Université Lille Nord de France

Ecole Doctorale Biologie-Santé

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

Lola GURGOGLIONE

Le 25 Septembre 2025

Caractérisation du rôle de la voie IRE1/XBP1 de la réponse UPR dans le processus de maturation immunogénique et les fonctions des cDC1 spléniques lors de l'infection à *Toxoplasma gondii*.

Composition du jury :

Madame le Professeur Isabelle DIMIER-POISSON, Rapportrice et Présidente du jury

Monsieur le Docteur Christophe PAGET, Rapporteur

Madame le Docteur Christelle FAVEEUW, Examinatrice

Monsieur le Docteur Nicolas BLANCHARD, Examinateur

Madame le Docteur Sabrina MARION, Directrice 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

Région Hauts-de-France

Résumé

L'induction de la réponse au stress UPR (Unfolded Protein Response) est apparue comme un mécanisme régulateur clé des processus inflammatoires, notamment en réponse aux infections. Il avait été précédemment montré dans le laboratoire que l'induction de la voie IRE1 de l'UPR dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) infectées par Toxoplasma gondii (T. gondii) favorise la production de cytokines pro-inflammatoires et la présentation par le CMH-I des antigènes parasitaires. En l'absence de IRE1 et de son effecteur XBP1 dans les DC, les souris infectées présentent une sensibilité accrue à l'infection, associée à une diminution de l'expansion et de l'activation des lymphocytes T CD8+ spléniques. Ce défaut était corrélé à une diminution de l'expansion des cellules dendritiques conventionnelles de type I (cDC1), sous-type essentiel pour la présentation des antigènes exogènes aux T CD8+. Cependant les mécanismes par lesquelles la voie IRE1 régule les fonctions des cDC1 in vivo n'avaient pas été élucidés. Dans ce projet de thèse, nous avons dans un premier temps, caractérisé en détail le processus de maturation immunogénique des cDC1 spléniques lors de l'infection aigüe. Nos résultats ont permis de montrer que ce processus se déroule en deux étapes initiées par des mécanismes distincts. Une première vague de maturation des cDC1 jusqu'au stade late immature CD103+/CCR7- est initiée pour une vaste majorité des cDC1. Cette étape semblerait être initiée par un signal cytokinique intrinsèque ou extrinsèque à la cellule et l'injection de GM-CSF dans des souris WT induit une expansion de ce sous-type suggérant son implication. Ce sous-type de cDC1 immatures est notamment caractérisé par une expression importante des gènes de la voie de l'IFNβ et de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. De plus, nous avons montré que la deuxième étape de maturation des cDC1 immatures jusqu'au stade matures CCR7+ reste limitée à une faible proportion des cDC1 ayant débuté leur processus de maturation lors de l'infection par des parasites vivants. Nos résultats ont également montré que la rencontre avec le parasite ou des débris parasitaires est nécessaire pour initier cette dernière étape de maturation, suggérant qu'une faible quantité de matériel parasitaire atteigne la rate ou qu'un mécanisme régulateur limite cette dernière étape de maturation. La deuxième partie du projet a cherché à mieux identifier les mécanismes par lesquels la voie IRE1/XBP1 régule la maturation et les fonctions des cDC1. Nous avons observé que l'absence de la voie IRE1/XBP1 au sein des cDC1 entraîne un défaut d'activation des LT CD8+ et de l'expansion des cDC1 totales de la rate lors de l'infection. En étudiant plus en détail la modulation du processus de maturation des cDC1 spléniques, nous avons pu corréler cette diminution des cDC1 totales à la diminution drastique du sous-type late immature CD103+. Nous avons observé qu'en l'absence de la voie IRE1/XBP1, la signature transcriptomique (analysée par single cell RNA sequencing) de ces cellules immatures reflétait un stress cellulaire intense, soutenu notamment par l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus d'apoptose et de réparation des dommages à l'ADN. De manière intéressante, nous n'avons pas observé de diminution dans le pourcentage des cDC1 matures CCR7+ dans les souris délétées pour la voie IRE1/XBP1 infectées, mais une diminution de leur activation. En étudiant, le profil transcriptomique des cDC1 matures, nous avons également observé une induction de nombreuses voies de l'apoptose, mais également la diminution de voies impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Abstract

The induction of the Unfolded Protein Response (UPR) has emerged as a key regulatory mechanism in inflammatory processes, particularly in response to infections. Previous work in the laboratory showed that activation of the IRE1 branch of the UPR in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) infected with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) promotes the production of pro-inflammatory cytokines and the MHC class I presentation of parasitic antigens. In the absence of IRE1 and its downstream effector XBP1 in dendritic cells (DCs), infected mice display increased susceptibility to infection, associated with impaired expansion and activation of splenic CD8+ T cells. This defect was correlated with a reduced expansion of conventional type I dendritic cells (cDC1), a critical subset for cross-presentation of exogenous antigens to CD8+ T cells. However, the mechanisms by which the IRE1 pathway regulates cDC1 functions in vivo had not yet been elucidated. In the first part of this PhD project, we thoroughly characterized the process of immunogenic maturation of splenic cDC1 during acute infection. Our results revealed that this maturation occurs in two distinct steps initiated by different mechanisms. A first wave of maturation to the late immature $CD103^{+}/CCR7^{-}$ stage is initiated in the vast majority of cDC1. This step appears to be triggered by an intrinsic or extrinsic cytokine signal, and GM-CSF injection into WT mice induced the expansion of this subset, suggesting its involvement. This immature cDC1 subtype is notably characterized by strong expression of IFN-β pathway genes and genes involved in lipid metabolism. Furthermore, we showed that the second step of maturation to the $CCR7^{+}$ mature stage is limited to a small proportion of cDC1 that had already initiated maturation in response to live parasites. Our results also showed that contact with the parasite or parasitic debris is required to trigger this final maturation step, suggesting that either a limited amount of parasitic material reaches the spleen or a regulatory mechanism restrains this step. The second part of the project aimed to identify how the IRE1/XBP1 pathway regulates cDC1 maturation and functions. We observed that the absence of the IRE1/XBP1 pathway in cDC1 led to defective CD8+ T cell activation and impaired expansion of total splenic cDC1 during infection. A more detailed analysis of splenic cDC1 maturation revealed that the reduced total cDC1 population was mainly due to a dramatic loss of the late immature $CD103^{+}$ subset. Single-cell RNA sequencing analysis showed that in the absence of IRE1/XBP1, these immature cells exhibited a transcriptomic signature reflecting intense cellular stress, characterized by the upregulation of genes involved in apoptosis and DNA damage repair. Interestingly, we did not observe a reduction in the proportion of $CCR7^{+}$ mature cDC1 in IRE1/XBP1-deficient mice during infection, but we did observe reduced activation of these cells. Transcriptomic profiling of mature cDC1 also revealed activation of several apoptotic pathways and a downregulation of genes involved in T cell activation and proliferation.

