat Shock Protein family A member 5	Hspa5 Fwd Hspa5 Rev	CCGAGGAGGAGGACAAGAAG CACATACGACGGCGTGATGC
NM_011631.1	Heat shock protein 90 beta, member 1	Hsp90b1 Fwd Hsp90b1 Rev	CAGTATGGATGGTCTGGCAAC ACGTTTCTTTGACTGGCATAG
NM_022331.1	Homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1	Herpud1 Fwd Herpud1 Rev	AGCAGCCGGACAACCTCTAAT CTTGAAAGTCTGCTGGACA
NM_008337.4	Interferon gamma	Ifn-g Fwd Ifn-g Rev	CAGCAACAGCAAGGCGAAA TTCTGAGGCTGGATTCCG
NM_031168.2	Interleukin 6	Il-6 Fwd Il-6 Rev	ACCACGGCCTTCCCTACTTC TCCACGATTTCCAGAGAACA
NM_001303244.1	Interleukin 12b, subunit p40	Il-12b Fwd Il-12b Rev	ACCAAATTACTCCGGACGGT TGGTCCAGTGTGACCTTCTC
NM_031252.2	Interleukin 23a, alpha subunit p19	Il-23a Fwd Il-23a Rev	CCAGCAGCTCTCTCGGAATC AAGCAGAAGCTGGCTGTTGTC
NM_008654.2	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	Ppp1r15a Fwd Ppp1r15a Rev	ACGATCGCTTTGGCAAC CTCCAGTGCAGGACATGCT
NM_016906.4	Sec61 alpha 1 subunit	Sec61a1 Fwd Sec61a1 Rev	CTATTTCCAGGGCTTCCGAGT AGGTGTTGTACTGGCCTCGGT
NM_013693.3	Tumor necrosis factor a	Tnf-a Fwd Tnf-a Rev	CTGTAGCCCACGTCGTAGC TTGAGATCCATGCCGTTG
NM_001271730.1	X-box binding protein 1 spliced	Xbp1s Fwd Xbp1s Rev	AAGAACACGCTTGGGAATGG CTGCACCTGCTGCGGAC

**TABLE 8 – Liste des primers utilisés en qPCR pour les expériences *in vitro* et *in vivo*.**

## 2.6 WB sur extraits protéiques totaux de BMDCs infectées

Afin d'étudier la modulation de la production des protéines de la réponse UPR, des expériences de WB ont été réalisées. Les BMDCs sont mises en culture à une quantité de  $2.10^5$  par puits dans une plaque 96 puits et sont incubées pendant 1, 2, 4, 6 et 16h à  $37^\circ\text{C}$  avec des parasites à une MOI de 4. Après infection, les cellules sont placées dans la glace, décollées et centrifugées 5min à 1500rpm  $4^\circ\text{C}$ . Des culots constitués de  $1.10^6$  BMDCs sont repris dans 100 $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (150mM NaCl; 20mM TrisHCl; 1mM EDTA; 1% Triton 100X) complété avec 10% d'inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP™ Roche) et 1% d'inhibiteurs de protéases (PROTEOLOC™) pendant 30min à  $4^\circ\text{C}$ . Les échantillons



sont centrifugés à 14000rpm 10min à 4°C et les surnageants sont congelés à -80°C. Avant utilisation, les échantillons sont dénaturés 5min à 95°C en présence de tampon de charge Laemmli 5X (140mM TrisHCl pH6,8; 25% glycérol; 10% SDS; 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol; 10mM DTT; 0,1% bleu de bromophénol) puis 20 $\mu$ L d'extrait protéiques (soit 2.10<sup>5</sup> cellules) sont déposés par puits dans un gel d'acrylamide (6 ou 10%) dans une cuve Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell Module (BIO-RAD). Après 1h30 de migration à 100V dans un tampon Tris-Glycine SDS 1X (EUROMEDEX), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h20 à 100V dans du tampon de transfert 1X (25mM Tris; 0,2M glycine; 0,2% SDS et 20% éthanol) puis la membrane est saturée dans une solution de BSA 5% dans du tampon TBS-T 1X (20mM Tris à pH 7,5; 150mM NaCl et 0,1% Tween 20) pendant 45min à température ambiante. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Table 9). Le lendemain, après plusieurs lavages, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (couplé à la peroxydase de Raifort HRP) dans du TBS-T 5% lait. La révélation est réalisée avec le kit Pierce<sup>™</sup> ECL Western Blotting Substrate ou le kit SuperSignal<sup>™</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific<sup>™</sup>) et le résultat est lu avec l'imageur ChemiDoc<sup>™</sup> XRS+ (BIO-RAD).

Anticorps	Clone	Dilution	Origine
Anti-mouse GADD 153	B-3	1/500 <sup>ème</sup>	Santa Cruz <sup>®</sup>
Anti-rabbit eIF2 $\alpha$		1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>
Anti-rabbit GAPDH	D16H11	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>
Anti-rabbit IRE1 $\alpha$	14C10	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>
Anti-rabbit Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser51)		1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>
Anti-rabbit PERK	C33E10	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>
Anti-rabbit XBP1s	83418	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signaling TECHNOLOGY <sup>®</sup>

TABLE 9 – Liste des anticorps utilisés en WB.

## 2.7 ELISA réalisé avec le surnageant de BMDCs infectées

Afin de quantifier la sécrétion, par les BMDCs, des interleukines IL-6, IL-12p40 et IL-23p19, le surnageant de BMDCs infectées ou non est collecté après 6h ou 16h d'infection et stocké à -80°C. Les ELISA sont réalisés suivant les protocoles des fabricants des kits IL-12/IL-23p40 (Total) Mouse Uncoated ELISA kit (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific), IL-6 Mouse Uncoated ELISA kit (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific) et Mouse IL-23 DuoSet<sup>®</sup> ELISA (R&D SYSTEMS<sup>®</sup>). Les plaques sont analysées avec le Spark<sup>®</sup> 10M (TECAN).

## 2.8 Mesure de la présentation antigénique de BMDCs infectées

Pour évaluer la capacité des BMDCs infectées à présenter l'antigène OVA-SKL8 en complexe avec les molécules du CMH-I présentes à la surface des cellules, les BMDCs sont mises en plaque 96 puits à fond plat à une concentration de  $5.10^4$  BMDCs/puits pendant 4h. Elles sont ensuite infectées avec la souche Pru Tomato SAG1-Ova avec une MOI variant de 0,01 à 2 et incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 5%  $\text{CO}_2$  durant 6h. Le taux d'infection est également quantifié en préparant une plaque indépendante selon les mêmes conditions que celles utilisées pour la mesure de la présentation antigénique. Le pourcentage de cellules infectées aux différentes MOI utilisées est déterminé par cytométrie en flux comme précédemment décrit dans la partie 2.4 page 89. En parallèle, l'aptitude des BMDCs à présenter de manière exogène le peptide SKL8 est contrôlée en les incubant 1h (avant ajout d'hybridomes) avec des concentrations croissantes (2,4pM à 5nM) de peptide synthétique SKL8 qui se fixera directement sur les molécules H-2K<sup>b</sup> présentes à la surface des cellules. Les hybridomes B3Z sont déposés à raison de deux hybridomes par cellule pendant 16h à  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ . Après centrifugation des plaques 2min à 2200rpm, 200 $\mu\text{L}$  de CPRG (pour 1L de PBS : 91mg de CPRG Roche; 1,25mL de NP-40 et 9mL de  $\text{MgCl}_2$  1M) est ajouté par puits pour détecter l'activation du TCR des hybridomes par dosage colorimétrique. Les plaques sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  et lorsque les puits passent d'une couleur jaune au violet, elles sont mesurées toutes les heures à 595nm et 655nm (pour éliminer le bruit de fond) au Spark<sup>®</sup> 10M (TECAN) jusqu'à saturation du signal (Figure 31).

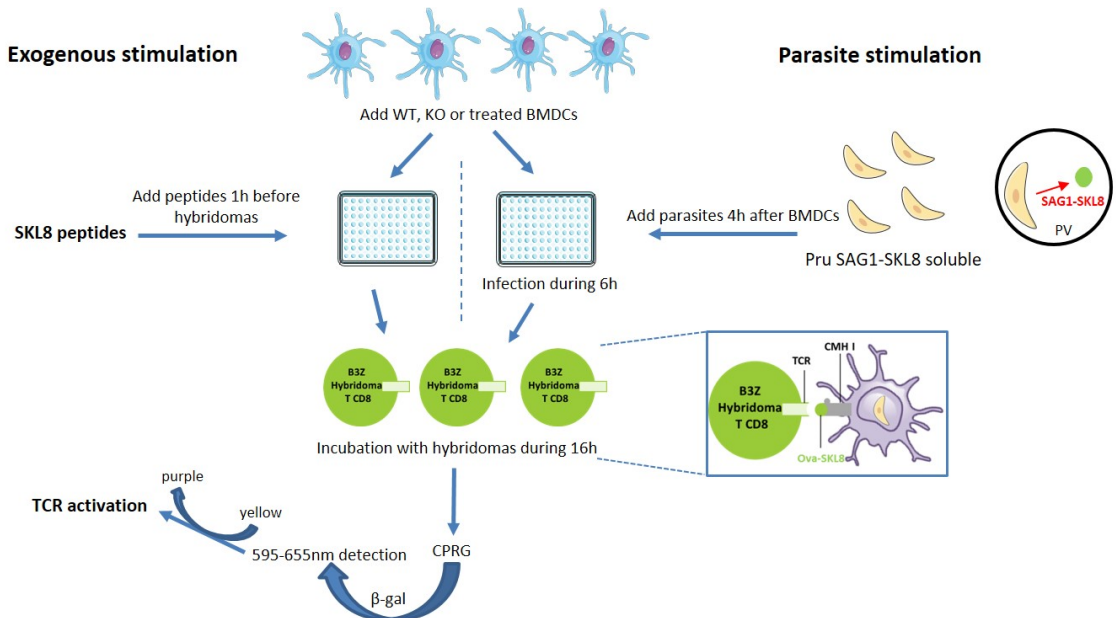


Figure 31 – Schéma expérimental de la mesure de la présentation antigénique des BMDCs.

### 2.9 Immunofluorescence indirecte sur fibroblastes et BMDCs infectés

Pour favoriser l'adhésion des BMDCs, les lamelles sont recouvertes de poly-L-lysine (SIGMA-Aldrich®) pendant 30min à température ambiante puis sont lavées trois fois avec de l'eau stérile avant d'être séchées. Les lamelles sontensemencées avec  $2 \cdot 10^5$  BMDCs/lamelles pendant une nuit pour ensuite être infectées à une MOI de 2 pendant 16h. Les lamelles sont fixées avec 1% de paraformaldéhyde (PAF) (EUROMEDEX) pendant 20min suivi de trois lavages au PBS 1X. L'action du PAF est neutralisée avec du PBS 1X/50mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 15min à température ambiante. Les cellules sont perméabilisées avec du PBS 1X/0,1% Triton pendant 3min, lavées plusieurs fois au PBS 1X avant d'être saturées avec du PBS 1X/1% BSA pendant 30min. L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-KDEL (1/50<sup>ème</sup> 10C3; Enzo® Life Sciences) et secondaire anti-souris sont dilués dans du PBS 1X/0,1% BSA. L'anticorps primaire est incubé pendant une nuit à 4°C dans une chambre humide, avant d'être remplacé durant 45min par l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa594 et du DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride Eurogentec), un intercalant de l'ADN permettant de marquer les noyaux des parasites et des BMDCs. Les lamelles sont ensuite montées au Mowiol et conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal LSM880 (Zeiss).

## 3 Expérimentation *in vivo*

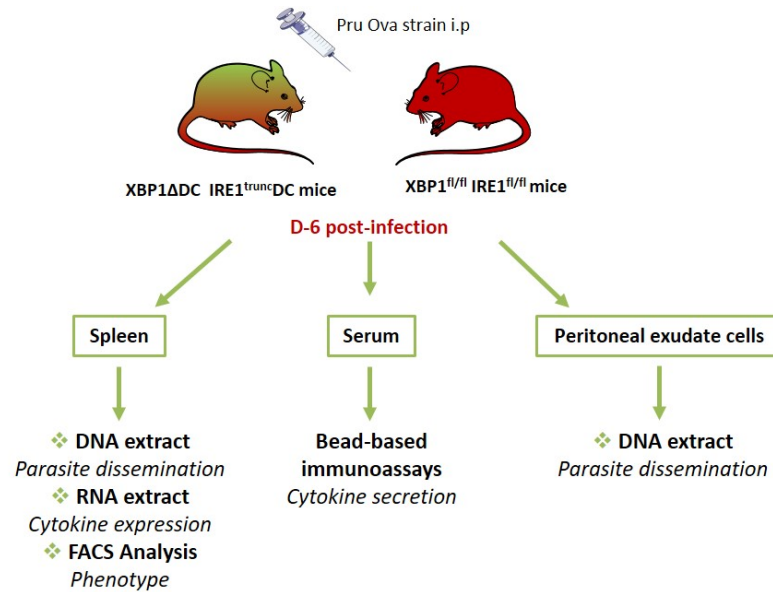
### 3.1 Infection des souris

Les souris sauvages C57BL/6 de Janvier Labs® et les souris ERAI âgées de 8 à 10 semaines ont été injectées en i.p avec 1000 parasites de la souche Pru Tomato SAG1-Ova et sacrifiées 6 jours post-infection. Les souris C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup> IRE1<sup>fl/fl</sup>, C57BL/6 XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC âgées de 8 à 10 semaines sont injectées avec 500 parasites de la souche Pru Tomato SAG1-Ova également en i.p. Les souris sont sacrifiées 6 jours post-infection sauf pour la courbe de survie où elles sont euthanasiées lorsque les points limites validés par le comité d'éthique sont atteints.

La rate, le sérum et le liquide intra-péritonéale (PEC, Peritoneal Exudate Cells) sont prélevés à chaque infection pour réaliser les différentes expériences (Figure 32 page suivante).

### 3.2 Analyse de la dissémination parasitaire et étude de l'expression de transcrits murin

Après prélèvement, la rate est conservée dans une solution de RNeasy lysis buffer (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific) à -20°C. Avant l'extraction d'ADN ou d'ARN,



**Figure 32 – Expériences réalisées *in vivo*.** La rate, le sérum et le PEC sont prélevés des souris C57BL/6 XBP1<sup>fl/fl</sup> IRE1<sup>fl/fl</sup>, C57BL/6 XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC 6 jours post-infection. Ces prélèvements permettent de réaliser différentes expériences : l'extraction de l'ADN de la rate et du PEC permet de quantifier le nombre de parasites par organe (cf 3.2.1) alors que l'extraction d'ARN permet d'estimer la quantité de transcrits de certaines cytokines dans la rate (cf 3.2.2 page suivante). La sécrétion des cytokines est quant à elle étudiée par un dosage immunologique à base de billes (CBA) et par ELISA (cf 3.3 page suivante). L'étude des DCs et des LTs est également réalisée (cf 3.5 page 97).

l'organe est placé dans 1mL de tampon RA1 Lysis buffer (MACHEREY NAGEL) contenant 10 $\mu$ L de 2-Mercaptoéthanol (SIGMA-ALDRICH®) pour pouvoir être broyé à l'aide du Kinematica™ Polytron™ PT1200E. Le lysat est alors utilisé au 1/5<sup>ème</sup> pour les extractions d'ADN et d'ARN et le surplus est congelé à -20°C pour des analyses futures.

### 3.2.1 Quantification du nombre de parasites dans la rate et le PEC

Afin de quantifier le nombre de parasites par organe, reflétant à un temps donné la capacité de dissémination et de réplification, l'ADN de la totalité du liquide intra-péritonéal récolté et 1/5<sup>ème</sup> du broyat de rate est extrait avec le kit NucleoSpin Tissue (MACHEREY NAGEL) puis dosé au NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). Les réactions de qPCR sont réalisées avec le SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™ by life technologies), 2 $\mu$ M de primers Forward et Reverse TOX9-TOX11 correspondant à l'amplification d'une séquence répétée non transcrite dans le génome de *T. gondii* (Reischl *et al.* 2003) et 20ng d'ADN en utilisant le QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems™ by life technologies) avec le cycle PCR suivant : 50°C 2min, 95°C 10min, [95°C 15sec, 60°C 1min]

$\times 40$ , 95°C 15sec, 60°C 1min, 95°C 15sec.

TOX9 : 5'-AGGAGAGATATCAGGACTGTAG-3'

TOX11 : 5'-GCGTCGTCTCGTCTAGATCG-3'

Les expériences sont réalisées en triplica techniques sur six souris minimum. Le nombre de parasites par rate et dans le PEC est estimé à l'aide de l'équation obtenue avec la courbe d'étalonnage qui établit un nombre de cycles qPCR (Ct) en fonction du log d'un nombre connu de parasites Pru Tomato SAG1-Ova (Annexe Figure 56 page 158).

### 3.2.2 Analyse de la quantité de transcrits de gènes d'intérêt dans la rate de souris infectées

Pour estimer la quantité relative de transcrits de gènes d'intérêt dans la rate, l'ARN total provenant du 1/5<sup>ème</sup> de la rate est extrait et traité à la DNase I avec le kit NucleoSpin RNA (MACHEREY NAGEL) selon le protocole du fabricant. Les ARN traités à la DNase I sont dosés au NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Scientific<sup>™</sup>) et stockés à -80°C. Pour réaliser les expériences de qPCR, l'ADNc est synthétisé à partir d'une quantité identique d'ARN traité à la DNase I en utilisant le kit SuperScript<sup>™</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis kit (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les primers utilisés pour les réactions de qPCR sont générés et vérifiés comme décrit dans la partie 2.5 page 89 et sont répertoriés dans la Table 8 page 91. Les réactions de qPCR sont réalisées en présence de SYBR<sup>™</sup> Select Master Mix (Applied Biosystems<sup>™</sup> by life technologies), 2µM de primers Forward et Reverse et 20ng d'ADNc sur le QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems<sup>™</sup> by life technologies) avec le cycle PCR suivant : 50°C 2min, 95°C 10min, [95°C 15sec, 60°C 1min]  $\times 40$ , 95°C 15sec, 60°C 1min, 95°C 15sec. Pour chaque gène étudié dans une condition donnée, la réaction de qPCR est réalisée en duplica techniques avec un minimum de quatre souris. La quantité relative de transcrits d'un gène donné est normalisée au gène de ménage *Gapdh*.

### 3.3 Analyse des cytokines du sérum

La quantification de la concentration en cytokine dans le sérum des souris infectées est effectuée avec le kit LEGENDplex<sup>™</sup> Mouse Inflammation Panel 13-plex (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , et GM-CSF) (BioLegend<sup>®</sup>) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons sont lus sur le cytomètre BD FACSCanto<sup>™</sup> II et analysés sur le logiciel LEGENDplex<sup>™</sup> v8.0. La concentration en IL12-p40 est détectée avec le kit IL-12/IL-23p40 (Total) Mouse Uncoated ELISA kit (Invitrogen by Thermo Fischer Scientific) et analysée avec le Spark<sup>®</sup> 10M (TECAN).

### 3.4 Extraction des splénocytes de la rate

La rate prélevée est perfusée en injectant 1mL d'une solution de PBS 2% SVF contenant 1mg/mL de collagenase (SIGMA-ALDRICH®) et 2µg/mL de DNase I (Roche) pendant 20min à 37°C dans une boîte de Pétri. Après incubation, la rate est placée sur un filtre de monofilaments polyamide PA 90/35 (SAATI) et écrasée avec le piston d'une seringue. L'ajout de PBS 2% SVF dans la boîte de Pétri permet de récupérer un maximum de cellules puis cette solution est passée sur un second filtre de monofilaments avant d'être centrifugée 8min à 1400rpm à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans le tampon Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™ (SIGMA-ALDRICH®) et incubé 6min à température ambiante. La solution est à nouveau filtrée, centrifugée comme précédemment et les cellules sont comptées en présence de bleu de trypan.

### 3.5 Analyse phénotypique des DCs et des LTs issus de la rate de souris infectées

Après 6 jours d'infection, la rate est prélevée et les splénocytes sont extraits (cf 3.4). Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X/1% BSA froid. Les culots cellulaires sont repris dans du PBS 1X/1% BSA/1% Fc Block (BD Pharmingen™). Après 10min d'incubation, différentes solutions d'anticorps dilués dans du PBS 1X sont ajoutées selon le marquage souhaité :

- Marquage DCs : marqueur de viabilité cellulaire (Zombie Violet™ Fixable Viability kit, 1/500<sup>ème</sup>, BioLegend®), anticorps anti-CD45, anti-CD3, anti-CD11c, anti-I-A/I-E, anti-CD8α et anti-CD80, anti-CD86, anti-H-2K<sup>b</sup> ou anti-H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL (Table 10 page suivante). Les cellules sont incubées 30min puis lavées deux fois au PBS 1X/0,1% BSA froid avant d'être analysées au cytomètre Attune NxT™ (ThermoFisher SCIENTIFIC). Ces marquages permettent de déterminer le nombre, la fréquence des DCs CD8α/+ par rate et d'apprécier l'expression des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et de présentation antigénique (H-2K<sup>b</sup> et le complexe H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL) dans ces populations. La stratégie de gating est représentée dans l'Annexe Figure 57 page 159.
- Marquage LTs : marqueur de viabilité cellulaire (Zombie Violet™ Fixable Viability kit, 1/500<sup>ème</sup>, BioLegend®), anticorps anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8α (Table 10 page suivante). Les cellules sont incubées 30min puis lavées deux fois au PBS 1X/0,1% BSA froid avant fixation (Fixation buffer BioLegend®) pendant 20min à 4°C. Par la suite, les cellules sont centrifugées 3min à 400g à 4°C et lavées deux fois avec 200µL de PBS 1X/0,1% BSA froid. Les culots cellulaires sont repris dans 200µL

de PBS 1X/0,1% BSA froid et la plaque est conservée à 4°C jusqu'au marquage intracellulaire. Pour détecter l'IFN- $\gamma$  dans les LTs, les cellules fixées sont reprises dans le tampon Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer 1X (BioLegend®) et centrifugées 5min à 400xg. Cette étape est répétée trois fois. Le culot cellulaire est ensuite repris dans le tampon précédent avec l'anticorps anti-IFN- $\gamma$  (Table 10) et incubé 20min à température ambiante. Cette étape est suivie de trois lavages avec le tampon Intracellular Staining Permeabilization et les cellules sont diluées dans du PBS avant d'être analysées au cytomètre Attune NxT™ (ThermoFisher SCIENTIFIC). Ces marquages permettent de déterminer le nombre, la fréquence des LTs CD4+ et CD8+ par rate et d'évaluer leur activation en détectant l'expression de l'IFN- $\gamma$ . La stratégie de gating est représentée dans l'Annexe Figure 58 page 159.

L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo10.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Dilution	Origine
Anti-mouse CD3	PE/Cy7	17A2	1/500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD4	AF700	GK1.5	1/1500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD8 $\alpha$	BV605	53-6.7	1/300 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD11c	APC	N418	1/100 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD45	APC-Cy7	30-F11	1/500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD80	PE	16-10A1	1/5000 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse CD86	PE	GL-1	1/5000 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse H-2K <sup>b</sup>	PE	AF6-88.5.5.3	1/500 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse H-2K <sup>b</sup> -SIINFEKL	PE	25-D1.16	1/100 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse I-A/I-E	PE ou FITC	M5/114.15.2	1/5000 <sup>ème</sup>	BioLegend®
Anti-mouse IFN $\gamma$	PE	XMG1.2	1/200 <sup>ème</sup>	BioLegend®

**TABLE 10** – Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour les expériences *in vivo*.

### 3.6 Analyse des DCs CD8 $\alpha$ -/+ dans les souris ERAI

Les souris ERAI permettent de détecter l'activation de la protéine XBP1s par cytométrie en flux grâce à la production d'une protéine chimérique XBP1-VenusFP. Après 6 jours d'infection, la rate est prélevée et les splénocytes sont extraits (cf 3.4 page précédente). Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X/1% BSA froid. Les culots cellulaires sont repris dans du PBS 1X/1% BSA/1% Fc Block (BD Pharmingen™). Après 10min d'incubation, une solution de PBS 1X contenant un marqueur de viabilité cellulaire (Live/Dead), des



anticorps anti-CD45, anti-Ly6C, anti-CD11b, anti-CD64, anti-CD3eCD19, anti-CD11c, anti-I-A/I-E, anti-XCR1 et anti-CD172a sont ajoutés. Les cellules sont incubées 30min puis lavées deux fois au PBS 1X/0,1% BSA froid avant d'être analysées au cytomètre BD LSR Fortessa™. L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo10 par détection de la fluorescence Venus émise par la protéine chimérique XBP1s-VenusFP dans les cellules vivantes CD45+ Ly6C- CD11b- CD64- CD3eCD19- CD11c+ I-A/I-E+ (XCR1+ CD172a- pour les cDC1s) ou (XCR1- CD172a+ pour les cDC2s).

### 3.7 Tri des DCs CD8 $\alpha$ + issues de la rate

Les rates des souris sauvages C57BL/6 de Janvier Labs® infectées depuis 6 jours sont prélevées et les splénocytes sont extraits (cf 3.4 page 97). Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X/1% BSA froid. Les culots cellulaires sont repris dans du PBS 1X/1% BSA/1% Fc Block (BD Pharmingen™). Après 10min d'incubation, une solution de PBS 1X contenant un marqueur de viabilité cellulaire (Zombie Violet™ Fixable Viability kit, 1/500<sup>ème</sup>, BioLegend®), l'anticorps anti-CD45, anti-CD3, anti-CD11c, anti-I-A/I-E et anti-CD8 $\alpha$  est ajoutée (Table 10 page précédente). Les cellules sont incubées 30min puis lavées deux fois au PBS 1X/0,1% BSA froid avant d'être reprises dans du RPMI à une concentration de  $30.10^6$  cellules/mL. Le tri des DCs CD8 $\alpha$ + s'effectue sur le cytomètre BD FACSAria™ III et la stratégie de gating représentée dans l'Annexe Figure 59 page 160. Afin d'étudier l'expression de certains transcrits dans les cellules triées, les ARN sont extraits avec le kit RNeasy® Micro kit (QIAGEN) et l'étude de la quantité de transcrits est réalisée par des expériences de RT-qPCR comme précédemment décrit dans la partie 3.2.2 page 96.

## 4 Analyses statistiques

Les graphiques représentant les résultats obtenus ont été générés avec le logiciel Graph Pad Prism 7.0 (San Diego, California USA). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de student, le test One-way ANOVA Tukey's ou le test Two-way ANOVA Tukey's et le test Log-rank (courbe de survie).





# Résultats



# Résultats

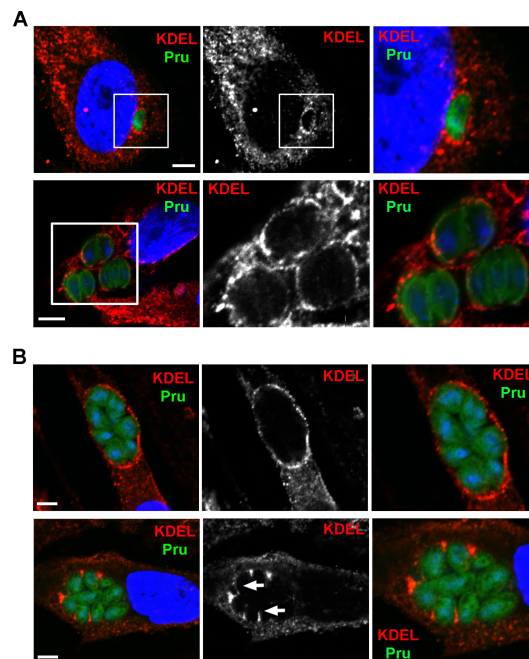
## 1 Modulation de la réponse UPR *in vitro*

### 1.1 *T. gondii* induit le recrutement du RE de l'hôte à la VP

*T. gondii* module activement son hôte en sécrétant de nombreux effecteurs parasitaires qui détournent certaines voies de signalisation impliquées dans les réponses immunitaires, métaboliques, dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Hakimi *et al.* 2017). Précédemment, il a été décrit que des composants du hRE sont recrutés de manière dépendante de Sec22b à la VP, processus nécessaire pour stimuler la présentation antigénique croisée de l'antigène soluble OVA sécrété dans l'espace vacuolaire par les parasites transgéniques Pru Tomato SAG1-Ova (Cebrian *et al.* 2011). Dans nos expériences, nous avons infecté des BMDCs avec la souche de type II Pru Luc GFP et observé le recrutement du hRE. Par immunofluorescence, le marquage du RE par la protéine KDEL a confirmé l'association précédemment décrite du hRE à la VP (Figure A 33 page suivante) (Goldszmid *et al.* 2009). Ce processus a également été détecté dans des fibroblastes humains infectés, dans lesquels des structures de type tubulaire positives pour KDEL ont été visualisées à l'intérieur de l'espace vacuolaire à proximité des parasites (Figure B 33 page suivante). Ceci suggère donc que l'association du hRE à la VP n'est pas spécifique aux cellules immunitaires et peut être déclenchée par le parasite pour assurer sa croissance ou sa survie. Cependant, il reste à élucider si ce recrutement est stimulé par le parasite ou déclenché par l'hôte. De plus, l'impact du recrutement du hRE médié par *T. gondii* sur l'homéostasie du hRE n'a jamais été étudié, notamment pour l'induction de la réponse UPR.

### 1.2 *T. gondii* induit l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les BMDCs

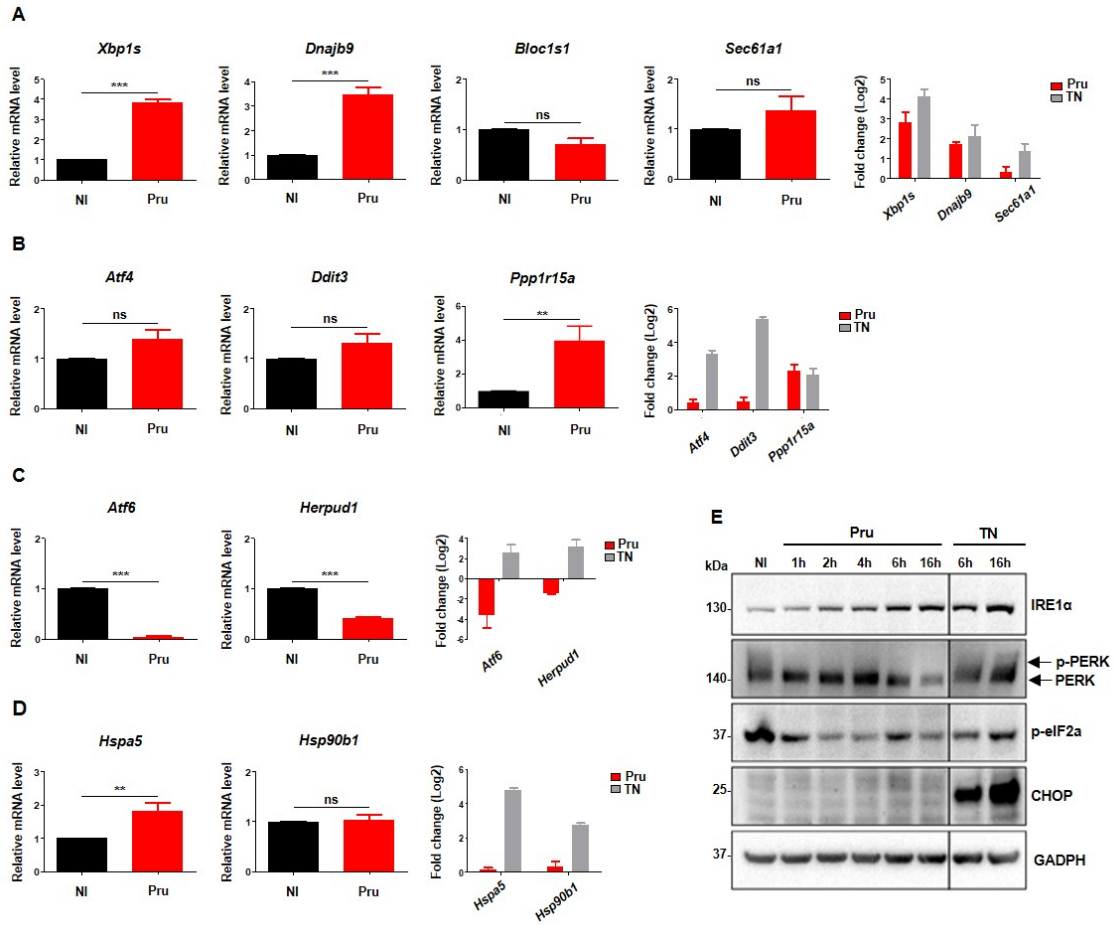
Tout d'abord, nous avons vérifié si l'infection par *T. gondii* activait la réponse UPR. Pour cela, nous avons infecté des BMDCs avec une souche de type II Pru pendant 16h et



**Figure 33 – Recrutement du hRE à la VP dans des BMDCs et des fibroblastes infectés par *T. gondii*.** Images d'immunofluorescence représentant le marquage d'une protéine résidente du hRE (KDEL) dans des BMDCs (A) et des fibroblastes humains (B) infectés avec des parasites Pru Luc GFP (vert) pendant 16h. Les flèches blanches (B) indiquent les tubules positifs pour le marquage de la protéine KDEL à l'intérieur de l'espace vacuolaire. (Barres : 5 $\mu$ m).

analysé l'activation des voies IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6 en mesurant l'expression de gènes cibles connus. En tant que contrôle positif, nous avons stimulé les cellules avec de la TN, un puissant inducteur pharmacologique du stress du RE.

Lors de l'infection par *T. gondii*, nous avons observé une augmentation de la quantité de transcrits *Xbp1s* et *Dnajb9* (cible du facteur de transcription XBP1s, codant pour la protéine ERdj4) (Figure A 34 page ci-contre). L'analyse par WB de BMDCs infectées indique également une augmentation de la quantité de la protéine IRE1 $\alpha$ , démontrant l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  lors de l'infection (Figure E 34 page suivante). Cependant, malgré l'activation de la protéine IRE1 $\alpha$ , nous n'avons pas détecté de diminution de la quantité de transcrits *Bloc1s1*, une cible "classique" de l'activité RIDD (Figure A 34 page ci-contre). De plus, contrairement à la stimulation par la TN (Figure 35 page 107), l'infection par *T. gondii* n'induit pas une réponse UPR classique illustrée par le manque d'expression des transcrits *Hspa5* et *Hsp90b1* (codant respectivement pour les chaperons BiP et GRP94) et *Sec61a1* ainsi que le manque d'induction des voies PERK et ATF6 (Figure A, B, C et D 34 page ci-contre). En effet, ni la phosphorylation de PERK (détectée



**Figure 34 – La voie IRE1α/XBP1s est activée dans des BMDCs infectées par *T. gondii*.** L’expression des gènes cibles de l’UPR (dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites Pru ou incubées avec de la TN) a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d’ARNm ou en Log2 fold change comparé à la condition BMDCs non infectée (NI) pour les voies IRE1α (A), PERK (B) et ATF6 (C) et les chaperons du RE (D). Les résultats sont normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh*. Unpaired Student T-test ns p>0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; mean ± S.E.M (n=3-14). E/ Analyse par WB de l’expression des protéines IRE1α, PERK et p-PERK, p-eIF2α et CHOP dans des BMDCs non infectées (NI), traitées à la tunicamycine (TN) ou infectées par des parasites Pru à différents temps d’incubation. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt.

par le shift de la migration de la protéine observé dans la condition TN) ainsi que sa cible eIF2α, ni l’induction de l’expression de la protéine CHOP n’ont été détectées par WB dans les BMDCs infectées (Figure E 34). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau des transcrits pour les effecteurs de la voie PERK (*Atf4* et *Ddit3* (codant pour la protéine CHOP)) (Figure B 34), contrairement à la stimulation par la TN (Figure B 35 page 107).

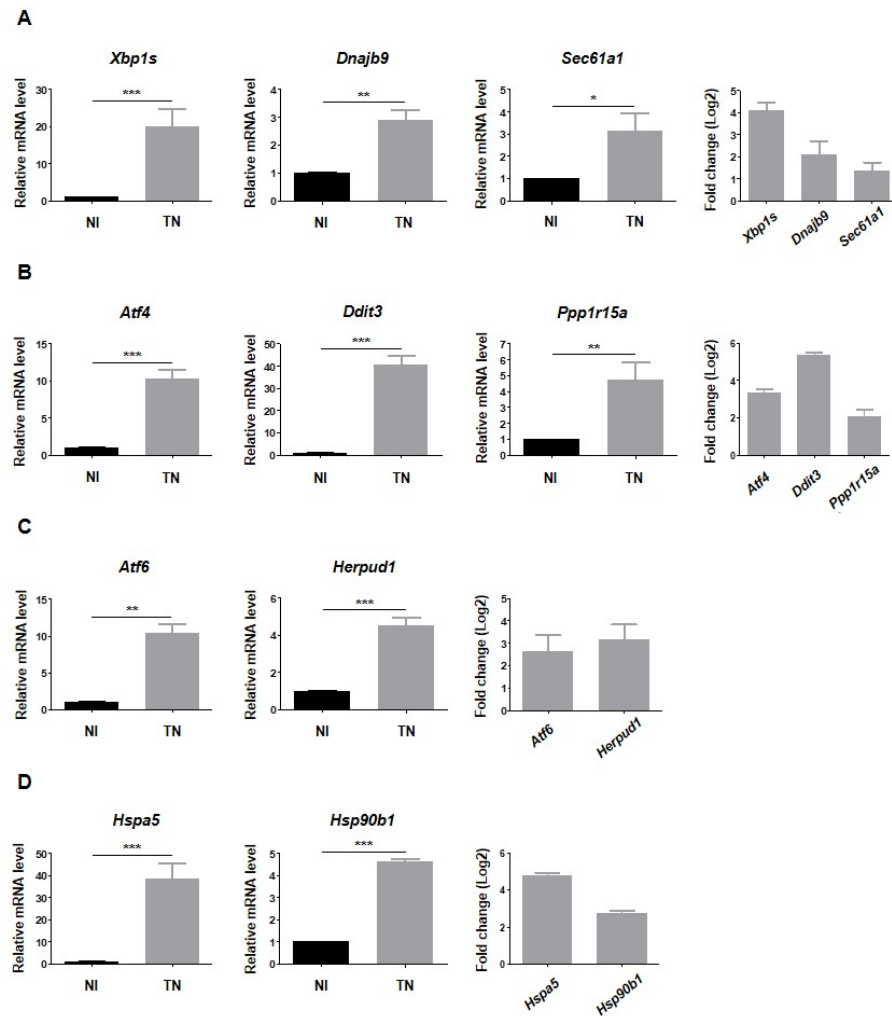
Il est également à noter que les taux d'expression des protéines p-PERK et p-eIF2 $\alpha$  sont étonnamment élevés dans les BMDCs non stimulées et diminuent graduellement durant l'infection (Figure E 34 page précédente). Un phénomène similaire a déjà été décrit pour la protéine p-eIF2 $\alpha$  dans les BMDCs stimulées avec du poly(I:C) (Clavarino *et al.* 2012a). De plus, les DCs spléniques présentent également un taux élevé de p-eIF2 $\alpha$  à l'état basal ce qui suggère qu'une régulation du taux de traduction des protéines est essentielle pour réguler l'homéostasie des DCs (Clavarino *et al.* 2012a). Conformément au rôle de GADD34 dans l'inhibition de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , nous avons remarqué une augmentation du nombre de transcrits *Ppp1r15a* (codant pour la protéine GADD34) dans les BMDCs infectées par *T. gondii* en l'absence d'activation de PERK (Figure B 35 page suivante). Ce résultat est en adéquation avec des études antérieures rapportant que l'expression de GADD34 peut avoir lieu indépendamment de l'activation de la réponse UPR (Dalet *et al.* 2017; Woo *et al.* 2009, 2012). De plus, l'infection par *T. gondii* induit une diminution de l'expression des transcrits *Atf6* et *Herpud1* (Figure C 34 page précédente), ce qui suggère que le parasite module activement la voie ATF6 dans les BMDCs probablement par la sécrétion d'effecteurs parasitaires, comme proposé dans une étude précédente impliquant TgROP18 (M. Yamamoto *et al.* 2011).

En parallèle, nous avons pu mettre en évidence que la modulation de la réponse UPR est identique lors de l'infection avec une souche de type I RH et une souche de type II Pru hormis pour la voie ATF6 qui n'est diminuée que dans des BMDCs infectées par la souche Pru (Figure 36 page 108). Ce résultat montre que la modulation des voies de signalisation de l'hôte peut être dépendante des souches étudiées comme cela a pu être mis en évidence pour l'activité de certains facteurs de virulence (Hakimi *et al.* 2017).