Table des matières

Introduction

1. *Toxoplasma gondii* : un parasite intracellulaire obligatoire 10

1.1 Biologie du parasite : les différentes formes parasitaires 10

1.1.1 Le tachyzoïte 10

1.1.2 Bradyzoïtes et kystes tissulaires 11

1.1.3 Oocystes et sporozoïtes 12

1.2 Cycle de vie et cycle lytique du tachyzoite 12

1.2.1 Cycle de vie 13

1.2.2 Cycle lytique du tachyzoite et organelles sécrétoires 14

1.2.3 Génotypes parasitaires et virulence 16

1.3 Transmission et pathogénie 18

1.3.1 Transmission à l'Homme 18

1.3.2 La toxoplasmose : Différentes formes de la maladie 19

1.3.3 Diagnostic et traitements 19

2. Réponse immunitaire face à l'infection par *Toxoplasma gondii* 20

2.1 Réponse immunitaire innée 21

2.1.1 Réponse immunitaire au site de l'infection 21

2.1.2 La reconnaissance du parasite : PRRs et PAMPs 22

2.1.2.1 Les Toll-like Récepteurs (TLRs) 23

2.1.2.2 Nod-Like Récepteurs (NLRs) et inflammasome 25

2.1.3 Le rôle des Interférons : induction des défenses cellulaires intrinsèques contre *T. gondii* .. 26

2.1.3.1 Interférons de type II : L'Interféron gamma (IFNγ) 26

2.1.3.2 Interférons de type I 29

2.2 Réponse immunitaire adaptative 31

2.2.1 Réponse immunitaire à médiation cellulaire : les lymphocytes T 31

2.2.1.1 Présentation antigénique par le CMH-I et présentation antigénique croisée 31

2.2.1.2 Présentation antigénique par le CMH-II 34

2.2.1.3 Les antigènes immunodominants de *T. gondii* 35

2.2.1.4 Rôle des T CD4+ 36

2.2.1.5 Rôle des T CD8+ 37

2.2.1.6 Synapse immunologique 39

2.2.2 Réponse immunitaire à médiation humorale : les cellules B et production d'anticorps 40

3. Cellules dendritiques : sous-types et fonctions dans la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii* 41
3.1 Généralités et sous-types 41
3.2 Les cellules dendritiques conventionnelles de type I : cDC1 42
3.2.1 Maturation des cDC1 42
3.2.2 Modulation de l'activité des DC par *T. gondii* 46

4. Unfolded Protein Response (UPR) 49
4.1 Les troies voies de l'UPR 51
4.1.1 La voie IRE1/XBP1 51
4.1.2 La voie PERK/CHOP 52
4.1.3 La voie ATF6 53
4.2 UPR et immunité 54
4.3 UPR et cellules dendritiques 55
4.3.1 UPR et survie des DC 55
4.3.2 UPR et fonctions immunitaires des DC 56
4.4 UPR et infection par *T. gondii* 57

Objectifs 59

Matériel et Méthodes

1. Cultures cellulaires et parasitaires 62
1.1 Fibroblastes humains 62
1.2 Culture parasitaire et préparation des STAgs 62

2. Modèles murins 63
2.1 Les souris ERAI 63
2.2 Les souris IRE1^{trunc} XBP1ΔXCR1-Cre 63
2.3 Les souris Ai6 64
2.4 Lignées de souris utilisées pour la génération des souris chimères MyD88 $^{fl/fl}$ CD11cCre et IFNAR $^{fl/fl}$ CD11c Cre 64
2.5 Génération des souris chimères MyD88$^{fl/fl}$ CD11c-Cre et IFNAR1$^{fl/fl}$CD11c-Cre 65

2.5 Courbe de survie des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées 66

3. Expériences réalisées *in vivo* 66
3.1 Analyse immunophénotypique des différentes populations immunitaires de la rate murine par cytométrie en flux multiparamétrique 66
3.2 Suivi de la migration des cDC1 dans la rate 69
3.3 Tri des cellules dendritiques et analyse par RT-qPCR des transcrits issus des cellules triées 69
3.4 Analyse par RT-qPCR des transcrits issus de la rate entière de souris 70
3.5 Analyse par bioplex des cytokines de la rate 71
3.6 Analyse par immunophénotypage des différents stades de maturation des cDC1 spléniques après injection de cytokines 71
3.7 Analyse du priming des T CD8+ dans les rates de souris infectées 72
3.8 CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing) 73

Résultats

1. Maturation immunogénique des cDC1 in vivo après infection par T. gondii 79
1.1 L'infection par *T. gondii* induit une importante expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques 79
1.2 L'infection par *T. gondii* induit une faible expansion du sous-type « late mature » 80
1.3 L'expression des gènes parasitaires est identifiée uniquement dans les cDC1s spléniques « late mature » (CCR7+) 83
1.4 Identification du signal parasitaire dans les cDC1 « late mature » (CCR7+) dans des souris Ai6 infectées 84
1.5 La stimulation des TLR est nécessaire pour atteindre le dernier stade de maturation (CCR7+) des cDC1 spléniques 86
1.6 L'infection par *T. gondii* entraîne une importante expression des cytokines pro-inflammatoires dans la rate 87
1.7 L'injection de GM-CSF induit l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) 89
1.8 La voie de l'IFNβ n'est pas impliquée dans la prolifération des cDC1 spléniques infectées par *T. gondii* 90