## 2 Mécanismes liés à l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ *in vitro*

### 2.1 La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s régule la réponse cytokinique dans les BMDCs infectées

Il a déjà été démontré que les facteurs de transcription de la réponse UPR (XBP1s et CHOP) régulent la réponse cytokinique dans les macrophages et les DCs après stimulation par des agonistes des TLRs ou lors d'infections (Márquez *et al.* 2017; Martinon *et al.* 2010; Mogilenko *et al.* 2019; Smith 2018). Par conséquent, nous avons examiné si l'activation d'IRE1 $\alpha$  médiée par *T. gondii* avait un impact sur la sécrétion de cytokines dans les BMDCs. Pour cela, nous avons tout d'abord confirmé que *T. gondii* stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 au cours de l'infection (Figure A 37 page 109). De plus, nos résultats

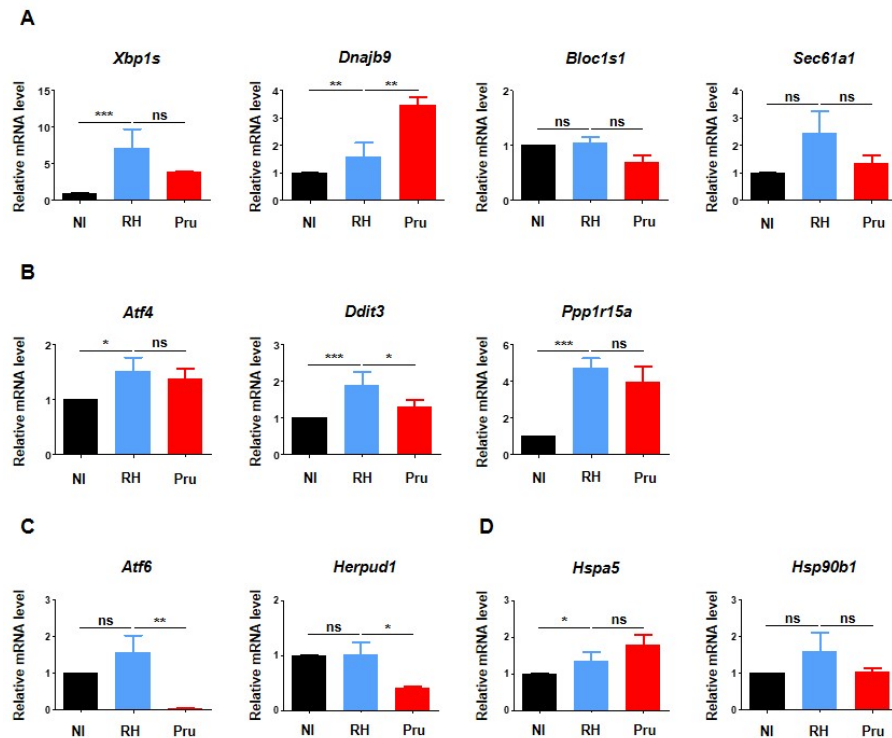


**Figure 35 – Activation de la réponse UPR dans des BMDCs stimulées par la TN.** L'expression des gènes cibles de l'UPR dans des BMDCs stimulées par la TN pendant 16h a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm ou en Log2 fold change comparé aux BMDCs non infectées (NI) pour les voies IRE1 $\alpha$  (A), PERK (B) et ATF6 (C) et des chaperons du RE (D). Les résultats sont normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh*. Unpaired Student T-test \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-14).

indiquent que, contrairement à l'IL-6 et l'IL-12, des parasites de type II (mais pas de type I, Figure 39 page 111) induisent spécifiquement l'expression et la sécrétion d'IL-23 (Figure A 37 page 109). Ce résultat suggère que des voies de signalisation innées distinctes peuvent être impliquées dans la détection des parasites de type II par rapport à des parasites de type I.

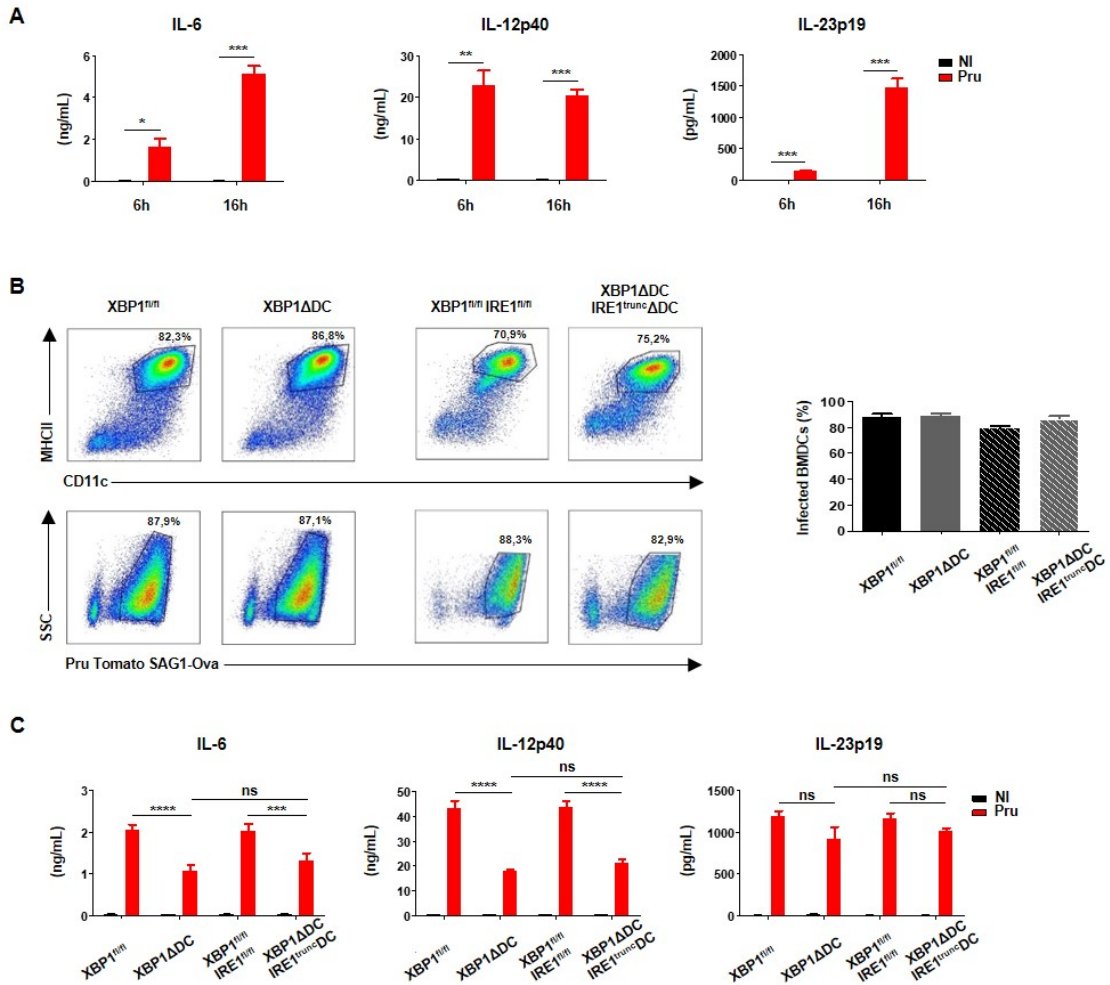
Pour établir le rôle d'XBP1s dans la production de cytokines, nous avons utilisé des





**Figure 36 – La modulation de la réponse UPR est similaire entre des BMDCs infectées par des parasites de type I ou de type II hormis pour la voie ATF6.** L'expression des gènes cibles de l'UPR dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites de type I (RH) ou une souche de type II (Pru) a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm par rapport aux BMDCs non infectées pour les voies IRE1 $\alpha$  (A), PERK (B) et ATF6 (C) et les chaperons du RE (D). Les résultats sont normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh*. Unpaired Student T-test ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-14).

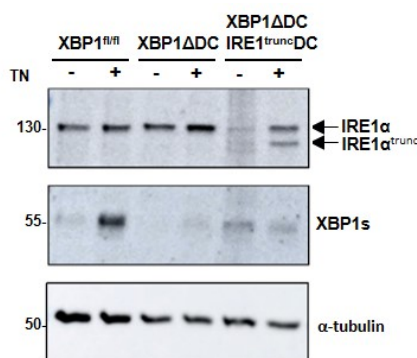
BMDCs issues de souris XBP1 $\Delta$ DC dépourvues de protéine XBP1 spécifiquement dans les cellules CD11c positives (Figure 38 page 110). Les BMDCs issues de souris XBP1<sup>fl/fl</sup> (n'exprimant pas la Cre) ont servi de contrôles tout au long de cette étude (Osorio *et al.* 2014; Tavernier *et al.* 2017). Nous avons constaté que la délétion de XBP1 dans des BMDCs infectées par *T. gondii* réduit de manière significative la production d'IL-6 et d'IL-12 mais pas d'IL-23 par rapport aux BMDCs contrôles (Figure 37 page ci-contre). Il est important de noter que la diminution de la production d'IL-6 et d'IL-12 dans les BMDCs XBP1 $\Delta$ DC n'est pas le résultat d'une infection parasitaire altérée, comme le montre le taux d'infection équivalent entre les BMDCs provenant de souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC (Figure B 37 page suivante). Afin d'étudier si IRE1 $\alpha$  contribue à la stimulation de la sécrétion des cytokines dans les BMDCs infectées, nous avons utilisé des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC déficientes en XBP1 et présentant une isoforme tronquée de la protéine IRE1 $\alpha$



**Figure 37 – La sécrétion d’IL-6 et d’IL-12 est dépendante de la voie IRE1 $\alpha$  dans des BMDCs infectées.** A/ Les sécrétions d’IL-6, d’IL-12 et d’IL-23 par des BMDCs non infectées ou infectées par des parasites Pru ont été mesurées par ELISA après 6h ou 16h d’infection. Unpaired Student T-test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-8). B/ Dot plot représentant l’expression des molécules CD11c et CMH-II à la surface des BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup>, XBP1 $\Delta$ DC, XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup> et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées par des parasites Pru pendant 16h. Graphique représentant le pourcentage moyen de cellules CD11c+ CMH-II+ infectées (n=3-6). C/ Les sécrétions d’IL-6, d’IL-12 et d’IL-23 par des BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup>, XBP1 $\Delta$ DC, XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup> et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC non infectées ou infectées par des parasites Pru pendant 16h ont été mesurées par ELISA. Two-way ANOVA Tukey’s multiple comparisons ns  $p > 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-6)

avec une fonction kinase préservée mais une activité endoribonucléasique altérée (Tavernier *et al.* 2017). La réduction de la quantité d’IRE1 $\alpha$  (Figure 38 page suivante) n’a pas été

corrélée à une diminution supplémentaire de la sécrétion d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23 (Figure C 37 page précédente). Ces données démontrent donc que l'activation d'IRE1 $\alpha$  induite par *T. gondii* contribue de manière sélective à la réponse cytokinique des BMDCs infectées via l'activation d'XBP1s.

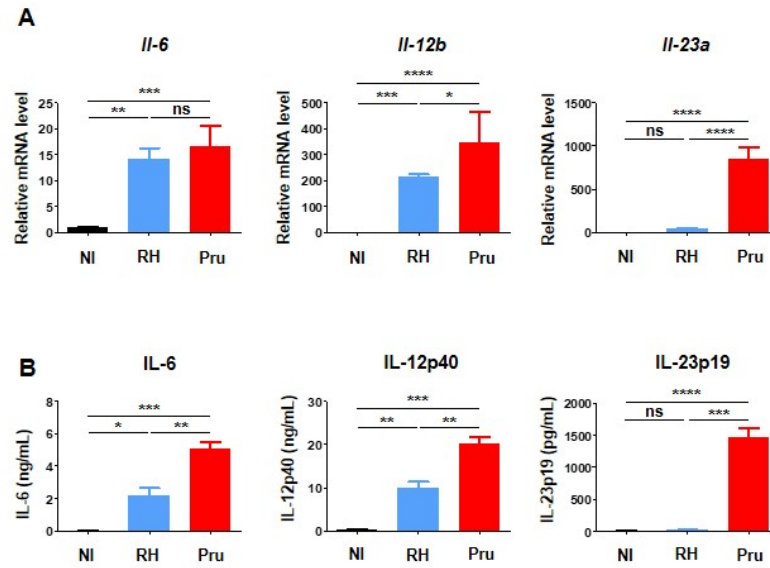


**Figure 38 – Vérification de l'expression protéique d'IRE1 $\alpha$  et XBP1s dans des BMDCs issues des souris XBP1 $\Delta$ DC et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC.** Analyse par WB de l'expression des protéines IRE1 $\alpha$  et XBP1s dans des BMDCs non traitées ou traitées à la TN issues de souris XBP1<sup>fl/fl</sup>, XBP1 $\Delta$ DC ou XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC.

## 2.2 L'activation de la réponse UPR et des réponses cytokiniques sont sous le contrôle de la signalisation des PRRs

Pour établir si l'activation de la réponse UPR et la réponse cytokinique résultante sont sous le contrôle de la signalisation des PRRs (comme démontré dans des études précédentes (Martinon *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2010)), différentes stratégies ont été menées. Dans un premier temps, des parasites de type II tués par la chaleur (PruHK) ont été utilisés. Ces parasites, qui sont phagocytés par les DCs, déclenchent la sécrétion d'IL-12 de manière dépendante de MyD88 et des TLRs mais ne peuvent induire de modulation des réponses de l'hôte par des effecteurs parasitaires sécrétés (Poncet *et al.* 2019). Nous avons également utilisé des BMDCs issues de souris déficientes pour la protéine adaptatrice MyD88 (MyD88 KO) pour établir le rôle de cette signalisation dans la modulation de la réponse UPR et la sécrétion de cytokines.

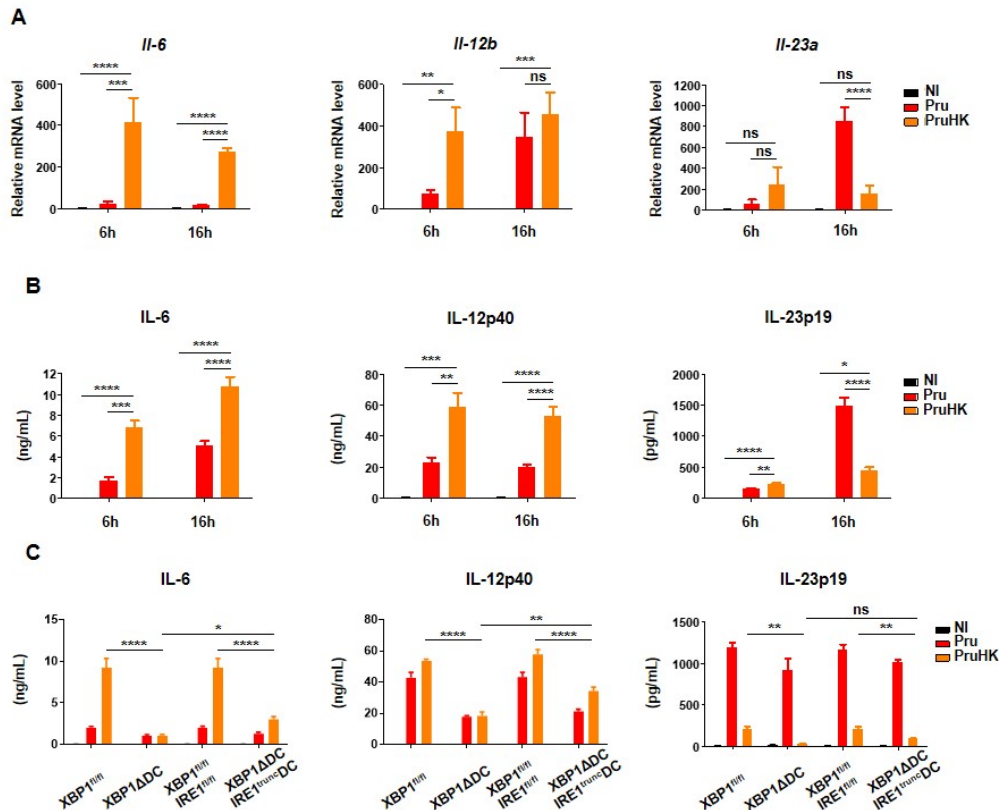
Nos données ont confirmé que l'internalisation des parasites PruHK par les BMDCs stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 à des niveaux plus élevés comparé à une invasion active par des parasites vivants (Figure A et B 40 page 112). Il est intéressant de noter que la production d'IL-23 est fortement réduite dans les BMDCs incubées avec des parasites HK, au niveau transcriptionnel et protéique (Figure A et B 40 page 112), indiquant que des parasites vivants sont nécessaires pour induire l'expression de cette cytokine. De plus,



**Figure 39 – L’expression et la sécrétion d’IL-23 est spécifique aux BMDCs infectées par des parasites de type II.** A/ L’expression des gènes *Il-6*, *Il-12* et *Il-23* dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites de type I RH ou de type II Pru a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d’ARNm comparé aux BMDCs non infectées. B/ Les sécrétions d’IL-6, d’IL-12 et d’IL-23 par des BMDCs non infectées ou infectées par des parasites RH ou Pru pendant 16h sont mesurées par ELISA. ANOVA Tukey’s multiple comparisons test ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-6).

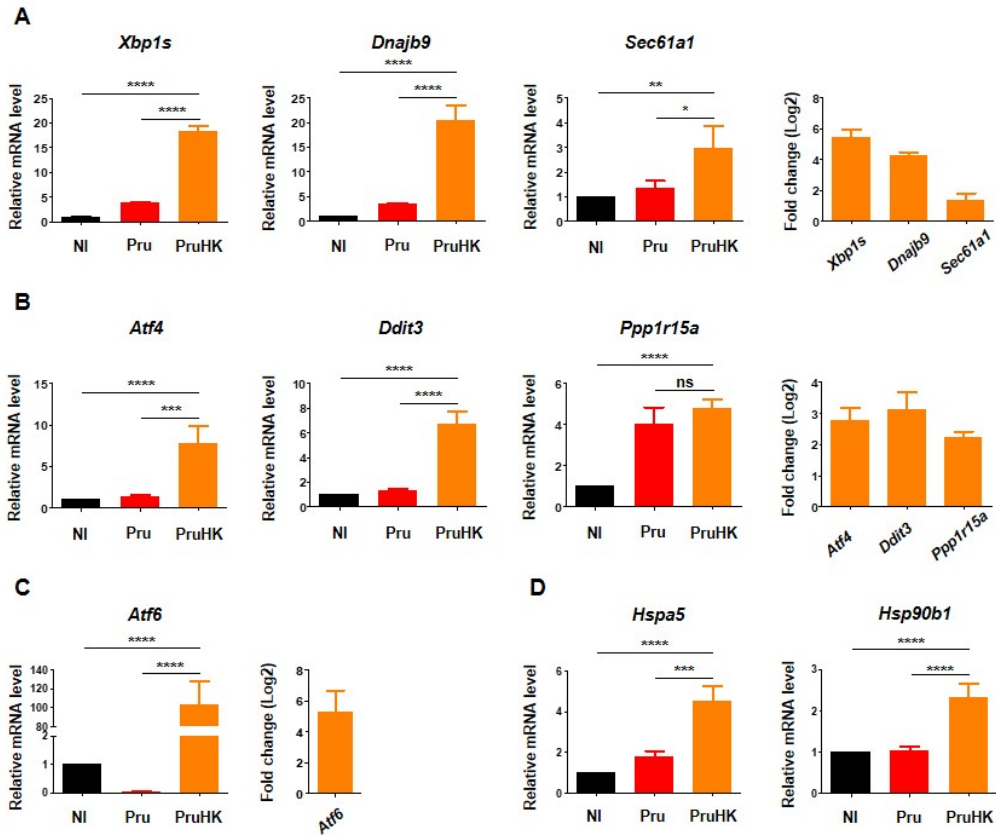
de la même manière que pour des BMDCs infectées avec des parasites vivants, des BMDCs provenant de souris XBP1 $\Delta$ DC incubées avec des parasites HK présentent une inhibition drastique de la sécrétion d’IL-6 et d’IL-12 (Figure C 40 page suivante), ce qui indique que la voie IRE1 $\alpha$  est très probablement déclenchée de manière dépendante des PRRs dans les BMDCs infectées par *T. gondii*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps étudié l’activation de l’UPR après l’internalisation de parasites HK. Nos données indiquent que le taux de transcrits *Xbp1s* et *Dnajb9* est augmenté dans des BMDCs incubées avec des parasites HK et à des niveaux plus élevés par rapport à une incubation avec des parasites vivants (Figure A 41 page 113). De plus, contrairement aux parasites vivants, les parasites HK régulent positivement les gènes codant pour les chaperons BIP, GRP94 et Sec61 (Figure A et D 41 page 113), ainsi que les voies PERK et ATF6. En effet, l’internalisation des parasites HK induit une augmentation du taux de transcrit *Atf4* (et des cibles de la protéine ATF4, *Ppp1r15a* et *Ddit3*) et *Atf6* (Figure B et C 41 page 113). Cependant, malgré l’augmentation du taux de transcrit *Ddit3*, nous n’avons pas détecté d’augmentation de la quantité de protéine CHOP dans des BMDCs stimulées par des parasites PruHK (Figure 42 page 114). Ainsi, des BMDCs activées par des parasites HK

## 2. MÉCANISMES LIÉS À L'ACTIVATION DE LA VOIE IRE1A *IN VITRO* Résultats



**Figure 40 – Expression et sécrétion de l’IL-6, IL-12 et IL-23 dans des BMDCs infectées par des parasites vivants ou HK.** A/ L’expression des gènes *Il-6*, *Il-12* et *Il-23* dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites Pru ou incubées avec des parasites PruHK a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d’ARNm comparé aux BMDCs non infectées (NI). ANOVA Tukey’s multiple comparisons test ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-8). B/ Les sécrétions d’IL-6, d’IL-12 et d’IL-23 par des BMDCs non infectées ou infectées par des parasites Pru ou incubées avec des parasites PruHK pendant 16h ont été mesurées par ELISA. ANOVA Tukey’s multiple comparisons test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-8). C/ Les sécrétions d’IL-6, d’IL-12 et d’IL-23 par les BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup>, XBP1 $\Delta$ DC, XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup> et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC non infectées ou infectées par des parasites Pru ou incubées avec des parasites PruHK pendant 16h ont été mesurées par ELISA. Two-way ANOVA Tukey’s multiple comparisons ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=4-6)

affichent une signature transcriptionnelle ATF4 au cours de laquelle l’expression de CHOP semble être modulée négativement au niveau protéique, ce qui contribue vraisemblablement à la prévention de l’apoptose dans les BMDCs activées (Krokowski *et al.* 2017). Pour conclure, les parasites HK et les parasites vivants modulent différemment l’UPR dans les BMDCs et nos données suggèrent que la signalisation des PRRs déclenchée par des parasites

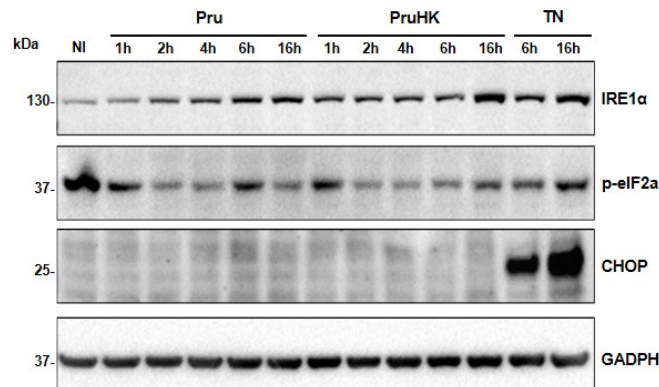


**Figure 41 – Les trois voies de la réponse UPR sont activées dans des BMDCs incubées avec des parasites PruHK.** L'expression des gènes cibles de l'UPR dans les BMDCs infectées par des parasites Pru ou incubées avec des parasites PruHK pendant 16h a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm ou en Log2 fold change comparé aux BMDCs non infectées (NI). ANOVA Tukey's multiple comparisons test ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-14).

HK active les trois voies de l'UPR. De plus, la voie IRE1 $\alpha$  est la seule voie de l'UPR à être régulée positivement par des parasites HK et des parasites vivants, suggérant que des mécanismes de détection innés similaires pourraient induire cette voie. En revanche, l'invasion de BMDCs par des parasites vivants entraîne une diminution de la transcription des gènes de la voie ATF6 et un maintien de la transcription des gènes de la voie PERK à un niveau basal (Figure B et C 34 page 105). Ce dernier processus pourrait être régulé par la sécrétion active d'effecteurs parasitaires dans les cellules hôtes, mais pourrait également refléter des mécanismes de détection réduits ou distincts pour des parasites résidant dans une vacuole.

Afin d'établir le rôle de la signalisation induites en aval des PRRs dans l'activation



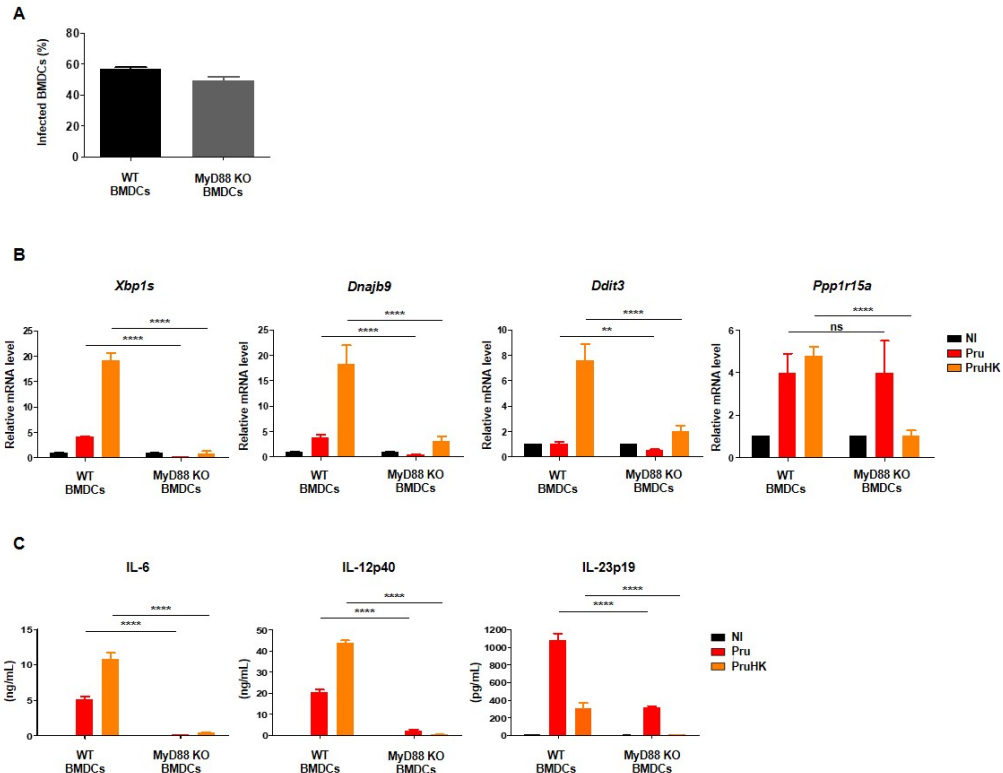


**Figure 42 – Etude de l’expression protéique de certaines protéines de la réponse UPR dans des BMDCs.** Analyse par WB de l’expression des protéines IRE1 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$  et CHOP dans les BMDCs non infectées (NI), traitées à la tunicamycine (TN), infectées par des parasites Pru ou incubées avec des parasites PruHK à différents temps d’incubation. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de dépôt.

de l’UPR, nous avons utilisé des BMDCs différenciées à partir de souris MyD88 KO. L’absence de cette protéine n’a pas d’impact sur l’invasion parasitaire, comme le montre le taux d’infection équivalent entre des BMDCs sauvages et MyD88 KO (Figure A 43 page ci-contre). Cependant, la perte de MyD88 entraîne une inhibition complète de l’induction des transcrits *Xbp1s* et *Dnajb9* dans des BMDCs incubées avec des parasites vivants ou HK (Figure B 43 page suivante). De plus, l’expression des transcrits *Ddit3* et *Ppp1r15a* n’est plus induite dans des BMDCs MyD88 KO incubées avec des parasites HK, confirmant que la voie PERK est déclenchée suite à la détection innée de composés de *T. gondii* (Figure B 43 page ci-contre). L’augmentation de l’expression de *Ppp1r15a* observée après incubation des BMDCs MyD88 KO avec des parasites vivants ne dépend pas de MyD88, confirmant ainsi qu’une voie de signalisation distincte de MyD88 et PERK induit l’expression de *Ppp1r15a* lors de la répllication du parasite. Par ailleurs, la sécrétion d’IL-6 et d’IL-12 est fortement altérée dans des BMDCs MyD88 KO, aussi bien après incubation avec des parasites vivants ou des parasites HK (Figure C 43 page suivante). Ceci indique donc que l’induction de ces cytokines est contrôlée par la détection de composés de *T. gondii* par des PRRs. En revanche, un niveau non négligeable d’IL-23 est sécrété dans les BMDCs MyD88 KO infectées par des parasites vivants (Figure C 43 page ci-contre). Ce résultat indique que l’induction de l’IL-23 est pour une partie (1/3) sous le contrôle d’un axe de signalisation indépendant de MyD88 et d’XBP1s et pour l’autre partie (2/3) sous le contrôle d’une voie de signalisation dépendante de MyD88 et indépendante de XBP1s. Cependant les deux voies nécessitent l’invasion de BMDCs par des parasites vivants.

En résumé, nos données démontrent que lors de l’infection de BMDCs par *T. gondii*, la

## Résultats 2. MÉCANISMES LIÉS À L'ACTIVATION DE LA VOIE IRE1A *IN VITRO*



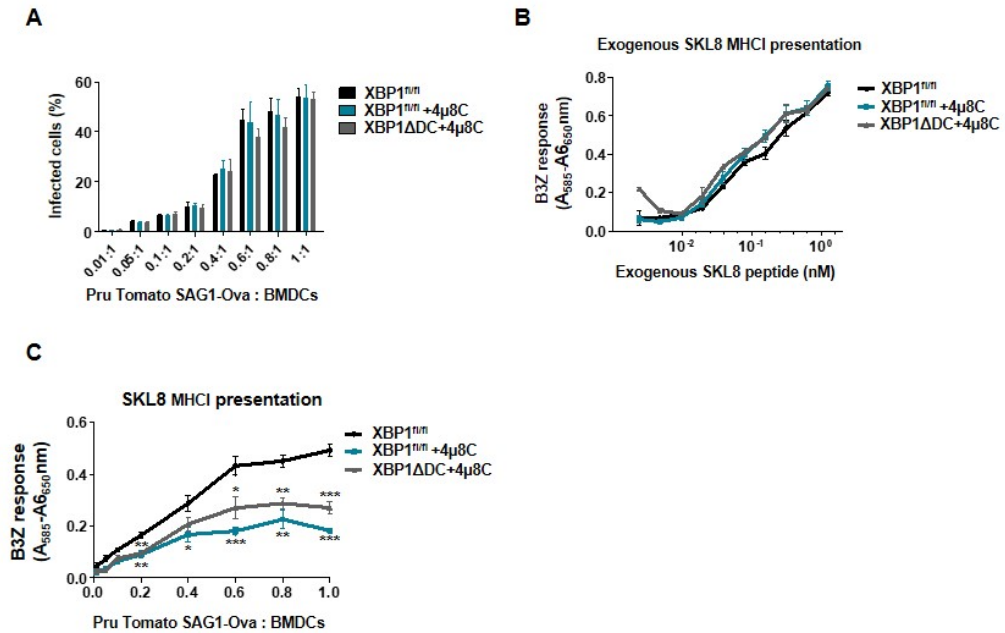
**Figure 43 – Les réponses UPR et cytokinique sont sous le contrôle de la protéine MyD88 dans des BMDCs infectées par *T. gondii*.** A/ Graphique représentant le pourcentage d'infection de BMDCs sauvages et déficientes en MyD88 (MyD88 KO) infectées (n=3). B/ L'expression des gènes cibles de l'UPR dans des BMDCs sauvages ou MyD88 KO incubées avec des parasites Pru ou PruHK pendant 16h a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm et normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh* (n=3-4). C/ Les sécrétions d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23 par des BMDCs sauvages, BMDCs MyD88 KO non infectées ou incubées avec des parasites Pru ou PruHK pendant 16h ont été mesurées par ELISA (n=4-6). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001; mean ± S.E.M.

sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 est sous le contrôle de l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  médiée par MyD88 et que les parasites peuvent également réguler de manière active les voies PERK et ATF6 de la réponse UPR. En revanche, la production d'IL-23 nécessite une invasion active de parasites vivants, est indépendante de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s et ne dépend que partiellement de la signalisation MyD88.



### 2.3 La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s régule la présentation antigénique croisée d'antigènes sécrétés par le parasite

Plusieurs études ont montré l'implication de la voie IRE1 $\alpha$  dans la régulation de la présentation antigénique par le CMH-I dans des BMDCs que se soit à l'état basal ou lors de leur activation (Cubillos-Ruiz *et al.* 2015; Osorio *et al.* 2014). Cependant, l'activation de l'axe IRE1 $\alpha$ /XBP1s peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur l'activation des LTs en fonction de la nature de la stimulation et de l'antigène. En effet, dans des BMDCs stimulées par des antigènes tumoraux, le renforcement de l'expression d'XBP1s améliore la présentation croisée et le priming des LTs CD8<sup>+</sup> (Y. Zhang *et al.* 2015). De même, l'inhibition de la voie IRE1 $\alpha$  dans des BMDCs entraîne une réduction de la présentation antigénique croisée d'antigènes de mélanome aux LTs CD8<sup>+</sup> mais n'a aucun impact sur la présentation antigénique par le CMH-II (Medel *et al.* 2019). Jusqu'à présent, la question de l'implication de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la présentation antigénique par le CMH-I n'a pas été abordée dans le contexte de BMDCs infectées par un pathogène intracellulaire obligatoire. Pour répondre à cette question, nous avons infecté des BMDCs avec des parasites Pru exprimant l'antigène soluble OVA (Pru Tomato SAG1-Ova), qui est sécrété dans l'espace vacuolaire de la VP. Nous avons utilisé des hybridomes de LTs CD8<sup>+</sup> (B3Z) reconnaissant spécifiquement le peptide OVA SIINFEKL (SKL8) présenté par la molécule H-2K<sup>b</sup> pour évaluer la capacité des BMDCs à présenter un peptide sécrété par *T. gondii* par le CMH-I. Étant donné que l'expression de la protéine IRE1 $\alpha$  n'est pas totalement abrogée dans les BMDCs XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC différenciées en présence de GM-CSF (Figure 38 page 110), nous avons traité des BMDCs contrôles XBP1<sup>fl/fl</sup> et des BMDCs XBP1 $\Delta$ DC avec la molécule 4 $\mu$ 8C, un inhibiteur sélectif du domaine endoribonucléasique d'IRE1 $\alpha$ . L'inhibition d'IRE1 $\alpha$  entraîne une diminution prononcée de la présentation du peptide SKL8 dans les BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup> et XBP1 $\Delta$ DC traitées avec le 4 $\mu$ 8C et infectées par des parasites Pru (Figure C 44 page ci-contre). Ce défaut n'est pas dû à une infection parasitaire altérée (Figure A 44 page suivante) ni à une expression réduite de la molécule de surface CMH-I, puisque la présentation du peptide SKL8 exogène n'est pas perturbée lors du traitement par la molécule 4 $\mu$ 8C (Figure B 44 page ci-contre). En conclusion, nos données indiquent que l'activation de la protéine IRE1 $\alpha$  dans les BMDCs stimule le priming des LTs CD8<sup>+</sup> par les antigènes sécrétés par *T. gondii*.



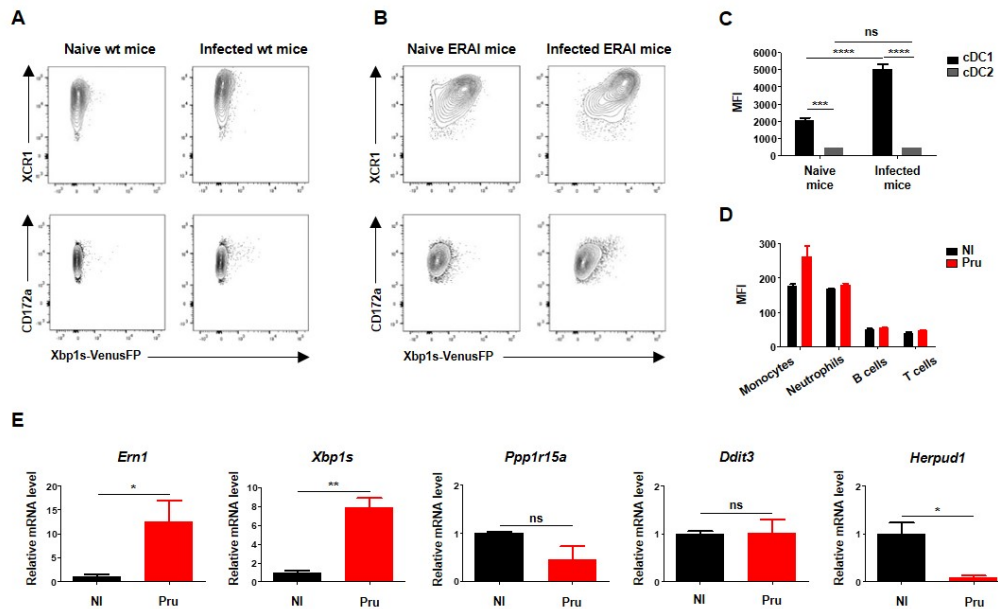
**Figure 44 – La voie IRE1 $\alpha$  améliore la présentation antigénique par le CMH-I d'antigènes sécrétés par *T. gondii*.** A/ Graphique représentant le pourcentage d'infection des BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup> et des BMDCs XBP1 $\Delta$ DC infectées par des parasites Pru pendant 16h, traitées ou non avec l'inhibiteur 4 $\mu$ 8C (n=3). B/ Présentation par le CMH-I du peptique synthétique SKL8 exogène par des BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup> et des BMDCs XBP1 $\Delta$ DC traitées ou non avec le 4 $\mu$ 8C détectée par les hybridomes B3Z (n=3). C/ Présentation par le CMH-I du peptique SKL8 sécrété par le parasite par des BMDCs XBP1<sup>fl/fl</sup> et des BMDCs XBP1 $\Delta$ DC infectées et traitées ou non avec du 4 $\mu$ 8C. L'infection a été effectuée à différentes MOI et la présentation antigénique a été détectée avec les hybridomes B3Z. Unpaired Student T-test \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; mean  $\pm$  S.E.M (n=3).

### 3 Impact de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans l'infection *in vivo*

#### 3.1 La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s est stimulée dans les cDC1s spléniques au cours de l'infection

Pour évaluer si la voie IRE1 $\alpha$  est activée chez la souris lors d'une infection par *T. gondii*, nous avons utilisé des souris ERAI génétiquement modifiées qui ont le gène *Xbp1* fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente Venus (VenusFP) (Iwawaki *et al.* 2003). Ainsi, la détection du signal VenusFP dans les cellules permet de mettre en évidence l'épissage du transcrit *Xbp1* (*Xbp1s*). Précédemment, il a été démontré que la voie IRE1 $\alpha$  et le facteur

de transcription XBP1s était préférentiellement induit dans les cDC1s spléniques à l'état basal par rapport aux cDC2s et aux pDCs (Osorio *et al.* 2014; Tavernier *et al.* 2017).



**Figure 45 – Activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les cDC1s des souris infectées par *T. gondii*.** A-B/ Expression du signal VenusFP par les cDC1s (CD11c+ CMH-II+ XCR1+ CD172a-) et les cDC2s (CD11c+ CMH-II+ XCR1- CD172a+) spléniques dans des souris sauvages (A) et ERAI (B) non infectées ou infectées avec 1000 parasites Pru pendant 6 jours. C/ Graphique illustrant l'intensité moyenne de fluorescence mesurée pour les souris ERAI non infectées ou infectées. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001; mean  $\pm$  S.E.M (n=5 souris par condition). D/ Graphique illustrant l'intensité moyenne de fluorescence mesurée dans les monocytes, neutrophiles, LBs, LTs de la rate de souris ERAI non infectées ou infectées. Mean  $\pm$  S.E.M. E/ Analyse par RT-qPCR de la quantité relative de transcrite des gènes cibles de la réponse UPR dans les cDC1s spléniques purifiées après tri par cytométrie en flux de splénocytes provenant de souris sauvages non infectées ou infectées avec 1000 parasites pendant 6 jours. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm et normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh*. Unpaired Student T-test ns p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01; mean  $\pm$  S.E.M (n=3-4).

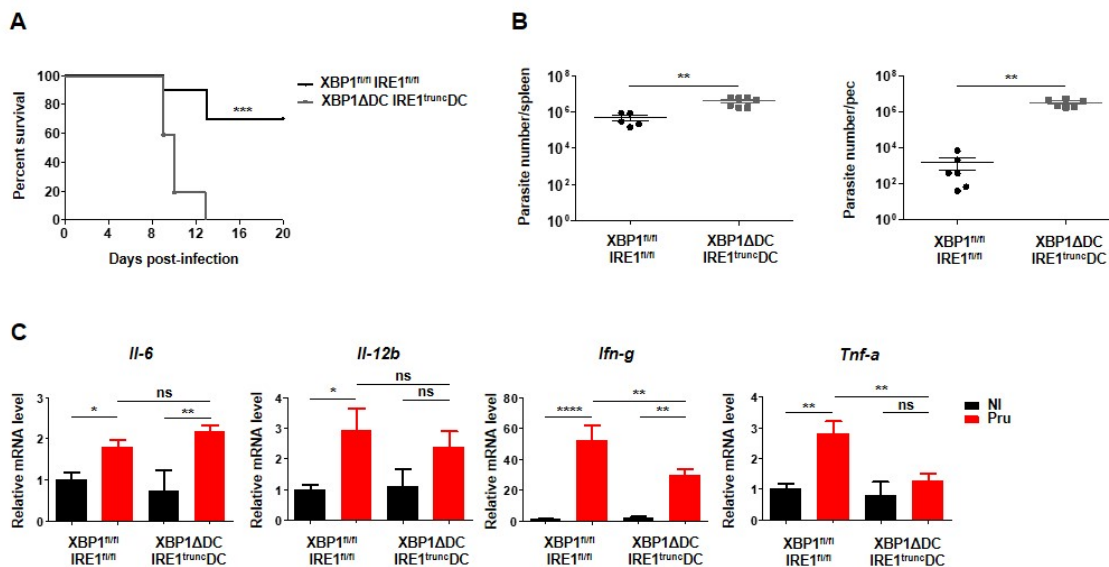
Des souris ERAI et sauvages ont été infectées avec des parasites Pru et les différentes sous-populations de DCs spléniques ont été analysées 6 jours après infection par cytométrie en flux. En accord avec les données obtenues précédemment, un signal VenusFP positif a été détecté à l'état basal dans les cDC1s (CD11c<sup>hi</sup>/CMH-II<sup>hi</sup>/XCR1+/CD172a-) mais pas dans les cDC2s (CD11c<sup>hi</sup>/CMH-II<sup>hi</sup>/XCR1-/CD172a+) dans les souris ERAI non infectées (Figure A-B 45). Lors de l'infection, le signal VenusFP augmente considérablement dans les cDC1s alors qu'il est inchangé dans la population cDC2 (Figure B-C 45), ce qui indique

que l'activation d'IRE1 $\alpha$  et l'expression en aval de la protéine XBP1s sont limitées aux cDC1s. De plus, nous n'avons pas observé d'induction significative du signal VenusFP dans les neutrophiles, monocytes, LBs et LTs spléniques, ce qui suggère que l'UPR contribue à la régulation des fonctions des cDC1s spléniques lors de l'infection (Figure D 45 page précédente). Pour confirmer les résultats que nous avons obtenus avec les souris ERAI, nous avons purifié par tri en cytométrie en flux les cDC1s spléniques de souris C57BL/6 sauvages infectées durant 6 jours et examiné l'induction de la réponse UPR en quantifiant, par RT-qPCR, le taux de transcrits de différents gènes induits lors de la réponse UPR. Une forte augmentation de la quantité des transcrits *Ern1* (codant pour la protéine IRE1 $\alpha$ ) et *Xbp1s* ainsi qu'une diminution de la quantité du transcrit *Herpud1* (voie ATF6) a été observée (Figure E 45 page ci-contre). En revanche, pour la voie PERK, aucune modulation de la quantité de transcrits n'a été observée pour *Ppp1r15a* (codant pour GADD34) et *Ddit3* (codant pour CHOP) (Figure E 45 page précédente). Tous ces résultats reflètent donc ceux obtenus dans les BMDCs infectées et suggèrent que l'induction de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s pourrait être impliquée dans la régulation des fonctions des cDC1s spléniques lors de l'infection par *T. gondii*.

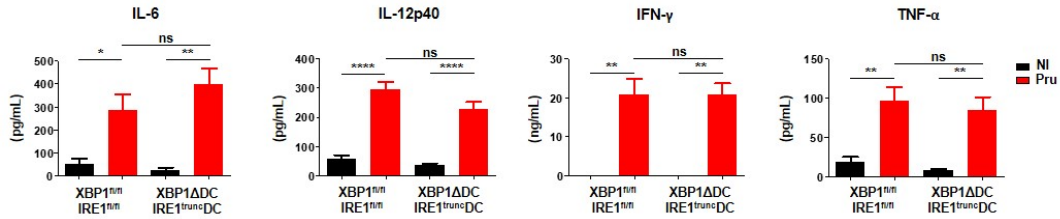
### 3.2 L'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s joue un rôle protecteur essentiel contre l'infection à *T. gondii*

Afin de déterminer la contribution de l'activation spécifique d'IRE1 $\alpha$  dans les DCs lors d'une infection par *T. gondii*, nous avons déterminé le taux de survie des souris contrôles (XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup>) par rapport aux souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées par i.p avec des parasites Pru. Nos données ont montré que les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC présentent une très forte susceptibilité à l'infection par rapport aux souris contrôles et succombent entre 9 et 12 jours après l'infection (Figure A 46 page suivante). Ce résultat indique donc que l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  dans les DCs joue un rôle protecteur essentiel contre l'infection aiguë à *T. gondii*. Pour mieux comprendre les processus conduisant à la mort précoce des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC, nous avons isolé la rate et collecté le PEC de souris, 6 jours après infection, et analysé la charge parasitaire par qPCR. Nous avons observé une augmentation significative de la charge parasitaire dans la rate et la cavité intra-péritonéale chez les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC par rapport aux souris contrôles, indiquant donc une augmentation de la prolifération des parasites (Figure B 46 page suivante). Ainsi, l'absence d'activation d'IRE1 $\alpha$  et d'XBP1s dans les DCs altère le contrôle de l'infection, suggérant un défaut dans l'établissement de la réponse Th1. En accord avec cette hypothèse, une diminution significative de la quantité de transcrits *Ifn-g* a été observée dans la rate de souris infectées XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC par rapport aux souris contrôles suggérant un défaut d'activation des LTs (Figure C 46 page suivante).

De plus, nous n'avons détecté aucun changement significatif de la quantité de transcrits *Il-6* et *Il-12* mais une diminution significative de la quantité de transcrits *Tnf-a*. De même, nous n'avons pas détecté de différences dans la concentration des cytokines IL-6, IL-12p40, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans le sérum des souris infectées XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC par rapport aux souris contrôles (Figure 47 page suivante). Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la charge parasitaire n'est pas corrélée à un choc cytokinique qui tuerait les souris après une hyper inflammation et une destruction des tissus causée par la prolifération accrue des parasites. Cela suggère également que chez les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC, la réponse Th1 réduite n'est pas une conséquence d'un défaut majeur de sécrétion d'IL-12 mais est probablement liée à une dérégulation fonctionnelle des cDC1s spléniques entravant l'activation des LTs CD8+.



**Figure 46 – La voie IRE1 $\alpha$  protège l'hôte de l'infection aiguë.** A/ Courbe de survie des souris contrôles (XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup>) et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées avec 500 parasites Pru en i.p. Log-rank (Mantel-Cox) test,  $p=0,0004$  ( $n=10$  souris par condition). B/ Nombre de parasites par rate ou PEC dans les souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées avec 500 parasites Pru en i.p. Unpaired Student T-test \*\*  $p<0,01$ ; mean  $\pm$  S.E.M ( $n=6-7$  souris par condition). C/ Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *IL-6*, *IL-12*, *Ifn-g* et *Tnf-a* dans la rate de souris contrôle et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC non infectées ou infectées avec 500 parasites Pru pendant 6 jours. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm comparés aux souris non infectées et normalisés en fonction du gène de ménage *Gapdh*. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns  $p>0,05$ ; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ; mean  $\pm$  S.E.M ( $n=4-7$  souris par condition).



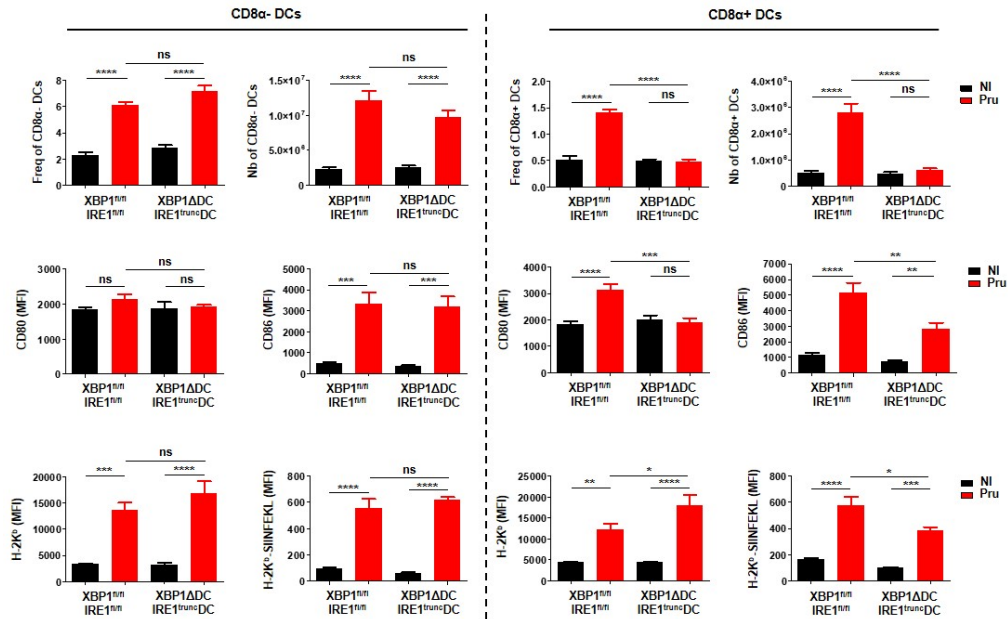
**Figure 47 – L’inhibition de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les DCs ne module pas la concentration en cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des souris infectées.** Évaluation de la concentration des cytokines IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans le sérum des souris contrôles (XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup>) et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> non infectées ou infectées avec 500 parasites Pru pendant 6 jours par CBA et ELISA. Two-way ANOVA Tukey’s multiple comparisons ns p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001; mean  $\pm$  S.E.M (n=4-7 souris par condition).

### 3.3 La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s module l’activité des DCs CD8 $\alpha$ + et LTs lors de l’infection par *T. gondii*

Afin de déterminer l’impact de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la population des DCs et LTs spléniques, nous avons infecté des souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> avec des parasites Pru et nous avons examiné la fréquence et l’activation des DCs CD8 $\alpha$ -/+ et des LTs CD4+ et LTs CD8+ par cytométrie en flux.

Tout d’abord, nous avons pu constater que la fréquence et le nombre de DCs CD8 $\alpha$ - augmentent durant l’infection et ceci de manière similaire entre les souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées. Une augmentation des DCs CD8 $\alpha$ + est également observée dans des souris contrôles lors d’une infection. Cependant cette augmentation n’est pas observée dans les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> (Figure 48 page suivante). De plus, de manière similaire à nos collaborateurs (Osorio *et al.* 2014), nous n’avons pas observé de défaut dans le nombre de DCs CD8 $\alpha$ + à l’état basal dans la rate. Ce résultat pourrait suggérer un défaut de migration des DCs CD8 $\alpha$ + vers la rate en absence d’activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s ou bien que cette voie soit essentielle à la survie des cDC1s après stimulation par des composants microbiens comme précédemment montré (Iwasaki *et al.* 2010). De plus, nous avons remarqué que l’expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 est identique dans les DCs CD8 $\alpha$ - issus de souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées alors que les DCs CD8 $\alpha$ + de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> montrent une diminution de l’expression de ces deux molécules (Figure 48 page suivante). La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s pourrait donc être impliquée dans l’activation des DCs CD8 $\alpha$ + spléniques durant l’infection. Pour finir, nous avons évalué si les DCs étaient capables de présenter le peptide SIINFEKL sécrété par le parasite Pru Tomato SAG1 Ova. L’expression de H-2K<sup>b</sup> et du complexe H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL est identique dans les DCs CD8 $\alpha$ - chez les deux



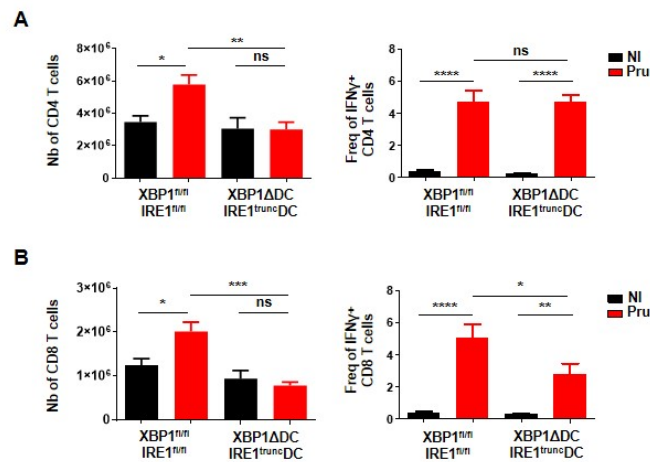


**Figure 48 – La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s impacte les DCs CD8 $\alpha$ + dans les souris infectées.** Etude de la fréquence et du nombre de DCs CD8 $\alpha$ - et CD8 $\alpha$ + dans la rate des souris contrôles (XBP1<sup>fl/fl</sup>IRE1<sup>fl/fl</sup>) et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées pendant 6 jours ainsi que leur expression des molécules CD80, CD86, H-2K<sup>b</sup> et du complexe H-2K<sup>b</sup>-OVA. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001;\*\*\*\* p<0,0001; mean  $\pm$  S.E.M (n=7 souris par condition).

génotypes murins (Figure 48). Cependant, pour les DCs CD8 $\alpha$ +, nos résultats préliminaires semblent indiquer une diminution du complexe H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL dans les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées sans que celle-ci soit corrélée à une perturbation de l'expression du H-2K<sup>b</sup> (Figure 48). Pour conclure, ces résultats démontrent que la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s a un impact important sur le nombre de DCs CD8 $\alpha$ + dans la rate après infection et semblerait aussi impliquée dans leur maturation et leur activité de présentation antigénique.

Ces altérations des DCs CD8 $\alpha$ + devrait avoir un impact sur la réponse T CD8+ induite lors d'une infection par *T. gondii*. Par conséquent, nous avons quantifié le nombre et l'activation des LTs CD4+ et LTs CD8+ spléniques dans les souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées. Nous avons vérifié l'augmentation du nombre de LTs CD4+ et LTs CD8+ ainsi que leur activation dans les rates de souris contrôles infectées (Figure A et B 49 page ci-contre). À l'inverse, nous avons constaté une diminution du nombre de LTs CD8+ et de leur activation dans les rates de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>truncDC</sup> infectées (Figure B 49 page suivante) montrant l'importance de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice médiée par les LTs CD8+. Néanmoins,

nous constatons également une diminution du nombre de LTs CD4<sup>+</sup> dans les rates de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées mais les LTs CD4<sup>+</sup> présents sont activés de façon similaire dans les deux types de souris suggérant que la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s n'impacte pas la présentation antigénique par le CMH-II durant l'infection (Figure A 49). Plus généralement, la diminution du nombre de LTs pourrait s'expliquer par une mort cellulaire induite par le parasite comme précédemment démontré (Kugler *et al.* 2016) et celle-ci serait plus précoce pour les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC due à la charge parasitaire plus élevée à 6 jours post-infection. Il serait donc important de vérifier cette hypothèse à un temps d'infection plus précoce (J3).



**Figure 49 – La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s impacte les LTs dans les souris infectées.** Etude du nombre de LTs CD4<sup>+</sup> (A) et LTs CD8<sup>+</sup> (B), ainsi que leur activation détectée par leur production d'IFN- $\gamma$  dans la rate des souris contrôles et XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées pendant 6 jours. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001; mean  $\pm$  S.E.M (n=7 souris par condition).

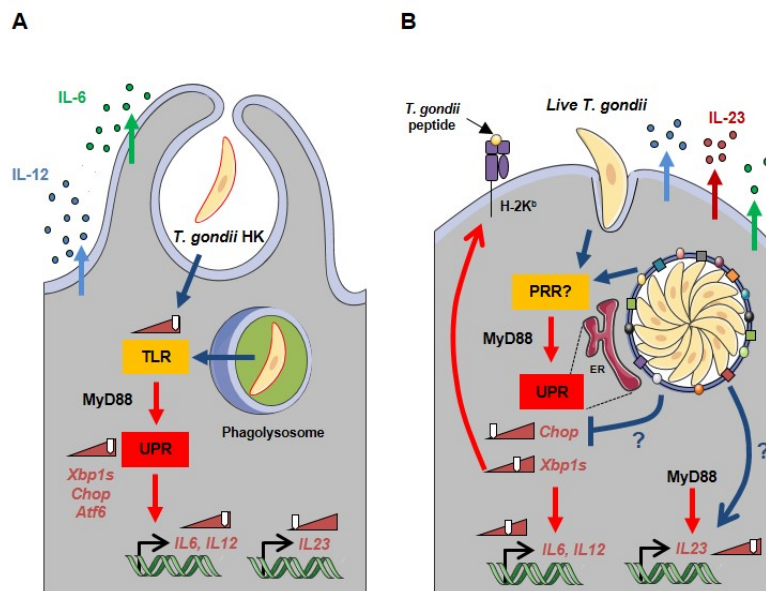
Cette étude cellulaire nous a permis de montrer que la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s contrôle les DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et par conséquent l'activation des LTs CD8<sup>+</sup> spécifiques de *T. gondii*.

## 4 Modèle

Pour conclure, notre étude nous permet de proposer un nouveau modèle de travail (Figure 50 page suivante). La stimulation de BMDCs avec des parasites HK induit l'activation des TLRs qui stimulent les trois voies de la réponse UPR de façon dépendante de MyD88. La voie IRE1 $\alpha$  stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 pour induire une réponse pro-inflammatoire. À l'inverse, l'infection de BMDCs par des parasites vivants pourrait entraîner une plus faible stimulation des TLRs étant donné que le parasite réside dans une VP à l'abri des



capteurs de la cellule hôte. Cependant, le parasite pourrait également réguler négativement la réponse UPR, comme le suggère l'inhibition de la voie ATF6 par les parasites vivants de type II (Figure 34 page 105). Après infection, seule la voie IRE1 $\alpha$ /Xbp1s est activée et ceci de manière dépendante de MyD88 et stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12. Cette voie favorise également la présentation, par le CMH-I, d'antigènes sécrétés par le parasite. La sécrétion d'IL-23 n'est que partiellement dépendante de MyD88 et n'est pas modulée par IRE1 $\alpha$  et CHOP. De ce fait, les facteurs de virulence parasitaires pourraient jouer un rôle dans l'induction de la sécrétion de l'IL-23. Alternativement, l'IL-23 pourrait être induit par des mécanismes (souche-spécifiques) de détection de composants parasitaires indépendants de MyD88.



**Figure 50 – Schéma hypothétique de la modulation de la réponse UPR et de son rôle dans les BMDCs infectées par *T. gondii*.** A/ Après la stimulation de BMDCs avec des parasites de type II HK, les TLRs sont activés et induisent l'activation des trois voies de la réponse UPR de façon dépendante de la voie MyD88. La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 par les BMDCs. B/ L'infection par des parasites de type II vivants entraîne une plus faible activation de la voie IRE1 $\alpha$  de manière dépendante de MyD88, alors que la voie PERK n'est pas induite et la voie ATF6 est régulée négativement. La voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s stimule la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 et favorise la présentation, par le CMH-I, d'antigènes sécrétés par le parasite. La sécrétion d'IL-23 est indépendante de l'UPR mais dépend en partie d'une voie de signalisation impliquant MyD88 et possiblement des effecteurs de *T. gondii*. Les flèches bleues indiquent les modulations induites par le parasite et les flèches rouges montrent les conséquences de l'induction de ces voies.

## Discussion et perspectives



# Discussion et perspectives

L'objectif de cette thèse avait pour but de déterminer si l'infection par *T. gondii* induit la réponse UPR dans les DCs et si un lien fonctionnel existe entre l'induction d'une réponse au stress du RE et la régulation des activités de sécrétion cytokinique et de présentation antigénique des DCs infectées. Les différents résultats obtenus ont permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la régulation des fonctions des DCs infectées par *T. gondii* et le contrôle de l'infection.

## Rôle du recrutement du hRE à la VP

*T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire capable d'envahir toutes les cellules nucléées dans lesquelles le parasite se réplique rapidement dans une vacuole. Pour permettre le détournement des nutriments de l'hôte et un échappement efficace face aux défenses cellulaires, *T. gondii* sécrète un véritable arsenal d'effecteurs parasitaires capables de moduler les voies de signalisation des cellules hôtes (Hakimi *et al.* 2017). Notamment, des effecteurs parasitaires ancrés à la MVP favorisent le recrutement d'organites de l'hôte, probablement pour stimuler l'absorption de lipides nécessaires aux divisions successives de ce parasite. *T. gondii* stimule le recrutement des mitochondries (Pernas *et al.* 2014, 2018), des fragments de Golgi (Deffieu *et al.* 2019), des endosomes (Romano *et al.* 2017) et du hRE (Goldszmid *et al.* 2009; Sinai *et al.* 1997). Actuellement, aucune information est connue sur l'impact de ce processus sur l'homéostasie des organites. Cependant, il est probable que des mécanismes spécifiques détectent des changements dans la structure et les fonctions de ces organites, entraînant la stimulation de voies de signalisation spécifiques. D'ailleurs, il a été montré que la réponse transcriptionnelle des cellules hôtes était modifiée en absence du recrutement des mitochondries à la VP. En effet, l'infection par des parasites déficients en la protéine TgMAF-1 (permettant le recrutement des mitochondries à la VP) par rapport à des parasites sauvages a révélé des modifications majeures de la réponse cytokinique (Pernas *et al.* 2014). Contrairement aux mitochondries et aux vésicules golgiennes, les

effecteurs qui stimulent l'association du hRE à la MVP ne sont pas identifiés. Cependant, une étude a rapporté l'interaction de TgGRA3 avec une protéine transmembranaire du hRE (CAMLG), suggérant que TgGRA3 pourrait contribuer à ce processus (J. Y. Kim *et al.* 2008). En accord avec les données de la littérature, nous avons détecté l'association du hRE avec la VP dans des fibroblastes humains et des BMDCs infectés par des parasites de type II Pru par immunofluorescence. De ce fait, l'identification des effecteurs parasitaires contribuant au recrutement du hRE à la MVP permettrait d'explorer son impact sur la régulation des fonctions du hRE et sur les réponses immunitaires. De manière intéressante, il a été récemment montré qu'une perturbation de l'homéostasie du calcium induite par STING active un stress chronique du RE dans les LTs (Wu *et al.* 2019). Deux études ont montré que l'infection par *T. gondii* induit l'activation de la voie cGAS/STING et par conséquent l'induction de la transcription des gènes *Isg15*, *Ifn-b*, *Il-12a* *in vitro* et *in vivo* (Majumdar *et al.* 2015; P. Wang *et al.* 2019). L'activation de la signalisation cGAS/STING serait induite par l'effecteur parasitaire TgGRA15 directement au niveau du hER. TgGRA15 interagit directement avec STING induisant son activation et le recrutement des molécules TRAF (P. Wang *et al.* 2019). Ainsi, il serait intéressant d'examiner si le recrutement du hRE induit par *T. gondii* active la voie cGAS/STING et la réponse UPR d'une manière dépendante de TgGRA15 ou d'autres effecteurs dans les DCs.

### Modulation de la réponse UPR dans les BMDCs infectées par *T. gondii*

Notre étude aborde pour la première fois l'implication de l'activation de la réponse UPR dans les DCs suite à l'infection par *T. gondii*. Nos résultats démontrent que l'infection de BMDCs par *T. gondii* active la protéine IRE1 $\alpha$  et induit l'expression du facteur de transcription XBP1s ainsi que l'augmentation de la transcription du gène cible d'XBP1s, *Dnajb9* (codant pour la protéine ERdj4). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une réponse UPR classique caractérisée par une augmentation de la transcription des gènes codant pour des chaperons du RE (*Hspa5* codant pour la protéine BiP et *Hsp90b1* codant pour la protéine GRP94), ainsi que l'activation des voies PERK et ATF6. Notamment, nous avons montré une diminution de la transcription des gènes impliqués dans la voie ATF6 dans des BMDCs infectées par la souche de type II, suggérant un rôle actif des effecteurs parasitaires dans la régulation de cette voie. En effet, il a été précédemment rapporté que TgROP18, un effecteur parasitaire ancré à la MVP, phosphoryle la protéine ATF6 $\beta$  de l'hôte entraînant ainsi sa dégradation par le protéasome (M. Yamamoto *et al.* 2011). De plus, des DCs isolées de souris déficientes en ATF6 $\beta$  présentent une altération dans la restimulation de LTs CD8 $^+$  sensibilisés, ce qui suggère un rôle d'ATF6 $\beta$  dans la présentation antigénique par le CMH-I (M. Yamamoto *et al.* 2011). Nos résultats in-

diquent donc que *T. gondii* cible également cette voie au niveau transcriptionnel par des mécanismes encore non caractérisés et dépendants de la souche utilisée puisque nous avons constaté une activation transcriptionnelle de la voie ATF6 dans les BMDCs infectées par une souche de type I ou des parasites HK. Cela suggère que les facteurs de virulence impliqués dans la modulation de la réponse UPR seraient spécifiques des souches de *T. gondii*. De même, l'expression de gènes impliqués dans la voie PERK et des gènes codant pour les chaperons classiques du RE (BiP, GRP94 et Sec61) est fortement induite dans des BMDCs incubées avec des parasites HK mais pas lors d'une infection par des parasites vivants. Cependant l'expression de *Ppp1r15a* (codant pour la protéine GADD34) est induite par des parasites vivants de manière indépendante des voies PERK et MyD88. Il a déjà été démontré que la protéine GADD34 peut être induite de manière dépendante de TRIF dans les DCs activées par du poly(I:C) (Clavarino *et al.* 2012a) ou de manière indépendante de la stimulation des PRRs suite à une dérégulation de l'homéostasie de l'appareil de Golgi (Krokowski *et al.* 2017). Par conséquent, la protéine GADD34 pourrait être induite à la suite de modifications majeures du trafic vésiculaire de l'hôte et/ou dépendante de la signalisation TRIF déclenchée après l'invasion parasitaire. Il serait également important de déterminer si GADD34, comme XBP1, contribue à la production cytokinique dans les DCs infectées.

La manipulation de la réponse UPR a été plus largement étudiée lors d'infections virales. Par exemple, le virus de la dengue est capable d'inhiber la voie PERK afin de maintenir la traduction des protéines virales par eIF2 $\alpha$  et d'éviter l'apoptose de la cellule hôte mais active les voies IRE1 et ATF6 pour renforcer sa capacité d'adaptation au stress notamment grâce à la protéine d'enveloppe virale DENV E (Pena *et al.* 2011; Smith 2018). Ainsi, une caractérisation plus poussée de la réponse UPR induite dans les DCs infectées par des parasites déficients en certains effecteurs parasitaires ou pour le translocon TgMYR1 qui assure l'export des protéines de GRAs (Franco *et al.* 2016; Naor *et al.* 2018; Panas *et al.* 2019), permettrait d'identifier des mécanismes par lesquels le parasite module les trois voies de l'UPR. Nos résultats préliminaires montrent que les BMDCs infectées par une souche de type II déficiente en TgMYR1 ne présentent pas d'augmentation de la transcription de *Xbp1s* mais une augmentation de celle de *Ddit3* (codant pour CHOP) comparé aux BMDCs infectées par une souche de type II sauvage. Il se pourrait donc que le parasite stimule la voie IRE1 $\alpha$  et inhibe la voie PERK. Ces premières informations suggèrent l'importance des effecteurs parasitaires dans la modulation de la réponse UPR.

## Implication des PRRs dans la modulation de la réponse UPR dans les BMDCs infectées par *T. gondii*

Au cours de la dernière décennie, la réponse UPR a été rapportée comme étant un régulateur crucial des réponses immunitaires grâce à la modulation de la production de cytokines (Smith 2018). Contrairement à la stimulation de PRRs isolés, l'activation de PRRs dans des cellules soumises à un stress du RE entraîne un effet synergique augmentant la production de certaines cytokines. Dans notre étude, nous avons démontré que les parasites HK activent les 3 voies de l'UPR dans les DCs. En utilisant des BMDCs provenant de souris déficientes en MyD88 stimulées par des parasites HK, nous avons démontré que cette réponse UPR dépend de la détection de composés microbiens de *T. gondii* par les PRRs. Une étude antérieure avait indiqué que la stimulation des macrophages par les TLR2 et TLR4 active l'induction des protéines IRE1 $\alpha$  et XBP1s via l'axe TRAF6/NOX2 et non par les voies ATF6 et PERK (Martinon *et al.* 2010). Une hypothèse serait que ces différences pourraient provenir de la nature des PRRs stimulés et de la cellule immunitaire étudiée. En effet, contrairement aux macrophages, le TLR4 ne serait pas impliqué dans la détection de *T. gondii* par les DCs (Scanga *et al.* 2002). Par ailleurs, les réponses des DCs murines suite à une infection, et particulièrement la sécrétion d'IL-12, dépendent de la détection de la protéine parasitaire TgPRF par les TLR11 et TLR12 (Koblansky *et al.* 2013; Plattner *et al.* 2008; Yarovinsky *et al.* 2005). En plus des TLR11 et TLR12, il est probable que la phagocytose des parasites HK par les DCs stimule d'autres TLRs endosomaux (notamment les TLR7 et TLR9) après la fusion des endosomes/lysosomes tardifs avec le phagosome (Tosh *et al.* 2015). Enfin, les PRRs cytosoliques pourraient être impliqués dans la détection de PAMPs de *T. gondii* après déstabilisation de la membrane du phagosome et une fuite d'antigènes (Pauwels *et al.* 2017). De ce fait, il serait intéressant d'étudier la réponse UPR au sein de BMDCs déficientes en certains PRRs, comme les TLR11 et TLR12, mais également pour les molécules TRIF et TRAF6 afin d'identifier les PRRs responsables de l'activation des différentes voies de la réponse UPR après incubation des BMDCs avec des parasites vivants ou HK.

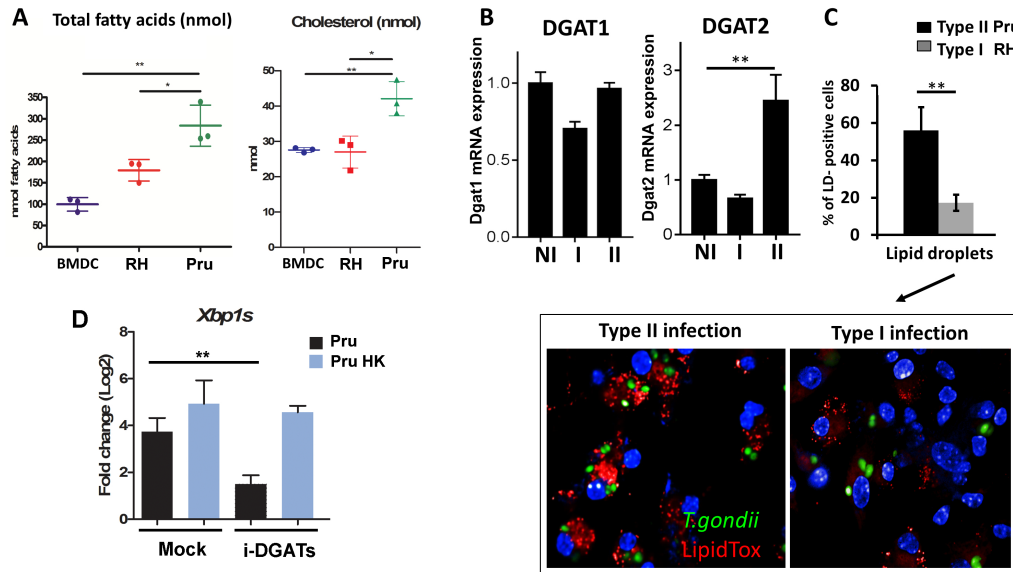
Les mécanismes de détection innée du parasite résidant dans une vacuole ne sont pas encore complètement élucidés, seule l'implication des TLR11 et TLR12 ayant été montrée (Poncet *et al.* 2019). Cependant, les IRGs et des composés de l'autophagie sont recrutés à la MVP des parasites de type II dans les DCs et provoquent des dommages partiels de la VP (Y. Lee *et al.* 2015). Ce processus favoriserait la fuite d'antigènes vers le cytosol qui pourraient donc être détectés par les PRRs cytosoliques. Inversement, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  pourrait stimuler ces PRRs. Par exemple, un axe de signalisation IRE1 $\alpha$ /RIDD/RIG-I implique le RE dans l'activation des récepteurs de type RLR (Lencer *et al.* 2015). Par ailleurs, les dommages mitochondriaux liés à la réponse UPR et la libéra-

tion d'ADN mitochondrial peuvent également jouer un rôle dans l'activation du capteur cytosolique STING (Majumdar *et al.* 2015; P. Wang *et al.* 2019; West *et al.* 2015). Dans notre étude, nous avons démontré que la réponse UPR produite par des parasites vivants dans les BMDCs est sous la dépendance de la voie MyD88. Ce résultat montre l'importance de la détection de composés parasitaires dans l'induction de la réponse UPR après l'infection par des parasites vivants. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires afin d'identifier d'autres mécanismes putatifs d'induction de la réponse UPR ou d'autres réponses dépendantes de l'UPR distinctes de celles examinées dans notre étude, en particulier la sécrétion des IFN-I. De manière générale, il est probable que les mécanismes de détection innée de composés microbiens, ainsi que les variations de l'homéostasie cellulaire induits par un agent pathogène intracellulaire, régulent de manière synergique le type de réponse UPR induite, ce qui permettrait un ajustement précis des réponses immunitaires innées. En particulier, la réponse UPR est intimement liée aux changements métaboliques cellulaires et notamment à la modulation de la glycolyse, la production de ROS ou un excès d'acides gras (Mogilenko *et al.* 2019; Pearce *et al.* 2014). Lors d'une collaboration avec les laboratoires des docteurs Dombrowicz (IPL, Lille) et Botté (IAB, Grenoble), nous avons observé dans les BMDCs infectées que les parasites de type II (mais pas de type I) induisent une augmentation de la quantité d'acides gras, de cholestérol et de gouttelettes lipidiques (Figure A et C 51 page suivante). De plus, l'expression du transcrit codant pour l'enzyme DGAT2 (mais pas DGAT1) responsable de la dernière étape de la formation des gouttelettes lipidiques est spécifiquement induite lors d'une infection par des parasites de type II (Figure B 51 page suivante). De manière intéressante, l'induction d'XBP1s est réduite dans les BMDCs traitées par un inhibiteur de DGAT2, uniquement pour les parasites vivants (Figure D 51 page suivante). Aux vues de ces résultats préliminaires, il serait donc intéressant d'étudier si la modulation du métabolisme lipidique de l'hôte par le parasite contribue de manière synergique avec les PRRs à l'induction de la voie IRE1 $\alpha$  lors de l'infection par des parasites vivants.

### **Rôle de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la sécrétion cytokinique des BMDCs infectées.**

Une étude précédente a montré que dans les macrophages stimulés par les TLR2 et TLR4, l'activation d'XBP1s induite par la protéine IRE1 $\alpha$  favorise la production de médiateurs inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Martinon *et al.* 2010). Dans notre étude, nous avons constaté que l'induction d'XBP1s induite par IRE1 $\alpha$  contribue à la production d'IL-6 et d'IL-12 (mais pas d'IL-23) dans des BMDCs infectées par une souche de type II. De plus, il a été démontré que la production d'IL-23 est sous le contrôle du facteur de transcription CHOP dans des DCs stimulées par des TLRs et un stress métabolique (Mogilenko *et al.* 2019).





**Figure 51 – L’augmentation du métabolisme lipidique est associée à la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans des BMDCs infectées par *T. gondii*.** A/ Concentration totale en acides gras et en cholestérol (nmol) mesurée par spectrométrie de masse dans des extraits cellulaires provenant de BMDCs non infectées ou infectées par des souches de type I (RH) ou de type II (Pru). T-test; \* p < 0,005; \*\* p < 0,01; mean  $\pm$  s.d. (n=3). B/ L’expression des gènes *Dgat1* et *Dgat2* dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites de type I ou de type II a été analysée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en quantité relative d’ARNm comparé aux BMDCs non infectées (NI). T-test; \*\* p < 0,01, mean  $\pm$  SEM. (n=3). C/ Pourcentage de BMDCs positives pour le marquage de gouttelettes lipidiques (coloration LipidTox en rouge) après infection par une souche de type I ou de type II (en vert). T-test; \*\* p < 0,01, mean  $\pm$  SEM. (n=3). D/ L’expression du gène *Xbp1s* dans des BMDCs infectées pendant 16h par des parasites Pru ou PruHK traitées ou non avec un inhibiteur des enzymes DGAT1-2 a été analysée par RT-qPCR en comparaison aux BMDCs non infectées (Fold change Log2). T-test; \*\* p < 0,01, moyenne  $\pm$  SEM. (n=3).

Dans notre étude, le facteur de transcription CHOP n’est pas induit dans les BMDCs infectées par *T. gondii* et la production d’IL-23 n’est pas affectée dans les BMDCs déficientes en IRE1 $\alpha$ /XBP1, ce qui suggère que l’induction de la sécrétion d’IL-23 lors d’une infection par une souche de type II est indépendante des facteurs de transcription XBP1s et CHOP. Cependant, il nous reste à tester si GADD34 pourrait être impliqué dans cette sécrétion. Contrairement à l’IL-6 et à l’IL-12, la sécrétion d’IL-23 par les BMDCs nécessite une invasion active des cellules par des parasites vivants, suggérant que des voies de détection innées distinctes contribuent à l’induction de ces différentes cytokines. En particulier, nous avons constaté qu’une partie de la sécrétion d’IL-23 est indépendante de l’adaptateur MyD88. Ainsi, les parasites pourraient sécréter des effecteurs qui réguleraient positivement

l'expression du gène *Il-23*. En outre, dans les DCs activées par les TLRs, la production d'IL-23 dépendante de l'UPR ne serait induite que par un effet synergique de stress cellulaires tels que des excès en acides gras, une inhibition de la glycolyse et la production de ROS mitochondriaux (Mogilenko *et al.* 2019). Par conséquent, il est également possible que la sécrétion d'IL-23 dans les BMDCs infectées soit partiellement liée à la reprogrammation métabolique des DCs lors de l'infection. Alors que l'IL-23 favorise les réponses Th17 et Th22, le rôle de cette cytokine au cours d'une infection par *T. gondii* reste controversé. Une première étude a montré que l'IL-23 permet une résistance limitée à l'infection aiguë (Lieberman *et al.* 2004), tandis qu'une deuxième démontre qu'une augmentation en IL-22 (dépendante de l'IL-23) est essentielle au développement de l'iléite induite par l'infection (Munoz *et al.* 2009). Cependant, une étude contradictoire a quant à elle montré qu'une réponse IL-22 protège les tissus de l'intestin grêle de l'hyper-inflammation lors d'une infection par des parasites de type II (Ryffel *et al.* 2019). Enfin, les macrophages inflammatoires expriment l'IL-23R et peuvent être activés par l'IL-23 pour produire de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-23 (Sun *et al.* 2019). Par conséquent, il est possible que chez des souris infectées par voie orale par des parasites de type II, la production d'IL-23 dans l'intestin puisse faciliter la clairance rapide du parasite pendant la phase aigüe tout en limitant l'inflammation intestinale. Cela serait bénéfique pour les parasites afin d'établir une infection latente.

Par ailleurs, la voie cGAS/STING activée par *T. gondii* induit l'expression d'*Ifnb* et d'*Isg15* (responsable de la production d'IL-1 $\beta$  (Napolitano *et al.* 2018)) *in vivo* (P. Wang *et al.* 2019). Il serait donc intéressant de vérifier la transcription et la sécrétion de ces deux cytokines dans les DCs infectées et déterminer l'implication de la réponse UPR dans cette réponse. Ceci permettrait d'obtenir des informations sur le rôle de la détection d'ADN par la voie cGAS/STING dans l'induction des réponses UPR, cytokinique et anti-parasitaires via les IRGs. De manière plus générale, il serait important de caractériser les relations fonctionnelles entre la stimulation des PRRs et la réponse UPR afin de déterminer leur rôle synergique probable dans la sécrétion cytokinique des DCs infectées.

### **Rôle de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans le contrôle de l'infection *in vivo*.**

De par l'utilisation de souris ERAI, nous avons constaté que la voie IRE1 $\alpha$  est fortement activée dans les DCs spléniques 6 jours après l'infection, mais que cette activation est limitée au sous-ensemble des cDC1s. Aucune activation n'a pu être observée dans d'autres types cellulaires tels que les cDC2s, les neutrophiles, les monocytes, les LBs et LTs. Ces résultats sont en accord avec des conclusions précédentes de nos collaborateurs montrant que l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  est une caractéristique du sous-ensemble cDC1 (Osorio *et al.* 2014). Nos résultats obtenus sur les cDC1s spléniques purifiées et triées provenant de souris

sauvages infectées ont confirmé l'activation de l'expression des transcrits *Ern1* (codant pour IRE1 $\alpha$ ) et *Xbp1s*. De plus, de manière similaire à nos résultats obtenus dans les BMDCs infectées, la transcription du gène *Ddit3* (codant pour CHOP) n'est pas induite lors de l'infection par *T. gondii* alors que la transcription du gène *Herpud1* (cible du facteur de transcription ATF6) est quant à elle diminuée. Ainsi, l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation des fonctions des cDC1s lors de l'infection. Cependant, il faudrait maintenant établir si l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les cDC1s est spécifique de la rate des souris infectées et obtenir une cinétique de l'activation de cette voie. En effet, en utilisant des souris ERAI, il serait intéressant d'examiner l'induction d'XBP1s dans les différentes populations de cellules immunitaires des ganglions mésentériques et de l'intestin à des temps plus précoces d'infection (J3) et suite à une infection orale par des kystes, mais aussi au sein du cerveau à un temps plus tardif correspondant à la mise en place de l'infection chronique. Il est possible d'envisager que la voie IRE1 $\alpha$  ait un effet bénéfique sur la présentation antigénique médiée par le CMH-I au sein d'autres CPAs telles que les astrocytes ou même les neurones comme récemment montré par nos collaborateurs (Salvioni *et al.* 2019).

Contrairement aux cDC2s, les cDC1s effectuent de manière efficace la présentation antigénique croisée par le CMH-I aux LTs CD8 $^+$  ce qui constitue un élément clé pour l'établissement de la réponse Th1 en réponse à une infection par des agents pathogènes intracellulaires, y compris *T. gondii*. Dans des BMDCs infectées par *T. gondii*, il a déjà été rapporté que la présentation, par le CMH-I, d'antigènes parasitaires sécrétés dépendait du recrutement du hRE et de ses composants au niveau de la MVP par l'intermédiaire de la protéine Sec22b (Cebrian *et al.* 2011). En accord avec les données de la littérature, nous avons constaté que la protéine IRE1 $\alpha$  favorise la présentation antigénique croisée par le CMH-I des antigènes OVA sécrétés par le parasite dans l'espace vacuolaire et donc l'activation des LTs CD8 $^+$  rapporteurs. Nos résultats sont donc cohérents avec le rôle bénéfique décrit précédemment de l'induction de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la promotion de la présentation croisée d'antigènes solubles du mélanome par les BMDCs (Medel *et al.* 2019). En outre, l'expression d'XBP1s améliore l'efficacité de vaccin contre les tumeurs, suggérant que la manipulation de l'UPR pourrait représenter une stratégie efficace pour stimuler les réponses des LTs CD8 $^+$  et une protection immunitaire à long terme (Y. Zhang *et al.* 2015). Néanmoins, il serait intéressant de confirmer nos résultats obtenus avec des BMDCs au sein de souris. Pour cela, deux approches pourraient être utilisées. Tout d'abord, l'activité de présentation antigénique par le CMH-I serait examinée dans des cDC1s et cDC2s issues de souris contrôles et déficientes en IRE1 $\alpha$ /XBP1 infectées *ex vivo* par des parasites Pru Tomato SAG1-Ova. De plus, la re-stimulation par des antigènes parasitaires ou le peptide OVA des LTs CD8 $^+$  et LTs CD4 $^+$  issus de souris contrôles et

déficiences en IRE1 $\alpha$ /XBP1 infectées pourrait permettre d'examiner leur priming et donc de manière indirecte, un défaut potentiel de présentation antigénique par les DCs. En outre, il serait intéressant de comprendre comment la voie IRE1 $\alpha$  module la présentation antigénique (ou d'autres réponses non étudiées dans ce projet) dans les DCs infectées. Pour cela, des expériences de microarrays ou RNAseq comparant les profils transcriptionnels de gènes induits par l'infection dans des DCs contrôles et déficientes pour IRE1 $\alpha$ /XBP1 permettraient d'apporter des pistes sur les mécanismes impliqués. En se basant sur la littérature, il serait important de vérifier la modulation de gènes impliqués dans la machinerie de présentation antigénique, de l'homéostasie du RE ou encore du métabolisme lipidique, connu pour réguler les réponses inflammatoires au sein des cellules immunitaires (Osorio *et al.* 2018; Pearce *et al.* 2014). En accord avec un rôle probable de la voie IRE1 $\alpha$  dans l'activation des LTs, nous avons constaté que les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC présentent un défaut dans le contrôle de l'infection parasitaire et succombent pendant la phase aiguë de l'infection. Ceci se traduit par une forte augmentation de la charge parasitaire dans la rate et la cavité intra-péritonéale de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées indiquant donc une augmentation de la prolifération. De manière intéressante, ce processus a également été observé dans des souris déficientes en XBP1 infectées par *Francisella tularensis* (Martinon *et al.* 2010) suggérant un mécanisme d'action similaire. Cette sensibilité élevée est corrélée à une expression plus faible du transcrite du gène *Ifn-g* dans la rate de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées, indiquant un défaut dans l'établissement de la réponse Th1. Cependant, la mort précoce des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées n'est pas due à une augmentation de la quantité ou de la transcription de cytokines pro-inflammatoires dans la rate ou le sang. Néanmoins, il serait nécessaire de vérifier les réponses cytokiniques des cDC1s spléniques et ganglionnaires mais aussi au sein d'autres organes tel que l'intestin et ceci à différents temps d'infection.