2. Rôle de la voie IRE1 de l'UPR dans la maturation immunogénique des cDC1 spléniques 94
2.1 La voie IRE1 de l'UPR est activée dans les cDC1 « late immature » et « mature » lors de l'infection par *T. gondii* 94
2.2 L'induction de la voie IRE1 est essentielle pour la survie des souris lors de l'infection par *T. gondii* 95
2.3 L'activation de la voie IRE1 est cruciale pour la mise en place de l'activation des lymphoyctes T CD8+ et l'expansion des cDC1 spléniques 97
2.4 La voie IRE1 est essentielle à l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques lors de l'infection 97
2.5 L'absence de la voie IRE1 n'entraîne pas de défaut migratoire des cDC1 « late mature » (CCR7+) lors de l'infection par *T. gondii* 100

2.6 L'absence de la voie IRE1 semble de pas entrainer de défaut de priming des LT CD8+ lors de l'infection par *T. gondii* 101

2.7 La délétion de la voie IRE1 dans les cDC1 « late immature » (CD103+) entraîne l'expression de la voie PERK/CHOP 103

2.8 L'analyse transcriptomique associé au protéome de surface (CITEseq) a permis d'identifier un nouveau cluster minoritaire de maturation des cDC1 appelé ISG+ cDC1 106

2.9 L'absence de la voie IRE1/XBP1 dans le sous-type « late immature » (CD103+) entraîne un stress cellulaire important engageant les voies de l'apoptose 108

2.10 L'absence de la voie IRE1/XBP1 active les voies de l'apoptose dans les cDC1 « late mature » (CCR7+) 111

Discussion 117

Références Bibliographiques 129

Abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique
ADNc Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ANOVA ANalysis Of VAriance
AP-1 Activator Protein-1
ARNm Acide RiboNucléique messager
ASC Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain
ASK1 Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF Activating Transcription Factor
ATG AuTophaGy
BiP Binding Immunoglobulin Protein
BMDC Bone Marrow-Derived primary Dendritic Cell
bZIP basic leucine ZIPper
CAM CAlModulin-like protein
CAMLG CAlcium Modulating LiGand
CCL C-C Ligand chemokine
CCR C-C chemokine Receptors
CD Cluster of Differenciation
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
CXCL C-X-C motif Ligand chemokine
DC Dendritic Cell
DGAT DiacylGlycérol O-AcylTransferase
DL Dose Létale
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDEM Er Degradation-Enhancing a-Mannosidase-like protein
EDTA EthyleneDiamineTetraacetic Acid
eIF2 eukaryotic Initiation Factor 2
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
GABA Gamma-AminoButyric Acid
GADD34 Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 34
GBP Guanylate Binding Protein
GM-CSF Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI GlycosylPhosphatidylnositol
GRA GRAnule dense protein
GTP Guanosine TriPhosphate
H-2 Histocompatibility-2
HAUSP Herpes virus-Associated Ubiquitin Specific Protease
HERPUD1 Homocysteine inducible ER Protein with Ubiquitin like Domain 1

HFF Human Foreskin Fibroblast
HK Heat Killed
HLA Human Leukocyte Antigen
hRE Réticulum endoplasmique de la cellule hôte
HSP Heat Shock protein
HSP90b1 HSP 90 beta member 1
ICAM IntraCellular Adhesion Molecule
IDO Indolamine 2,3-DiOxygenase
IEL IntraEpithelial Lymphocyte
IFN InterFeroN
Ig Immunoglobulin
IL InterLeukine
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
IST Inhibitor of STAT Transcription
IVN IntraVacuolar Network
JAK JAnus Kinase
JNK c-Jun N-terminal Kinase
KO Knock-Out
LB Lymphocyte B
LFA Lymphocyte Functional Antigen
LT Lymphocyte T
MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP Monocyte Chemoattractant Protein
MIIC MHC-II Compartment
MIP Macrophage Inflammatory Protein
moDC monocyte-derived DC
MOI Multiplicity Of Infection
mtROS mitochondrial ROS
MVP Membrane de la vavuole parasitophore
MyD88 Myeloid Differentiation primary response 88
MYR MYc Regulation
NET Neutrophil Extracellular Trap
NFAT Nuclear Factor of Activated T cell
NFkB Nuclear Factor-Kappa B
NK Natural Killer
NLR NOD Like Receptor
NLRP NLR family Pyrin domain
NO Oxide nitrique
NTPases Nucleoside TriPhosphatase
NuRD Nucleosome Remodeling Deacetylase
OVA OVAlbumin
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
Poly(I:C) Polyinosinic:polycytidylic acid
PP2A Protein Phosphatase 2A
PRR Pattern Recognition Receptor
qPCR quantitative Polymerase Chain Reaction
RE Réticulum Endoplasmique
RIDD Regulated IRE1-Dependent Decay
RIG-I Retinoid acid-Inducible Gene I
ROI Oxygen Reactive Intermediates
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
SIDA Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
SNARE Soluble N-éthylmaleimie-sensitive-factor Attachment protein REceptor
STAg Soluble Tachyzoite Antigen
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
STING STimulator of INterferon Genes
SVF Sérum de Veau Foetal
TAP Transporters associated with Antigen Processing
TCR T Cell Receptor
TGF Transforming Growth Factor
Th1 T helper 1
TLR Toll Like Receptor
TNF Tumor Necrosis Factor
TRAF TNF Receptor-Associated Factor
TRIF TIR domain-contaning adaptor protein inducing interferon b
uORFs upstream Open Reading Frame
UPR Unfolded Protein Response
UPRE Unfolded Protein Response Element
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP Vacuole Parasitophore
XBP1 X-box Binding Protein 1

Introduction

Introduction

1. *Toxoplasma gondii* : un parasite intracellulaire obligatoire

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) est un protozoaire intracellulaire obligatoire, appartenant au phylum des Apicomplexes. Ce phylum regroupe de nombreux micro-organismes pathogènes causant des pathologies humaines et vétérinaires ayant un impact sanitaire et économique considérable, notamment *Plasmodium*, responsable du paludisme ; *Eimeria*, agent des coccidioses aviaires ; ou encore *Cryptosporidium* et *Babesia*. *T. gondii* est responsable d'une anthropozoonose cosmopolite, la toxoplasmose, qui touche environ 30% de la population mondiale.