### Rôle de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la modulation des DCs et LTs durant l'infection *in vivo*.

Récemment, nous avons débuté l'étude du rôle de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans les DCs et LTs spléniques au sein de souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées. Les premières expériences réalisées 6 jours après l'infection nous montrent une forte diminution de la quantité de DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> corrélée avec l'activation de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s observée dans les expériences précédentes. Cette observation suggère soit un défaut de migration des DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> vers la rate ou bien un taux de mortalité important pouvant avoir lieu en absence de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s lors de l'infection. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier la proportion de DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> (DCs migratoires) et le taux d'apoptose/nécrose des DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dans des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC comparé à

des souris contrôles infectées au sein de la rate mais aussi dans les ganglions lymphatiques et ceci à différents temps de l'infection notamment à un temps plus précoce (J3). De plus, outre la diminution de leur nombre, la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s semble favoriser l'activation des DCs CD8 $\alpha$ + et semblerait impliquée dans l'activation de la présentation antigénique des DCs CD8 $\alpha$ + confirmant ainsi nos résultats obtenus *in vitro* avec les BMDCs. Des expériences dans d'autres organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions permettraient de déterminer si cet effet est spécifique des DCs CD8 $\alpha$ + de la rate. Ces dysfonctionnements des DCs CD8 $\alpha$ + doivent avoir un impact fort sur la réponse T CD8 lors d'une infection par *T. gondii*. En effet, nous avons observé une diminution du nombre de LTs CD8+ et de leur activation dans des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC infectées montrant un impact de la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s dans la mise en place de la réponse T CD8. Néanmoins, nous remarquons également une diminution du nombre de LTs CD4+ sans que leur activation ne soit modulée. Nous pouvons donc supposer qu'un mécanisme d'apoptose des LTs CD8+ et LTs CD4+ préalablement décrit dans la littérature (Kugler *et al.* 2016) pourrait avoir lieu et ceci de manière plus précoce dans les souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC par rapport aux souris contrôles dû à la plus forte charge parasitaire. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de quantifier le taux d'apoptose/nécrose des LTs dans différents organes lymphoïdes secondaires dans des souris XBP1 $\Delta$ DC IRE1<sup>trunc</sup>DC comparé à des souris contrôles.

Comme précédemment mentionné, d'autres études viseront donc à mieux caractériser les mécanismes par lesquels la voie IRE1 $\alpha$ /XBP1s régule l'induction des réponses Th1, en particulier pour le priming/activation des LTs dans les ganglions et la rate de souris infectées à J3 et J6.

# Annexe



## Review

# *Toxoplasma* and Dendritic Cells: An Intimate Relationship That Deserves Further Scrutiny

Anaïs F. Poncet,<sup>1</sup> Nicolas Blanchard,<sup>2,\*</sup> and Sabrina Marion<sup>1,\*</sup>

***Toxoplasma gondii* (*Tg*), an obligate intracellular parasite of the phylum Apicomplexa, infects a wide range of animals, including humans. A hallmark of *Tg* infection is the subversion of host responses, which is thought to favor parasite persistence and propagation to new hosts. Recently, a variety of parasite-secreted modulatory effectors have been uncovered in fibroblasts and macrophages, but the specific interplay between *Tg* and dendritic cells (DCs) is just beginning to emerge. In this review, we summarize the current knowledge on *Tg*–DC interactions, including innate recognition, cytokine production, and antigen presentation, and discuss open questions regarding how *Tg*-secreted effectors may shape DC functions to perturb innate and adaptive immunity.**

## ***Toxoplasma* Infection Induces Robust Th1 and Cytotoxic Responses**

*Toxoplasma gondii* (*Tg*) is a widespread parasite, infecting a large range of warm-blooded animals, including humans who are considered to be accidental hosts in the *Tg* life cycle. For optimal transmission, parasites need to preserve their host and strike a delicate balance so that efficient immune responses control the parasite burden, while restricting immunopathology. Possibly reflecting the diversity of its natural hosts, multiple genotypes of *Tg* exist worldwide. Yet most parasites in North America and Europe fall within one of three clonal lineages: type I, II, or III, which are also the most studied in laboratory mice [1]. In immune-competent humans, a generally mildly symptomatic acute phase of tachyzoite dissemination is followed by the development of bradyzoite-containing cysts in the brain, leading to lifelong persisting infection. Latent *Tg* infection of the brain is now considered as a possibly underestimated cause of behavioral alterations and mental disorders in humans [2,3]. Moreover, in immunosuppressed individuals, parasite conversion to highly replicative tachyzoites can induce brain tissue damage and fatal acute neuroinflammation. Congenital infections can also be life-threatening for the developing fetus, causing severe neurological pathologies at birth, or milder, ocular toxoplasmosis later in life. When considering laboratory mice, type II and type III parasites typically exhibit a relatively low virulence during the acute phase, while type I strains kill their host prematurely due to hyperinflammation and uncontrolled parasite dissemination, and thus fail to establish latent infections. However, this phenotype only applies in laboratory mice, and type I strains can lead to persistent infection in wild mice and possibly other hosts, due to genetic variations in host resistance loci [4,5].

As an obligatory intracellular parasite, *Tg* has the ability to invade all nucleated cells and to reside within a **parasitophorous vacuole (PV)** (see **Glossary**). To modulate cell-intrinsic defenses, the parasite releases effectors into the host through apicomplexan-specific secretory organelles called **rhotries (ROP)** and **dense granules (GRA)**. These effectors operate in concert to manipulate host cell responses involved in cytokine and chemokine secretion, cell-cycle progression, host survival, and metabolic homeostasis [6,7]. Strikingly, while a growing number of effectors dampening cell-autonomous immunity are being characterized, very few effectors promoting parasite latency and preservation of the host have been identified.

## Highlights

*Tg* innate recognition by murine DCs involves TLR11 and TLR12 signaling, resulting in IL-12 secretion.

Innate sensing and cytokine secretion triggered by *Tg* infection requires live parasite phagocytosis in human DCs.

*Tg* modulates the antigen-presentation pathways of infected DCs.

*Tg* enhances the migratory ability of DCs.

The different DC subsets likely display distinct responses to *Tg* infection in terms of cytokine responses, antigen presentation, and parasite clearance.

<sup>1</sup>Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Université de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>2</sup>Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (CPTP), Université de Toulouse, INSERM, CNRS, UPS, Toulouse, France

\*Correspondence: nicolas.blanchard@inserm.fr (N. Blanchard) and Sabrina.Marion@pasteur-lille.fr (S. Marion).



During natural oral *Tg* infection, dendritic cells (DCs) (Box 1) are one of the first cell types that encounter parasites in the intestine [8]. DCs are key players in the local activation of cell-mediated immunity against *Tg* by producing interleukin (IL)-12 that activates interferon (IFN)- $\gamma$  production by T cells and natural killer (NK) cells [9]. T cells play a major role in controlling acute dissemination and keeping chronic cerebral infection under control [9]. While the mechanisms by which *Tg* modulates host responses have been extensively investigated in fibroblasts, monocytes, and macrophages [6,7], how DC functions are modulated by the parasite remains ill-defined. The consequences of these interactions most likely impact on immunomodulatory functions of DCs and on T cell activation, and are therefore important for the outcome of infection. Since our current knowledge on these questions mainly derives from the study of mouse models, this review concentrates on mouse studies. One section is also dedicated to emerging findings on the specific responses of human DCs, which substantially differ (e.g., in parasite sensing).

### Innate Recognition of *Tg* by DCs

#### The *Tg* Profilin-TLR11/12-IL-12 Axis: A Major Pathway in DC Responses in Mice

Macrophages and DCs detect and respond to microbial products by **pattern-recognition receptors (PRRs)**, such as Toll-like receptors (TLRs). PRR signaling influences multiple biological processes, including antigen presentation, cell survival, cytokine production, and antimicrobial responses. During *Tg* infection, the molecular processes enabling *Tg* sensing by infected DCs are not fully uncovered.

#### Box 1. DC Functions and Subsets

DCs represent an efficient patrolling system sampling tissues in search of danger signals, and a first line of defense against invading pathogens. At steady-state, DCs reside in immature or semimature states in the periphery, where they constantly take up and process self-antigens to maintain self-tolerance. In response to infection, DCs undergo a program of maturation involving the upregulation of MHC and co-stimulatory molecules at the cell surface, the CCR7-dependent migration to T cell-rich zones of secondary lymphoid organs, and the release of cytokines promoting the differentiation of naive T cells into effector/memory cells, as well as the local activation of other immune cells [103]. Depending on the nature of the microbial compounds they sense, DCs produce distinct cytokines and shape the differentiation of different types of effector T cells, adapting T cell polarization to the specific threat. Moreover, DCs bridge innate and adaptive immunity by presenting processed antigenic peptides on MHC molecules to prime naive antigen-specific T cells. DCs exist as functionally distinct subsets, which can be distinguished based on their tissue distribution, cell surface markers, and transcriptional programs (Table I).

Table I. DC Subsets<sup>a</sup>

DC subsets	Monocyte DC	cDC1	cDC2	pDC
Type	Migratory	Lymphoid resident (CD8 $\alpha^+$ ) Migratory (CD103 $^+$ )	Lymphoid resident DC	Lymphoid resident DC
Mouse markers	CD11b $^+$ Lys6C $^{hi/lo}$ CD64 $^+$	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ XCR1 $^+$ CLEC9A $^+$ FLT3 $^+$ CD11b $^-$ CD8 $\alpha^+$ or CD103 $^+$	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ CD24 $^+$ CD172a $^+$ CD8 $\alpha^-$	CD11c $^{int}$ MHC-II $^{int}$ B220 $^+$ PDCA1 $^+$ SiglecH $^+$ Lys6C $^+$
Human markers	CD11b $^+$ , CD14 $^+$ , CD206 $^+$ CD209 $^+$	CD11c $^{int}$ MHC-II $^+$ XCR1 $^+$ CLEC9A $^+$ FLT3 $^+$ BDCA3 $^+$ CD11b $^-$	CD11c $^+$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ CD172a $^+$ FLT3 $^+$ BDCA1 $^+$	CD11c $^-$ MHC-II $^{int}$ BDCA2 $^+$ BDCA4 $^+$ CD123 $^+$ CD304 $^+$
Functions	TNF, iNOS, and ROI production; Presentation on MHC-II; CD4 T cell response	Against intracellular pathogens; IL-12 production; TLR3 induced; Cross-presentation on MHC-I; CD8 T cell response	Against extracellular pathogens IL-12, TNF $\alpha$ production Presentation on MHC-II CD4 T cell response	IFN I/III, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL6 production TLR7, TLR9 induced CD4 and CD8 T cell response

<sup>a</sup>Abbreviations: iNOS, inducible nitric oxide synthase; ROI, reactive oxygen intermediates.

### Glossary

**Active invasion:** *Toxoplasma gondii* invades host cells by secreting effectors (rhoptry and microneme proteins) that enable parasite adhesion to the host plasma membrane and penetration into the forming vacuole.

**Cross-presentation:** refers to the presentation by MHC-I molecules of peptides derived from an extracellular source (from endocytosed proteins or microorganisms internalized through phagocytosis or after active invasion).

**Dense granule (GRA):** specific apicomplexan secretory organelle containing proteins involved in the maturation of the parasitophorous vacuole, the formation of the intravacuolar network, and the modulation of host cell responses when secreted beyond the vacuole limiting membrane.

**Endolysosome:** intracellular organelle resulting from the fusion of a lysosome with an endocytic vesicle.

**Endoplasmic reticulum (ER):** a network of membranous tubules within the cytoplasm continuous with the nuclear membrane involved in protein and lipid synthesis and cellular homeostasis.

**Exosome:** extracellular vesicle originated from the endocytic compartment involved in cell-to-cell communication.

**Immunity-related GTPase (IRG) and guanylate-binding proteins (GBPs):**

GTPases induced upon interferon gamma stimulation, which accumulate at the parasite vacuole limiting membrane and trigger its degradation.

**Inflammasome:** intracellular multiprotein complex that detects microorganisms and other stressors, which activates IL-1 $\beta$  and IL-18 production. It also induces a form of cell death called pyroptosis.

**Intravacuolar network (IVN):** a network of membrane tubules and vesicles, present in the vacuolar space of the parasitophorous vacuole, that interconnect the parasites and also connect the parasites to the vacuole-limiting membrane.

**Parasitophorous vacuole (PV):** an intracellular vacuole in which the parasites replicate, protected from the host defense mechanisms.

**Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs):** small molecular motifs found in microbial molecules recognized by pattern-recognition receptors.

Pioneer studies reported that, upon *Tg* systemic infection, the induction of IL-12 production by macrophages, DCs, and neutrophils depends on the signaling molecule MyD88, suggesting a TLR-mediated microbial detection. Similar to MyD88<sup>-/-</sup> animals, mice in which MyD88 deletion is restricted to CD11c<sup>+</sup> DCs fail to control type II *Tg* systemic infection and exhibit a strong decrease in IFN- $\gamma$  production [10,11], demonstrating the major role of DCs in inducing a protective T helper cell (Th)1 immunity. In contrast to macrophages, IL-12 production in DCs downstream of MyD88 was found to be independent from the nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathway but to rely on the transcription factor interferon regulatory factor 8 (IRF8) [12] (Figure 1A, Key Figure). TLR11 and TLR12, two endolysosomal TLRs, which are able to form heterodimers and are stimulated in an UNC93B1-dependent manner, were then identified as the major players in innate sensing of *Tg* by DCs, via the recognition of *Tg* profilin (*Tg*PRF) (Figure 1A) [13]. Mice deficient in these sensing molecules display a drastic defect in IL-12 production by splenic DCs. Consequently, IFN- $\gamma$  production is severely impaired, and mice become highly susceptible to infection [13–17]. There seems to be a functional specificity between both TLRs, since TLR12, but not TLR11, is involved in IL-12 production by plasmacytoid DCs (pDCs) (Box 1). Similar to DC-MyD88<sup>-/-</sup> mice, TLR12<sup>-/-</sup> mice display a more severe susceptibility to infection compared with TLR11<sup>-/-</sup> mice, which is due to a defect in the early activation of IFN- $\gamma$  production by NK cells and impaired parasite clearance in the peritoneum [16]. Of note, TLR11/TLR12-mediated recognition of *Tg*PRF only operates in mice and not in humans, in which the ortholog TLR11/12 genes are not functional.

#### Sensing *Tg* beyond TLR11 and TLR12

TLR2 and TLR4 represent major mammalian surface TLRs that recognize lipoproteins and liposaccharides derived from bacteria, viruses, fungi, and parasites. They can also signal from endosomes after internalization of ligand/receptor complexes. In contrast to macrophages [18], TLR2 and TLR4 were proposed to not operate in murine DCs in the sensing of *Tg* **pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)** based on the observation that IL-12 production is not altered in splenic DCs of TLR2<sup>-/-</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> mice injected with soluble tachyzoite antigens (STAGs) [19]. However, the responses of splenic DCs isolated from infected mice or of splenic DCs infected *ex vivo* with live parasites have not been explored in this study. Along this line, parasite surface adhesins *Tg*MIC1/MIC4 were recently reported to stimulate IL-12 secretion in a TLR2-dependent manner in bone-marrow-derived DCs (BMDCs) [20]. Alterations in the production of additional TLR2-stimulated cytokines, notably type I interferons (IFN-I) [21], or in the regulation of other DCs functions (e.g., antigen presentation [22]) were not examined in TLR2<sup>-/-</sup> infected BMDCs. Thus, further exploration of TLR2 signaling after *Tg* infection may reveal novel regulatory mechanisms of DC responses. Most importantly, while TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> and TLR9<sup>-/-</sup> mice infected systemically with *Tg* demonstrate limited susceptibility and modest defects in IL-12 production, severe mortality was demonstrated in the same animals receiving the parasite orally [18,23,24]. Notably, DC maturation and migration to draining mesenteric lymph nodes (MLNs) were altered in TLR9<sup>-/-</sup> mice together with decreased CD4<sup>+</sup> T cell responses [23]. TLR2, TLR4, and TLR9 were also demonstrated to be essential for the development of efficient IFN- $\gamma$  responses by T cells in the small intestine after oral infection [23,24]. In addition, parasite-induced damage of the intestinal mucosa is decreased in TLR4<sup>-/-</sup> mice and in mice treated with broad-spectrum antibiotics, suggesting that mucosal immune responses to *Tg* also rely on the indirect stimulation of DCs by normal gut microflora [25]. Hence, the route of infection likely impacts on the mechanisms of *Tg* innate sensing, which may also differ after oral infection between the different DC subsets present in the intestinal mucosa.

#### *Tg* Innate Sensing in Human DCs

Deciphering the respective roles of TLRs in the sensing of *Tg* PAMPs is of particular relevance for human DCs, which lack functional TLR11 and TLR12 genes. In contrast to murine DCs, human

#### Pattern-recognition receptors

**(PRRs):** host sensors that detect PAMPs and trigger signaling pathways involved in innate immune responses.

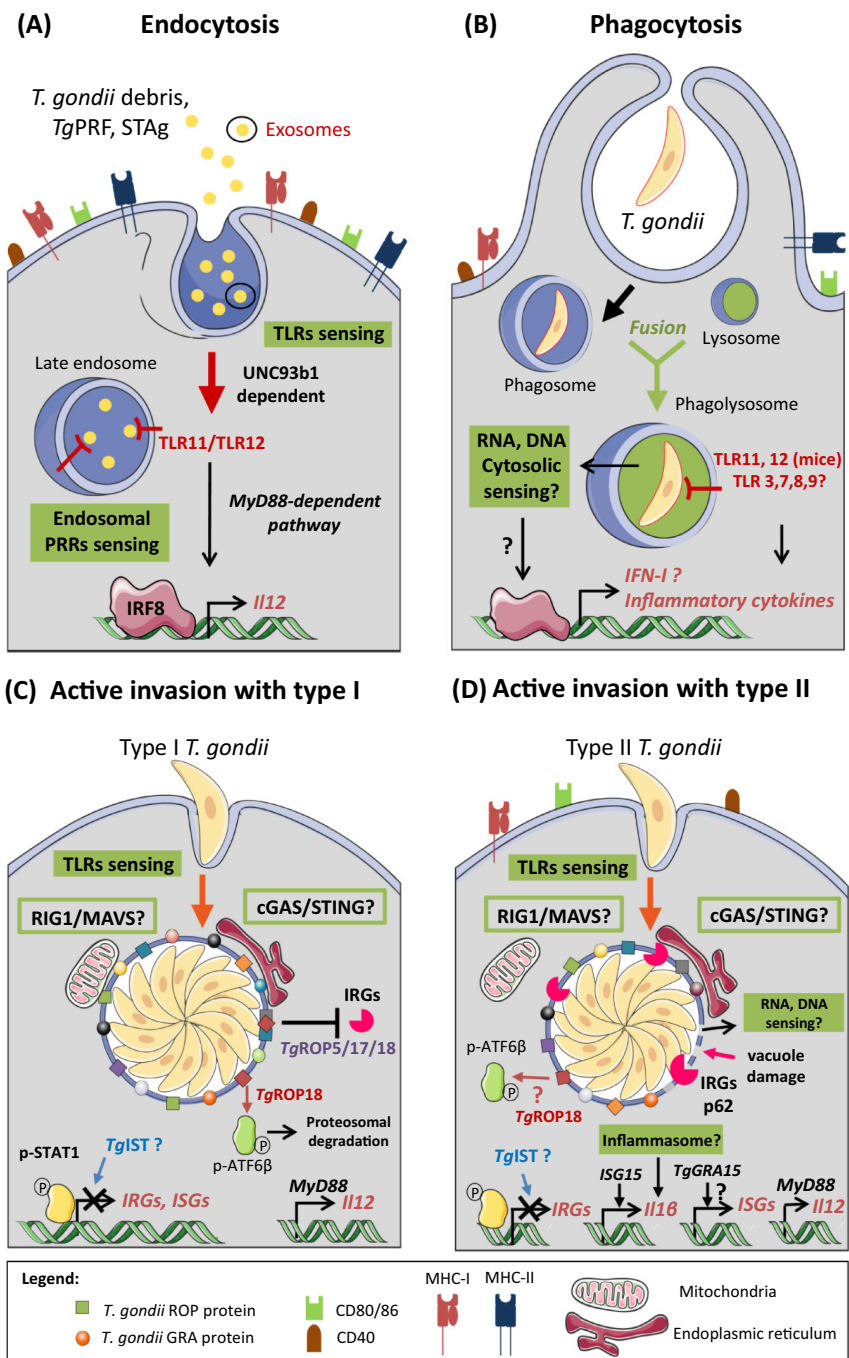
**Phagocytosis:** a mechanism by which phagocytes engulf and digest large particles and microorganisms.

**Rhoptry (ROP):** a specific apicomplexan secretory organelle containing proteins involved in parasite invasion, PV formation, and modulation of host cell responses.

**Unfolded protein response (UPR):** ER stress response induced by an accumulation of misfolded proteins in the ER, changes in lipid homeostasis, TLR stimulation, and oxidative stresses. It is characterized by the activation of three ER sensors: ATF6, PERK, and IRE1 $\alpha$ , which induce transcriptional programs aiming to restore cell homeostasis but can lead to the induction of cell apoptosis.

**Key Figure**

Innate Sensing and Modulation of Signaling Pathways in *Tg*-infected Dendritic Cells (DCs)



Trends in Parasitology

(See figure legend at the bottom of the next page.)

monocyte-derived DCs (MDDCs) fail to respond to STAGs as well as heat-killed (HK) or fixed parasites [26,27]. The TLRs involved in *Tg* sensing in human DCs have not yet been identified; however, studies carried out in human blood-derived monocytes, which are major producers of IL-12 upon infection, revealed that parasite invasion is not essential to trigger cytokine responses. Furthermore, phagocytic uptake of live parasites and the acidification of the resulting phagosome enhance cytokine production compared with **active invasion** (Figure 1B) [27]. When parasite **phagocytosis** (but not adhesion) is inhibited, cytokine responses are abrogated, indicating that surface TLRs are not involved in *Tg* sensing. In addition, as phagocytosis of HK but not irradiated parasites fails to stimulate cytokine production, efficient innate recognition of *Tg* may rely on the detection of heat-labile compounds, possibly parasite RNA [27]. Thus, based on what is known for phagosomes containing inert or microbial antigenic material, phagocytosis of live parasites in human monocytes and DCs may trigger the stimulation of endosomal TLRs following phago-lysosomal fusion, or of cytosolic PRRs after phagosomal membrane disruption [28]. Importantly, as opposed to the mouse context in which conventional cDC1s dominate the IL-12 response, the human cDC1 are nonresponsive to *Tg* infection, and IL-12 and TNF- $\alpha$  production following *Tg* stimulation is restricted to the cDC2 subset [27].

#### How Do PRRs Sense Parasites Residing in Intracellular Vacuoles?

Even in murine DCs, which have been more extensively studied, the molecular processes of PAMP sensing from vacuolar parasites remain a conundrum. Using trans-well experiments, Pifer *et al.* demonstrated that contacts between murine DCs and DC-depleted splenocytes infected by tachyzoites are not required for TLR11-mediated IL-12 production [13]. This suggests that *Tg*PRF, a cytoskeleton protein localized in the cytosol of parasites, is released into the medium and further internalized by DCs into **endolysosomes**, where TLR11/TLR12 are localized [13] (Figure 1A). Whether *Tg*PRF detection by distant DCs relies on the presence of the protein in apoptotic bodies, necrotic debris, or **exosomes** remains an open question. In line with this idea, two independent studies recently demonstrated an active role for exosomes released by type I and type II tachyzoites in stimulating IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$  production by macrophages

---

**Figure 1.** (A) Internalization of parasite debris, soluble tachyzoite antigen (STAg), *Tg* profilin (*Tg*PRF), or *Tg* exosomes stimulate interferon regulatory factor 8 (IRF8)-mediated production of interleukin (IL)-12 via a Toll-like receptor (TLR)11/12- and MyD88-dependent pathway in mice. (B) Phagocytosis of live or killed parasites results in TLR activation after phagolysosomal fusion. TLR11 and TLR12 play a major role in triggering a cytokine response in mice. However, other endosomal TLRs, such as TLR 3/7/8/9, may be also stimulated, notably in human DCs, which lack functional TLR11 and TLR12 genes. Parasite degradation and partial disruption of the phagosomal membrane may lead to the release of RNA/DNA from the parasite sensed by cytosolic pattern-recognition receptors (PRRs) described to induce type I interferon (IFN) production. (C) Innate sensing of type I parasites that have actively invaded DCs relies on MyD88-dependent activation of TLRs, and has yet to be fully uncovered. Possible additional mechanisms may involve the RIG-1 and STING sensors localized at the host mitochondria and endoplasmic reticulum, respectively, two compartments tightly associated with the parasitophorous vacuole (PV). IFN- $\gamma$  stimulation triggers the phosphorylation of STAT1, but the transcriptional activation of interferon-stimulated gene (ISG), notably immunity-related GTPase (IRG), is impaired in type I-infected DCs, likely by a *Tg*IST-mediated process. The *Tg* ROP5/17/18 effectors also block IRG-induced vacuole damage upon IFN- $\gamma$  stimulation, while *Tg* ROP18 triggers ATF6 $\beta$  phosphorylation and degradation, resulting in decreased CD8<sup>+</sup> T cell activation. Also, MHC-I, MHC-II, and co-stimulatory molecule surface expression are down regulated by type I parasites. (D) The innate sensing of type II parasites also relies on MyD88-dependent activation of TLRs. Distinct sensing mechanisms compared with type I parasites may be induced, correlating with partial vacuole disruption. Upon IFN- $\gamma$  stimulation, PV damage and antigen escape to the cytosol is mediated by autophagy proteins (ATG and p62) and IRG/guanylate-binding protein (GBP) recruitment at the PV membrane. Other ISG genes may be also induced in a *Tg*GRA15II- and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B-dependent manner. Possible leakage of parasite RNA/DNA upon PV disruption may activate cytosolic PRRs. In addition, ISG15 induces IL-1 $\beta$  production in infected conventional (c)DC1. A putative activation of the inflammasome has not been investigated. Type II infection itself also triggers the phosphorylation of STAT1 but *Tg*IST effector likely reduces STAT1-mediated IRG/GBP expression. *Tg*IST is also likely involved in the downregulation of MHC-II molecule surface expression upon IFN- $\gamma$  stimulation. Abbreviations: cGAS, cyclic GMP-AMP synthase; STING, stimulator of interferon genes; RIG1, retinoic acid inducible gene 1 protein; MAVS, mitochondrial antiviral signaling protein.

---

*in vitro*. When injected into mice, these exosomes were able to induce specific anti-*Tg* humoral responses and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity, suggesting that *Tg* exosome internalization by DCs contributes to MHC-I and MHC-II antigen presentation [29,30]. Furthermore, in correlation with the detection of *Tg*PRF by immune cells 'at a distance' from infected cells, bystander splenic DCs, which do not contain phagocytosed or invaded parasites, induce high amounts of IL-12 [31]. Yet, one may envision that, while TLR11/12 stimulation by *Tg*PRF is critical to trigger IL-12 secretion, active invasion by parasites may activate distinct endosomal TLRs or cytosolic PRRs (Figure 1C,D). Cytosolic PRR stimulation would imply a process of *Tg* PAMP export from the PV to the host cytosol, in particular nucleic acids. Although speculative, it is logical to consider that this process may be facilitated by vacuolar membrane breakdown following IFN- $\gamma$  and STAT1-induced **immunity-related GTPase (IRG)** and **guanylate-binding protein (GBP)** recruitment at the PV membrane (PVM) [6,32]. Supporting this hypothesis, polymorphic *Tg* ROP18, ROP5, and ROP17 proteins are essential secreted factors localized at the PVM that disrupt IRG/GBP-mediated parasite restriction, albeit in a strain-specific manner (Figure 1C). Type II strains possess an inactive ROP5 allele, which hampers blockade of PV disruption in IFN- $\gamma$ -activated macrophages (Figure 1D). It is likely that similar mechanisms exist in DCs. In support of this hypothesis, infection of IFN- $\gamma$ -primed BMDCs by type II, but not by type I, parasites induces the recruitment of ubiquitin and the P62 sequestosome (SQSTM1) at the PVM, via a process dependent on the IRG-regulatory proteins *Irgm1/Irgm3* and the autophagy-related proteins (ATGs) ATG3, ATG5, ATG7, and ATG16L1 (Box 2). Accumulation of p62 on parasite-containing vacuoles occurs after partial damage by IFN- $\gamma$ -inducible IRG and GBP and contribute to the cytosolic release of luminal antigens that activate CD8<sup>+</sup> T cell responses [33]. In addition, in BMDCs, the infection itself is sufficient to trigger STAT1 phosphorylation and nuclear translocation in a strain-independent manner, and these responses are accentuated by the addition of IFN- $\gamma$  [34] (Figure 1C,D). However, parasites impede STAT1 activity by inducing the formation of aberrant transcriptional complexes at the promoter of IFN-stimulated genes (ISGs), such as *Irf1* and *Igtf* [34] (Figure 1C). In macrophages, this inhibitory process is mediated by the *Tg*-secreted effector IST (inhibitor of STAT1 transcriptional activity) in both type I and type II strain-infected cells [35–37]. Most likely, similar *Tg*IST-mediated inhibitory mechanisms take place in infected DCs; however, this remains to be formally established. As previously mentioned, upon IFN- $\gamma$  stimulation of BMDCs, type II parasites, but not type I parasites, induce *Irgm1/Irgm3* recruitment at the PVM, which is not sufficient to induce parasite clearance but triggers partial PV disruption [33]. Although this difference is likely linked to the inactive ROP5-II allele, it is worth mentioning that the distinct *Tg* strains can differentially modulate specific aspects of IFN- $\gamma$  signaling through

#### Box 2. *Tg* Modulation of Autophagy in DCs

Canonical autophagy is activated in *Tg*-infected cells upon CD40 signaling. This pathway is dependent on ULK1, accompanied by LC3 accumulation onto the PV and it involves lysosomal elimination of the parasite [104,105]. Autophagic targeting of *Tg* occurs in macrophages and endothelial cells where it plays an important role in parasite restriction, in particular regarding access to the neural tissue [106]. As a survival counter-strategy, *Tg* activates signaling cascades that antagonize host autophagy through at least two distinct mechanisms, involving the activation of Akt and the inhibition of PKR. In addition, some autophagy-related proteins are required for the IRG/GBP-mediated restriction of *Tg* in the context of IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages and fibroblasts. However, these processes are distinct from bona fide autophagy, which typically involves fusion with and degradation in lysosomes [104,105].

Autophagy regulates several DC functions, including antigen presentation, cytokine production, and migration [107]. In *Tg*-infected DCs, the recruitment of autophagy protein at the PVM regulates parasite antigen escape to the host cytosol and subsequent T cell activation [33,86,87], albeit in a process that is likely not dependent on canonical autophagy [86,87]. Moreover, it is currently unknown to what extent autophagy contributes to *Tg* parasite restriction in DCs and if autophagy avoidance pathways are mobilized by the parasite in this cell type. Interestingly, host autophagy may be hijacked by the parasite for the acquisition of nutrients to sustain its growth [108]. Knowing that the PV in *Tg*-infected DCs intersects with various host organelles [46,68,69,73], it would be interesting to investigate how the autophagosome–PV interplay regulates both the parasite and DC metabolisms.



the polymorphic effector proteins ROP16 and GRA15. In particular, GRA15 from type II strains was reported to upregulate a certain set of ISGs in human fibroblasts in a STAT1-independent but NF- $\kappa$ B-dependent manner [38,39].

Therefore, strain-specific induced PV damage may promote *Tg* PAMP export to the host cytosol, resulting in strain-specific innate sensing mechanisms and activation of corresponding downstream pathways. Of particular interest is the activation of the **inflammasome**. NLRP3 activation and IL-1 $\beta$  production in human monocytes and bone marrow-derived macrophages were reported to be specifically triggered by type II strains and dependent on the secretion of *Tg*GRA15 into host cells [40,41]. Whether the inflammasome is activated in *Tg*-infected DCs remains to be addressed.

Finally, although not yet explored in *Tg*-infected immune cells, other mechanisms of microbial sensing may control the immune response outcome. The mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS), stimulated downstream of the nucleic acid cytosolic sensor RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) as well as STING (stimulator of interferon genes), downstream of the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) sensor, are localized at the mitochondrial membrane and the **endoplasmic reticulum (ER)**, respectively [42] (Figure 1C,D). Interestingly, these two compartments tightly associate with the PVM, therefore are likely to be in direct contact with *Tg* PAMPs. Of note, only type I and type III strains, but not type II strains, were reported to trigger the recruitment of mitochondria at the PVM in human fibroblasts [43]. Additionally, a cell achieves frequent contacts between the ER and late endosomes/lysosomes, where endosomal TLRs reside [44,45], and the PV has been recently shown to intersect with various endosomal compartments [46]. Hence, mechanisms distinct from PVM damage may promote the delivery of PAMPs from vacuolar parasites into intracellular compartments implicated in microbial innate sensing.

#### DC Cytokine Secretion: Beyond IL-12

Owing to the crucial role of IL-12 in the induction of the cytotoxic and Th1 responses, most studies have focused on the mechanisms by which splenic DCs secrete this cytokine. Nonetheless, the distinct DC subsets operating during infection may secrete additional cytokines contributing to the regulation of various immune responses (Box 1). This aspect is illustrated by a recent study showing that ISG15 production, an IFN-I-stimulated proinflammatory molecule, enhances the recruitment of cDC1 specifically producing IL-1 $\beta$  at the site of infection during type II parasite systemic infection [47] (Figure 1D). Along this line, IFN-I plays an important role in parasite infections [48,49]. In *Tg*-infected mice, pDCs, which expand after oral infection with type II parasites and play a key role in CD4<sup>+</sup> T cell priming, were shown to secrete high levels of IFN- $\alpha$  [16,50]. In contrast, IFN- $\beta$  is mainly produced by inflammatory monocytes in the MLN and requires parasite phagocytosis [51]. Of note, human DCs actively phagocytose parasites and might therefore trigger IFN-I secretion upon *Tg* infection. In addition, in the mouse, IFN-I serum levels gradually increase during systemic *Tg* infection, and the cytokine can be detected in the brain and spleen of infected mice. *Ifnar*<sup>-/-</sup> (interferon alpha and beta receptor 1) mice orally infected with *Tg*, have increased parasite loads compared with wild-type mice, correlated with slightly decreased survival [51,52]. Importantly, IFN-I are prominent regulators of cDC1 turnover *in vivo* through a dose-dependent modulation of multiple processes, including DC apoptosis, proliferation, migration [53], and maturation [54] as well as their **cross-presentation** efficacy [55]. Hence, the role of IFN-I (via an autocrine effect or produced by surrounding cells) in the modulation of DC functions would deserve further exploration.

Moreover, the immune system associated with the intestinal mucosa comprises distinct lymphoid cells, including antigen-experienced CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells and various subsets of innate

lymphoid cells (ILCs), which reside in the epithelium and the underlying lamina propria (LP). DCs are central players in determining tolerance versus immunity during inflammation and infection. Among the DC subsets in the intestinal LP and MLN, CD103<sup>+</sup> DCs play an important role in maintaining intestinal homeostasis and inducing regulatory or effector T cells (Box 1). Two recent studies highlighted the role of IL-22 in gut protection against inflammation-triggered tissue necrosis during *Tg* type II infection [56,57]. DCs being potent regulators of T cell and ILC functions, secretion of cytokines by CD103<sup>+</sup> DCs and other DC subsets in the intestinal mucosa may contribute to the establishment of protective CD4<sup>+</sup> T cell and ILC responses against immunopathology. These responses may be manipulated by the parasite as suggested by the downregulation of retinoic acid production previously observed in mucosal DCs [8].

To conclude, while in mice, *Tg*PRF detection by TLR11/12 is critical in triggering the secretion of IL-12 and the IFN- $\gamma$  response for early parasite clearance, active invasion of DCs and parasite phagocytosis in human cells likely stimulate additional innate sensing mechanisms, which have not yet been fully unraveled (Figure 1). These distinct mechanisms of *Tg* detection may not only regulate DC secretion of various chemokines and cytokines, but also modulate other DC functions, including antigen presentation and T cell priming [58–60]. In addition, it is possible that *Tg* secretes yet to be identified, strain-specific factors that target PRR-induced signaling pathways, impacting on the outcome of inflammatory responses. Finally, based on the diversity of DC phenotypes and functions, it appears essential to explore in more depth the mechanisms of *Tg* innate sensing in the different tissue-resident DC subtypes, notably after oral infection.

### Modulation of *Tg* Antigen Presentation and T Cell Responses

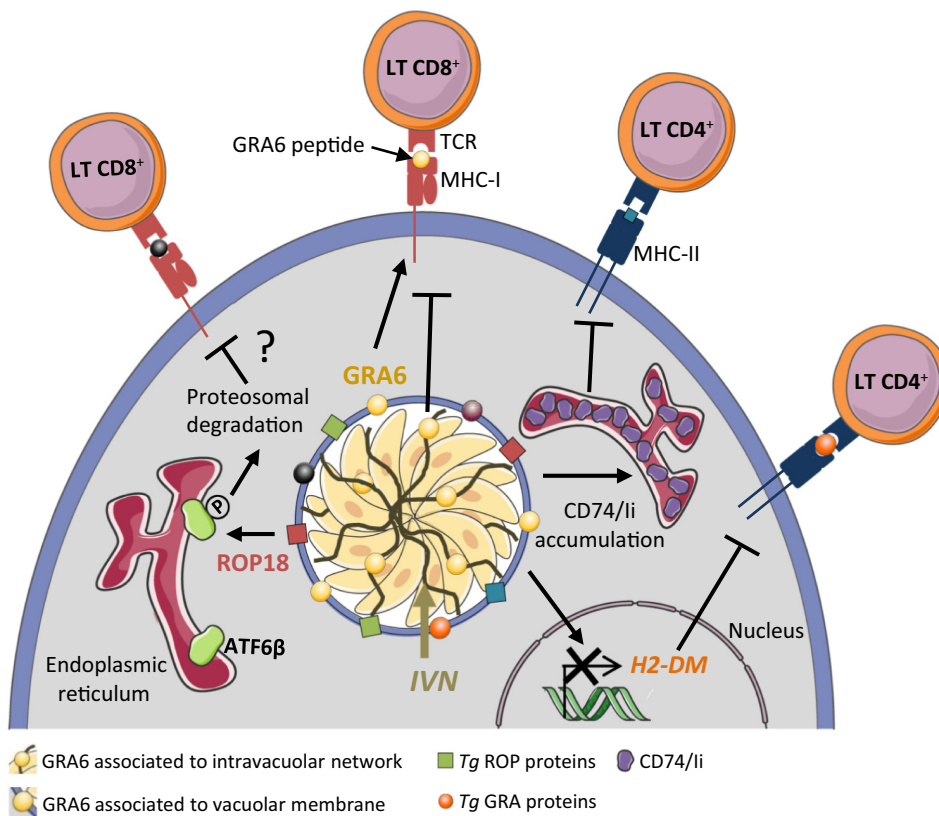
T cell activation relies on three signals: (i) signal 1 elicited by MHC/peptide complex engagement of the TCR; (ii) signal 2 triggered when co-stimulatory receptors (e.g., CD28) bind their ligands (e.g., CD80, CD86) on antigen-presenting cells; (iii) and signal 3 integrating the cytokine environment to complete T cell differentiation. Thus, antigen availability, expression of co-stimulatory molecules and cytokine release are critical factors regulating T cell activation and memory formation that can be targeted by *Tg* to promote parasite dissemination and/or persistence.

#### Mechanisms of MHC-I Presentation by *Tg* and Modulation Thereof

Through the process of cross-presentation, MHC-I molecules can present antigenic peptides derived from extracellular sources, including those from microorganisms that reside in a phagosome or a vacuole, like *Tg*. The pathways by which *Tg* antigens access the MHC-I pathway have been partially unraveled [61]. Active secretion of parasite antigens into the infected host cell is a major requirement for efficient MHC-I presentation [62–65]. Moreover, emerging evidence shows that luminal and membrane-bound antigens follow processing mechanisms that exhibit similarities as well as distinctions. The analogies include the implication of the transporter associated with antigen processing (TAP) and the proteasome, suggesting that, in both cases, antigenic precursors exit the vacuole and reach the host cytosol before loading onto MHC-I molecules [66,67]. For luminal antigens, access to the DC cytosol is facilitated by fusion of vesicles of the host ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) onto the vacuole [68] through a mechanism that depends on the soluble NSF attachment protein receptor (SNARE) protein Sec22b [69]. This process promotes the recruitment of components of the ER-associated degradation machinery onto the PVM, then allowing retrotranslocation of vacuolar antigens to the host cytosol. Intriguingly, Sec22b-mediated ER–PV interactions are not involved in the presentation of the membrane-bound protective GRA6 antigen [70]. Instead, optimal processing of GRA6 requires the epitope to be located at the C terminus of GRA6 and to protrude into the host cytosol [70,71]. Of note, the protective membrane-bound GRA6 antigen associates with a membranous, tubulovesicular

**intravacuolar network (IVN)** generated in the vacuolar space by parasite effectors. In the absence of this network, GRA6 redistributes to the PVM and is presented more efficiently by MHC-I, leading to enhanced CD8<sup>+</sup> T cell responses [72]. Thus, by trapping membrane-bound antigens, the network plays a negative modulatory function on recognition of *Tg*-infected cells by CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2).

Another way by which the parasite may potentially affect DC antigen presentation capabilities is by redirecting organelles towards the PV. In *Tg*-infected fibroblasts, a variety of Rab-containing organelles, including Golgi and endocytic compartments, are sequestered in the PV, allowing lipid acquisition by the parasite [46]. In DCs as well, the PV intersects with endocytic recycling compartments, resulting in accumulation of the Rab22a GTPase onto the PVM. In this case, this process seems to benefit the host as it promotes *Tg* MHC-I presentation [73]. Yet at this stage, besides effectors that generate the IVN [46], the effectors driving the PV–host organelle connections remain ill-defined. Furthermore, the exact implications of these new infection-related trafficking pathways on DC functions and parasite fitness remain to be studied.