1.1 Biologie du parasite : les différentes formes parasitaires

T. gondii existe sous trois formes : le tachyzoïte, le bradyzoïte, tous deux résultant de la multiplication asexuée chez les hôtes intermédiaires et le sporozoïte provenant de la multiplication sexuée chez l'hôte définitif (voir aussi chapitre 1.2.1). Chacune de ces formes joue un rôle spécifique dans la pathogénie et la transmission du parasite.

1.1.1 Le tachyzoïte

Le **tachyzoïte** résulte de la multiplication asexuée du parasite chez les hôtes intermédiaires (les homéothermes). Le tachyzoïte peut envahir toutes les cellules nucléées de l'organisme et s'y multiplier de manière rapide au sein d'une vacuole, appelée, vacuole parasitophore (VP). La multiplication et dissémination des tachyzoites est responsable de la phase aigüe de l'infection (Dubey et al. 1998, Dubey et al. 2010).

En forme de croissant, un tachyzoïte mesure environ 2 à 6 µm et peut se déplacer par glissement, flexion, ondulation ou rotation (Dubey et al. 2010). Il n'a aucun moyen visible de locomotion comme les cils, les flagelles ou les pseudopodes (Dubey et al. 2010). Le tachyzoïte est une cellule hautement polarisée possédant une extrémité antérieure pointue et une extrémité postérieure arrondie (Figure 1 - a). A son extrémité antérieure, est présent le complexe apical constitué de deux anneaux apicaux polaires (extérieur et intérieur) où s'ancrent les organelles de sécrétion spécifiques aux parasites apicomplexes : les micronèmes et les rhoptries. Le complexe apical joue un rôle essentiel dans la motilité parasitaire et l'invasion de la cellule hôte (Carruthers et al. 2007). Le tachyzoïte est délimité par une pellicule (enveloppe extérieure) comprenant la membrane plasmique et le complexe membranaire interne (CMI) dans lequel est ancré le cytosquelette d'acto-myosine (Figure 1 - a)

(Dobrowolski et al. 1997) et les microtubules sous-pelliculaires (Sweeney et al. 2010). Le tachyzoite est également constitué des organelles classiques des cellules eucaryotes : un noyau, un Golgi, un réticulum endoplasmique et une mitochondrie unique. D'autres organites spécifiques sont présents tels que les micropores (impliqués dans l'endocytose), les granules denses (voir chapitre 1.2.2) et l'apicoplaste, impliqué dans la synthèse lipidique.

1.1.2 Bradyzoïtes et kystes tissulaires

Résultant de la conversion des tachyzoïtes chez l'hôte intermédiaire, le bradyzoïte est le stade enkysté du parasite, responsable de la phase chronique de l'infection (Figure 1 - b). Il se divise d'une manière lente par endodyogénie asynchrone à l'intérieur du kyste intracellulaire (Dubey et al. 2010). D'une forme sphéroïde, les kystes s'établissent dans le cerveau, la rétine et les muscles squelettiques et cardiaques (plus rarement dans les poumons, le foie et les reins) et persistent durant toute la vie de l'hôte infecté (Tu et al., 2018). Leur taille est variable. Les kystes tissulaires jeunes peuvent avoir un diamètre de 5 µm et ne contenir que deux bradyzoïtes, tandis que les plus âgés peuvent en contenir des milliers (Figure 2 - b). Ces kystes atteignent 100 µm de longueur (forme allongée) dans les cellules musculaires et un diamètre de 70 µm au sein des neurones (Dubey et al. 2010). La forme kystique du parasite est responsable de la transmission entre hôtes par carnivorisme. La conversion entre le stade tachyzoïte et le stade bradyzoïte est un processus clé dans le cycle de vie de T. gondii, et est induit par divers facteurs environnementaux. Des conditions de stress, des facteurs cellulaires intrinsèques, ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte, induisent la différenciation (Sanchez et al. 2021, cf. 1.2). Le kyste est formé d'une paroi dérivant de la membrane de la vacuole parasitophore, composée à la fois d'une couche externe compacte et une deuxième couche interne plus souple s'étendant dans la matrice du kyste. Cette paroi semble limiter les échanges avec la cellule hôte car elle n'est perméable qu'aux molécules de faibles poids moléculaires (10kDa maximum) (Tu et al., 2018). Notamment, il a été démontré que contrairement aux tachyzoïtes, les kystes intra-neuronaux ne présentent pas d'antigènes parasitaires sur les molécules du CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I) dans les neurones infectés (Salvioni et al., 2019).

En cas d'immunosuppression, les bradyzoïtes peuvent se reconvertir en tachyzoïtes, entraînant une réactivation de l'infection latente (Lyons et al. 2002). La multiplication et dissémination rapide des tachyzoïtes, notamment dans le cerveau, est corrélée à une forte inflammation et la destruction des tissus pouvant entrainer des pathologies sévères (Singh et al. 2014) (cf 1.3).

1.1.3 Oocystes et sporozoïtes

Les oocytes sont issus de la multiplication sexuée dans l'intestin de l'hôte définitif (tous les félidés) et sont dotés d'une forme sphérique limitée par une membrane résistante. Les oocystes non sporulés constituent la forme de résistance et de dissémination du parasite dans le milieu extérieur (Figure 1 – c) (Dubey et al. 2010). Un à cinq jours suivant l'excrétion des oocystes dans les déjections des chats, la sporulation se produit dans le milieu extérieur selon les conditions d'humidité, d'oxygène et de température et donne naissance à des oocystes sporulés qui contiennent 2 sporoblastes chacun avec 2 noyaux. L'allongement des deux sporoblastes forme alors deux sporocystes ovoïdes contenant chacun quatre sporozoïtes (Dubey et al. 2010). Après ingestion des oocystes sporulés par l'hôte intermédiaire, la paroi protectrice est digérée dans l'estomac et les sporozoïtes pénètrent les entérocytes et les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal via un mécanisme encore très peu élucidé, où ils se convertissent en tachyzoïtes et disséminent dans l'hôte (Dubey et al. 2010).

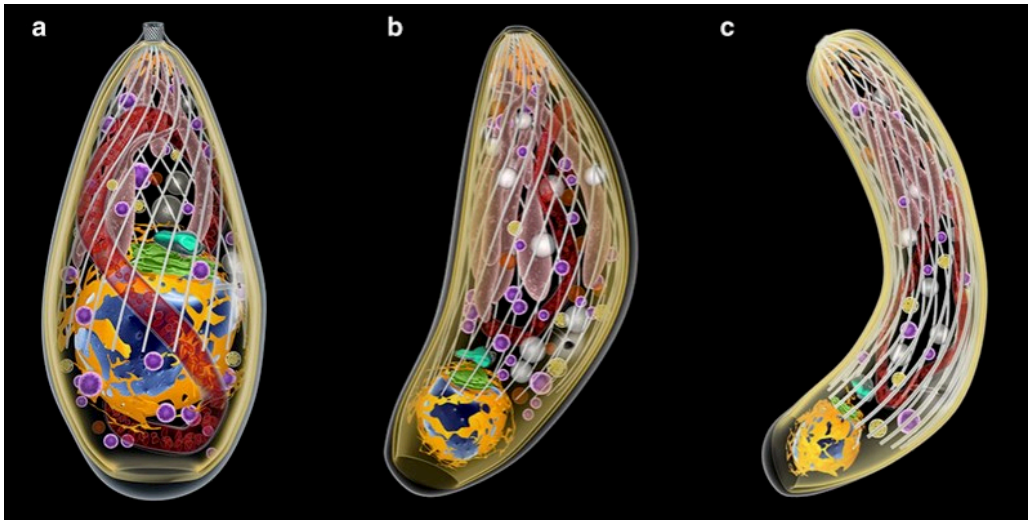


Figure 1 - Les trois stades infectieux de **Toxoplasma gondii** : tachyzoïte (a), bradyzoïte (b) et sporozoïte (c). Le noyau (en bleu) est entouré par le réticulum endoplasmique rugueux (en jaune). Au-dessus se trouvent l'appareil de Golgi (en vert) ainsi que l'apicoplaste (en bleu-vert). La mitochondrie unique s'étend à travers le cytosol (en rouge). Des granules denses (en magenta) et des granules d'amylopectine (en blanc) sont dispersés dans le cytosol. Le complexe apical comprend le conoïde de forme cylindrique. En dessous se situent les organites de sécrétion : les micronèmes (en orange) et les rhoptries (en rose). Le corps cellulaire est délimité par trois membranes formant la pellicule, sous laquelle se trouve un réseau de microtubules sous-pelliculaires (Attias et al. 2020).

1.2 Cycle de vie et cycle lytique du tachyzoite

1.2.1 Cycle de vie

Toxoplasma gondii a un cycle de vie complexe, présentant deux types de reproduction : la **reproduction sexuée** chez l'hôte définitif (Félidés) et la **reproduction asexuée** chez l'hôte intermédiaire (tous les homéothermes) (Figure 2).

La reproduction sexuée se déroule exclusivement dans l'épithélium intestinal des félidés, notamment les chats domestiques. Après ingestion de kystes tissulaires contenant les bradyzoïtes, ces derniers envahissent les cellules épithéliales intestinales et amorcent une phase de schizogonie (multiplication asexuée), suivie de la gamétogénèse (Speer et al. 2005). Les mérozoïtes se différencient en microgamètes (mâles) et macrogamètes (femelles), dont la fusion donne naissance à un zygote qui évolue en oocyste. Ces oocystes non sporulés sont excrétés dans les fèces du chat et deviennent infectieux après sporulation dans l'environnement (Dubey et al. 1998).

Chez les hôtes intermédiaires, tels que les humains, les rongeurs ou les oiseaux, *T. gondii* se reproduit exclusivement de manière **asexuée**. L'infection débute par l'ingestion d'oocystes sporulés contenant les sporozoites ou de kystes tissulaires contenant des bradyzoïtes. Les sporozoïtes ou bradyzoïtes libérés envahissent les entérocytes et se différencient en tachyzoïtes (Hill et al. 2005, Hill et al. 2010). Cette multiplication est suivie par la lyse des cellules hôtes et la dissémination systémique du parasite. Les tachyzoïtes disséminent r*a*pidement via la circulation sanguine hors du site primaire d'infection, atteignant notamment le cerveau, où ils se convertissent en bradyzoïtes, établissant une infection chronique latente. Les connaissances actuelles indiquent que l'induction de la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes est multifactorielle et implique la contribution du cycle cellulaire et du métabolisme de la cellule hôte ainsi que les réponses inflammatoires de l'environnement tissulaire. Ainsi chez la souris, l'IFNγ et le TNFα ainsi que la production de l'oxyde nitrique (NO) favorisent la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Lüder et al. 2017). Par ailleurs, certains facteurs intrinsèques à la cellule hôte infectée semblent également participer à ce processus. Notamment, il a été montré que deux protéines cellulaires favorisent la différenciation en bradyzoite : la protéine CDA-1 (Cell Division Autoantigen 1) qui inhibe la croissance de la cellule hôte, et la protéine CD73 qui augmente la concentration en adénosine (Lüder et al. 2017). Il est important de noter que l'invasion des neurones primaires de souris ou de rat en culture (sans stress ou stimulus exogène) conduit à la conversion spontanée des tachyzoïtes en bradyzoïtes et à la formation de kystes intracellulaires, par des mécanismes encore inconnus. Cela suggère donc que les cellules neuronales fournissent un microenvironnement cellulaire spécifique suffisant pour déclencher la conversion (Swierzy et al., 2017), un phénomène également observé dans les cellules musculaires squelettiques (Swierzy et al. 2015; Lüder et al. 2017).