## Trends in Parasitology

**Figure 2. Modulation of Antigen Presentation by *Tg* Effectors.** The intravacuolar tubulovesicular network (IVN) reduces GRA6 localization at the vacuole limiting membrane, therefore impeding access of the C-terminal fragment, that contains the antigenic peptide, into the host cytosol. This ultimately reduces presentation of the GRA6-derived peptide by MHC-I molecules on the cell surface. *Tg*ROP18 downregulates CD8 T cell activation by a yet unknown mechanism that involves *Tg*ROP18-mediated phosphorylation and degradation of the endoplasmic reticulum (ER) sensor ATF6 $\beta$ . *Tg* infection represses H2-DM expression and induces CD74/li accumulation in the ER, thereby impairing MHC-II antigen presentation and CD4 T cell activation.



Additional indirect mechanisms may contribute to the modulation of MHC-I presentation by the parasite. Of particular interest is the role of the ER-associated **unfolded protein response (UPR)** induced by viruses, bacteria, and parasite infections [74]. UPR induction in DCs has recently been implicated in the modulation of MHC-I antigen presentation in normal and pathological conditions [75–77]. Interestingly, type I *Tg*ROP18 was reported to directly phosphorylate the host UPR sensor ATF6 $\beta$ , resulting in its degradation by the proteasome [78] (Figure 1C). DCs isolated from ATF6 $\beta$  knockout (KO) mice exhibit a reduced ability to restimulate primed CD8<sup>+</sup> T cells, but not CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting a yet unexplored function of ATF6 $\beta$  in MHC-I antigen presentation (Figure 2). However, since an enhanced IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells in mice infected with *Tg*ROP18 KO parasites was also observed, it is likely that additional mechanisms beyond the targeting of ATF6 $\beta$ -mediated cross-presentation dampen T cell activation [78]. Therefore, whether *Tg*ROP18 directly impacts on MHC-I presentation requires further investigation. Finally, it remains to be studied whether MHC-I presentation is modulated during the chronic phase of the infection by persistent parasites present in tissues, such as the muscles, the retina, and the central nervous system. Indeed, we have recently shown that MHC-I presentation of tachyzoite-derived antigens by neurons is pivotal for CD8<sup>+</sup> T cell-mediated parasite control in the brain [79]. However, it remains to be established if and how effectors secreted by bradyzoites interfere with MHC-I presentation, both in the target neuronal cells and in the surrounding DCs.

#### Modulation of MHC-II Presentation by *Tg*

The manipulation of the MHC-II antigen-presentation pathway by *Tg* tachyzoites has been reported both at steady-state and following IFN- $\gamma$  stimulation (Box 3).

At steady-state, *Tg* promotes the accumulation of CD74/li in the ER of infected cells and reduces the transcription of H2-DM, a chaperone essential for MHC-II loading. These combined effects result in the inhibition of MHC-II presentation of parasite-derived antigens [80]. Accumulation of CD74 is triggered by type I and type II strains, requires invasion by live parasites (but not replication), and is observed in macrophages and cDC1 isolated from the lymph nodes (LNs) of infected mice. In fact, *Tg* infection is known to impede IFN- $\gamma$ -mediated upregulation of MHC-II in multiple cell types [81,82]. This is due to the ability of *Tg* to disturb chromatin remodeling at the class II transactivator CIITA locus [35] through the blockade of STAT1 activity (Figure 2) [83]. The parasite effector(s) responsible for this effect were reported to be hroptry and/or dense granule-derived proteins [80]. *Tg*IST, which represses STAT1-dependent promoters, is thus a very likely candidate for the dysregulation of MHC-II molecule expression [36,37].

By preventing the upregulation of MHC-II on the surface of infected DCs, *Tg* alters the activation of CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo* [84] and impedes parasite control. In agreement, CD74<sup>-/-</sup>-H2-DM<sup>-/-</sup> KO mice fail to control infection by type II strains, correlating with high cerebral cyst burden, showing the important role of MHC-II antigen presentation during chronic toxoplasmosis [80].

#### Box 3. Mechanisms of MHC-II Presentation by *Tg*

Two natural CD4<sup>+</sup> T cell antigens from *Tg* have been described so far: (i) the AS15 peptide derives from the TgCD4Ag28m protein [85], predicted to be a secreted protein, and (ii) the second one derives from *Tg*PRF [109]. Based on the fact that the *Tg* CD4Ag28m-derived AS15 peptide is robustly presented even when DCs are fed with heat-killed (HK) parasites, it is likely that both secreted and nonsecreted parasite antigens have access to the MHC-II antigen degradative compartments where peptide loading on MHC-II molecules occurs [85,110]. The mechanisms promoting antigen entry into the degradative compartments in the case of replicating parasites residing in a vacuole are still elusive. DCs deficient in the autophagy protein ATG5, but not ATG7, induce diminished CD4<sup>+</sup> T cell production of IL-2 and IFN- $\gamma$  after type II strain infection [86,87]. This defect is not accompanied by changes in MHC-II and co-stimulatory molecule expression or impaired production of IL-12, IL-1 $\beta$ , or TNF- $\alpha$  [86], suggesting that it may be linked to a reduced delivery of antigens to the MHC-II presentation pathway.

Furthermore, immunization with the *Tg* AS15 peptide, a natural CD4<sup>+</sup> T cell antigen (Box 3), lowered cyst burden and parasite load in the brain of infected mice [85].

Moreover, DCs deficient in the autophagy protein ATG5, but not ATG7, were reported to induce diminished CD4<sup>+</sup> T cell production of IL-2 and IFN- $\gamma$  after type II strain infection, suggesting that noncanonical autophagy may stimulate delivery of antigens to the MHC-II presentation pathway (Box 2) [86,87]. In general, in contrast to macrophages, the role of autophagy in the modulation of DC responses upon *Tg* infection remains mostly unexplored (Box 2).

#### Modulation of DC Maturation by *Tg*

Contrasting results were obtained *in vitro* on the modulation of co-stimulatory molecule expression following *Tg* infection. Infection by type I parasites leads to the activation of human DCs by increasing the expression of CD40, CD80, CD86, and HLA-DR [26,88]. In contrast, immature murine BMDCs are activated after exposure to HK parasites or STAg (increased CD40, CD80, CD86, and MHC-II expression) but not after invasion by type I parasites, which also render them resistant to subsequent activation by TLR ligands [84] (Figure 3). Importantly, Tait *et al.* reported that infection by type I parasites is correlated with a decrease in the number of DCs in peritoneal exudate cells (PECs) and LNs, compared with type II infection [89]. DCs recruited at the site of infection display a reduced expression of CD80 and MHC-I compared with DCs analyzed during type II infection. As expected, the diminished number of activated DCs altered the generation of specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. In addition, IL-12 treatment during type I infection only modestly increased the number of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells, reinforcing the hypothesis that type I parasites restrict CD8<sup>+</sup> T cell priming. The observed DC reduction upon type I infection may be a result of parasite-triggered cell death or impaired recruitment in response to altered chemokine environment. Overall, this may well explain the higher virulence of type I strains in comparison with type II strains and suggest that type II parasite virulence may be efficiently controlled by murine DCs. Supporting this hypothesis, systemic infection of mice by type II parasites resulted in increased expression of CD40, CD80, CD86, and MHC-II markers and elevated IL-12 production by both CD8 $\alpha^-$  and CD8 $\alpha^+$  splenic DCs [90] (Figure 3). In addition, CD40–CD154 interactions were found to be essential to maintain splenic DC activation during infection [90]. In agreement, CD40 is upregulated in cDC1 following STAg injection in mice [91]. Therefore, strain-dependent modulation of DC maturation appears critical to shape the generation of *Tg* antigen-specific T cells and determine the outcome of infection in mice.

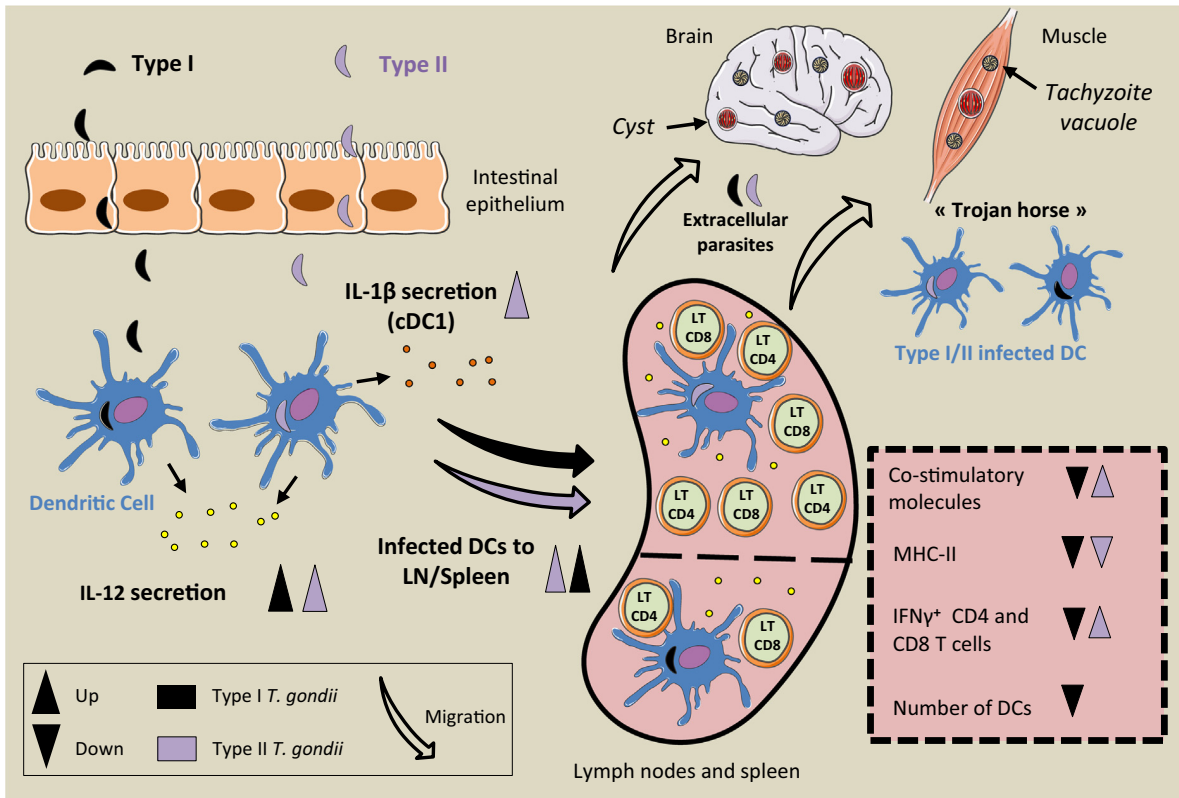
Nonetheless, the precise mechanisms by which the parasite interferes with key DC functions, such as antigen presentation, DC maturation, and survival, need to be elucidated. Also, an improved characterization of *Tg* antigen-presentation pathways in human DCs, as well as in distinct tissue-resident DC subtypes, is an important goal for future studies.

#### *Tg* Modulation of DC Migratory Functions

Pioneer experiments suggested that DCs and monocytes participate to the transport of the parasite from the primary site of infection and are used as 'Trojan horses' to enhance rapid parasite dissemination towards distant organs [92]. This phenomenon likely complements the ability of the parasites to exploit cerebral endothelial cells as a replication niche and a direct portal of entry into the brain parenchyma [93].

Supporting the 'Trojan horse' hypothesis, type I strain-infected murine BMDCs display enhanced ability to disseminate *in vivo* compared with free tachyzoites [94]. Phagocytosis of HK parasites or incubation with *Tg* secretory fraction do not enhance migration of DCs *in vitro* [94,95], suggesting a modulation of host signaling by secreted effectors. In addition, DCs infected by type II parasites,

A



B

Modulation of DC functions	Type I		Type II		Killed parasites	STAGs
	Tg effector	Host target / pathway	Tg effector	Host target		
IL12 secretion	<i>TgPRF</i> # § <i>TgMIC1/MIC4</i> # <i>TgCyclophilin</i> #	TLR11/12 # § TLR2 # CCR5 #	<i>TgPRF</i> # § <i>TgCyclophilin</i> #	TLR11/12 # § CCR5 #	#	#
IL1β secretion	nd	nd	§		nd	nd
STAT1 pathway	#		#		nd	nd
IFNγ-inducible gene transcription	<i>TgIST?</i> #	STAT1 # MHC-II ? #	<i>TgIST?</i> #	STAT1 # MHC-II ? #	nd	nd
Co-stimulatory molecule expression	# §		§		#	#
T cell priming/activation	<i>TgROP18</i> §	ATF6β §	#		nd	nd
Motility / Chemotaxis	<i>Tg14-3-3</i> # <i>TgGRA5</i> #	GABAergic signaling # CCR7 # TIMP-1-CD63-FAK #	# §		#	#

up down no modulation nd : no data # : in vitro § : in vivo

Trends in Parasitology

(See figure legend at the bottom of the next page.)

but not bystander cells, migrate significantly longer distances compared with type I-infected DCs in a 3D matrix [96]. Similarly, an enrichment of migratory type II-infected DCs compared with type I strain-infected DCs was monitored in spleen and MLN 16 h after inoculation of preinfected BMDCs [95]. Importantly, infection of monocytes, NK, B and T cells failed to induce an enhanced migratory phenotype [97], indicating a DC-specific modulation of host responses by the parasite via regulatory mechanisms that have been partially uncovered and recently expertly reviewed [98]. It is proposed that a transition from mesenchymal to the ameboid migration mode enables high-speed locomotion of the parasite through interstitial tissues and across biological barriers, which, in conjunction with enhanced chemotaxis, promotes *Tg* dissemination (Box 4).

Nonetheless, parasite effectors that stimulate the migratory ability of DCs need to be characterized. *Tg*GRA5, secreted and inserted at the PVM during parasite intracellular replication, was identified as a factor stimulating migration of human DCs *in vitro* [99]. The authors further pinpointed a peptide derived from the type I-*Tg*GRA5 hydrophilic N-terminal region, which, after internalization by micropinocytosis, triggers the expression of CCR7 and enhances DC directional migration via a JNK-dependent signaling [99]. However, how this peptide acts at the PVM during infection by live parasites remains to be determined. In addition to *Tg*GRA5, *Tg*14-3-3, a protein located in the vacuolar space, was shown to induce *in vitro* DC hypermotility and enhanced chemotaxis via an unknown mechanism that may involve sequestration of host 14-3-3 at the PVM [100] (Figure 3). Thus, it is likely that a synergistic effect of several parasite effectors contributes to the modulation of distinct signaling pathways and transcriptional responses altering DC migration. The identification and subsequent depletion of these effectors will provide a useful means to assess the importance of parasite-driven activation of DC migration in *Tg* virulence and the establishment of latent infections in mice. It is noteworthy that, after intraperitoneal type I parasite injection, *Tg* was reported to preferentially target pDCs in the peritoneum and to enhance their migration towards the marginal zone and T cell areas of the spleen. This process was found to be partially dependent on CCR2 [101]. Therefore, further *in vivo* investigations are required to clearly identify which DC subset(s) are targeted by the parasite at the site of infection after oral infection [8], and whether a differential impact on DC migratory functions is observed in an *in vivo* context between type I and type II parasites.

### Concluding Remarks

DCs critically bridge innate and adaptive immunity through their capacity to sense microbial compounds and drive antigen-specific T cell activation. DCs perform this task by patrolling tissues in search of danger signals, by antigen presentation, and by secreting immunomodulatory cytokines that shape innate and adaptive immune responses. Hence, it is assumed that any manipulation of these key activities by the parasite may directly impact on parasite dissemination or persistence. A growing body of evidence suggests that the parasite targets each of these processes (summarized in Figure 3). In laboratory mice, type I strain infection results in uncontrolled parasite growth, rapid dissemination, and detrimental tissue inflammation that eventually kills the host. In contrast, type II parasite burden and inflammation are kept under control, allowing latent infections to establish in organs distant from the gut, the primary site of parasite entry. While a growing list of parasite effectors modulating host responses in macrophages and monocytes

### Outstanding Questions

How do surface or endocytic pattern-recognition receptors sense parasites residing in an intracellular vacuole?

Do previously identified parasite-secreted effectors modulate DC responses similarly to other cell types?

Which parasite effectors regulate DC migratory functions?

Are there parasite effectors that hijack the specialized endocytic pathway of DCs to sustain their intracellular life?

Are there type II strain-specific effectors involved in promoting parasite latency and host maintenance?

Are there tissue-specific responses of DCs to *T. gondii* infection?

**Figure 3. Modulation of Dendritic Cell (DC) Functions during *Tg* Infection.** (A) Scheme summarizing the modulation of DC functions in mice infected by the *Tg* type I and type II strains during the different steps of the infection from parasite entry into the intestine, to their migration in secondary lymphoid organs. *Tg* parasites can also disseminate to distant organs such as the brain and muscles, possibly by using DCs as shuttle leucocytes or as extracellular parasites in the blood. For simplification, modulations of human DC functions by the infection were not included in this figure. (B) Table summarizing the functions of murine DCs that are upregulated (red) or downregulated (green), compared with unchallenged DCs, by live *Tg* type I and type II strain infection, killed parasites, or soluble tachyzoite antigens (STAGs). When identified, the parasite effectors and targeted host pathways were indicated, as well as whether these findings were obtained *in vitro* in the context of differentiated or isolated murine DCs (#) or *in vivo* in infected mice (\$). Abbreviations: LN, lymph node; *Tg*PRF, *Tg* profilin.

**Box 4. Modulation of DC Migratory Functions by *T. gondii***

*In vitro*, BMDCs and human MDDCs secrete GABA after infection with type I, II, or III strains [111]. GABA secretion activates, via an autocrine effect, functional GABA<sub>A</sub> receptors, which induce the *in vitro* transmigration and chemotaxis of type II infected murine DCs and promote parasite dissemination after their adoptive transfer in mice [111,112]. The signaling molecule calcium also plays a central role for this migratory activation as signal transduction following GABAergic activation is mediated via the L-type voltage-dependent calcium channel (L-VDC) subtype Ca<sub>v</sub>1.3. More recently, the Barragan laboratory further identified a TIMP-1-CD63-ITGB1-FAK signaling axis hijacked by *Tg* to drive high-speed amoeboid migration [113]. Moreover, infected DC-enhanced migration is preceded by morphological changes. Human and murine DCs infected by type II parasites display cytoskeletal actin remodeling, exhibit a process of podosome dissolution and CD18 and CD11c integrin redistribution, thereby adopting an integrin-independent amoeboid-like motility [96,114]. These morphological changes require parasite invasion of the DCs but are independent of GABAergic signaling, in agreement with the hypermotility phenotype being independent of chemotactic cues [114]. In particular, the initial hypermotility phenotype of infected DCs does not depend on CCR7 or CCR5, but infected DCs upregulate CCR7 to potentiate their chemotactic migration [111,114].

has been characterized, only a few were identified as possibly manipulating DC functions. It is likely that effectors previously identified in other cell types may hijack similar host pathways in DCs, notably *Tg*GRA24 [102], which targets the p38 MAPK signaling, and *Tg*IST, which impairs STAT1-mediated ISG transcription [37]. However, it is also possible that certain *Tg* effectors exert specific functions in DCs (see Outstanding Questions). Importantly, the genetic polymorphisms of some effectors delineate the hypervirulence of type I strain versus the latency of avirulent type II strains in mice, with a major impact of type I parasite-mediated modulation of cell-autonomous immunity. However, the ability of the different DC subsets to kill or restrict parasite growth remains elusive. This may have major consequences on the stimulation of distinct *Tg* innate sensing mechanisms. Whether *Tg* manipulates PRR-mediated detection of *Tg* PAMPs, and thereby the downstream pathways controlled by PRR stimulation, needs to be explored.

DCs exhibit specialized trafficking pathways (e.g., dedicated for cross-presentation); it is thus possible that DC-specific *Tg* effectors hijack such pathways to support their intracellular lifestyle. Up to now, no type II-specific effector that manipulates host-cell responses to eventually promote parasite latency and host maintenance has been identified. Hence, identifying the key DC subsets operating in the gut of orally infected mice, or the brain and muscular tissues during parasite latency, and the characterization of their responses upon virulent versus latent infection are important goals for future studies. Based on the specificity of DC functions compared with macrophages, in-depth exploration of DC–*Toxoplasma* interactions is needed to open novel therapeutic avenues that would reduce inflammation-induced pathology and boost antigen-specific T cell responses, which could ultimately ameliorate the clinical outcome of cerebral chronic toxoplasmosis.

**References**

- Sibley, L.D. *et al.* (2009) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 364, 2749–2761
- Fuglewicz, A. *et al.* (2017) Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. *Adv. Clin. Exp. Med.* 26, 1033–1038
- Bayani, M. *et al.* (2019) *Toxoplasma gondii* infection and risk of Parkinson and Alzheimer diseases: A systematic review and meta-analysis on observational studies. *Acta Trop.* 196, 165–171
- Hassan, M.A. *et al.* (2019) Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int. J. Parasitol.* 49, 63–70
- Murillo-León, M. *et al.* (2019) Molecular mechanism for the control of virulent *Toxoplasma gondii* infections in wild-derived mice. *Nat. Commun.* 10, 1233
- Hakimi, M.-A. *et al.* (2017) *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 615–645
- Lima, T.S. and Lodoen, M.B. (2019) Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 103
- Cohen, S.B. and Denkers, E.Y. (2015) Impact of *Toxoplasma gondii* on dendritic cell subset function in the intestinal mucosa. *J. Immunol. (Baltimore)* 195, 2754–2762
- Dupont, C.D. *et al.* (2012) Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* 34, 793–813
- Liu, C.-H. *et al.* (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. (Baltimore)* 177, 31–35
- Hou, B. *et al.* (2011) Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 278–283
- Raetz, M. *et al.* (2013) Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J. Immunol. (Baltimore)* 191, 4818–4827

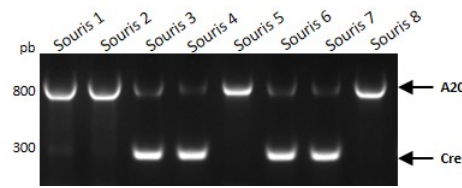


13. Pifer, R. *et al.* (2011) UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 286, 3307–3314
14. Yarovinsky, F. *et al.* (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626–1629
15. Plattner, F. *et al.* (2008) *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* 3, 77–87
16. Koblansky, A.A. *et al.* (2013) Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119–130
17. Melo, M.B. *et al.* (2010) UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 6, e1001071
18. Debierre-Grockiego, F. *et al.* (2007) Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. (Baltimore)* 179, 1129–1137
19. Scanga, C.A. *et al.* (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol. (Baltimore)* 168, 5997–6001
20. Sardinha-Silva, A. *et al.* (2019) *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 bind to Toll-like receptors 2 and 4 N-glycans triggering innate immune response. *PLoS Pathog.* 15, e1007871
21. Dietrich, N. *et al.* (2010) Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLoS One* 5, e10250
22. Corridoni, D. *et al.* (2019) NOD2 and TLR2 signal via TBK1 and PI31 to direct cross-presentation and CD8 T cell responses. *Front. Immunol.* 10, 958
23. Minns, L.A. *et al.* (2006) TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. (Baltimore)* 176, 7589–7597
24. Benson, A. *et al.* (2009) Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* 6, 187–196
25. Heimesaat, M.M. *et al.* (2007) Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 56, 941–948
26. Subauste, C.S. and Wessendarp, M. (2000) Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN-gamma. *J. Immunol. (Baltimore)* 165, 1498–1505
27. Tosh, K.W. *et al.* (2016) The IL-12 response of primary human dendritic cells and monocytes to *Toxoplasma gondii* is stimulated by phagocytosis of live parasites rather than host cell invasion. *J. Immunol. (Baltimore)* 196, 345–356
28. Pauwels, A.-M. *et al.* (2017) Patterns, receptors, and signals: regulation of phagosome maturation. *Trends Immunol.* 38, 407–422
29. Silva, V.O. *et al.* (2018) Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunol.* 40, e12571
30. Li, Y. *et al.* (2018) Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int. J. Nanomedicine* 13, 467–477
31. Christian, D.A. *et al.* (2014) Use of transgenic parasites and host reporters to dissect events that promote interleukin-12 production during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 82, 4056–4067
32. Saeij, J.P. and Frickel, E.-M. (2017) Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death. *Curr. Opin. Microbiol.* 40, 72–80
33. Lee, Y. *et al.* (2015) p62 Plays a specific role in interferon- $\gamma$ -induced presentation of a *Toxoplasma* vacuolar antigen. *Cell Rep.* 13, 223–233
34. Schneider, A.G. *et al.* (2013) *Toxoplasma gondii* triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFN $\gamma$ -induced STAT1 transcriptional activity. *PLoS One* 8, e60215
35. Lang, C. *et al.* (2012) Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-infected macrophages to IFN- $\gamma$ . *PLoS Pathog.* 8, e1002483
36. Olias, P. *et al.* (2016) *Toxoplasma* effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- $\gamma$ -dependent gene expression. *Cell Host Microbe* 20, 72–82
37. Gay, G. *et al.* (2016) *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- $\gamma$ -mediated host defenses. *J. Exp. Med.* 213, 1779–1798
38. Rosowski, E.E. and Saeij, J.P.-J. (2012) *Toxoplasma gondii* clonal strains all inhibit STAT1 transcriptional activity but polymorphic effectors differentially modulate IFN $\gamma$  induced gene expression and STAT1 phosphorylation. *PLoS One* 7, e51448
39. Rosowski, E.E. *et al.* (2011) Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp. Med.* 208, 195–212
40. Gov, L. *et al.* (2013) Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. *mBio* 4, e00255-13
41. Gorfu, G. *et al.* (2014) Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *mBio* 5, e01117-13
42. Schlee, M. and Hartmann, G. (2016) Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566–580
43. Pernas, L. *et al.* (2014) *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. *PLoS Biol.* 12, e1001845
44. Wijdeven, R.H. *et al.* (2015) ER contact sites direct late endosome transport. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 37, 1298–1302
45. Cabukusta, B. and Neefjes, J. (2018) Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic Cph. Den.* 19, 761–769
46. Romano, J.D. *et al.* (2017) The parasite *Toxoplasma* sequesters diverse Rab host vesicles within an intravacuolar network. *J. Cell Biol.* 216, 4235–4254
47. Napolitano, A. *et al.* (2018) Cysteine-reactive free ISG15 generates IL-1 $\beta$ -producing CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells at the site of infection. *J. Immunol. (Baltimore)* 201, 604–614
48. Beiting, D.P. (2014) Protozoan parasites and type I interferons: a cold case reopened. *Trends Parasitol.* 30, 491–498
49. Silva-Barrios, S. and Stäger, S. (2017) Protozoan parasites and type I IFNs. *Front. Immunol.* 8, 14
50. Pepper, M. *et al.* (2008) Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. *J. Immunol. (Baltimore)* 180, 6229–6236
51. Han, S.-J. *et al.* (2014) Internalization and TLR-dependent type I interferon production by monocytes in response to *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Cell Biol.* 92, 872–881
52. Orellana, M.A. *et al.* (1991) Role of beta interferon in resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 59, 3287–3290
53. Mattei, F. *et al.* (2009) Type I IFN regulate DC turnover in vivo. *Eur. J. Immunol.* 39, 1807–1818
54. Pantel, A. *et al.* (2014) Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation. *PLoS Biol.* 12, e1001759
55. Schiavoni, G. *et al.* (2013) Type I interferons as stimulators of DC-mediated cross-priming: impact on anti-tumor response. *Front. Immunol.* 4, 483
56. Couturier-Maillard, A. *et al.* (2018) Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii*-induced intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 11, 1181–1190
57. Ryffel, B. *et al.* (2019) Blockade of IL-33R/ST2 signaling attenuates *Toxoplasma gondii* ileitis depending on IL-22 expression. *Front. Immunol.* 10, 702
58. Blander, J.M. (2018) Regulation of the cell biology of antigen cross-presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 717–753
59. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295
60. Nair-Gupta, P. *et al.* (2014) TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* 158, 506–521
61. Gros, M. and Amigorena, S. (2019) Regulation of antigen export to the cytosol during cross-presentation. *Front. Immunol.* 10, 41

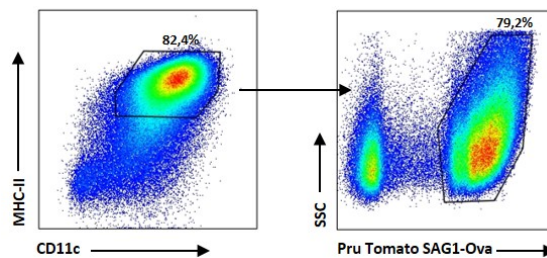
62. Kwok, L.-Y. *et al.* (2003) The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis. *J. Immunol. (Baltimore)* 170, 1949–1957
63. Gregg, B. *et al.* (2011) Subcellular antigen location influences T-cell activation during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 6, e22936
64. Dupont, C.D. *et al.* (2014) Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 10, e1004047
65. Grover, H.S. *et al.* (2014) Impact of regulated secretion on anti-parasitic CD8 T cell responses. *Cell Rep.* 7, 1716–1728
66. Gubbels, M.-J. *et al.* (2005) Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 73, 703–711
67. Blanchard, N. *et al.* (2008) Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 9, 937–944
68. Goldszmid, R.S. *et al.* (2009) Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 399–410
69. Cebrian, I. *et al.* (2011) Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355–1368
70. Buaille, C. *et al.* (2017) MHC I presentation of *Toxoplasma gondii* immunodominant antigen does not require Sec22b and is regulated by antigen orientation at the vacuole membrane. *Eur. J. Immunol.* 47, 1160–1170
71. Feliu, V. *et al.* (2013) Location of the CD8 T cell epitope within the antigenic precursor determines immunogenicity and protection against the *Toxoplasma gondii* parasite. *PLoS Pathog.* 9, e1003449
72. Lopez, J. *et al.* (2015) Intravacuolar membranes regulate CD8 T cell recognition of membrane-bound *Toxoplasma gondii* protective antigen. *Cell Rep.* 13, 2273–2286
73. Cebrian, I. *et al.* (2016) Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. *EMBO Rep.* 17, 1753–1765
74. Galluzzi, L. *et al.* (2017) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in infection by intracellular parasites. *Future Sci. OA* 3, FSO198
75. Cubillos-Ruiz, J.R. *et al.* (2015) ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis. *Cell* 161, 1527–1538
76. Grootjans, J. *et al.* (2016) The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 469–484
77. Osorio, F. *et al.* (2018) Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. *Curr. Opin. Immunol.* 52, 100–107
78. Yamamoto, M. *et al.* (2011) ATF6beta is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J. Exp. Med.* 208, 1533–1546
79. Salvioni, A. *et al.* (2019) Robust control of a brain-persisting parasite through MHC I presentation by infected neurons. *Cell Rep.* 27, 3254–3268.e8
80. Leroux, L.-P. *et al.* (2015) Parasite manipulation of the invariant chain and the peptide editor H2-DM affects major histocompatibility complex class II antigen presentation during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 83, 3865–3880
81. Lüder, C.G.K. *et al.* (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
82. Lang, C. *et al.* (2006) Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN- $\gamma$ -induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes Infect.* 8, 1994–2005
83. Kim, S.-K. *et al.* (2007) *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN- $\gamma$ -inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J. Immunol.* 178, 5154–5165
84. McKee, A.S. *et al.* (2004) Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. (Baltimore)* 173, 2632–2640
85. Grover, H.S. *et al.* (2012) The *Toxoplasma gondii* peptide AS15 elicits CD4 T cells that can control parasite burden. *Infect. Immun.* 80, 3279–3288
86. Liu, E. *et al.* (2015) Atg5 but not Atg7 in dendritic cells enhances IL-2 and IFN- $\gamma$  production by *Toxoplasma gondii*-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. *Microbes Infect.* 17, 275–284
87. Lee, H.K. *et al.* (2010) *In vivo* requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32, 227–239
88. Séguin, R. and Kasper, L.H. (1999) Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 179, 467–474
89. Tait, E.D. *et al.* (2010) Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol. (Baltimore)* 185, 1502–1512
90. Straw, A.D. *et al.* (2003) CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J. Immunol. (Baltimore)* 170, 727–734
91. Schulz, O. *et al.* (2000) CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells *in vivo* requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453–462
92. Courret, N. *et al.* (2006) CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107, 309–316
93. Konradt, C. *et al.* (2016) Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat. Microbiol.* 1, 16001
94. Lambert, H. *et al.* (2006) Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell. Microbiol.* 8, 1611–1623
95. Lambert, H. *et al.* (2009) The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect. Immun.* 77, 1679–1688
96. Kanatani, S. *et al.* (2015) Infection by *Toxoplasma gondii* induces amoeboid-like migration of dendritic cells in a three-dimensional collagen matrix. *PLoS One* 10, e0139104
97. Lambert, H. *et al.* (2011) Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 13, 96–102
98. Bhandage, A.K. and Barragan, A. (2019) Calling in the CaVary-*Toxoplasma gondii* hijacks GABAergic signaling and voltage-dependent calcium channel signaling for Trojan horse-mediated dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 61
99. Persat, F. *et al.* (2012) A synthetic peptide derived from the parasite *Toxoplasma gondii* triggers human dendritic cells' migration. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1241–1250
100. Weidner, J.M. *et al.* (2016) Migratory activation of parasitized dendritic cells by the protozoan *Toxoplasma gondii* 14-3-3 protein. *Cell. Microbiol.* 18, 1537–1550
101. Bierly, A.L. *et al.* (2008) Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol. (Baltimore)* 181, 8485–8491
102. Braun, L. *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
103. Dalod, M. *et al.* (2014) Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 33, 1104–1116
104. Evans, R.J. *et al.* (2018) The interplay of host autophagy and eukaryotic pathogens. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 118
105. Subauste, C.S. (2019) Interplay between *Toxoplasma gondii*, autophagy, and autophagy proteins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 139
106. Corcino, Y.L. *et al.* (2019) Epidermal growth factor receptor promotes cerebral and retinal invasion by *Toxoplasma gondii*. *Sci. Rep.* 9, 669
107. Ghislat, G. and Lawrence, T. (2018) Autophagy in dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 944–952
108. Wang, Y. *et al.* (2009) Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *J. Biol. Chem.* 284, 1694–1701
109. Yarovinsky, F. *et al.* (2006) Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4<sup>+</sup> T cell response. *Immunity* 25, 655–664

110. Draheim, M. *et al.* (2017) Profiling MHC II immunopeptidome of blood-stage malaria reveals that cDC1 control the functionality of parasite-specific CD4 T cells. *EMBO Mol. Med.* 9, 1605–1621
111. Fuks, J.M. *et al.* (2012) GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 8, e1003051
112. Kanatani, S. *et al.* (2017) Voltage-dependent calcium channel signaling mediates GABAA receptor-induced migratory activation of dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 13, e1006739
113. Ólafsson, E.B. *et al.* (2018) *Toxoplasma gondii* infection shifts dendritic cells into an amoeboid rapid migration mode encompassing podosome dissolution, secretion of TIMP-1, and reduced proteolysis of extracellular matrix. *Cell. Microbiol.* 20, e12808
114. Weidner, J.M. *et al.* (2013) Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. *Cell. Microbiol.* 15, 1735–1752

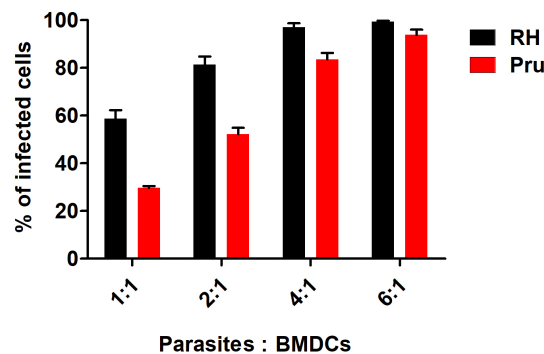




**Figure 52 – Exemple d’un résultat de génotypage de souris C57BL/6  $Xbp1^{\Delta/DC}$   $IRE1^{\Delta/DC}$ .** La bande à 800pb détectée chez toutes les souris correspond au contrôle interne (gène A20). La bande à 270pb visualisée pour les souris 3, 4, 6 et 7 correspond au gène *Cre*. Cela signifie que les souris sont C57BL/6  $Xbp1\Delta DC$   $IRE1^{truncDC}$ .

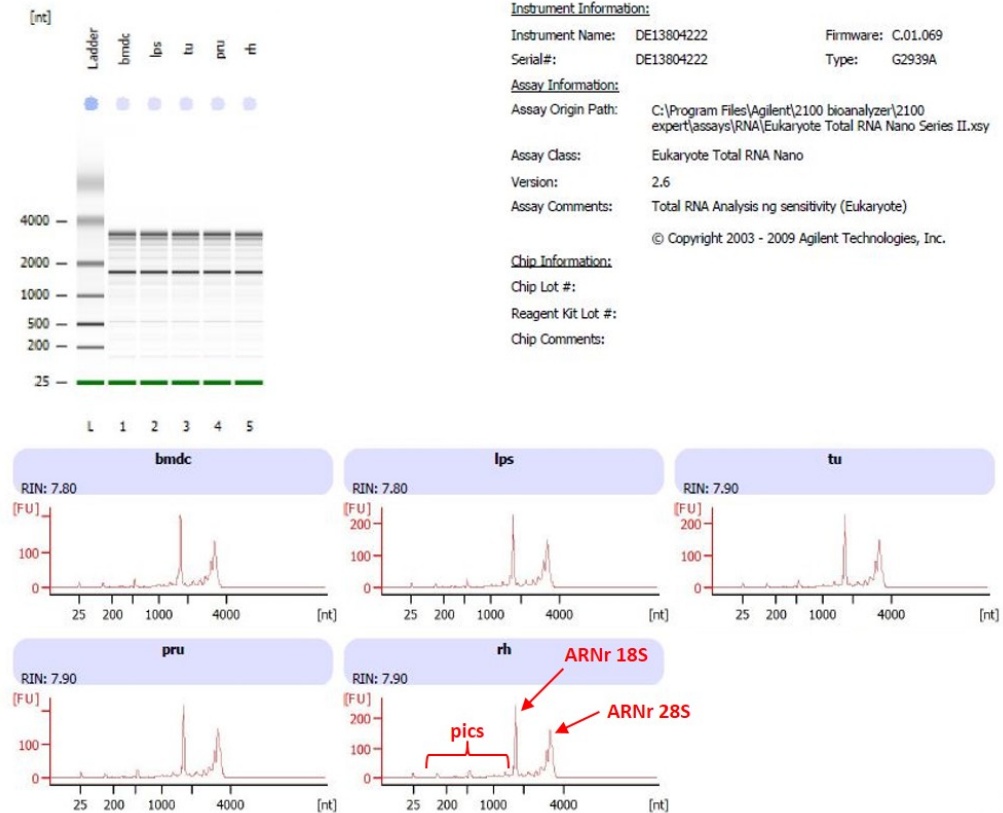


**Figure 53 – Représentation du taux de différenciation des BMDCs et de leur pourcentage d’infection.** La population de cellules dérivés de la moelle osseuse murine différenciées avec du GM-CSF pendant 10 jours exprimant les marqueurs CD11c+ et CMH-II+ doit être supérieur à 80%. Le taux d’infection de ces BMDCs par la Pru Tomato SAG1-Ova doit être d’environ 80% pour une MOI de 4.

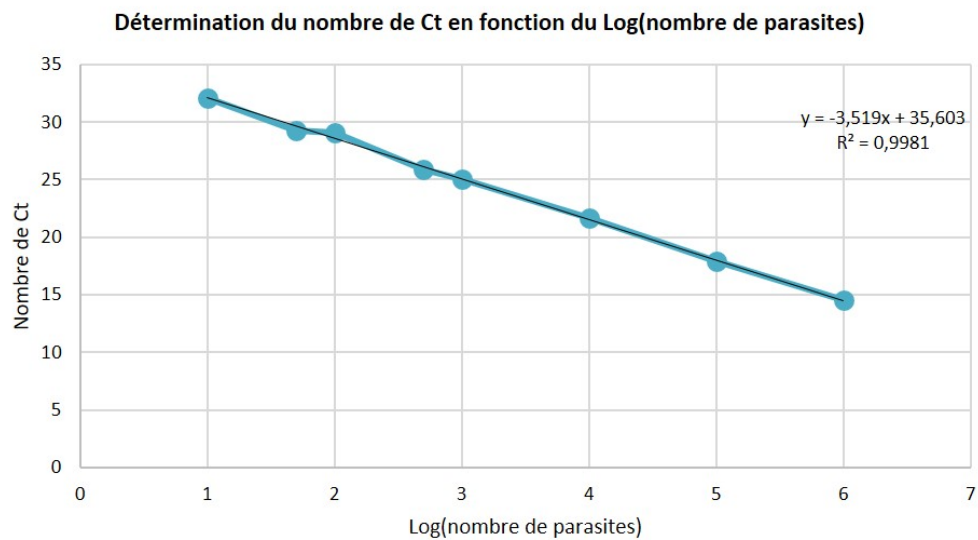


**Figure 54 – Graphique représentant le pourcentage de BMDCs infectées par une souche RH ou Pru à différentes MOI.**

## Electrophoresis File Run Summary



**Figure 55 – Exemple de la détection de la qualité de l'ARN par Bioanalyzer.** Le bioanalyzer est un outil d'électrophorèse automatisé qui permet de détecter la qualité de l'ARN en visualisant les ARN ribosomiaux 18S (1<sup>er</sup> pic) et 28S (2<sup>ème</sup> pic). Le logiciel mesure la qualité de l'ARN avec le RIN (RNA Integrity Number) pouvant aller de 1 (ARN complètement dégradé) à 10 (ARN intact). Dans cet exemple, la présence des deux pics majoritaires accompagnés de faibles pics additionnels montre une faible dégradation de l'ARN se traduisant par un RIN d'environ 7,90 pour les échantillons.



**Figure 56 – Courbe d'étalonnage représentant le nombre de Ct en fonction du log du nombre de parasites.** La totalité de l'ADN extrait à partir d'un nombre connu de parasites purifiés allant de 10 à 1000000 parasites (ici représenté en échelle log) a été utilisé en qPCR pour amplifier une séquence répétée du génome parasitaire avec les primers TOX9-TOX11. Cela a permis de produire une courbe d'étalonnage représentant le nombre de Ct (proportionnel à l'amplification de la séquence) par rapport au nombre de parasites qui permet d'évaluer approximativement le nombre de parasites dans la rate et le liquide intra-péritonéal.