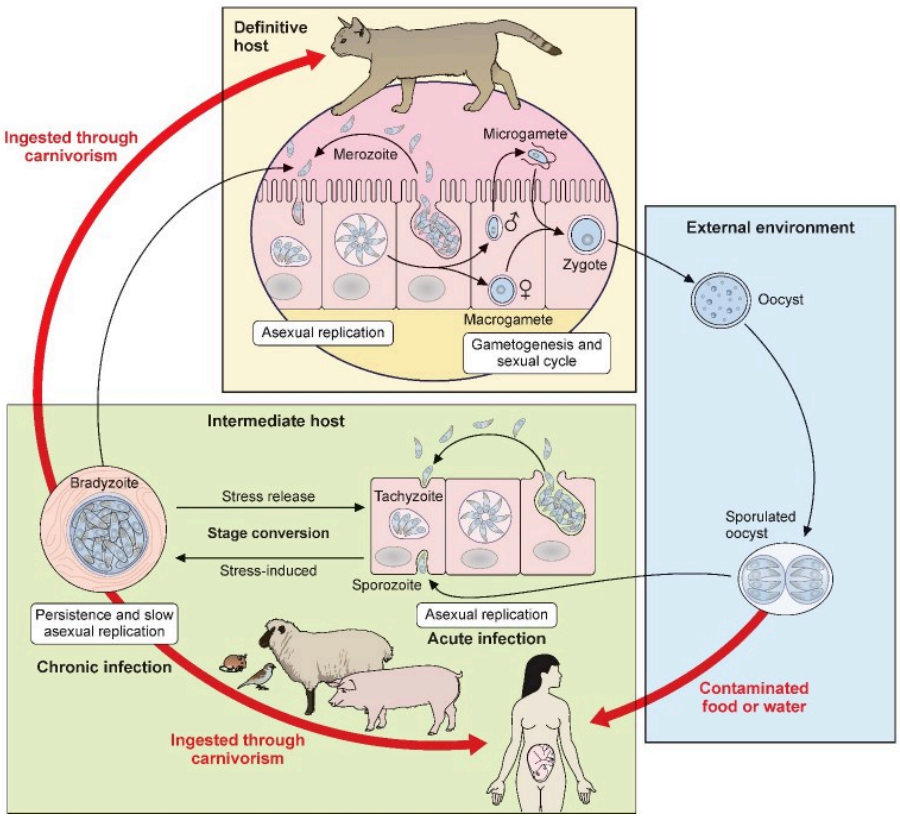


Figure 2 - Cycle de vie de *T. gondii*. Représentation schématique des stades infectieux et de leurs modes de transmission et de réplication chez leurs hôtes respectifs (Sanchez et al. 2021).

1.2.2 Cycle lytique du tachyzoite et organelles sécrétoires

Le cycle lytique représente les étapes par lesquelles le parasite adhère à une cellule hôte, l'envahit en formant la vacuole parasitophore (VP), s'y réplique et enfin sort de cette cellule par lyse cellulaire (Figure 3). Le premier contact du parasite avec cette cellule se fait par sa couche protéique de surface. En effet, le parasite est recouvert de protéines de surface ancrées dans la membrane plasmique par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) appelés SAG (surface antigen) notamment SAG1, qui reconnaissent les protéoglycanes sulfatés sur la cellule hôte (Figure 3 – A) (Bishop *et al*., 2005 ; Hill et al., 2002 ; Carruthers et al. 2008). Ce premier contact induit une vague de calcium intracellulaire qui active la sécrétion du contenu des micronèmes, notamment la protéine AMA1. Ce processus est immédiatement suivi par la sécrétion des protéines contenues dans le cou des rhoptries, les protéines RONs (Rhoptry Neck Proteins*)* incluant RON2, RON4 et RON5, qui s'insèrent dans la membrane de la cellule hôte pour établir par interaction avec la protéine AMA1, la jonction mobile (MJ : Moving junction) (Figure 3 - B). Cette structure permet d'ancrer le parasite au cytosquelette de la cellule hôte, mais également d'exclure les protéines transmembranaires de type I de la cellule hôte (Mordue et al. 1999). Cette stratégie est essentielle pour la survie du parasite afin

d'éviter la voie classique de fusion des lysosomes à la VP (Mordue et al. 1999). Les rhoptries sécrètent également dans le cytoplasme de la cellule hôte et ceci dès la formation de la MJ, les protéines ROP, qui sont des kinases ou pseudokinases qui vont manipuler les réponses de l'hôte de manière précoce (Hakimi et al. 2017) (cf. 1.2.3). Pour finir, les granules denses, sécrètent les protéines « GRAs » au sein de l'espace vacuolaire lors de la formation de la VP, de manière constitutive et continue, lors de la réplication parasitaire. Les protéines GRAs sont retrouvées à la MVP, dans l'espace intravacuolaire, ou sont transloquées vers le cytosol ou le noyau de la cellule hôte (Rastogi et al. 2019). Elles jouent un rôle essentiel pour assurer la réplication et la survie du parasite au sein de la VP. Elles contribuent notamment à la formation du réseau de nanotubules intravacuolaires, qui relie les parasites entre eux et avec la MVP, assurant une communication inter-parasitaire et les échanges avec le milieu extérieur (Travier et al. 2008 ; Hakimi et al. 2017). Les protéines GRAs vont également modifier certaines voies de signalisation de l'hôte ou moduler certains programmes transcriptionnels, régulant le cycle cellulaire, les voies métaboliques et les mécanismes cellulaires de défense, établissant ainsi un environnement non délétère pour la croissance parasitaire (Rosowski et al. 2011, Gay et al. 2016, Matta et al. 2019).

En absence de réponse inflammatoire qui induit les mécanismes de défenses cellulaires pouvant entrainer la lyse vacuolaire ou l'arrêt de la croissance parasitaire, le parasite se réplique de manière synchrone par endodyogénie en produisant en continu de l'acide abscissique (ABA), qui à des concentrations dépassant un seuil limite provoque la sortie du parasite ou « egress » (Nagamune et al. 2008). En outre, la réplication du parasite conduit à l'acidification de la vacuole parasitophore qui induit aussi la sortie du parasite (Roiko et al., 2014). Le parasite sécrète également des enzymes appelées NTPases appauvrissant la cellule hôte en ATP conduisant à l'arrêt des pompes Na+/K+, à la baisse du K+ intracellulaire et finalement à la sortie du parasite (Blader et al., 2015).

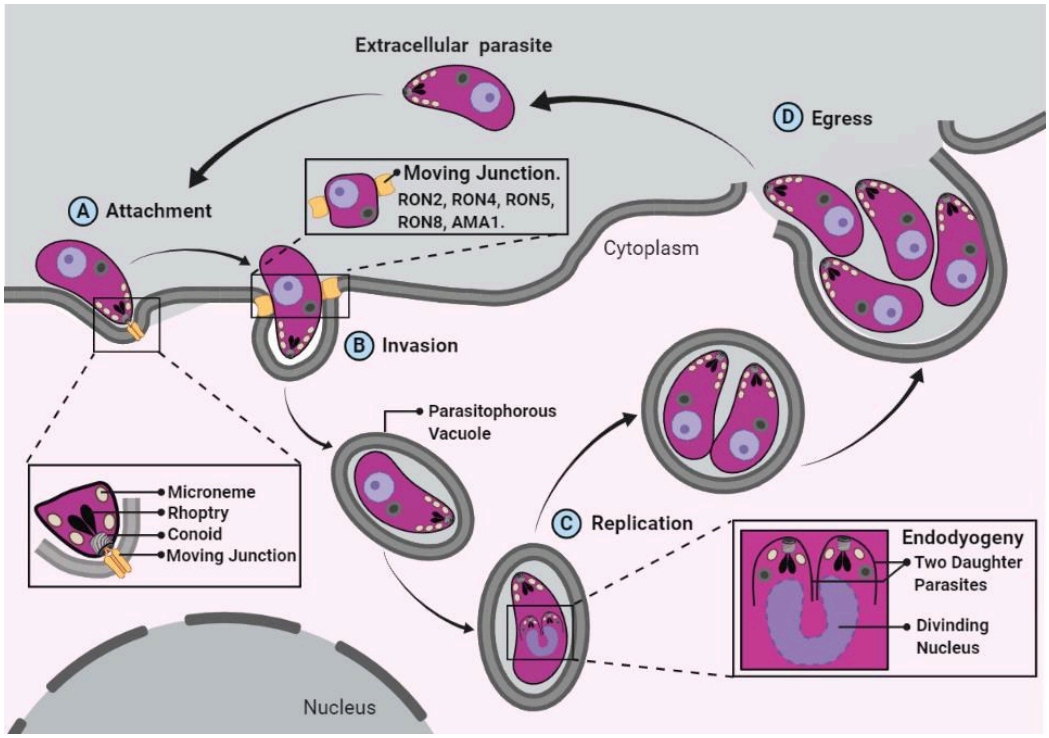


Figure 3 - Cycle lytique de *T. gondii* (Blader *et al.*, 2015). (**A)** Dans une première étape, le parasite adhère fermement à la cellule hôte en formant la jonction mobile après sécrétion du contenu des rhoptries et micronèmes. **(B)** Le parasite envahit la cellule hôte en formant la vacuole parasitophore (PV) dans le cytoplasme de la cellule hôte. **(C)** Le parasite se réplique par endodyogénie, au sein de la PV. **(D)** Enfin, les parasites rompent la membrane de la PV et la membrane de la cellule hôte et sortent avant d'envahir les cellules voisines.

1.2.3 Génotypes parasitaires et virulence

T. gondii se compose de 3 génotypes majeurs : les souches de type I, II et III se distinguant par leur virulence définie chez la souris de laboratoire, et leur pouvoir kystogénique (Dardé et al. 2008). Les génotypes de *T. gondii* sont très similaires et présentent une faible diversité génétique de seulement 2% du génome (Sibley LD et al. 2009, Singh et al. 2002, Howe et al. 1995, Saeij et al. 2005). **Les souches de type I** de *T. gondii* sont caractérisées par une virulence élevée chez les souris de laboratoire avec une dose létale médiane (DL50) proche de 1. **Les souches de type II et de type III** sont peu virulentes mais possèdent un pouvoir kystogénique important. Les souches de type II causent la grande majorité des infections chez l'homme.

Les effecteurs parasitaires sécrétés par les souches de type I inhibent les défenses cellulaires des cellules infectées, permettant au parasite de se répliquer et disséminer rapidement dans l'hôte, pouvant conduire à sa mort (Boothroyd et al. 2002, Saeij et al. 2005). Par exemple, le complexe ROP5/ROP17/ROP18, localisé à la MVP, phosphoryle les protéines IRGs (Immune-Related GTPases) de l'hôte entrainant leur dissociation de la MVP et bloquant ainsi la lyse vacuolaire (Figure 4) (Etheridge

et al. 2014 ; Fleckenstein et al. 2012). De plus, la pseudokinase TgROP54 diminue le recrutement de la protéine GBP2 (Guanylate Binding protein 2) à la VP la protégeant de la lyse (E. W. Kim et al. 2016). D'autres part, TgROP16 induit la phosphorylation des facteurs de transcriptions STAT3 et STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) induisant la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et le TNF-α dans les souris infectées (Butcher et al. 2011, Ong et al. 2010, Saeij et al. 2006). Dans les macrophages, il a été montré que l'effecteur TgIST (Inhibitor of STAT1 transcriptional activity), sécrété par les granules denses, inhibe STAT1 et donc l'expression des ISGs (Interferon-Stimulated Genes) (Gay et al. 2016, Matta et al. 2019).