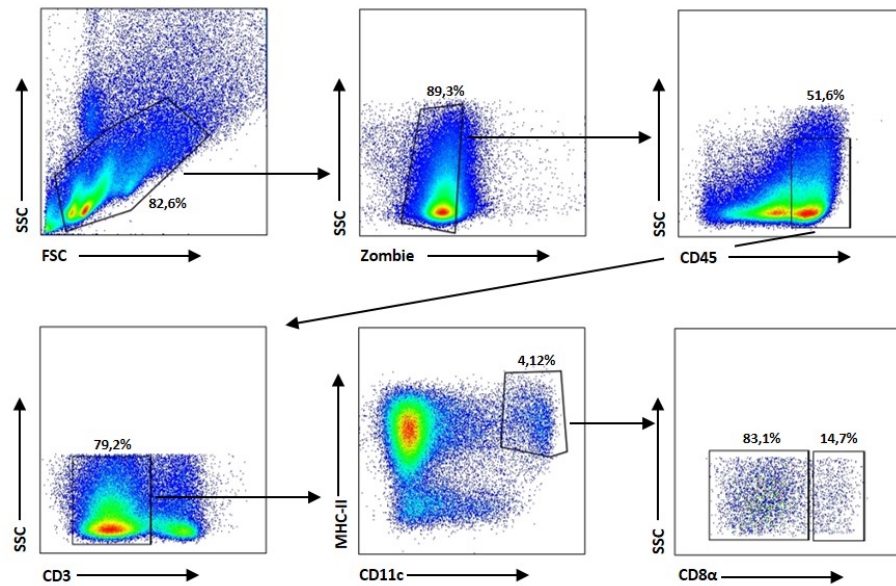


Figure 57 – Représentation de la stratégie de gating des DCs CD8 $\alpha$ -/+ par cytométrie en flux. Les DCs CD8 $\alpha$ -/+ sont identifiées en sélectionnant les cellules vivantes CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CMH-II<sup>+</sup>.

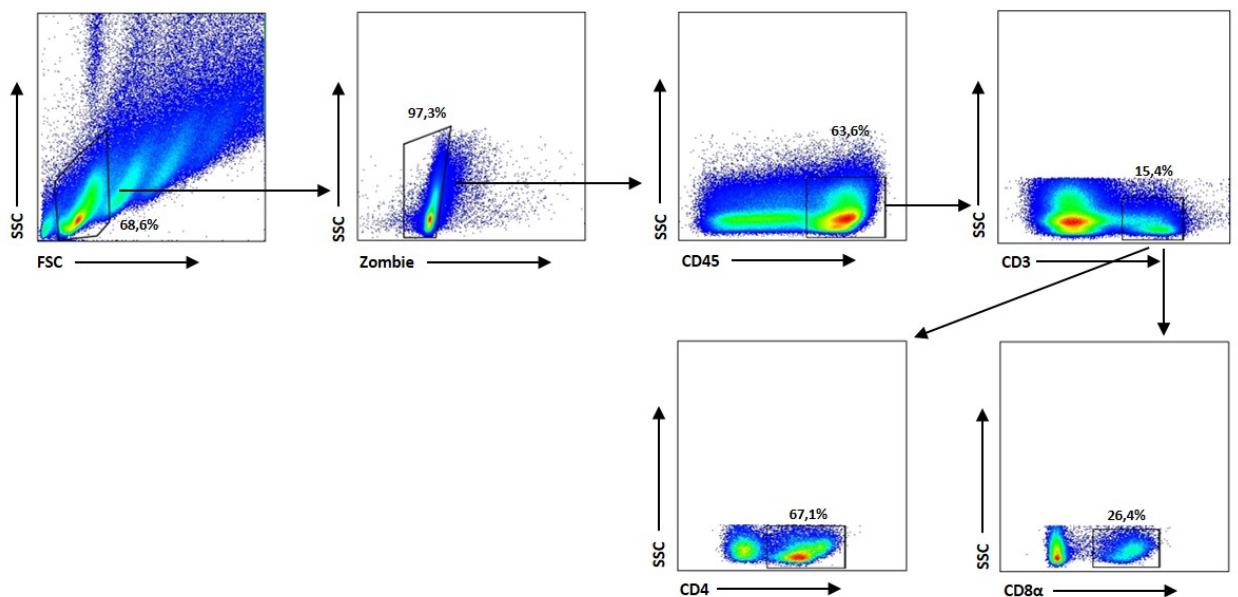
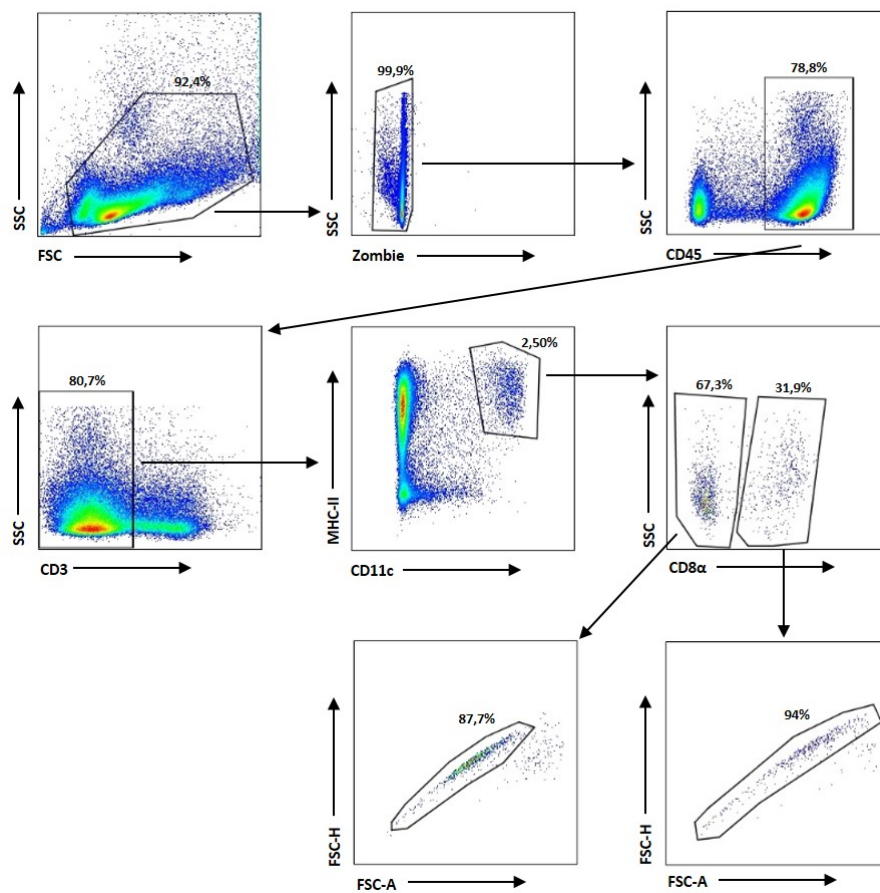


Figure 58 – Représentation de la stratégie de gating des LTs par cytométrie en flux. Les LTs CD4<sup>+</sup> et LTs CD8<sup>+</sup> sont identifiées en sélectionnant les cellules vivantes CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>.



**Figure 59 – Représentation de la stratégie de gating pour trier les DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> par cytométrie en flux.** Les DCs CD8 $\alpha$ <sup>-/+</sup> sont triées en sélectionnant les cellules vivantes CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CMH-II<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-/+</sup> singulets.

## Références bibliographiques



## Références bibliographiques

- Abdallah, D. S. A., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., and Denkers, E. Y. (2011). “Toxoplasma gondii Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps”. In: *Infection and Immunity* 80.2. Ed. by J. H. Adams, pp. 768–777. DOI: 10.1128/iai.05730-11.
- Ackerman, A. L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). “A Role for the Endoplasmic Reticulum Protein Retrotranslocation Machinery during Crosspresentation by Dendritic Cells”. In: *Immunity* 25.4, pp. 607–617. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.017.
- Adams, L. B., Hibbs, J. B., Taintor, R. R., and Krahenbuhl, J. L. (1990). “Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine.” en. In: *The Journal of Immunology* 144.7, pp. 2725–2729.
- Adiko, A. C., Babdor, J., Gutierrez-Martinez, E., Guernonprez, P., and Saveanu, L. (2015). “Intracellular Transport Routes for MHC I and Their Relevance for Antigen Cross-Presentation”. In: *Frontiers in Immunology* 6. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00335.
- Adolph, T. E., Tomczak, M. F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J. N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., *et al.* (2013). “Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation”. In: *Nature* 503.7475, pp. 272–276. DOI: 10.1038/nature12599.
- Agop-Nersesian, C., Egarter, S., Langsley, G., Foth, B. J., Ferguson, D. J. P., and Meissner, M. (2010). “Biogenesis of the Inner Membrane Complex Is Dependent on Vesicular Transport by the Alveolate Specific GTPase Rab11B”. In: *PLoS Pathogens* 6.7. Ed. by L. D. Sibley, e1001029. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001029.
- Ahn, H.-J., Kim, S., Kim, H.-E., and Nam, H.-W. (2006). “Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of Toxoplasma gondii”. In: *The Korean Journal of Parasitology* 44.4, p. 303. DOI: 10.3347/kjp.2006.44.4.303.



- Akazawa, Y., Isomoto, H., Matsushima, K., Kanda, T., Minami, H., Yamaguchi, N., Taura, N., Shiozawa, K., Ohnita, K., Takeshima, F., *et al.* (2013). “Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to Helicobacter Pylori VacA-Induced Apoptosis”. In: *PLoS ONE* 8.12. Ed. by P. Chen, e82322. DOI: 10.1371/journal.pone.0082322.
- 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”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.3, pp. 1126–1131. DOI: 10.1073/pnas.1313501111.
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., and Boothroyd, J. C. (2005). “Identification of the Moving Junction Complex of Toxoplasma gondii: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles”. In: *PLoS Pathogens* 1.2, e17. DOI: 10.1371/journal.ppat.0010017.
- Alexander, J., Jebbari, H., Bluethmann, H., Brombacher, F., and Roberts, C. W. (1998). “The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis”. In: *International Journal for Parasitology* 28.1, pp. 113–120. DOI: 10.1016/S0020-7519(97)00168-9.
- Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Liu, X., Mahdi, R. M., Clarke, G. L., Nussenblatt, R. B., Gery, I., Lee, Y. S., and Egwuagu, C. E. (2007). “TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1”. In: *Nature Medicine* 13.6, pp. 711–718. DOI: 10.1038/nm1585.
- Amiar, S., MacRae, J. I., Callahan, D. L., Dubois, D., Dooren, G. G. van, Shears, M. J., Cesbron-Delauw, M.-F., Maréchal, E., McConville, M. J., McFadden, G. I., *et al.* (2016). “Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in Toxoplasma gondii and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase”. In: *PLOS Pathogens* 12.8. Ed. by K. Kim, e1005765. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005765.
- Anand, S. S. and Babu, P. P. (2013). “Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration in Experimental Cerebral Malaria”. In: *Neurosignals* 21.1-2, pp. 99–111. DOI: 10.1159/000336970.
- Anderson-White, B., Beck, J. R., Chen, C.-T., Meissner, M., Bradley, P. J., and Gubbels, M.-J. (2012). “Cytoskeleton Assembly in Toxoplasma gondii Cell Division”. In: *International Review of Cell and Molecular Biology Volume 298*. Elsevier. DOI: 10.1016/b978-0-12-394309-5.00001-8.
- Andrade, W. A., Carmo Souza, M. do, Ramos-Martinez, E., 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 and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to Toxoplasma gondii in Mice”. In: *Cell Host & Microbe* 13.1, pp. 42–53. DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.003.

- Appenzeller-Herzog, C. and Hall, M. N. (2012). “Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling”. In: *Trends in Cell Biology* 22.5, pp. 274–282. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.02.006.
- Aragón, T., Anken, E. van, Pincus, D., Serafimova, I. M., Korennykh, A. V., Rubio, C. A., and Walter, P. (2008). “Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites”. In: *Nature* 457.7230, pp. 736–740. DOI: 10.1038/nature07641.
- Asselah, T., Bièche, I., Mansouri, A., Laurendeau, I., Cazals-Hatem, D., Feldmann, G., Bedossa, P., Paradis, V., Martinot-Peignoux, M., Lebrech, D., *et al.* (2010). “In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C”. In: *The Journal of Pathology* 221.3, pp. 264–274. DOI: 10.1002/path.2703.
- Bailey, D. and O’Hare, P. (2007). “Transmembrane bZIP Transcription Factors in ER Stress Signaling and the Unfolded Protein Response”. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 9.12, pp. 2305–2322. DOI: 10.1089/ars.2007.1796.
- Baird, M., Ang, P. W., Clark, I., Bishop, D., Oshima, M., Cook, M. C., Hemmings, C., Takeishi, S., Worthley, D., Boussioutas, A., *et al.* (2012). “The unfolded protein response is activated in Helicobacter-induced gastric carcinogenesis in a non-cell autonomous manner”. In: *Laboratory Investigation* 93.1, pp. 112–122. DOI: 10.1038/labinvest.2012.131.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). “Dendritic cells and the control of immunity”. In: *Nature*. DOI: 10.1038/32588.
- Bando, H., Lee, Y., Sakaguchi, N., Pradipta, A., Ma, J. S., Tanaka, S., Cai, Y., Liu, J., Shen, J., Nishikawa, Y., *et al.* (2018a). “Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response”. In: *mBio* 9.5. Ed. by E. Y. Denkers and J. C. Boothroyd. DOI: 10.1128/mbio.01738-18.
- Bando, H., Sakaguchi, N., Lee, Y., Pradipta, A., Ma, J. S., Tanaka, S., Lai, D.-H., Liu, J., Lun, Z.-R., Nishikawa, Y., *et al.* (2018b). “Toxoplasma Effector TgIST Targets Host IDO1 to Antagonize the IFN-gamma-Induced Anti-parasitic Response in Human Cells”. In: *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02073.
- Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., and Cowman, A. F. (2006). “Regulation of apicomplexan actin-based motility”. In: *Nature Reviews Microbiology* 4.8, pp. 621–628. DOI: 10.1038/nrmicro1465.
- 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”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.23, pp. 9631–9636. DOI: 10.1073/pnas.1015338108.

- Bekpen, C., Hunn, J. P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D. M., Glowalla, E., Leptin, M., and Howard, J. C. (2005). “The interferon-inducible p47 IRG GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage”. In: *Genome Biology* 6.11. DOI: 10.1186/gb-2005-6-11-r92.
- Benhamron, S., Hadar, R., Iwawaky, T., So, J.-S., Lee, A.-H., and Tirosh, B. (2013). “Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells”. In: *European Journal of Immunology* 44.3, pp. 867–876. DOI: 10.1002/eji.201343953.
- Benson, A., Pifer, R., Behrendt, C. L., Hooper, L. V., and Yarovinsky, F. (2009). “Gut Commensal Bacteria Direct a Protective Immune Response against *Toxoplasma gondii*”. In: *Cell Host & Microbe* 6.2, pp. 187–196. DOI: 10.1016/j.chom.2009.06.005.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., West, A. B., and Ron, D. (2001). “Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice”. In: *Journal of Clinical Investigation* 107.5, pp. 585–593. DOI: 10.1172/jci11476.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). “Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response”. In: *Nature Cell Biology* 2.6, pp. 326–332. DOI: 10.1038/35014014.
- Bettigole, S. E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A.-H., Spencer, L. A., Weller, P. F., and Glimcher, L. H. (2015). “The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation”. In: *Nature Immunology* 16.8, pp. 829–837. DOI: 10.1038/ni.3225.
- Bhandage, A. K. and Barragan, A. (2019). “Calling in the CaValry-*Toxoplasma gondii* Hijacks GABAergic Signaling and Voltage-Dependent Calcium Channel Signaling for Trojan horse-Mediated Dissemination”. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00061.
- Bhattacharyya, S., Sen, U., and Vrati, S. (2013). “Regulated IRE1-dependent decay pathway is activated during Japanese encephalitis virus-induced unfolded protein response and benefits viral replication”. In: *Journal of General Virology* 95, pp. 71–79. DOI: 10.1099/vir.0.057265-0.
- Billker, O., Lourido, S., and Sibley, D. L. (2009). “Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites”. In: *Cell Host & Microbe* 5.6, pp. 612–622. DOI: 10.1016/j.chom.2009.05.017.
- Bischof, L. J., Kao, C.-Y., Los, F. C. O., Gonzalez, M. R., Shen, Z., Briggs, S. P., Goot, F. G. van der, and Aroian, R. V. (2008). “Activation of the Unfolded Protein Response Is Required for Defenses against Bacterial Pore-Forming Toxin In Vivo”. In: *PLoS Pathogens* 4.10. Ed. by F. M. Ausubel, e1000176. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000176.

- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C.-T., and Gubbels, M.-J. (2015). “Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later”. In: *Annual Review of Microbiology* 69.1, pp. 463–485. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N. T., Cheng, T., Shastri, A. J., Robey, E. A., and Shastri, N. (2008). “Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum”. In: *Nature Immunology* 9.8, pp. 937–944. DOI: 10.1038/ni.1629.
- Blanchard, N. and Shastri, N. (2010). “Topological journey of parasite-derived antigens for presentation by MHC class I molecules”. In: *Trends in Immunology* 31.11, pp. 414–421. DOI: 10.1016/j.it.2010.08.004.
- Blander, J. M. (2018). “Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation”. In: *Annual Review of Immunology* 36.1, pp. 717–753. DOI: 10.1146/annurev-immunol-041015-055523.
- 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”. In: *The Journal of Immunology*.
- Boothroyd, J. C. and Dubremetz, J.-F. (2008). “Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries”. In: *Nature Reviews Microbiology* 6.1, pp. 79–88. DOI: 10.1038/nrmicro1800.
- Boothroyd, J. C. and Grigg, M. E. (2002). “Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?” In: *Current Opinion in Microbiology* 5.4, pp. 438–442. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00349-1.
- 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”. In: *Cell Host & Microbe* 13.4, pp. 489–500. DOI: 10.1016/j.chom.2013.03.002.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B. H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., *et al.* (2009). “A Role for Lipid Bodies in the Cross-presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I in Dendritic Cells”. In: *Immunity* 31.2, pp. 232–244. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.06.022.
- Bradley, P. J. and Sibley, D. L. (2007). “Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors”. In: *Current Opinion in Microbiology* 10.6, pp. 582–587. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.013.
- Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Hammoudi, P.-M., Cannella, D., Kieffer-Jaquinod, S., Vollaire, J., Jossierand, V., Touquet, B., Couté, Y., Tardieux, I., *et al.* (2019). “The *Toxoplasma* effector TEEGR promotes parasite persistence by modulating NFκB sig-

- nalling via EZH2". In: *Nature Microbiology* 4.7, pp. 1208–1220. DOI: 10.1038/s41564-019-0431-8.
- 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". In: *The Journal of Experimental Medicine* 210.10, pp. 2071–2086. DOI: 10.1084/jem.20130103.
- Brown, C. R. and McLeod, R. (1990). "Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in Toxoplasma gondii infection". In: *Journal of Immunology*.
- Buaille, C., Guerrero, N. A., Cebrian, I., Blanié, S., Lopez, J., Bassot, E., Vasseur, V., Santi-Rocca, J., and Blanchard, N. (2017). "MHC I presentation of Toxoplasma gondii immunodominant antigen does not require Sec22b and is regulated by antigen orientation at the vacuole membrane". In: *European Journal of Immunology* 47.7, pp. 1160–1170. DOI: 10.1002/eji.201646859.
- Burnett, H. F., Audas, T. E., Liang, G., and Lu, R. R. (2012). "Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection". In: *Cell Stress and Chaperones* 17.4, pp. 473–483. DOI: 10.1007/s12192-012-0324-8.
- Butcher, B. A., Greene, R. I., Henry, S. C., Annecharico, K. L., Weinberg, J. B., Denkers, E. Y., Sher, A., and Taylor, G. A. (2005). "p47 GTPases Regulate Toxoplasma gondii Survival in Activated Macrophages". In: *Infection and Immunity* 73.6, pp. 3278–3286. DOI: 10.1128/iai.73.6.3278-3286.2005.
- 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 Rhopty Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control". In: *PLoS Pathogens* 7.9. Ed. by C. A. Hunter, e1002236. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002236.
- Buzoni-Gatel, D., Schulthess, J., Menard, L. C., and Kasper, L. H. (2006). "Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on Toxoplasma gondii infections". In: *Cellular Microbiology* 8.4, pp. 535–544. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00692.x.
- Caffaro, C. E. and Boothroyd, J. C. (2011). "Evidence for Host Cells as the Major Contributor of Lipids in the Intravacuolar Network of Toxoplasma-Infected Cells". In: *Eukaryotic Cell* 10.8, pp. 1095–1099. DOI: 10.1128/ec.00002-11.
- Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA". In: *Nature* 415.6867, pp. 92–96. DOI: 10.1038/415092a.

- Campbell-Valois, F.-X., Trost, M., Chemali, M., Dill, B. D., Laplante, A., Duclos, S., Sadeghi, S., Rondeau, C., Morrow, I. C., Bell, C., *et al.* (2012). “Quantitative Proteomics Reveals That Only a Subset of the Endoplasmic Reticulum Contributes to the Phagosome”. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 11.7. DOI: 10.1074/mcp.m111.016378.
- Carruthers, V. B. and Boothroyd, J. C. (2007). “Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion”. In: *Current Opinion in Microbiology* 10.1, pp. 83–89. DOI: 10.1016/j.mib.2006.06.017.
- Carruthers, V. B. and Sibley, D. L. (1997). “Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts”. In: *European Journal of Cell Biology* 73, pp. 114–123.
- Carruthers, V. B. and Tomley, F. M. (2008). “Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in apicomplexans”. In: *Sub-cellular biochemistry* 47, pp. 33–45.
- Cascio, P. (2001). “26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide”. In: *The EMBO Journal* 20.10, pp. 2357–2366. DOI: 10.1093/emboj/20.10.2357.
- Cebrian, I., Croce, C., Guerrero, N. A., Blanchard, N., and Mayorga, L. S. (2016). “Rab22a controls MHC -I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells”. In: *EMBO reports* 17.12, pp. 1753–1765. DOI: 10.15252/embr.201642358.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L. F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). “Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells”. In: *Cell* 147.6, pp. 1355–1368. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.021.
- Celli, J. and Tsolis, R. M. (2014). “Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes?” In: *Nature Reviews Microbiology* 13.2, pp. 71–82. DOI: 10.1038/nrmicro3393.
- Christian, D. A., Koshy, A. A., Reuter, M. A., Betts, M. R., Boothroyd, J. C., and Hunter, C. A. (2014). “Use of Transgenic Parasites and Host Reporters To Dissect Events That Promote Interleukin-12 Production during Toxoplasmosis”. In: *Infection and Immunity* 82.10. Ed. by J. H. Adams, pp. 4056–4067. DOI: 10.1128/iai.01643-14.
- Chu, J.-Q., Shi, G., Fan, Y.-M., Choi, I.-W., Cha, G.-H., Zhou, Y., Lee, Y.-H., and Quan, J.-H. (2016). “Production of IL-1 $\beta$  and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in Toxoplasma gondii-Infected THP-1 Macrophages”. In: *The Korean Journal of Parasitology* 54.6, pp. 711–717. DOI: 10.3347/kjp.2016.54.6.711.
- Clavarino, G., Claudio, N., Dalet, A., Terawaki, S., Couderc, T., Chasson, L., Ceppi, M., Schmidt, E. K., Wenger, T., Lecuit, M., *et al.* (2012a). “Protein phosphatase 1 subunit

- Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acid-stimulated dendritic cells”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.8, pp. 3006–3011. DOI: 10.1073/pnas.1104491109.
- Clavarino, G., Cláudio, N., Couderc, T., Dalet, A., Judith, D., Camosseto, V., Schmidt, E. K., Wenger, T., Lecuit, M., Gatti, E., *et al.* (2012b). “Induction of GADD34 Is Necessary for dsRNA-Dependent Interferon-beta Production and Participates in the Control of Chikungunya Virus Infection”. In: *PLoS Pathogens* 8.5. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002708.
- Coelho, D. S. and Domingos, P. M. (2014). “Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay”. In: *Frontiers in Genetics* 5. DOI: 10.3389/fgene.2014.00076.
- Coffey, M. J., Sleeb, B. E., Uboldi, A. D., Garnham, A., Franco, M., Marino, N. D., Panas, M. W., Ferguson, D. J. P., Enciso, M., O’Neill, M. T., *et al.* (2015). “An aspartyl protease defines a novel pathway for export of Toxoplasma proteins into the host cell”. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.10809.
- Cohen, S. B. and Denkers, E. Y. (2015). “Impact of Toxoplasma gondii on Dendritic Cell Subset Function in the Intestinal Mucosa”. In: *The Journal of Immunology* 195.6, pp. 2754–2762. DOI: 10.4049/jimmunol.1501137.
- 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”. In: *Infection and Immunity* 70.12, pp. 6933–6939. DOI: 10.1128/iai.70.12.6933-6939.2002.
- Coombes, J. L., Charsar, B. A., Han, S.-J., Halkias, J., Chan, S. W., Koshy, A. A., Striepen, B., and Robey, E. A. (2013). “Motile invaded neutrophils in the small intestine of Toxoplasma gondii-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.21, E1913–E1922. DOI: 10.1073/pnas.1220272110.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., and Joiner, K. A. (2006). “Toxoplasma gondii Sequesters Lysosomes from Mammalian Hosts in the Vacuolar Space”. In: *Cell* 125.2, pp. 261–274. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.056.
- Coppens, I. and Romano, J. D. (2018). “Hostile intruder: Toxoplasma holds host organelles captive”. In: *PLOS Pathogens* 14.3. Ed. by L. Read, e1006893. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006893.
- Costa-Silva, T. A., Meira, C. S., Ferreira, I. M. R., Hiramoto, R. M., and Pereira-Chiocola, V. L. (2008). “Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins

- in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*". In: *Experimental Parasitology* 120.3, pp. 227–234. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.07.015.
- Couper, K. N., Roberts, C. W., Brombacher, F., Alexander, J., and Johnson, L. L. (2005). "Toxoplasma gondii-Specific Immunoglobulin M Limits Parasite Dissemination by Preventing Host Cell Invasion". In: *Infection and Immunity* 73.12, pp. 8060–8068. DOI: 10.1128/iai.73.12.8060-8068.2005.
- 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". In: *Blood* 107.1, pp. 309–316. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0666.
- Couturier-Maillard, A., Froux, N., Piotet-Morin, J., Michaudel, C., Brault, L., Bérichel, J. L., Sénéchal, A., Robinet, P., Chenuet, P., Jejou, S., *et al.* (2018). "Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii*-induced intestinal inflammation". In: *Mucosal Immunology* 11.4, pp. 1181–1190. DOI: 10.1038/s41385-018-0005-8.
- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R., and Wearsch, P. A. (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation". In: *Immunological Reviews* 207.1, pp. 145–157. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00316.x.
- Cross, B. C. S., Bond, P. J., Sadowski, P. G., Jha, B. K., Zak, J., Goodman, J. M., Silverman, R. H., Neubert, T. A., Baxendale, I. R., Ron, D., *et al.* (2012). "The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.15, E869–E878. DOI: 10.1073/pnas.1115623109.
- Cubillos-Ruiz, J. R., Silberman, P. C., Rutkowski, M. R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., Zhang, S., Bettigole, S. E., Gupta, D., Holcomb, K., *et al.* (2015). "ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis". In: *Cell* 161.7, pp. 1527–1538. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.025.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., and Diehl, J. A. (2003). "Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival". In: *Molecular and Cellular Biology* 23.20, pp. 7198–7209. DOI: 10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003.
- Curt-Varesano, A., Braun, L., Ranquet, C., Hakimi, M.-A., and Bougdour, A. (2015). "The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells". In: *Cellular Microbiology* 18.2, pp. 151–167. DOI: 10.1111/cmi.12498.



- Dalet, A., Argüello, R. J., Combes, A., Spinelli, L., Jaeger, S., Fallet, M., Manh, T.-P. V., Mendes, A., Perego, J., Reverendo, M., *et al.* (2017). “Protein synthesis inhibition and GADD34 control IFN-beta heterogeneous expression in response to dsRNA”. In: *The EMBO Journal* 36.6, pp. 761–782. DOI: 10.15252/embj.201695000.
- Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). “Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming”. In: *The EMBO Journal* 33.10, pp. 1104–1116. DOI: 10.1002/embj.201488027.
- Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., and Pelloux, H. (2016). “Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis”. In: *Trends in Parasitology* 32.6, pp. 492–506. DOI: 10.1016/j.pt.2016.04.001.
- Dardé, M. L. (2008). “Toxoplasma gondii, "new" genotypes and virulence”. In: *Parasite* 15.3, pp. 366–371. DOI: 10.1051/parasite/2008153366.
- 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”. In: *The Journal of Immunology* 179.2, pp. 1129–1137. DOI: 10.4049/jimmunol.179.2.1129.
- Deffieu, M. S., Alayi, T. D., Slomianny, C., and Tomavo, S. (2019). “The Toxoplasma gondii dense granule protein TgGRA3 interacts with host Golgi and dysregulates anterograde transport”. In: *Biology Open* 8.3, bio039818. DOI: 10.1242/bio.039818.
- Degrandi, D., Kravets, E., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A. K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2012). “Murine Guanylate Binding Protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.1, pp. 294–299. DOI: 10.1073/pnas.1205635110.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E. S. (2005). “Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate”. In: *Science* 307.5715, pp. 1630–1634. DOI: 10.1126/science.1108003.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P., and Ron, D. (2004). “Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2”. In: *Molecular and Cellular Biology* 24.23, pp. 10161–10168. DOI: 10.1128/mcb.24.23.10161-10168.2004.
- Denkers, E. Y., Yap, G., Scharton-Kersten, T., Charest, H., Butcher, B. A., Caspar, P., Heiny, S., and Sher, A. (1997). “Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to Toxoplasma gondii”. In: *Journal of Immunology*.
- Dias-Teixeira, K. L., Calegari-Silva, T. C., Santos, G. R. R. M. D., Santos, J. V. dos, Lima, C., Medina, J. M., Aktas, B. H., and Lopes, U. G. (2016). “The integrated endoplasmic

- reticulum stress response in *Leishmania amazonensis* macrophage infection: the role of X-box binding protein 1 transcription factor”. In: *The FASEB Journal* 30.4, pp. 1557–1565. DOI: 10.1096/fj.15-281550.
- Dimier, I. and Bout, D. (1998). “Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron”. In: *Immunology* 94.4, pp. 488–495. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00553.x.
- Drewry, L. L. and Sibley, L. D. (2019). “The hitchhiker’s guide to parasite dissemination”. In: *Cellular Microbiology*. DOI: 10.1111/cmi.13070.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. (1998). “Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts”. In: *Clinical Microbiology Reviews* 11.2, pp. 267–299. DOI: 10.1128/cmr.11.2.267.
- Dubremetz, J. F. (2007). “Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction”. In: *Cellular Microbiology* 9.4, pp. 841–848. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x.
- 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*”. In: *Immunity* 29.2, pp. 306–317. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.019.
- Dunay, I. R. and Sibley, D. L. (2010). “Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*”. In: *Current Opinion in Immunology* 22.4, pp. 461–466. DOI: 10.1016/j.coi.2010.04.008.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., and Gilbert, R. (1999). “Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling”. In: *The Lancet* 353.9167, pp. 1829–1833. DOI: 10.1016/s0140-6736(98)08220-8.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., and Hunter, C. A. (2012). “Immune response and immunopathology during toxoplasmosis”. In: *Seminars in Immunopathology* 34.6, pp. 793–813. DOI: 10.1007/s00281-012-0339-3.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., Selleck, E. M., Pepper, M., Leney-Greene, M., Pritchard, G. H., Koshy, A. A., Wagage, S., Reuter, M. A., Sibley, L. D., *et al.* (2014). “Parasite Fate and Involvement of Infected Cells in the Induction of CD4+ and CD8+ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*”. In: *PLoS Pathogens* 10.4. Ed. by G. S. Yap, e1004047. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004047.
- Dustin, M. L. (2014). “The Immunological Synapse”. In: *Cancer Immunology Research* 2.11, pp. 1023–1033. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-14-0161.
- Dzierszynski, F., Pepper, M., Stumhofer, J. S., LaRosa, D. F., Wilson, E. H., Turka, L. A., Halonen, S. K., Hunter, C. A., and Roos, D. S. (2007). “Presentation of *Toxoplasma*

- gondii Antigens via the Endogenous Major Histocompatibility Complex Class I Pathway in Nonprofessional and Professional Antigen-Presenting Cells”. In: *Infection and Immunity* 75.11, pp. 5200–5209. DOI: 10.1128/iai.00954-07.
- Ely, K. H., Kasper, L. H., and Khan, I. A. (1999). “Augmentation of the CD8+ T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection”. In: *Journal of Immunology*.
- Embgenbroich, M. and Burgdorf, S. (2018). “Current Concepts of Antigen Cross-Presentation”. In: *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01643.
- Etheridge, R. D., Alaganaan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E., and Sibley, D. L. (2014). “The *Toxoplasma* Pseudokinase ROP5 Forms Complexes with ROP18 and ROP17 Kinases that Synergize to Control Acute Virulence in Mice”. In: *Cell Host & Microbe* 15.5, pp. 537–550. DOI: 10.1016/j.chom.2014.04.002.
- Ewald, S. E., Chavarria-Smith, J., and Boothroyd, J. C. (2013). “NLRP1 Is an Inflammasome Sensor for *Toxoplasma gondii*”. In: *Infection and Immunity* 82.1. Ed. by J. H. Adams, pp. 460–468. DOI: 10.1128/iai.01170-13.
- Feliu, V., Vasseur, V., Grover, H. S., Chu, H. H., Brown, M. J., Wang, J., Boyle, J. P., Robey, E. A., Shastri, N., and Blanchard, N. (2013). “Location of the CD8 T Cell Epitope within the Antigenic Precursor Determines Immunogenicity and Protection against the *Toxoplasma gondii* Parasite”. In: *PLoS Pathogens* 9.6. Ed. by E. Y. Denkers, e1003449. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003449.
- Ferguson, D. J. P. (2009). “*Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore”. In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104.2, pp. 133–148. DOI: 10.1590/s0074-02762009000200003.
- Fleckenstein, M. C., Reese, M. L., Könen-Waisman, S., Boothroyd, J. C., Howard, J. C., and Steinfeldt, T. (2012). “A *Toxoplasma gondii* Pseudokinase Inhibits Host IRG Resistance Proteins”. In: *PLoS Biology* 10.7. Ed. by G. E. Ward, e1001358. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001358.
- 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”. In: *Eukaryotic Cell* 10.9, pp. 1193–1206. DOI: 10.1128/ec.00297-10.
- Fox, B. A., Gigley, J. P., and Bzik, D. J. (2004). “*Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation”. In: *International Journal for Parasitology* 34.3, pp. 323–331. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.12.001.

- Fox, B. A., Guevara, R. B., Rommereim, L. M., Falla, A., Bellini, V., Pètre, G., Rak, C., Cantillana, V., Dubremetz, J.-F., Cesbron-Delauw, M.-F., *et al.* (2019). “Toxoplasma gondii Parasitophorous Vacuole Membrane-Associated Dense Granule Proteins Orchestrate Chronic Infection and GRA12 Underpins Resistance to Host Gamma Interferon”. In: *mBio* 10.4. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.00589-19.
- 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”. In: *mBio* 7.1. DOI: 10.1128/mbio.02231-15.
- French, A. R., Holroyd, E. B., Yang, L., Kim, S., and Yokoyama, W. M. (2006). “IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation”. In: *Cytokine* 35.5-6, pp. 229–234. DOI: 10.1016/j.cyto.2006.08.006.
- Frickel, E.-M., Sahoo, N., Hopp, J., Gubbels, M.-J., Craver, M. P. J., Knoll, L. J., Ploegh, H. L., and Grotenbreg, G. M. (2008). “Parasite Stage-Specific Recognition of Endogenous Toxoplasma gondii-Derived CD8+ T Cell Epitopes”. In: *The Journal of Infectious Diseases* 198.11, pp. 1625–1633. DOI: 10.1086/593019.
- Fuks, J. M., Arrighi, R. B. G., Weidner, J. M., Mendu, S. K., Jin, Z., Wallin, R. P. A., Rethi, B., Birnir, B., and Barragan, A. (2012). “GABAergic Signaling Is Linked to a Hypermigratory Phenotype in Dendritic Cells Infected by Toxoplasma gondii”. In: *PLoS Pathogens* 8.12. Ed. by C. A. Hunter, e1003051. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003051.
- Gaddi, P. J. and Yap, G. S. (2007). “Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis”. In: *Immunology and Cell Biology* 85.2, pp. 155–159. DOI: 10.1038/sj.icb.7100038.
- Galluzzi, L., Diotallevi, A., and Magnani, M. (2017). “Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in infection by intracellular parasites”. In: *Future Science OA* 3.3. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0020.
- Galluzzi, L., Diotallevi, A., Santi, M. D., Ceccarelli, M., Vitale, F., Brandi, G., and Magnani, M. (2016). “Leishmania infantum Induces Mild Unfolded Protein Response in Infected Macrophages”. In: *PLOS ONE* 11.12. DOI: 10.1371/journal.pone.0168339.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., and Reizis, B. (2013). “The role of dendritic cells in autoimmunity”. In: *Nature Reviews Immunology* 13.8, pp. 566–577. DOI: 10.1038/nri3477.
- Gardner, B. M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C. M., and Walter, P. (2013). “Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response”. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.3, a013169–a013169. DOI: 10.1101/cshperspect.a013169.

- Gay, G., Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Vollaire, J., Josserand, V., Bertini, R.-L., Varesano, A., Touquet, B., Bock, P.-J. D., Coute, Y., *et al.* (2016). “Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 213.9, pp. 1779–1798. DOI: 10.1084/jem.20160340.
- Gazzinelli, R., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). “Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine”. In: *Journal of Immunology*.
- Gazzinelli, R., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). “Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.13, pp. 6115–6119. DOI: 10.1073/pnas.90.13.6115.
- 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”. In: *Journal of Immunology*.
- Ge, Y. Y., Zhang, L., Zhang, G., Wu, J. P., Tan, M. J., Hu, W., Liang, Y. J., and Wang, Y. (2008). “In pregnant mice, the infection of Toxoplasma gondii causes the decrease of CD4+CD25+ - regulatory T cells”. In: *Parasite Immunology* 30.9, pp. 471–481. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01044.x.
- Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C., and Bradley, P. J. (2006). “Toxoplasma gondii Targets a Protein Phosphatase 2C to the Nuclei of Infected Host Cells”. In: *Eukaryotic Cell* 6.1, pp. 73–83. DOI: 10.1128/ec.00309-06.
- 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”. In: *Cell Host & Microbe* 17.5, pp. 642–652. DOI: 10.1016/j.chom.2015.04.003.
- Goldszmid, R. S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., and Sher, A. (2009). “Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in Toxoplasma gondii-infected dendritic cells”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 206.2, pp. 399–410. DOI: 10.1084/jem.20082108.
- Goodall, J. C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., and Gaston, J. S. H. (2010). “Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.41, pp. 17698–17703. DOI: 10.1073/pnas.1011736107.

- 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*”. In: *mBio* 5.1. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.01117-13.
- 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”. In: *mBio* 4.4. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.00255-13.
- Gregg, B., Dzierszynski, F., Tait, E., Jordan, K. A., Hunter, C. A., and Roos, D. S. (2011). “Subcellular Antigen Location Influences T-Cell Activation during Acute Infection with *Toxoplasma gondii*”. In: *PLoS ONE* 6.7. Ed. by Y. A. Kwai, e22936. DOI: 10.1371/journal.pone.0022936.
- Gregg, B., Taylor, B. C., John, B., Tait-Wojno, E. D., Girgis, N. M., Miller, N., Wagage, S., Roos, D. S., and Hunter, C. A. (2013). “Replication and Distribution of *Toxoplasma gondii* in the Small Intestine after Oral Infection with Tissue Cysts”. In: *Infection and Immunity* 81.5. Ed. by J. F. Urban, pp. 1635–1643. DOI: 10.1128/iai.01126-12.
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J., and Blumberg, R. S. (2016). “The unfolded protein response in immunity and inflammation”. In: *Nature Reviews Immunology* 16.8, pp. 469–484. DOI: 10.1038/nri.2016.62.
- Gros, M. and Amigorena, S. (2019). “Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation”. In: *Frontiers in Immunology* 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00041.
- Grover, H. S., Blanchard, N., Gonzalez, F., Chan, S., Robey, E. A., and Shastri, N. (2012). “The *Toxoplasma gondii* Peptide AS15 Elicits CD4 T Cells That Can Control Parasite Burden”. In: *Infection and Immunity* 80.9. Ed. by J. L. Flynn, pp. 3279–3288. DOI: 10.1128/iai.00425-12.
- Grover, H. S., Chu, H. H., Kelly, F. D., Yang, S. J., Reese, M. L., Blanchard, N., Gonzalez, F., Chan, S. W., Boothroyd, J. C., Shastri, N., *et al.* (2014). “Impact of Regulated Secretion on Antiparasitic CD8 T Cell Responses”. In: *Cell Reports* 7.5, pp. 1716–1728. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.031.
- Gubbels, M.-J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M., and Robey, E. A. (2005). “Class I Major Histocompatibility Complex Presentation of Antigens That Escape from the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii*”. In: *Infection and Immunity* 73.2, pp. 703–711. DOI: 10.1128/iai.73.2.703-711.2005.
- Guiton, R., Vasseur, V., Charron, S., Arias, M. T., Langendonck, N. V., Buzoni-Gatel, D., Ryffel, B., and Dimier-Poisson, I. (2010). “Interleukin 17 Receptor Signaling Is Deleterious during *Toxoplasma gondii* Infection in Susceptible BL6 Mice”. In: *The Journal of Infectious Diseases* 202.3, pp. 427–435. DOI: 10.1086/653738.

- Hajj, H. E., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., *et al.* (2006). “The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling”. In: *PROTEOMICS* 6.21, pp. 5773–5784. DOI: 10.1002/pmic.200600187.
- Håkansson, S. (2001). “*Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole”. In: *The EMBO Journal* 20.12, pp. 3132–3144. DOI: 10.1093/emboj/20.12.3132.
- Håkansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., and Sibley, L. D. (1999). “Time-Lapse Video Microscopy of Gliding Motility in *Toxoplasma gondii* Reveals a Novel, Biphasic Mechanism of Cell Locomotion”. In: *Molecular Biology of the Cell* 10.11. Ed. by W. J. Nelson, pp. 3539–3547. DOI: 10.1091/mbc.10.11.3539.
- Hakimi, M.-A., Olias, P., and Sibley, L. D. (2017). “*Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription”. In: *Clinical Microbiology Reviews* 30.3, pp. 615–645. DOI: 10.1128/cmr.00005-17.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., *et al.* (2013). “ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death”. In: *Nature Cell Biology* 15.5, pp. 481–490. DOI: 10.1038/ncb2738.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000a). “Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells”. In: *Molecular Cell* 6.5, pp. 1099–1108. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00108-8.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000b). “Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response”. In: *Molecular Cell* 5.5, pp. 897–904. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80330-5.
- Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). “Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase”. In: *Nature* 397.6716, pp. 271–274. DOI: 10.1038/16729.
- Hassan, I., Gaines, K. S., Hottel, W. J., Wishy, R. M., Miller, S. E., Powers, L. S., Rutkowski, D. T., and Monick, M. M. (2014). “Inositol-requiring Enzyme 1 Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication”. In: *Journal of Biological Chemistry* 289.11, pp. 7537–7546. DOI: 10.1074/jbc.m113.510594.
- Hassan, I., Zhang, M. S., Powers, L. S., Shao, J. Q., Baltrusaitis, J., Rutkowski, D. T., Legge, K., and Monick, M. M. (2011). “Influenza A Viral Replication Is Blocked by Inhibition of the Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) Stress Pathway”. In: *Journal of Biological Chemistry* 287.7, pp. 4679–4689. DOI: 10.1074/jbc.m111.284695.

- Hassan, M. A., Olijnik, A.-A., Frickel, E.-M., and Saeij, J. P. (2019). “Clonal and atypical Toxoplasma strain differences in virulence vary with mouse sub-species”. In: *International Journal for Parasitology* 49.1, pp. 63–70. DOI: 10.1016/j.ijpara.2018.08.007.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). “Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress”. In: *Molecular Biology of the Cell* 10.11. Ed. by P. Silver, pp. 3787–3799. DOI: 10.1091/mbc.10.11.3787.
- Heimesaat, M. M., Fischer, A., Jahn, H. K., Niebergall, J., Freudenberg, M., Blaut, M., Liesenfeld, O., Schumann, R. R., Gobel, U. B., and Bereswill, S. (2007). “Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal Escherichia coli”. In: *Gut* 56.7, pp. 941–948. DOI: 10.1136/gut.2006.104497.
- Herber, D. L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V., Nagaraj, S., Tyurin, V. A., Corzo, A., Cho, H.-I., Celis, E., Lennox, B., et al. (2010). “Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer”. In: *Nature Medicine* 16.8, pp. 880–886. DOI: 10.1038/nm.2172.
- Hermanns, T., Müller, U. B., Könen-Waisman, S., Howard, J. C., and Steinfeldt, T. (2015). “The Toxoplasma gondii rhoptry protein ROP18 is an IrpA-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7”. In: *Cellular Microbiology* 18.2, pp. 244–259. DOI: 10.1111/cmi.12499.
- Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S. A. (2015). “Proteostasis control by the unfolded protein response”. In: *Nature Cell Biology* 17.7, pp. 829–838. DOI: 10.1038/ncb3184.
- Hill, D. and Dubey, J. P. (2002). “Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention”. In: *Clinical Microbiology and Infection* 8.10, pp. 634–640. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x.
- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J. S. (2009). “Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells”. In: *The Journal of Cell Biology* 186.3, pp. 323–331. DOI: 10.1083/jcb.200903014.
- Hong, D.-P., Radke, J. B., and White, M. W. (2017). “Opposing Transcriptional Mechanisms Regulate Toxoplasma Development”. In: *mSphere* 2.1. Ed. by S. N. Moreno. DOI: 10.1128/msphere.00347-16.
- Hosken, N. and Bevan, M. (1990). “Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules”. In: *Science* 248.4953, pp. 367–370. DOI: 10.1126/science.2326647.
- Hou, B., Benson, A., Kuzmich, L., DeFranco, A. L., and Yarovinsky, F. (2010). “Critical coordination of innate immune defense against Toxoplasma gondii by dendritic cells responding via their Toll-like receptors”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.1, pp. 278–283. DOI: 10.1073/pnas.1011549108.



- Howe, D. K., Honore, S., Derouin, F., and Sibley, L. D. (1997). “Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis”. In: *Journal Of Clinical Microbiology*.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D. (1995). “*Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease”. In: *Journal of Infectious Diseases* 172.6, pp. 1561–1566. DOI: 10.1093/infdis/172.6.1561.
- Hsiao, C.-H. C., Hiller, N. L., 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”. In: *Traffic* 14.5, pp. 519–531. DOI: 10.1111/tra.12049.
- Hu, F., Yu, X., Wang, H., Zuo, D., Guo, C., Yi, H., Tirosh, B., Subjeck, J. R., Qiu, X., and Wang, X.-Y. (2011). “ER stress and its regulator X-box-binding protein-1 enhance polyIC-induced innate immune response in dendritic cells”. In: *European Journal of Immunology* 41.4, pp. 1086–1097. DOI: 10.1002/eji.201040831.
- Hu, H., Tian, M., Ding, C., and Yu, S. (2019). “The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection”. In: *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03083.
- Hu, K., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2002). “A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*”. In: *The Journal of Cell Biology* 156.6, pp. 1039–1050. DOI: 10.1083/jcb.200112086.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J., and Exton, J. H. (2006). “Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1alpha Mediated NFkB Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression”. In: *Molecular and Cellular Biology* 26.8, pp. 3071–3084. DOI: 10.1128/mcb.26.8.3071-3084.2006.
- Hunter, C. A. and Sibley, L. D. (2012). “Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors”. In: *Nature Reviews Microbiology* 10.11, pp. 766–778. DOI: 10.1038/nrmicro2858.
- Huynh, M.-H. (2003). “Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex”. In: *The EMBO Journal* 22.9, pp. 2082–2090. DOI: 10.1093/emboj/cdg217.
- Inacio, P., Zuzarte-Luis, V., Ruivo, M. T. G., Falkard, B., Nagaraj, N., Rooijers, K., Mann, M., Mair, G., Fidock, D. A., and Mota, M. M. (2015). “Parasite-induced ER stress response in hepatocytes facilitates Plasmodium liver stage infection”. In: *EMBO reports* 16.8, pp. 955–964. DOI: 10.15252/embr.201439979.
- Iwakoshi, N. N., Lee, A.-H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K., and Glimcher, L. H. (2003). “Plasma cell differentiation and the unfolded protein response inter-

- sect at the transcription factor XBP-1". In: *Nature Immunology* 4.4, pp. 321–329. DOI: 10.1038/ni907.
- Iwakoshi, N. N., Pypaert, M., and Glimcher, L. H. (2007). "The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells". In: *The Journal of Experimental Medicine* 204.10, pp. 2267–2275. DOI: 10.1084/jem.20070525.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010). "Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System". In: *Science* 327.5963, pp. 291–295. DOI: 10.1126/science.1183021.
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., and Kohno, K. (2009). "Function of IRE1alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.39, pp. 16657–16662. DOI: 10.1073/pnas.0903775106.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2003). "A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress". In: *Nature Medicine* 10.1, pp. 98–102. DOI: 10.1038/nm970.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation". In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11.2, pp. 113–127. DOI: 10.1038/nrm2838.
- Jensen, K. D. C., Wang, Y., Wojno, E. D. T., Shastri, A. J., Hu, K., Cornel, L., Boedec, E., Ong, Y.-C., Chien, Y.-h., Hunter, C. A., *et al.* (2011). "Toxoplasma Polymorphic Effectors Determine Macrophage Polarization and Intestinal Inflammation". In: *Cell Host & Microbe* 9.6, pp. 472–483. DOI: 10.1016/j.chom.2011.04.015.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). "Cross-presentation by dendritic cells". In: *Nature Reviews Immunology* 12.8, pp. 557–569. DOI: 10.1038/nri3254.
- John, B., Harris, T. H., Tait, E. D., Wilson, E. H., Gregg, B., Ng, L. G., Mrass, P., Roos, D. S., Dzierszinski, F., Weninger, W., *et al.* (2009). "Dynamic Imaging of CD8+ T Cells and Dendritic Cells during Infection with Toxoplasma gondii". In: *PLoS Pathogens* 5.7. Ed. by E. M. Riley, e1000505. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000505.
- Johnson, L. L. and Sayles, P. C. (2002). "Deficient Humoral Responses Underlie Susceptibility to Toxoplasma gondii in CD4- Deficient Mice". In: *Infection and Immunity* 70.1, pp. 185–191. DOI: 10.1128/iai.70.1.185-191.2002.
- Jong, M. F. de, Starr, T., Winter, M. G., Hartigh, A. B. den, Child, R., Knodler, L. A., Dijl, J. M. van, Celli, J., and Tsolis, R. M. (2013). "Sensing of Bacterial Type IV Secretion via the Unfolded Protein Response". In: *mBio* 4.1. Ed. by C. Roy and Y. Rikihisa. DOI: 10.1128/mbio.00418-12.
- Jongert, E., Lemiere, A., Ginderachter, J. V., Craeye, S. D., Huygen, K., and D'Souza, S. (2010). "Functional characterization of in vivo effector CD4+ and CD8+ T cell

- responses in acute Toxoplasmosis: An interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells”. In: *Vaccine* 28.13, pp. 2556–2564. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.01.031.
- Jordan, K. A., Wilson, E. H., Tait, E. D., Fox, B. A., Roos, D. S., Bzik, D. J., Dzierszinski, F., and Hunter, C. A. (2009). “Kinetics and Phenotype of Vaccine-Induced CD8+ T-Cell Responses to *Toxoplasma gondii*”. In: *Infection and Immunity* 77.9, pp. 3894–3901. DOI: 10.1128/iai.00024-09.
- Kanatani, S., Fuks, J. M., Olafsson, E. B., Westermark, L., Chambers, B., Varas-Godoy, M., Uhlén, P., and Barragan, A. (2017). “Voltage-dependent calcium channel signaling mediates GABAA receptor-induced migratory activation of dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*”. In: *PLOS Pathogens* 13.12. Ed. by E. Y. Denkers, e1006739. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006739.
- Kanatani, S., Uhlén, P., and Barragan, A. (2015). “Infection by *Toxoplasma gondii* Induces Amoeboid-Like Migration of Dendritic Cells in a Three-Dimensional Collagen Matrix”. In: *PLOS ONE* 10.9. Ed. by M. A. Hakimi, e0139104. DOI: 10.1371/journal.pone.0139104.
- Kang, H., Remington, J. S., and Suzuki, Y. (2000). “Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and Inducible Nitric Oxide Synthase”. In: *The Journal of Immunology* 164.5, pp. 2629–2634. DOI: 10.4049/jimmunol.164.5.2629.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). “Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens”. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.13, pp. 6020–6024. DOI: 10.1073/pnas.89.13.6020.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E. S., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H., *et al.* (2008). “XBP1 Links ER Stress to Intestinal Inflammation and Confers Genetic Risk for Human Inflammatory Bowel Disease”. In: *Cell* 134.5, pp. 743–756. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.021.
- Keestra-Gounder, A. M., Byndloss, M. X., Seyffert, N., Young, B. M., Chávez-Arroyo, A., Tsai, A. Y., Cevallos, S. A., Winter, M. G., Pham, O. H., Tiffany, C. R., *et al.* (2016). “NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation”. In: *Nature* 532.7599, pp. 394–397. DOI: 10.1038/nature17631.
- Kelly, M. N., Kolls, J. K., Happel, K., Schwartzman, J. D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., and Khan, I. A. (2004). “Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection”. In: *Infection and Immunity* 73.1, pp. 617–621. DOI: 10.1128/iai.73.1.617-621.2005.

- 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”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.37, pp. 14872–14877. DOI: 10.1073/pnas.0702356104.
- Khan, I. A., Ely, K. H., and Kasper, L. H. (1994). “Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice”. In: *Journal of Immunology*.
- Khan, I. A., Green, W. R., Kasper, L. H., Green, K. A., and Schwartzman, J. D. (1999). “Immune CD8+ T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host”. In: *Infection and Immunity*.
- Khan, I. A., Murphy, P. M., Casciotti, L., Schwartzman, J. D., Collins, J., Gao, J.-L., and Yeaman, G. R. (2001). “Mice Lacking the Chemokine Receptor CCR1 Show Increased Susceptibility to *Toxoplasma gondii* Infection”. In: *The Journal of Immunology* 166.3, pp. 1930–1937. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1930.
- 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”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.25, pp. 13955–13960. DOI: 10.1073/pnas.94.25.13955.
- 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”. In: *mSphere* 1.2. Ed. by I. J. Blader. DOI: 10.1128/msphere.00045-16.
- Kim, J. Y., Ahn, H.-J., Ryu, K. J., and Nam, H.-W. (2008). “Interaction between Parasitophorous Vacuolar Membrane-associated GRA3 and Calcium Modulating Ligand of Host Cell Endoplasmic Reticulum in the Parasitism of *Toxoplasma gondii*”. In: *The Korean Journal of Parasitology* 46.4, p. 209. DOI: 10.3347/kjp.2008.46.4.209.
- Kim, S., Joe, Y., Kim, H. J., Kim, Y.-S., Jeong, S. O., Pae, H.-O., Ryter, S. W., Surh, Y.-J., and Chung, H. T. (2015). “Endoplasmic Reticulum Stress-Induced IRE1alpha Activation Mediates Cross-Talk of GSK-3beta and XBP-1 To Regulate Inflammatory Cytokine Production”. In: *The Journal of Immunology* 194.9, pp. 4498–4506. DOI: 10.4049/jimmunol.1401399.
- Kim, S.-K., Fouts, A. E., and Boothroyd, J. C. (2007). “*Toxoplasma gondii* Dysregulates IFN-gamma-Inducible Gene Expression in Human Fibroblasts: Insights from a Genome-Wide Transcriptional Profiling”. In: *The Journal of Immunology* 178.8, pp. 5154–5165. DOI: 10.4049/jimmunol.178.8.5154.
- Kitai, Y., Ariyama, H., Kono, N., Oikawa, D., Iwawaki, T., and Arai, H. (2013). “Membrane lipid saturation activates IRE1alpha without inducing clustering”. In: *Genes to Cells* 18.9, pp. 798–809. DOI: 10.1111/gtc.12074.

- Kloetzel, P. M. (2004). “Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII”. In: *Nature Immunology* 5.7, pp. 661–669. DOI: 10.1038/ni1090.
- 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*”. In: *Immunity* 38.1, pp. 119–130. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.016.
- Kojima, E. I. J. I., Takeuchi, A., Haneda, M., Yagi, A., Hasegawa, T., Yamaki, K. I., Takeda, K., Akira, S., Shimokata, K., and Isobe, K. I. (2003). “The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice”. In: *The FASEB Journal* 17.11, pp. 1573–1575. DOI: 10.1096/fj.02-1184fje.
- Konishi, E. and Nakao, M. (1992). “Naturally occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against *Toxoplasma gondii*”. In: *Parasitology* 104.3, pp. 427–432. DOI: 10.1017/s003118200006368x.
- Konradt, C., Ueno, N., Christian, D. A., DeLong, J. H., Pritchard, G. H., Herz, J., Bzik, D. J., Koshy, A. A., McGavern, D. B., Lodoen, M. B., *et al.* (2016). “Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system”. In: *Nature Microbiology* 1.3. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.1.
- Korennykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., and Walter, P. (2008). “The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1”. In: *Nature* 457.7230, pp. 687–693. DOI: 10.1038/nature07661.
- Korennykh, A. and Walter, P. (2012). “Structural Basis of the Unfolded Protein Response”. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28.1, pp. 251–277. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155826.
- Kosmaczewski, S. G., Edwards, T. J., Han, S. M., Eckwahl, M. J., Meyer, B. I., Peach, S., Hesselberth, J. R., Wolin, S. L., and Hammarlund, M. (2014). “The RtcB RNA ligase is an essential component of the metazoan unfolded protein response”. In: *EMBO reports* 15.12, pp. 1278–1285. DOI: 10.15252/embr.201439531.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., and Momoi, T. (2006). “ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation”. In: *Cell Death & Differentiation* 14.2, pp. 230–239. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401984.

- Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. (1995). “A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules”. In: *Science* 267.5195, pp. 243–246. DOI: 10.1126/science.7809629.
- Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T. O., Klümpers, V., Felekyan, S., Kühnemuth, R., Peters, S. W., Seidel, C. A. M., and Pfeffer, K. (2016). “Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes”. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.11479.
- Krokowski, D., Guan, B.-J., Wu, J., Zheng, Y., Pattabiraman, P. P., Jobava, R., Gao, X.-H., Di, X.-J., Snider, M. D., Mu, T.-W., *et al.* (2017). “GADD34 Function in Protein Trafficking Promotes Adaptation to Hyperosmotic Stress in Human Corneal Cells”. In: *Cell Reports* 21.10, pp. 2895–2910. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.027.
- Kugler, D. G., Flomerfelt, F. A., Costa, D. L., Laky, K., Kamenyeva, O., Mittelstadt, P. R., Gress, R. E., Rosshart, S. P., Rehmann, B., Ashwell, J. D., *et al.* (2016). “Systemic toxoplasma infection triggers a long-term defect in the generation and function of naive T lymphocytes”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 213.13, pp. 3041–3056. DOI: 10.1084/jem.20151636.
- Kwok, L.-Y., Lütjen, S., Soltek, S., Soldati, D., Busch, D., Deckert, M., and Schlüter, D. (2003). “The Induction and Kinetics of Antigen-Specific CD8 T Cells Are Defined by the Stage Specificity and Compartmentalization of the Antigen in Murine Toxoplasmosis”. In: *The Journal of Immunology* 170.4, pp. 1949–1957. DOI: 10.4049/jimmunol.170.4.1949.
- Lamarque, M. H., Roques, M., Kong-Hap, M., Tonkin, M. L., Rugarabamu, G., Marq, J.-B., Penarete-Vargas, D. M., Boulanger, M. J., Soldati-Favre, D., and Lebrun, M. (2014). “Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites”. In: *Nature Communications* 5.1. DOI: 10.1038/ncomms5098.
- Lambert, H., Dellacasa-Lindberg, I., and Barragan, A. (2011). “Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*”. In: *Microbes and Infection* 13.1, pp. 96–102. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.10.002.
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., and Barragan, A. (2006). “Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination”. In: *Cellular Microbiology* 8.10, pp. 1611–1623. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x.
- Lambert, H., Vutova, P. P., Adams, W. C., Lore, K., and Barragan, A. (2009). “The *Toxoplasma gondii*-Shuttling Function of Dendritic Cells Is Linked to the Parasite Genotype”. In: *Infection and Immunity* 77.4, pp. 1679–1688. DOI: 10.1128/iai.01289-08.

- Lambert, H. and Barragan, A. (2010). “Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*”. In: *Cellular Microbiology* 12.3, pp. 292–300. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x.
- Lang, C., Algner, M., Beinert, N., Groß, U., and Lüder, C. G. K. (2006). “Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression”. In: *Microbes and Infection* 8.8, pp. 1994–2005. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.02.031.
- 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-gamma”. In: *PLoS Pathogens* 8.1. Ed. by G. S. Yap, e1002483. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002483.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., and Glimcher, L. H. (2003). “XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response”. In: *Molecular and Cellular Biology* 23.21, pp. 7448–7459. DOI: 10.1128/mcb.23.21.7448-7459.2003.
- Lee, A.-H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., and Glimcher, L. H. (2008). “Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1”. In: *Science* 320.5882, pp. 1492–1496. DOI: 10.1126/science.1158042.
- Lee, H. K., Mattei, L. M., Steinberg, B. E., Alberts, P., Lee, Y. H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). “In Vivo Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by Dendritic Cells”. In: *Immunity* 32.2, pp. 227–239. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.12.006.
- Lee, Y., Sasai, M., Ma, J. S., Sakaguchi, N., Ohshima, J., Bando, H., Saitoh, T., Akira, S., and Yamamoto, M. (2015). “p62 Plays a Specific Role in Interferon-gamma-Induced Presentation of a *Toxoplasma* Vacuolar Antigen”. In: *Cell Reports* 13.2, pp. 223–233. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.005.
- Lemgruber, L., Lupetti, P., Martins-Duarte, E. S., Souza, W. D., and Vommoro, R. C. (2011). “The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form”. In: *Cellular Microbiology* 13.12, pp. 1920–1932. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01681.x.
- Lencer, W. I., DeLuca, H., Grey, M. J., and Cho, J. A. (2015). “Innate immunity at mucosal surfaces: the IRE1-RIDD-RIG-I pathway”. In: *Trends in Immunology* 36.7, pp. 401–409. DOI: 10.1016/j.it.2015.05.006.
- Lerner, A. G., Upton, J.-P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., *et al.* (2012). “IRE1alpha Induces Thioredoxin-Interacting Protein to Activate the NLRP3 Inflammasome and Promote

- Programmed Cell Death under Irremediable ER Stress”. In: *Cell Metabolism* 16.2, pp. 250–264. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.07.007.
- Leroux, L.-P., Nishi, M., El-Hage, S., Fox, B. A., Bzik, D. J., and Dzierszynski, F. S. (2015). “Parasite Manipulation of the Invariant Chain and the Peptide Editor H2-DM Affects Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation during *Toxoplasma gondii* Infection”. In: *Infection and Immunity* 83.10. Ed. by J. H. Adams, pp. 3865–3880. DOI: 10.1128/iai.00415-15.
- Lévêque, M. F., Berry, L., Yamaryo-Botté, Y., Nguyen, H. M., Galera, M., Botté, C. Y., and Besteiro, S. (2017). “TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*”. In: *Molecular Microbiology* 105.1, pp. 158–174. DOI: 10.1111/mmi.13694.
- Li, S., Kong, L., and Yu, X. (2013). “The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis”. In: *Critical Reviews in Microbiology* 41.2, pp. 150–164. DOI: 10.3109/1040841x.2013.813899.
- Li, Y., Liu, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., Shi, Y., Wang, X., Li, X., and Zhou, H. (2018). “Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses”. In: *International Journal of Nanomedicine* Volume 13, pp. 467–477. DOI: 10.2147/ijn.s151110.
- Lieberman, L. A., Cardillo, F., Owyang, A. M., Rennick, D. M., Cua, D. J., Kastelein, R. A., and Hunter, C. A. (2004). “IL-23 Provides a Limited Mechanism of Resistance to Acute Toxoplasmosis in the Absence of IL-12”. In: *The Journal of Immunology* 173.3, pp. 1887–1893. DOI: 10.4049/jimmunol.173.3.1887.
- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., *et al.* (2009). “Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production”. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379.2, pp. 196–200. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.070.
- Ling, Y. M., Shaw, M. H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G. A., Ferguson, D. J. P., and Yap, G. S. (2006). “Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 203.9, pp. 2063–2071. DOI: 10.1084/jem.20061318.
- Liu, C.-H., Fan, Y.-t., 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”. In: *The Journal of Immunology* 177.1, pp. 31–35. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.31.



- Liu, C. Y., Schröder, M., and Kaufman, R. J. (2000). “Ligand-independent Dimerization Activates the Stress Response Kinases IRE1 and PERK in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum”. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.32, pp. 24881–24885. DOI: 10.1074/jbc.m004454200.
- Liu, E., Grol, J. V., and Subauste, C. S. (2015). “Atg5 but not Atg7 in dendritic cells enhances IL-2 and IFN-gamma production by Toxoplasma gondii-reactive CD4+ T cells”. In: *Microbes and Infection* 17.4, pp. 275–284. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.12.008.
- Liu, Q., Wang, Z.-D., Huang, S.-Y., and Zhu, X.-Q. (2015). “Diagnosis of toxoplasmosis and typing of Toxoplasma gondii”. In: *Parasites & Vectors* 8.1. DOI: 10.1186/s13071-015-0902-6.
- Lopez, J., Bittame, A., Massera, C., Vasseur, V., Effantin, G., Valat, A., Buillon, C., Allart, S., Fox, B. A., Rommereim, L. M., *et al.* (2015). “Intravacuolar Membranes Regulate CD8 T Cell Recognition of Membrane-Bound Toxoplasma gondii Protective Antigen”. In: *Cell Reports* 13.10, pp. 2273–2286. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.11.001.
- López-Yglesias, A. H., Camanzo, E., Martin, A. T., Araujo, A. M., and Yarovinsky, F. (2019). “TLR11-independent inflammasome activation is critical for CD4+ T cell-derived IFN-gamma production and host resistance to Toxoplasma gondii”. In: *PLOS Pathogens* 15.6. Ed. by J. P. J. Saeij, e1007872. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007872.
- Lu, Y., Liang, F.-X., and Wang, X. (2014). “A Synthetic Biology Approach Identifies the Mammalian UPR RNA Ligase RtcB”. In: *Molecular Cell* 55.5, pp. 758–770. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.06.032.
- Luangsay, S., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Mennechet, F. J. D., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2003). “CCR5 mediates specific migration of Toxoplasma gondii—primed CD8+ lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells”. In: *Gastroenterology* 125.2, pp. 491–500. DOI: 10.1016/s0016-5085(03)00903-x.
- Lüder, C. G., Lang, C., Giraldo-Velasquez, M., Algner, M., Gerdes, J., and Gross, U. (2003). “Toxoplasma gondii inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA”. In: *Journal of Neuroimmunology* 134.1-2, pp. 12–24. DOI: 10.1016/s0165-5728(02)00320-x.
- Lueder, C. G. K. and Rahman, T. (2017). “Impact of the host on Toxoplasma stage differentiation”. In: *Microbial Cell* 4.7, pp. 203–211. DOI: 10.15698/mic2017.07.579.
- Lutjen, S., Soltek, S., Virna, S., Deckert, M., and Schluter, D. (2006). “Organ- and Disease-Stage-Specific Regulation of Toxoplasma gondii-Specific CD8-T-Cell Responses by CD4 T Cells”. In: *Infection and Immunity* 74.10, pp. 5790–5801. DOI: 10.1128/iai.00098-06.

- Lyons, R. E., McLeod, R., and Roberts, C. W. (2002). “Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion”. In: *Trends in Parasitology* 18.5, pp. 198–201. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)02248-1.
- 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”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 211.10, pp. 2013–2032. DOI: 10.1084/jem.20131272.
- Maingat, F., Halloran, B., Acharjee, S., Marle, G. van, Church, D., Gill, M. J., Uwiera, R. R. E., Cohen, E. A., Meddings, J., Madsen, K., *et al.* (2011). “Inflammation and epithelial cell injury in AIDS enteropathy: involvement of endoplasmic reticulum stress”. In: *The FASEB Journal* 25.7, pp. 2211–2220. DOI: 10.1096/fj.10-175992.
- Majumdar, T., Chattopadhyay, S., Ozhegov, E., Dhar, J., Goswami, R., Sen, G. C., and Barik, S. (2015). “Induction of Interferon-Stimulated Genes by IRF3 Promotes Replication of Toxoplasma gondii”. In: *PLoS Pathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004779.
- Mantegazza, A. R., Magalhaes, J. G., Amigorena, S., and Marks, M. S. (2012). “Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II”. In: *Traffic* 14.2, pp. 135–152. DOI: 10.1111/tra.12026.
- Márquez, S., Fernández, J. J., Terán-Cabanillas, E., Herrero, C., Alonso, S., Azogil, A., Montero, O., Iwawaki, T., Cubillos-Ruiz, J. R., Fernández, N., *et al.* (2017). “Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 $\alpha$  Enhances IL-23 Expression by Human Dendritic Cells”. In: *Frontiers in Immunology* 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00639.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A.-H., and Glimcher, L. H. (2010). “TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages”. In: *Nature Immunology* 11.5, pp. 411–418. DOI: 10.1038/ni.1857.
- Masatani, T., Matsuo, T., Tanaka, T., Terkawi, M. A., Lee, E.-G., Goo, Y.-K., Aboge, G. O., Yamagishi, J., Hayashi, K., Kameyama, K., *et al.* (2013). “TgGRA23, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein associated with the parasitophorous vacuole membrane and intravacuolar network”. In: *Parasitology International* 62.4, pp. 372–379. DOI: 10.1016/j.parint.2013.04.003.
- Matta, S. K., Olias, P., Huang, Z., Wang, Q., Park, E., Yokoyama, W. M., and Sibley, D. L. (2019). “Toxoplasma gondii effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201904637. DOI: 10.1073/pnas.1904637116.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., and Gerlo, S. (2014). “Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation”. In: *Trends in Biochemical Sciences* 39.5, pp. 245–254. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.008.

- Mayorga, L. S. and Cebrian, I. (2018). “Rab22a: A novel regulator of immune functions”. In: *Molecular Immunology*. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.03.028.
- Mazumdar, J., Wilson, E. H., Masek, K., Hunter, C. A., and Striepen, B. (2006). “Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.35, pp. 13192–13197. DOI: 10.1073/pnas.0603391103.
- 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*”. In: *The Journal of Immunology* 173.4, pp. 2632–2640. DOI: 10.4049/jimmunol.173.4.2632.
- Mearns, G. P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S. E., Mobley, J. A., Corbett, J. A., and Benveniste, E. N. (2014). “PERK-Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Inflammation”. In: *Molecular and Cellular Biology* 34.20, pp. 3911–3925. DOI: 10.1128/mcb.00980-14.
- Medel, B., Costoya, C., Fernandez, D., Pereda, C., Lladser, A., Sauma, D., Pacheco, R., Iwawaki, T., Salazar-Onfray, F., and Osorio, F. (2019). “IRE1alpha Activation in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Modulates Innate Recognition of Melanoma Cells and Favors CD8+ T Cell Priming”. In: *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03050.
- Mehlitz, A., Karunakaran, K., Herweg, J.-A., Krohne, G., Linde, S. van de, Rieck, E., Sauer, M., and Rudel, T. (2014). “The chlamydial organism *Simkania negevensis* forms ER vacuole contact sites and inhibits ER-stress”. In: *Cellular Microbiology* 16.8, pp. 1224–1243. DOI: 10.1111/cmi.12278.
- Mehrbod, P., Ande, S. R., Alizadeh, J., Rahimizadeh, S., Shariati, A., Malek, H., Hashemi, M., Glover, K. K. M., Sher, A. A., Coombs, K. M., *et al.* (2019). “The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections”. In: *Virulence* 10.1, pp. 376–413. DOI: 10.1080/21505594.2019.1605803.
- 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*”. In: *PLoS Pathogens* 6.8. Ed. by L. D. Sibley, e1001071. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001071.
- Menard, L. C., Minns, L. A., Darce, S., Mielcarz, D. W., Foureau, D. M., Roos, D., Dzierszinski, F., Kasper, L. H., and Buzoni-Gatel, D. (2007). “B Cells Amplify IFN-gamma Production By T Cells via a TNF-alpha-Mediated Mechanism”. In: *The Journal of Immunology* 179.7, pp. 4857–4866. DOI: 10.4049/jimmunol.179.7.4857.
- Mennechet, F. J. D., Kasper, L. H., Rachinel, N., Li, W., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2002). “Lamina Propria CD4+ T Lymphocytes Synergize with Murine In-

- testinal Epithelial Cells to Enhance Proinflammatory Response Against an Intracellular Pathogen”. In: *The Journal of Immunology* 168.6, pp. 2988–2996. DOI: 10.4049/jimmunol.168.6.2988.
- Mennechet, F. J. D., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Luangsay, S., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2004). “Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells”. In: *European Journal of Immunology* 34.4, pp. 1059–1067. DOI: 10.1002/eji.200324416.
- Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., and Tschopp, J. (2012). “ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway”. In: *Cell Death & Disease* 3.1, e261–e261. DOI: 10.1038/cddis.2011.132.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). “The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting”. In: *Annual Review of Immunology* 31.1, pp. 563–604. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Mercier, C. and Cesbron-Delauw, M.-F. (2015). “Toxoplasma secretory granules: one population or more?” In: *Trends in Parasitology* 31.2, pp. 60–71. DOI: 10.1016/j.pt.2014.12.002.
- Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., and Cesbron-Delauw, M.-F. (2002). “Biogenesis of Nanotubular Network in Toxoplasma Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins”. In: *Molecular Biology of the Cell* 13.7. Ed. by J. Lippincott-Schwartz, pp. 2397–2409. DOI: 10.1091/mbc.e02-01-0021.
- Merquiol, E., Uzi, D., Mueller, T., Goldenberg, D., Nahmias, Y., Xavier, R. J., Tirosh, B., and Shibolet, O. (2011). “HCV Causes Chronic Endoplasmic Reticulum Stress Leading to Adaptation and Interference with the Unfolded Protein Response”. In: *PLoS ONE* 6.9. DOI: 10.1371/journal.pone.0024660.
- Miller, C. M., Boulter, N. R., Ikin, R. J., and Smith, N. C. (2009). “The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*”. In: *International Journal for Parasitology* 39.1, pp. 23–39. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.08.002.
- Minns, L. A., Menard, L. C., Foureau, D. M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D. W., Buzoni-Gatel, D., and Kasper, L. H. (2006). “TLR9 Is Required for the Gut-Associated Lymphoid Tissue Response following Oral Infection of *Toxoplasma gondii*”. In: *The Journal of Immunology* 176.12, pp. 7589–7597. DOI: 10.4049/jimmunol.176.12.7589.
- Miranda, K., Pace, D. A., Cintron, R., Rodrigues, J. C. F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., Haas, F. D., Souza, W. D., *et al.* (2010). “Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant

- vacuole". In: *Molecular Microbiology* 76.6, pp. 1358–1375. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07165.x.
- Mogilenko, D. A., Haas, J. T., L'homme, L., Fleury, S., Quemener, S., Levavasseur, M., Becquart, C., Wartelle, J., Bogomolova, A., Pineau, L., *et al.* (2019). "Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR". In: *Cell* 177.5, 1201–1216.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.018.
- Momburg, F., Neefjes, J. J., and Hammerling, G. J. (1994). "Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters". In: *Current Opinion in Immunology* 6.1, pp. 32–37. DOI: 10.1016/0952-7915(94)90030-2.
- Monteiro, V. G., Melo, E. J. T. de, Attias, M., and Souza, W. de (2001). "Morphological Changes during Conoid Extrusion in *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Treated with Calcium Ionophore". In: *Journal of Structural Biology* 136.3, pp. 181–189. DOI: 10.1006/jsbi.2002.4444.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). "Toxoplasmosis". In: *The Lancet* 363.9425, pp. 1965–1976. DOI: 10.1016/s0140-6736(04)16412-x.
- Morada, M., Pendyala, L., Wu, G., Merali, S., and Yarlett, N. (2013). "Cryptosporidium parvum Induces an Endoplasmic Stress Response in the Intestinal Adenocarcinoma HCT-8 Cell Line". In: *Journal of Biological Chemistry* 288.42, pp. 30356–30364. DOI: 10.1074/jbc.m113.459735.
- Mordue, D. G. and Sibley, D. L. (2003). "A novel population of Gr1(+)-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis". In: *Journal of Leukocyte Biology* 74.6, pp. 1015–1025. DOI: 10.1189/jlb.0403164.
- Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Moss, J., and Noda, M. (2008). "Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1". In: *Cellular Microbiology* 10.4, pp. 921–929. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01094.x.
- Moroda, M., Takamoto, M., Iwakura, Y., Nakayama, J., and Aosai, F. (2017). "Interleukin-17A-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Toxoplasma gondii* Infection Due to Excessively Induced *T. gondii* HSP70 and Interferon Gamma Production". In: *Infection and Immunity* 85.12. DOI: 10.1128/iai.00399-17.
- Morrisette, N. (2014). "Targeting *Toxoplasma* Tubules: Tubulin, Microtubules, and Associated Proteins in a Human Pathogen". In: *Eukaryotic Cell* 14.1, pp. 2–12. DOI: 10.1128/ec.00225-14.
- Mulvey, M., Arias, C., and Mohr, I. (2007). "Maintenance of Endoplasmic Reticulum (ER) Homeostasis in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells through the Association of

- a Viral Glycoprotein with PERK, a Cellular ER Stress Sensor”. In: *Journal of Virology* 81.7, pp. 3377–3390. DOI: 10.1128/jvi.02191-06.
- Munoz, M., Heimesaat, M. M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I. R., Wolk, K., *et al.* (2009). “Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 206.13, pp. 3047–3059. DOI: 10.1084/jem.20090900.
- Murillo-León, M., Müller, U. B., Zimmermann, I., Singh, S., Widdershooven, P., Campos, C., Alvarez, C., Könen-Waisman, S., Lukes, N., Ruzsics, Z., *et al.* (2019). “Molecular mechanism for the control of virulent *Toxoplasma gondii* infections in wild-derived mice”. In: *Nature Communications* 10.1. DOI: 10.1038/s41467-019-09200-2.
- Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N., and Sibley, L. D. (2008). “Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*”. In: *Nature* 451.7175, pp. 207–210. DOI: 10.1038/nature06478.
- Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P. A., Tampé, R., *et al.* (2014). “TLR Signals Induce Phagosomal MHC-I Delivery from the Endosomal Recycling Compartment to Allow Cross-Presentation”. In: *Cell* 158.3, pp. 506–521. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.054.
- Nakajima, S., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Saito, Y., Kato, H., Huang, T., Yao, J., Paton, A. W., Paton, J. C., and Kitamura, M. (2011). “Selective Abrogation of BiP/GRP78 Blunts Activation of NF- $\kappa$ B through the ATF6 Branch of the UPR: Involvement of C/EBP and mTOR-Dependent Dephosphorylation of Akt”. In: *Molecular and Cellular Biology* 31.8, pp. 1710–1718. DOI: 10.1128/mcb.00939-10.
- Nakano, Y., Hisaeda, H., Sakai, T., Zhang, M., Maekawa, Y., Zhang, T., Nishitani, M., Ishikawa, H., and Himeno, K. (2001). “Granule-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by CD8<sup>+</sup> T cells”. In: *Immunology* 104.3, pp. 289–298. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2001.01319.x.
- 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”. In: *mBio* 9.2. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.02401-17.
- Napolitano, A., Veen, A. G. van der, Bunyan, M., Borg, A., Frith, D., Howell, S., Kjaer, S., Beling, A., Snijders, A. P., Knobloch, K.-P., *et al.* (2018). “Cysteine-Reactive Free ISG15 Generates IL-1 $\beta$  Producing CD8 $\alpha$  + Dendritic Cells at the Site of Infection”. In: *The Journal of Immunology* 201.2, pp. 604–614. DOI: 10.4049/jimmunol.1701322.

- Neefjes, J., Jongasma, M. L. M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). “Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation”. In: *Nature Reviews Immunology* 11.12, pp. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.
- Niedelman, W., Gold, D. A., Rosowski, E. E., Sprokholt, J. K., Lim, D., Arenas, A. F., 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”. In: *PLoS Pathogens* 8.6. Ed. by D. Soldati-Favre. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002784.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., and Ron, D. (2001). “Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ ”. In: *The Journal of Cell Biology* 153.5, pp. 1011–1022. DOI: 10.1083/jcb.153.5.1011.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2006). “Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation”. In: *The Journal of Cell Biology* 172.3, pp. 383–393. DOI: 10.1083/jcb.200507057.
- Ohtsuka, Y., Lee, J., Stamm, D., and Sanderson, I. (2001). “MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine”. In: *Gut* 49.4, pp. 526–533. DOI: 10.1136/gut.49.4.526.
- Olafsson, E. B., Varas-Godoy, M., and Barragan, A. (2018). “*Toxoplasma gondii* infection shifts dendritic cells into an amoeboid rapid migration mode encompassing podosome dissolution, secretion of TIMP-1, and reduced proteolysis of extracellular matrix”. In: *Cellular Microbiology* 20.3, e12808. DOI: 10.1111/cmi.12808.
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., Santos, L. D., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., *et al.* (2009). “Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infection”. In: *Immunity* 31.5, pp. 772–786. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.10.001.
- Olguin, J. E., Fernandez, J., Salinas, N., Juarez, I., Rodriguez-Sosa, M., Campuzano, J., Castellanos, C., and Saavedra, R. (2015). “Adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response”. In: *Microbes and Infection* 17.8, pp. 586–595. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.04.002.
- Olias, P., Etheridge, R. D., Zhang, Y., Holtzman, M. J., and Sibley, D. L. (2016). “*Toxoplasma* Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-gamma-Dependent Gene Expression”. In: *Cell Host & Microbe* 20.1, pp. 72–82. DOI: 10.1016/j.chom.2016.06.006.
- Ong, Y.-C., Reese, M. L., and Boothroyd, J. C. (2010). “*Toxoplasma* Rhoptry Protein 16 (ROP16) Subverts Host Function by Direct Tyrosine Phosphorylation of STAT6”. In:

- Journal of Biological Chemistry* 285.37, pp. 28731–28740. DOI: 10.1074/jbc.m110.112359.
- Opitz, C. and Soldati, D. (2002). “‘The glideosome’: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*”. In: *Molecular Microbiology* 45.3, pp. 597–604. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x.
- Osorio, F., Lambrecht, B. N., and Janssens, S. (2018). “Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways”. In: *Current Opinion in Immunology* 52, pp. 100–107. DOI: 10.1016/j.coi.2018.04.020.
- Osorio, F., Tavernier, S. J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Veters, J., Delrue, I., Rycke, R. D., Parthoens, E., Pouliot, P., *et al.* (2014). “The unfolded-protein-response sensor IRE-1 $\alpha$  regulates the function of CD8 $\alpha$  + dendritic cells”. In: *Nature Immunology* 15.3, pp. 248–257. DOI: 10.1038/ni.2808.
- Palam, L. R., Baird, T. D., and Wek, R. C. (2011). “Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation”. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.13, pp. 10939–10949. DOI: 10.1074/jbc.m110.216093.
- Panas, M. W., Naor, A., Cygan, A. M., and Boothroyd, J. C. (2019). “*Toxoplasma* Controls Host Cyclin E Expression through the Use of a Novel MYR1-Dependent Effector Protein, HCE1”. In: *mBio* 10.2. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.00674-19.
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. (2009). “*Toxoplasmosis* snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis”. In: *International Journal for Parasitology* 39.12, pp. 1385–1394. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003.
- Parussini, F., Coppens, I., Shah, P. P., Diamond, S. L., and Carruthers, V. B. (2010). “Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of *Toxoplasma gondii*”. In: *Molecular Microbiology* 76.6, pp. 1340–1357. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07181.x.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J. C., Wilce, M. C. J., Rossjohn, J., Talbot, U. M., and Paton, J. C. (2006). “AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP”. In: *Nature* 443.7111, pp. 548–552. DOI: 10.1038/nature05124.
- Pauwels, A.-M., Trost, M., Beyaert, R., and Hoffmann, E. (2017). “Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation”. In: *Trends in Immunology* 38.6, pp. 407–422. DOI: 10.1016/j.it.2017.03.006.



- Peaper, D. R. and Cresswell, P. (2008). “Regulation of MHC Class I Assembly and Peptide Binding”. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24.1, pp. 343–368. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175347.
- Pearce, E. J. and Everts, B. (2014). “Dendritic cell metabolism”. In: *Nature Reviews Immunology* 15.1, pp. 18–29. DOI: 10.1038/nri3771.
- 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”. In: *Cell Host & Microbe* 8.2, pp. 208–218. DOI: 10.1016/j.chom.2010.07.004.
- Pena, J. and Harris, E. (2011). “Dengue Virus Modulates the Unfolded Protein Response in a Time-dependent Manner”. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.16, pp. 14226–14236. DOI: 10.1074/jbc.m111.222703.
- Pepper, M., Dzierszynski, F., Crawford, A., Hunter, C. A., and Roos, D. (2004). “Development of a System To Study CD4<sup>+</sup>-T-Cell Responses to Transgenic Ovalbumin-Expressing *Toxoplasma gondii* during Toxoplasmosis”. In: *Infection and Immunity* 72.12, pp. 7240–7246. DOI: 10.1128/iai.72.12.7240-7246.2004.
- Pereira-Chioccola, V. L., Vidal, J. E., and Su, C. (2009). “*Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients”. In: *Future Microbiology* 4.10, pp. 1363–1379. DOI: 10.2217/fmb.09.89.
- Pernas, L., Adomako-Ankomah, Y., Shastri, A. J., Ewald, S. E., Treeck, M., Boyle, J. P., and Boothroyd, J. C. (2014). “*Toxoplasma* Effector MAF1 Mediates Recruitment of Host Mitochondria and Impacts the Host Response”. In: *PLoS Biology* 12.4. Ed. by B. Striepen, e1001845. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001845.
- Pernas, L., Bean, C., Boothroyd, J. C., and Scorrano, L. (2018). “Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids”. In: *Cell Metabolism* 27.4, 886–897.e4. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.02.018.
- Persat, F., Mercier, C., Ficheux, D., Colomb, E., Trouillet, S., Bendridi, N., Musset, K., Loeuillet, C., Cesbron-Delauw, M.-F., and Vincent, C. (2012). “A synthetic peptide derived from the parasite *Toxoplasma gondii* triggers human dendritic cells migration”. In: *Journal of Leukocyte Biology* 92.6, pp. 1241–1250. DOI: 10.1189/jlb.1211600.
- Persson, E. K., Agnarson, A. M., Lambert, H., Hitziger, N., Yagita, H., Chambers, B. J., Barragan, A., and Grandien, A. (2007). “Death Receptor Ligation or Exposure to Perforin Trigger Rapid Egress of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*”. In: *The Journal of Immunology* 179.12, pp. 8357–8365. DOI: 10.4049/jimmunol.179.12.8357.
- Pfefferkorn, E. (1984). “Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81.3, pp. 908–912. DOI: 10.1073/pnas.81.3.908.

- Pfefferkorn, E., Eckel, M., and Rebhun, S. (1986). “Interferon gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan”. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 20.3, pp. 215–224. DOI: 10.1016/0166-6851(86)90101-5.
- Pifer, R., Benson, A., Sturge, C. R., and Yarovinsky, F. (2010). “UNC93B1 Is Essential for TLR11 Activation and IL-12-dependent Host Resistance to *Toxoplasma gondii*”. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.5, pp. 3307–3314. DOI: 10.1074/jbc.M110.171025.
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P., and Chakraborty, T. (2012). “Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*”. In: *Cellular Microbiology* 14.6, pp. 949–964. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01769.x.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.-F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). “*Toxoplasma* Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11-Dependent Induction of an Interleukin-12 Response”. In: *Cell Host & Microbe* 3.2, pp. 77–87. DOI: 10.1016/j.chom.2008.01.001.
- Poncet, A. F., Blanchard, N., and Marion, S. (2019). “*Toxoplasma* and Dendritic Cells: An Intimate Relationship That Deserves Further Scrutiny”. In: *Trends in Parasitology*. DOI: 10.1016/j.pt.2019.08.001.
- Portman, N. and Šlapeta, J. (2014). “The flagellar contribution to the apical complex: a new tool for the eukaryotic Swiss Army knife?” In: *Trends in Parasitology* 30.2, pp. 58–64. DOI: 10.1016/j.pt.2013.12.006.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S.-B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Benink, J. R., and Yewdell, J. W. (2003). “Quantitating Protein Synthesis, Degradation, and Endogenous Antigen Processing”. In: *Immunity* 18.3, pp. 343–354. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00051-7.
- Pucchio, T. D., Chatterjee, B., Smed-Sørensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J. E. (2008). “Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I”. In: *Nature Immunology* 9.5, pp. 551–557. DOI: 10.1038/ni.1602.
- Pueyo, S., Leport, C., Chene, G., Morlat, P., Hafner, R., Vilde, J. L., Luft, B., Salamon, R., and Aubertin, J. (1993). “Facteurs de risque de toxoplasmose cérébrale chez les patients infectés par le VIH: données d’un essai de prophylaxie primaire”. In: *La Revue de Médecine Interne* 14.10, p. 1001. DOI: 10.1016/S0248-8663(05)80119-5.
- Qin, Q.-M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B. D., Ficht, T. A., and Figueiredo, P. de (2008). “RNAi Screen of Endoplasmic Reticulum-Associated Host Factors Reveals a Role for IRE1alpha in Supporting *Brucella* Replication”. In: *PLoS Pathogens* 4.7. Ed. by D. S. Schneider, e1000110. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000110.

- Qiu, Q., Zheng, Z., Chang, L., Zhao, Y.-S., Tan, C., Dandekar, A., Zhang, Z., Lin, Z., Gui, M., Li, X., *et al.* (2013). “Toll-like receptor-mediated IRE1alpha activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis”. In: *The EMBO Journal* 32.18, pp. 2477–2490. DOI: 10.1038/emboj.2013.183.
- Rabaud, C., May, T., Lucet, J. C., Leport, C., Ambroise-Thomas, P., and Canton, P. (1996). “Pulmonary Toxoplasmosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: A French National Survey”. In: *Clinical Infectious Diseases* 23.6, pp. 1249–1254. DOI: 10.1093/clinids/23.6.1249.
- Radke, J., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., and White, M. W. (2001). “Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*”. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 115.2, pp. 165–175. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00284-5.
- Raetz, M., Kibardin, A., Sturge, C. R., Pifer, R., Li, H., Burstein, E., Ozato, K., Larin, S., and Yarovinsky, F. (2013). “Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-Dependent IL-12 Response to *Toxoplasma gondii* Profilin”. In: *The Journal of Immunology* 191.9, pp. 4818–4827. DOI: 10.4049/jimmunol.1301301.
- Rastogi, S., Cygan, A. M., and Boothroyd, J. C. (2019). “Translocation of effector proteins into host cells by *Toxoplasma gondii*”. In: *Current Opinion in Microbiology* 52, pp. 130–138. DOI: 10.1016/j.mib.2019.07.002.
- Rathore, A. P. S., Ng, M.-L., and Vasudevan, S. G. (2013). “Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2alpha phosphorylation”. In: *Virology Journal* 10.1, p. 36. DOI: 10.1186/1743-422x-10-36.
- Reid, A. J., Vermont, S. J., Cotton, J. A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G. A., Könen-Waisman, S., Latham, S. M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M. A., *et al.* (2012). “Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia Differing in Host Range and Transmission Strategy”. In: *PLoS Pathogens* 8.3. Ed. by B. Striepen, e1002567. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002567.
- Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., and Glimcher, L. H. (2001). “Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1”. In: *Nature* 412.6844, pp. 300–307. DOI: 10.1038/35085509.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., and Costa, J.-M. (2003). “Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes”. In: *BMC Infectious Diseases* 3.1. DOI: 10.1186/1471-2334-3-7.

- Reverendo, M., Mendes, A., Argüello, R. J., Gatti, E., and Pierre, P. (2018). “At the crossway of ER-stress and proinflammatory responses”. In: *The FEBS Journal* 286.2, pp. 297–310. DOI: 10.1111/febs.14391.
- Richardson, C. E., Kooistra, T., and Kim, D. H. (2010). “An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*”. In: *Nature* 463.7284, pp. 1092–1095. DOI: 10.1038/nature08762.
- Rio, L. D., Bennouna, S., Salinas, J., and Denkers, E. Y. (2001). “CXCR2 Deficiency Confers Impaired Neutrophil Recruitment and Increased Susceptibility During *Toxoplasma gondii* Infection”. In: *The Journal of Immunology* 167.11, pp. 6503–6509. DOI: 10.4049/jimmunol.167.11.6503.
- 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”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201.11, pp. 1761–1769. DOI: 10.1084/jem.20050054.
- Robert-Gangneux, F. and Darde, M.-L. (2012). “Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis”. In: *Clinical Microbiology Reviews* 25.2, pp. 264–296. DOI: 10.1128/cmr.05013-11.
- Rohloff, P., Miranda, K., Rodrigues, J. C. F., Fang, J., Galizzi, M., Plattner, H., Hentschel, J., and Moreno, S. N. J. (2011). “Calcium Uptake and Proton Transport by Acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*”. In: *PLoS ONE* 6.4. Ed. by G. Langsley, e18390. DOI: 10.1371/journal.pone.0018390.
- Roiko, M. S., Svezhova, N., and Carruthers, V. B. (2014). “Acidification Activates *Toxoplasma gondii* Motility and Egress by Enhancing Protein Secretion and Cytolytic Activity”. In: *PLoS Pathogens* 10.11. Ed. by L. J. Knoll, e1004488. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004488.
- Romano, J. D., Nolan, S. J., Porter, C., Ehrenman, K., Hartman, E. J., Hsia, R.-c., and Coppens, I. (2017). “The parasite *Toxoplasma* sequesters diverse Rab host vesicles within an intravacuolar network”. In: *The Journal of Cell Biology* 216.12, pp. 4235–4254. DOI: 10.1083/jcb.201701108.
- Ron, D. and Walter, P. (2007). “Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response”. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8.7, pp. 519–529. DOI: 10.1038/nrm2199.
- 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 NFκB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 208.1, pp. 195–212. DOI: 10.1084/jem.20100717.
- Rosowski, E. E. and Saeij, J. P. J. (2012). “*Toxoplasma gondii* Clonal Strains All Inhibit STAT1 Transcriptional Activity but Polymorphic Effectors Differentially Modu-

- late IFN $\gamma$  Induced Gene Expression and STAT1 Phosphorylation”. In: *PLoS ONE* 7.12. Ed. by I. Blader. DOI: 10.1371/journal.pone.0051448.
- Ryffel, B., Huang, F., Robinet, P., Panek, C., Couillin, I., Erard, F., Piotet, J., Bert, M. L., Mackowiak, C., Arias, M. T., *et al.* (2019). “Blockade of IL-33R/ST2 Signaling Attenuates *Toxoplasma gondii* Ileitis Depending on IL-22 Expression”. In: *Frontiers in Immunology* 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00702.
- Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., Grigg, M. E., Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. C. (2005). “Bioluminescence Imaging of *Toxoplasma gondii* Infection in Living Mice Reveals Dramatic Differences between Strains”. In: *Infection and Immunity* 73.2, pp. 695–702. DOI: 10.1128/iai.73.2.695-702.2005.
- Saeij, J. P. J., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., and Boothroyd, J. C. (2006). “*Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue”. In: *Nature* 445.7125, pp. 324–327. DOI: 10.1038/nature05395.
- Saeij, J. P. J. and Frickel, E. M. (2017). “Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole: a role for GBPs, autophagy and host cell death”. In: *Current Opinion in Microbiology* 40, pp. 72–80. DOI: 10.1016/j.mib.2017.10.021.
- Salvioni, A., Belloy, M., Lebourg, A., Bassot, E., Cantaloube-Ferrieu, V., Vasseur, V., Blanié, S., Liblau, R. S., Suberbielle, E., Robey, E. A., *et al.* (2019). “Robust Control of a Brain-Persisting Parasite through MHC I Presentation by Infected Neurons”. In: *Cell Reports* 27.11, 3254–3268.e8. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.051.
- Sangaré, L. O., Yang, N., Konstantinou, E. K., Lu, D., Mukhopadhyay, D., Young, L. H., and Saeij, J. P. J. (2019). “*Toxoplasma* GRA15 Activates the NF $\kappa$ B Pathway through Interactions with TNF Receptor-Associated Factors”. In: *mBio* 10.4. Ed. by L. M. Weiss. DOI: 10.1128/mbio.00808-19.
- Sardinha-Silva, A., Mendonça-Natividade, F. C., Pinzan, C. F., Lopes, C. D., Costa, D. L., Jacot, D., Fernandes, F. F., Zorzetto-Fernandes, A. L. V., Gay, N. J., Sher, A., *et al.* (2017). “The lectin-specific activity of *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming”. In: *bioRxiv*. DOI: 10.1101/187690.
- Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C., and Murphy, K. M. (2012). “Re(de)fining the dendritic cell lineage”. In: *Nature Immunology* 13.12, pp. 1145–1154. DOI: 10.1038/ni.2467.
- Sauer, A., Pfaff, A. W., Villard, O., Creuzot-Garcher, C., Dalle, F., Chiquet, C., Pelloux, H., Speeg-Schatz, C., Gaucher, D., Prevost, G., *et al.* (2012). “Interleukin 17A as an Effective Target for Anti-inflammatory and Antiparasitic Treatment of Toxoplasmic Uveitis”. In: *Journal of Infectious Diseases* 206.8, pp. 1319–1329. DOI: 10.1093/infdis/jis486.

- 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”. In: *The Journal of Immunology* 168.12, pp. 5997–6001. DOI: 10.4049/jimmunol.168.12.5997.
- Schaeffer, M., Han, S.-J., Chtanova, T., Dooren, G. G. v., Herzmark, P., Chen, Y., Roysam, B., Striepen, B., and Robey, E. A. (2009). “Dynamic Imaging of T Cell-Parasite Interactions in the Brains of Mice Chronically Infected with *Toxoplasma gondii*.” In: *The Journal of Immunology* 182.10, pp. 6379–6393. DOI: 10.4049/jimmunol.0804307.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R. J. (2001). “Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis”. In: *Molecular Cell* 7.6, pp. 1165–1176. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00265-9.
- Schlee, M. and Hartmann, G. (2016). “Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing”. In: *Nature Reviews Immunology* 16.9, pp. 566–580. DOI: 10.1038/nri.2016.78.
- Schneider, A. G., Abdallah, D. S. A., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. (2013). “*Toxoplasma gondii* Triggers Phosphorylation and Nuclear Translocation of Dendritic Cell STAT1 while Simultaneously Blocking IFN $\gamma$ -Induced STAT1 Transcriptional Activity”. In: *PLoS ONE* 8.3. Ed. by M. A. Hakimi. DOI: 10.1371/journal.pone.0060215.
- Schulthess, J., Meresse, B., Ramiro-Puig, E., Montcuquet, N., Darce, S., Bègue, B., Ruemmele, F., Combadière, C., Santo, J. P. D., Buzoni-Gatel, D., *et al.* (2012). “Interleukin-15-Dependent Nkp46+ Innate Lymphoid Cells Control Intestinal Inflammation by Recruiting Inflammatory Monocytes”. In: *Immunity* 37.1, pp. 108–121. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.013.
- Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., and Sousa, C. R. e (2000). “CD40 Triggering of Heterodimeric IL-12 p70 Production by Dendritic Cells In Vivo Requires a Microbial Priming Signal”. In: *Immunity* 13.4, pp. 453–462. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)00045-5.
- Séguin, R. and Kasper, L. H. (1999). “Sensitized Lymphocytes and CD40 Ligation Augment Interleukin-12 Production by Human Dendritic Cells in Response to *Toxoplasma gondii*”. In: *The Journal of Infectious Diseases* 179.2, pp. 467–474. DOI: 10.1086/314601.
- Segura, E. and Villadangos, J. A. (2011). “A Modular and Combinatorial View of the Antigen Cross-Presentation Pathway in Dendritic Cells”. In: *Traffic* 12.12, pp. 1677–1685. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01254.x.

- 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*”. In: *PLoS Pathogens* 9.4. Ed. by G. S. Yap. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003320.
- Sheiner, L., Santos, J. M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G. E., and Soldati-Favre, D. (2010). “*Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design”. In: *Molecular Microbiology*, no–no. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07255.x.
- Shen, B. and Sibley, D. L. (2012). “The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites”. In: *Current Opinion in Microbiology* 15.4, pp. 449–455. DOI: 10.1016/j.mib.2012.02.007.
- Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, P. G., Wu, C., Yates, J. R., Su, A. I., Kelly, J. W., and Wiseman, R. L. (2013). “Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments”. In: *Cell Reports* 3.4, pp. 1279–1292. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.03.024.
- Sidrauski, C. and Walter, P. (1997). “The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response”. In: *Cell* 90.6, pp. 1031–1039. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80369-4.
- Silva, V. O., Maia, M. M., Torrecilhas, A. C., Taniwaki, N. N., Namiyama, G. M., Oliveira, K. C., Ribeiro, K. S., Santos Toledo, M. dos, Xander, P., and Pereira-Chioccola, V. L. (2018). “Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response”. In: *Parasite Immunology* 40.9, e12571. DOI: 10.1111/pim.12571.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (2001). “The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane”. In: *The Journal of Cell Biology* 154.1, pp. 95–108. DOI: 10.1083/jcb.200101073.
- Sinai, A. P., Webster, P., and Joiner, K. A. (1997). “Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction”. In: *Journal of Cell Science*, pp. 2117–28.
- Sitia, R. and Braakman, I. (2003). “Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory”. In: *Nature* 426.6968, pp. 891–894. DOI: 10.1038/nature02262.
- Skariah, S., McIntyre, M. K., and Mordue, D. G. (2010). “*Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion”. In: *Parasitology Research* 107.2, pp. 253–260. DOI: 10.1007/s00436-010-1899-6.
- Smith, J. A. (2018). “Regulation of Cytokine Production by the Unfolded Protein Response; Implications for Infection and Autoimmunity”. In: *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00422.

- Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K., Liu, Y.-P., and Splitter, G. A. (2013). “Brucella Induces an Unfolded Protein Response via TcpB That Supports Intracellular Replication in Macrophages”. In: *PLoS Pathogens* 9.12. Ed. by C. R. Roy, e1003785. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003785.
- Sriburi, R., Bommasamy, H., Buldak, G. L., Robbins, G. R., Frank, M., Jackowski, S., and Brewer, J. W. (2007). “Coordinate Regulation of Phospholipid Biosynthesis and Secretory Pathway Gene Expression in XBP-1(S)-induced Endoplasmic Reticulum Biogenesis”. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.10, pp. 7024–7034. DOI: 10.1074/jbc.M609490200.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J. W. (2004). “XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum”. In: *The Journal of Cell Biology* 167.1, pp. 35–41. DOI: 10.1083/jcb.200406136.
- Stahl, S., Burkhart, J. M., Hinte, F., Tirosh, B., Mohr, H., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Ruzsics, Z., Budt, M., and Brune, W. (2013). “Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response”. In: *PLoS Pathogens* 9.8. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003544.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). “Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution”. In: *Journal of Experimental Medicine*. DOI: 10.1084/jem.137.5.1142.
- Straw, A. D., MacDonald, A. S., Denkers, E. Y., and Pearce, E. J. (2003). “CD154 Plays a Central Role in Regulating Dendritic Cell Activation During Infections That Induce Th1 or Th2 Responses”. In: *The Journal of Immunology* 170.2, pp. 727–734. DOI: 10.4049/jimmunol.170.2.727.
- Striepen, B., Jordan, C. N., Reiff, S., and Dooren, G. G. van (2007). “Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa”. In: *PLoS Pathogens* 3.6, e78. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030078.
- Sturge, C. R., Benson, A., Raetz, M., Wilhelm, C. L., Mirpuri, J., Vitetta, E. S., and Yarovinsky, F. (2013). “TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.26, pp. 10711–10716. DOI: 10.1073/pnas.1307868110.
- Subauste, C. S. and Wessendarp, M. (2000). “Human Dendritic Cells Discriminate Between Viable and Killed *Toxoplasma gondii* Tachyzoites: Dendritic Cell Activation After Infection with Viable Parasites Results in CD28 and CD40 Ligand Signaling That Controls IL-12-Dependent and -Independent T Cell Production of IFN-gamma”. In: *The Journal of Immunology* 165.3, pp. 1498–1505. DOI: 10.4049/jimmunol.165.3.1498.



- Sun, R., Hedl, M., and Abraham, C. (2019). “IL23 induces IL23R recycling and amplifies innate receptor-induced signalling and cytokines in human macrophages, and the IBD-protective IL23R R381Q variant modulates these outcomes”. In: *Gut*. DOI: 10.1136/gut.jnl-2018-316830.
- Suzuki, Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. (1990a). “Treatment of Toxoplasmic Encephalitis in Mice with Recombinant Gamma Interferon”. In: *Infection and Immunity*.
- Suzuki, Y. and Remington, J. S. (1990b). “The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice”. In: *The Journal of Immunology*.
- Suzuki, Y., Yang, Q., Yang, S., Nguyen, N., Lim, S., Liesenfeld, O., Kojima, T., and Remington, J. S. (1996). “IL-4 Is Protective Against Development of Toxoplasmic Encephalitis”. In: *Journal of Immunology*.
- 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*”. In: *The Journal of Immunology* 164.10, pp. 5375–5382. DOI: 10.4049/jimmunol.164.10.5375.
- 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”. In: *The American Journal of Pathology* 176.4, pp. 1607–1613. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090825.
- Swiecki, M. and Colonna, M. (2015). “The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells”. In: *Nature Reviews Immunology* 15.8, pp. 471–485. DOI: 10.1038/nri3865.
- Tait, E. D., Jordan, K. A., Dupont, C. D., Harris, T. H., Gregg, B., Wilson, E. H., Pepper, M., Dzierszinski, F., Roos, D. S., and Hunter, C. A. (2010). “Virulence of *Toxoplasma gondii* Is Associated with Distinct Dendritic Cell Responses and Reduced Numbers of Activated CD8+ T Cells”. In: *The Journal of Immunology* 185.3, pp. 1502–1512. DOI: 10.4049/jimmunol.0903450.
- Tam, A. B., Koong, A. C., and Niwa, M. (2014). “Ire1 Has Distinct Catalytic Mechanisms for XBP1/HAC1 Splicing and RIDD”. In: *Cell Reports* 9.3, pp. 850–858. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.016.
- Tam, A. B., Mercado, E. L., Hoffmann, A., and Niwa, M. (2012). “ER Stress Activates NFkB by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK”. In: *PLoS ONE* 7.10. Ed. by M. Koritzinsky, e45078. DOI: 10.1371/journal.pone.0045078.
- Tardif, K. D., Mori, K., Kaufman, R. J., and Siddiqui, A. (2004). “Hepatitis C Virus Suppresses the IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response”. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.17, pp. 17158–17164. DOI: 10.1074/jbc.m312144200.

- Tavernier, S. J., Osorio, F., Vandersarren, L., Vettters, J., Vanlangenakker, N., Isterdael, G. V., Vergote, K., Rycke, R. D., Parthoens, E., Laar, L. van de, *et al.* (2017). “Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival”. In: *Nature Cell Biology* 19.6, pp. 698–710. DOI: 10.1038/ncb3518.
- Taylor, G. A. (2007). “IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens”. In: *Cellular Microbiology* 9.5, pp. 1099–1107. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00916.x.
- Tenorio, E. P., Fernandez, J., Castellanos, C., Olguin, J. E., and Saavedra, R. (2011). “CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10”. In: *European Journal of Immunology* 41.12, pp. 3529–3541. DOI: 10.1002/eji.201141507.
- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R., and Weiss, L. M. (2000). “*Toxoplasma gondii*: from animals to humans”. In: *International Journal for Parasitology* 30.12-13, pp. 1217–1258. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00124-7.
- Thuerlauf, D. J., Marcinko, M., Belmont, P. J., and Glembotski, C. C. (2007). “Effects of the Isoform-specific Characteristics of ATF6alpha and ATF6beta on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability”. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.31, pp. 22865–22878. DOI: 10.1074/jbc.M701213200.
- Thuerlauf, D. J., Morrison, L., and Glembotski, C. C. (2004). “Opposing Roles for ATF6alpha and ATF6beta in Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Induction”. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.20, pp. 21078–21084. DOI: 10.1074/jbc.M400713200.
- Tian, S., Liu, Z., Donahue, C., Falo, L. D., and You, Z. (2012). “Genetic Targeting of the Active Transcription Factor XBP1s to Dendritic Cells Potentiates Vaccine-induced Prophylactic and Therapeutic Antitumor Immunity”. In: *Molecular Therapy* 20.2, pp. 432–442. DOI: 10.1038/mt.2011.183.
- Tiwari, A., Hannah, R., Lutshumba, J., Ochiai, E., Weiss, L. M., and Suzuki, Y. (2019). “Penetration of CD8+ Cytotoxic T Cells into Large Target, Tissue Cysts of *Toxoplasma gondii*, Leads to Its Elimination”. In: *The American Journal of Pathology* 189.8, pp. 1594–1607. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.04.018.
- Tosh, K. W., Mittereder, L., Bonne-Annee, S., Hieny, S., Nutman, T. B., Singer, S. M., Sher, A., and Jankovic, D. (2015). “The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion”. In: *The Journal of Immunology* 196.1, pp. 345–356. DOI: 10.4049/jimmunol.1501558.
- Travier, L., Mondragon, R., Dubremetz, J.-F., Musset, K., Mondragon, M., Gonzalez, S., Cesbron-Delauw, M.-F., and Mercier, C. (2008). “Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the

- parasitophorous vacuole". In: *International Journal for Parasitology* 38.7, pp. 757–773. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.10.010.
- Tu, V., Yakubu, R., and Weiss, L. M. (2018). "Observations on bradyzoite biology". In: *Microbes and Infection* 20.9-10, pp. 466–476. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.12.003.
- Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q., Vasudevan, S. G., Chevet, E., and Gu, F. (2007). "Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response". In: *Virology Journal* 4.1, p. 91. DOI: 10.1186/1743-422x-4-91.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., and Ron, D. (2000). "Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1". In: *Science* 287.5453, pp. 664–666. DOI: 10.1126/science.287.5453.664.
- Vattem, K. M. and Wek, R. C. (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.31, pp. 11269–11274. DOI: 10.1073/pnas.0400541101.
- Villegas, E. N., Lieberman, L. A., Carding, S. R., and Hunter, C. A. (2002). "Susceptibility of Interleukin-2-Deficient Mice to *Toxoplasma gondii* Is Associated with a Defect in the Production of Gamma Interferon". In: *Infection and Immunity* 70.9, pp. 4757–4761. DOI: 10.1128/iai.70.9.4757-4761.2002.
- Volmer, R., Ploeg, K. van der, and Ron, D. (2013). "Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.12, pp. 4628–4633. DOI: 10.1073/pnas.1217611110.
- Wakabayashi, S. and Yoshida, H. (2013). "The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists". In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 6.7, e201303010. DOI: 10.5936/csbj.201303010.
- Walter, P. and Ron, D. (2011). "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation". In: *Science* 334.6059, pp. 1081–1086. DOI: 10.1126/science.1209038.
- Wan, L., Gong, L., Wang, W., An, R., Zheng, M., Jiang, Z., Tang, Y., Zhang, Y., Chen, H., Yu, L., *et al.* (2015). "T. gondii rhoptry protein ROP18 induces apoptosis of neural cells via endoplasmic reticulum stress pathway". In: *Parasites & Vectors* 8.1. DOI: 10.1186/s13071-015-1103-z.
- Wang, M. and Kaufman, R. J. (2016). "Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease". In: *Nature* 529.7586, pp. 326–335. DOI: 10.1038/nature17041.
- Wang, P., Li, S., Zhao, Y., Zhang, B., Li, Y., Liu, S., Du, H., Cao, L., Ou, M., Ye, X., *et al.* (2019). "The GRA15 protein from *Toxoplasma gondii* enhances host defense responses

- by activating the interferon stimulator STING”. In: *JBC*. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009172.
- Wang, S., Wang, Z., Gu, Y., Li, Z., Li, Z., Wei, F., and Liu, Q. (2016). “Toxoplasma gondii mitogen-activated protein kinases are associated with inflammasome activation in infected mice”. In: *Microbes and Infection* 18.11, pp. 696–700. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.07.004.
- Wang, X., Kang, H., Kikuchi, T., and Suzuki, Y. (2004). “Gamma Interferon Production, but Not Perforin-Mediated Cytolytic Activity, of T Cells Is Required for Prevention of Toxoplasmic Encephalitis in BALB/c Mice Genetically Resistant to the Disease”. In: *Infection and Immunity* 72.8, pp. 4432–4438. DOI: 10.1128/iai.72.8.4432-4438.2004.
- Wang, Y. and Yin, H. (2015). “Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*”. In: *Parasites & Vectors* 8.1. DOI: 10.1186/s13071-015-1001-4.
- Way, S. W. and Popko, B. (2016). “Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis”. In: *The Lancet Neurology* 15.4, pp. 434–443. DOI: 10.1016/s1474-4422(15)00381-6.
- Webster, S. J., Ellis, L., O’Brien, L. M., Tyrrell, B., Fitzmaurice, T. J., Elder, M. J., Clare, S., Chee, R., Gaston, J. S. H., and Goodall, J. C. (2016). “IRE1alpha mediates PKR activation in response to *Chlamydia trachomatis* infection”. In: *Microbes and Infection* 18.7-8, pp. 472–483. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.010.
- Wei, W., Zhang, F., Chen, H., Tang, Y., Xing, T., Luo, Q., Yu, L., Du, J., Shen, J., and Zhang, L. (2018). “*Toxoplasma gondii* dense granule protein 15 induces apoptosis in choriocarcinoma JEG-3 cells through endoplasmic reticulum stress”. In: *Parasites & Vectors* 11.1. DOI: 10.1186/s13071-018-2835-3.
- Weidner, J. M., Kanatani, S., Hernández-Castañeda, M. A., Fuks, J. M., Rethi, B., Wallin, R. P. A., and Barragan, A. (2013). “Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype”. In: *Cellular Microbiology*, n/a–n/a. DOI: 10.1111/cmi.12145.
- Weidner, J. M., Kanatani, S., Uchtenhagen, H., Varas-Godoy, M., Schulte, T., Engelberg, K., Gubbels, M.-J., Sun, H. S., Harrison, R. E., Achour, A., *et al.* (2016). “Migratory activation of parasitized dendritic cells by the protozoan *Toxoplasma gondii* 14-3-3 protein”. In: *Cellular Microbiology* 18.11, pp. 1537–1550. DOI: 10.1111/cmi.12595.
- West, A. P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., Lang, S. M., Bestwick, M., Duguay, B. A., Raimundo, N., MacDuff, D. A., *et al.* (2015). “Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response”. In: *Nature* 520.7548, pp. 553–557. DOI: 10.1038/nature14156.

- Wickner, S., Maurizi, M. R., and Gottesman, S. (1999). “Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins”. In: *Science* 286.5446, pp. 1888–1893. DOI: 10.1126/science.286.5446.1888.
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., and Freund, C. (2017). “Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation”. In: *Frontiers in Immunology* 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00292.
- 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<sup>+</sup> T Cells”. In: *PLoS Pathogens* 6.3. Ed. by E. Y. Denkers, e1000815. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000815.
- Wilson, D. C., Matthews, S., and Yap, G. S. (2008). “IL-12 Signaling Drives CD8<sup>+</sup> T Cell IFN-gamma Production and Differentiation of KLRG1<sup>+</sup> Effector Subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection”. In: *The Journal of Immunology* 180.9, pp. 5935–5945. DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.5935.
- Wilson, E. H., Wille-Reece, U., Dzierszinski, F., and Hunter, C. A. (2005). “A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis”. In: *Journal of Neuroimmunology* 165.1-2, pp. 63–74. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.04.018.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). “Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor-dependent Long-Term Cultures”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 185.2, pp. 317–328. DOI: 10.1084/jem.185.2.317.
- Witola, W. H., Mui, E., Hargrave, A., Liu, S., Hypolite, M., Montpetit, A., Cavailles, P., Bisanz, C., Cesbron-Delauw, M.-F., Fournié, G. J., *et al.* (2010). “NALP1 Influences Susceptibility to Human Congenital Toxoplasmosis, Proinflammatory Cytokine Response, and Fate of *Toxoplasma gondii*-Infected Monocytic Cells”. In: *Infection and Immunity* 79.2. Ed. by J. H. Adams, pp. 756–766. DOI: 10.1128/iai.00898-10.
- Wolfson, J. J., May, K. L., Thorpe, C. M., Jandhyala, D. M., Paton, J. C., and Paton, A. W. (2008). “Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways”. In: *Cellular Microbiology* 10.9, pp. 1775–1786. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01164.x.
- Woo, C. W., Cui, D., Arellano, J., Dorweiler, B., Harding, H., Fitzgerald, K. A., Ron, D., and Tabas, I. (2009). “Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling”. In: *Nature Cell Biology* 11.12, pp. 1473–1480. DOI: 10.1038/ncb1996.

- Woo, C. W., Kutzler, L., Kimball, S. R., and Tabas, I. (2012). “Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B”. In: *Nature Cell Biology* 14.2, pp. 192–200. DOI: 10.1038/ncb2408.
- Wout, E. F. A. van’t, Schadewijk, A. van, Boxtel, R. van, Dalton, L. E., Clarke, H. J., Tommassen, J., Marciniak, S. J., and Hiemstra, P. S. (2015). “Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells”. In: *PLOS Pathogens* 11.6. Ed. by M. R. Parsek, e1004946. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004946.
- Wu, J., Chen, Y.-J., Dobbs, N., Sakai, T., Liou, J., Miner, J. J., and Yan, N. (2019). “STING-mediated disruption of calcium homeostasis chronically activates ER stress and primes T cell death”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 216.4, pp. 867–883. DOI: 10.1084/jem.20182192.
- Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G. D.-Y., and Kaufman, R. J. (2007). “ATF6alpha Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress”. In: *Developmental Cell* 13.3, pp. 351–364. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.07.005.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). “Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6alpha and XBP1”. In: *Developmental Cell* 13.3, pp. 365–376. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.07.018.
- Yamamoto, M., Ma, J. S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Okuyama, M., Kayama, H., *et al.* (2011). “ATF6 beta is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18”. In: *The Journal of Experimental Medicine* 208.7, pp. 1533–1546. DOI: 10.1084/jem.20101660.
- 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-gamma-Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*”. In: *Immunity* 37.2, pp. 302–313. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.06.009.
- 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”. In: *Journal of Experimental Medicine* 206.12, pp. 2747–2760. DOI: 10.1084/jem.20091703.
- Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A. W., *et al.* (2009). “Activation of the Akt-NFkB Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Re-

- sponse”. In: *The Journal of Immunology* 183.2, pp. 1480–1487. DOI: 10.4049/jimmunol.0900017.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., *et al.* (2005). “TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein”. In: *Science* 308.5728, pp. 1626–1629. DOI: 10.1126/science.1109893.
- Yarovinsky, F. (2014). “Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection”. In: *Nature Reviews Immunology* 14.2, pp. 109–121. DOI: 10.1038/nri3598.
- Yarovinsky, F., Kanzler, H., Hieny, S., Coffman, R. L., and Sher, A. (2006). “Toll-like Receptor Recognition Regulates Immunodominance in an Antimicrobial CD4+ T Cell Response”. In: *Immunity* 25.4, pp. 655–664. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.07.015.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000). “ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs”. In: *Molecular Cell* 6.6, pp. 1355–1364. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00133-7.
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). “A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response”. In: *Developmental Cell* 4.2, pp. 265–271. DOI: 10.1016/s1534-5807(03)00022-4.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). “XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor”. In: *Cell* 107.7, pp. 881–891. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). “pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response”. In: *The Journal of Cell Biology* 172.4, pp. 565–575. DOI: 10.1083/jcb.200508145.
- Zehner, M., Marschall, A. L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A. J., *et al.* (2015). “The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8+ T Cells”. In: *Immunity* 42.5, pp. 850–863. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.04.008.
- Zenewicz, L. A., Antov, A., and Flavell, R. A. (2009). “CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease”. In: *Trends in Molecular Medicine* 15.5, pp. 199–207. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.03.002.
- Zeng, L., Liu, Y.-P., Sha, H., Chen, H., Qi, L., and Smith, J. A. (2010). “XBP-1 Couples Endoplasmic Reticulum Stress to Augmented IFN $\beta$  Induction via a cis-Acting En-

- hancer in Macrophages”. In: *The Journal of Immunology* 185.4, pp. 2324–2330. DOI: 10.4049/jimmunol.0903052.
- Zhang, K., Wong, H. N., Song, B., Miller, C. N., Scheuner, D., and Kaufman, R. J. (2005). “The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis”. In: *Journal of Clinical Investigation* 115.2, pp. 268–281. DOI: 10.1172/jci200521848.
- Zhang, P., Su, C., Jiang, Z., and Zheng, C. (2016). “Herpes Simplex Virus 1 UL41 Protein Suppresses the IRE1/XBP1 Signal Pathway of the Unfolded Protein Response via Its RNase Activity”. In: *Journal of Virology* 91.4. DOI: 10.1128/jvi.02056-16.
- Zhang, Y., Chen, G., Liu, Z., Tian, S., Zhang, J., Carey, C. D., Murphy, K. M., Storkus, W. J., Falco, L. D., and You, Z. (2015). “Genetic Vaccines To Potentiate the Effective CD103+ Dendritic Cell-Mediated Cross-Priming of Antitumor Immunity”. In: *The Journal of Immunology* 194.12, pp. 5937–5947. DOI: 10.4049/jimmunol.1500089.
- Zhou, J., Gan, X., Wang, Y., Zhang, X., Ding, X., Chen, L., Du, J., Luo, Q., Wang, T., Shen, J., *et al.* (2015). “Toxoplasma gondii prevalent in China induce weaker apoptosis of neural stem cells C17.2 via endoplasmic reticulum stress (ERS) signaling pathways”. In: *Parasites & Vectors* 8.1, p. 73. DOI: 10.1186/s13071-015-0670-3.



## Abstract

The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is one of the most common zoonotic pathogen invading all animals, including humans. In healthy individuals, type II parasite persists in cysts in the central nervous system leading to severe mental disorders and increasing the risk of developing neurodegenerative diseases. The control of chronic toxoplasmosis relies on dendritic cells (DCs) functions that activate the IL-12- induced T cell IFN- $\gamma$ -derived response. In order to survive, *T. gondii* secretes an arsenal of virulence factors that modulate host immune responses; however the interplay between DCs and *T. gondii* has been poorly explored. Recent studies highlighted the intricate molecular cross-talk between the Unfolded Protein Response (UPR) and the innate pathways. The UPR response is a cytoprotective response induced during a cellular stress triggered by an imbalance in protein and lipid homeostasis, but also during intracellular pathogen infection. So far, nothing is known about the influence of *T. gondii* infection on the UPR. We hypothesized that *T. gondii* induction of the UPR could modulate the antigenic presentation ability and cytokine secretion of DCs, thereby impacting parasite dissemination and persistence. Using, Bone-Marrow-derived DC (BMDCs) and mice deficient for the ER sensor IRE1 $\alpha$  and the transcription factor XBP1, we examined the impact of the UPR on DC responses and T cell activation. Our results demonstrated that *T. gondii* infection activates the IRE1 $\alpha$  arm of the UPR in BMDCs in a MyD88 dependent manner, thereby inducing a unique set of secreted pro-inflammatory cytokines. We also demonstrated that this pathway regulates MHC-I presentation of secreted parasite antigens. In infected mice, we found that the IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway is specifically activated in splenic cDC1s, regulates T CD8+ cell responses and thus, the IFN- $\gamma$  production. In addition, IRE1 $\alpha$ /XBP1 deficient mice do not control parasite proliferation and succumb during the acute phase of the infection. Therefore, our work revealed an essential protective role of the IRE1 $\alpha$  branch of the UPR in DCs to fight *T. gondii* infection.

## Résumé

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) est un parasite intracellulaire obligatoire responsable d'une zoonose cosmopolite, la toxoplasmose. Chez les sujets sains, les parasites de type II persistent sous forme de kystes cérébraux, responsables de maladies mentales sévères et augmentant le risque d'apparition de maladies neurodégénératives. Le contrôle de la toxoplasmose chronique dépend de la sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire IL-12 par les cellules dendritiques (DCs) permettant l'activation des lymphocytes T CD8+ (LTs CD8+) cytotoxiques et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ . Les LTs CD8+ jouent un rôle clé dans l'élimination des cellules parasitées durant la phase aiguë de l'infection, mais aussi dans l'établissement d'une immunité protectrice à long terme. Afin de survivre et persister, *T. gondii* sécrète de nombreux facteurs de virulence qui modulent les réponses immunitaires de son hôte. Des travaux récents ont mis en évidence le rôle clé de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) dans la régulation des réponses immunitaires. La réponse UPR est une réponse cytoprotectrice induite durant un stress cellulaire déclenché lors de variations dans l'homéostasie protéique et lipidique au sein du réticulum endoplasmique mais aussi lors d'un stress infectieux. Jusqu'à présent, l'influence de l'infection par *T. gondii* sur la réponse UPR n'est pas connue. Nous avons émis l'hypothèse que l'induction de l'UPR par *T. gondii* dans les DCs pourrait moduler leur capacité de présentation antigénique et la sécrétion de cytokines inflammatoires, impactant ainsi la dissémination et la persistance du parasite. En utilisant, des DCs déficientes pour certains effecteurs de l'UPR (IRE1 $\alpha$  et XBP1s), nous avons examiné l'impact de leur activité sur les DCs infectées. *In vitro*, nos résultats ont montré que *T. gondii* active la voie IRE1 $\alpha$  de l'UPR d'une manière dépendante de la voie MyD88 et contrôle ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 et la présentation antigénique d'antigènes parasitaires par le CMH-I. Dans les souris infectées, la voie IRE1 $\alpha$  est spécifiquement activée dans la sous-population de cDC1 et régule l'activation des LTs CD8+, essentiels à la production de l'IFN- $\gamma$ . De plus, les souris déficientes pour IRE1 $\alpha$  et XBP1 spécifiquement dans les DCs ne contrôlent pas la prolifération des parasites et succombent à l'infection aiguë. Notre étude révèle donc un rôle protecteur essentiel de cette voie dans les DCs pour combattre l'infection à *T. gondii*.