A contrario, les effecteurs sécrétés par les souches de type II stimulent les réponses immunitaires de l'hôte limitant ainsi la dissémination parasitaire afin de préserver l'hôte et d'y établir une infection latente. Notamment, les souches de type II sécrètent TgGRA15(II) à la MVP, qui est capable d'interagir avec les facteurs TRAFs (TNF Receptor-Associated Factors) de l'hôte induisant l'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor Kappa B) et ainsi la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 (Figure 4) (Jensen et al. 2012, Rosowski et al. 2011, Sangaré et al. 2019). Par ailleurs, les souches de type II possèdent un polymorphisme dans le gène codant pour TgROP5 le rendant inactif, n'empêchant donc pas l'action de lyse de la PV par les IRGs (Behnke et al. 2011). De plus, les souches de type II modulent les réponses cellulaires afin d'usurper le potentiel migratoire des cellules immunitaires telles que les DC, afin d'établir une infection latente sous forme de kystes dans les organes éloignés du site premier d'infection (tels que le cerveau) (Courret et al. 2006). Notamment, la protéine TgGRA28, sécrétée via le translocon MYR1, est injectée dans le noyau des macrophages infectés. Cela déclenche chez ces cellules un profil transcriptionnel typique des DC, notamment en induisant l'expression de CCR7, leur confèrant une capacité de migration et de chimiotactisme améliorée. In vivo, ces macrophages infectés migrent plus efficacement vers les organes secondaires que ceux infectés par des souches déficientes en TgGRA28, soulignant le rôle direct de TgGRA28 dans la dissémination du parasite (Hoeve et al. 2022). De plus, le parasite peut également infecter les DC et favorise leur transmigration trans-endothéliale (TEM) à travers des monocouches de cellules endothéliales. Ce phénomène est associé à une surexpression de ICAM-1 à la surface des DC infectées, facilitée par l'effecteur TgGRA15(II), ce qui améliore leur adhésion aux cellules endothéliales, la délétion du gène ICAM-1 dans les DC ou la suppression de TgGRA15 dans T. gondii réduit significativement la TEM (Ross et al. 2022).

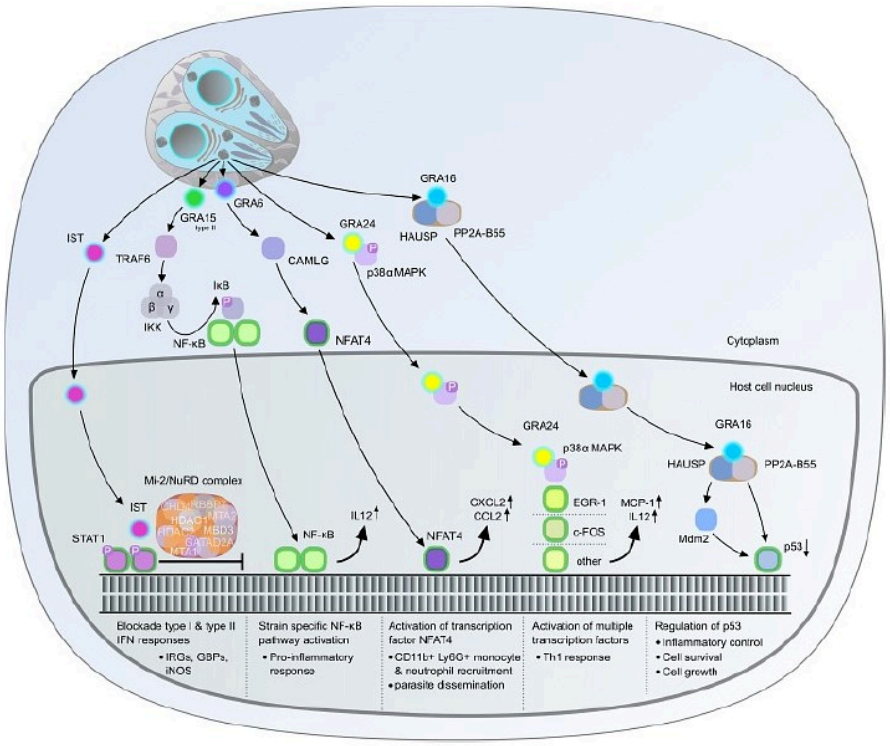


Figure 4 – Les protéines denses granules (GRAs) de *Toxoplasma gondii* adoptent différentes localisations et fonctions au sein de la cellule hôte. Certaines, comme TgIST, TgGRA24 et TgGRA16, sont transloquées dans le noyau, tandis que d'autres, telles que TgGRA15, se localisent à la membrane de la vacuole parasitophore (MVP), ou encore comme TgGRA6, restent associées à la vacuole parasitophore (VP) tout en interagissant avec le cytosol de l'hôte. TgIST interfère avec la réponse IFN en recrutant le complexe NuRD/Mi-2, inhibant ainsi la fixation de STAT1 sur les promoteurs dépendants de l'IFN. TgGRA24, quant à elle, active la voie p38α MAPK en formant un complexe avec cette kinase, ce qui entraîne l'induction de facteurs de transcription tels qu'EGR-1 et c-FOS, impliqués dans la réponse Th1. TgGRA16 interagit avec HAUSP et la sous-unité B55 de PP2A pour moduler négativement l'activité de p53.Chez les souches de type II, TgGRA15(II) active TRAF6, menant à l'activation de la voie NF-κB et à une réponse pro-inflammatoire. En revanche, dans les souches de type I, TgGRA6(I) se lie à CAMLG et stimule l'activation de NFAT4, favorisant ainsi la production de chimiokines telles que CXCL2 et CCL2, ce qui contribue au recrutement de cellules immunitaires vers le site d'infection (Hakimi et al. 2017).

1.3 Transmission et pathogénie

1.3.1 Transmission à l'Homme

Chez les hôtes intermédiaires, notamment les Hommes, la transmission peut survenir suite à l'ingestion d'eau, ou de fruits et légumes contaminés par les oocystes sporulés, ou par l'ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes, ainsi appelé transmission horizontale (Figure 2). La paroi des kystes et des oocystes est rompue par les enzymes de l'estomac, libérant ainsi les parasites dans le tractus digestif, entraînant une infection systémique. (Attias et al. 2020, Dubey

1998). Lors de la primo-infection de la femme enceinte, les tachyzoïtes peuvent pénétrer le placenta et ainsi infecter le fœtus, par la transmission dite verticale (Figure 2) (Tenter et al. 2000, Attias et al. 2020).

1.3.2 La toxoplasmose : Différentes formes de la maladie

La toxoplasmose peut se manifester sous plusieurs formes cliniques, qui varient en fonction de l'état immunitaire de l'hôte et du moment de l'infection. Chez les personnes immunocompétentes, la toxoplasmose aiguë est le plus souvent asymptomatique mais peut provoquer des symptômes grippaux tel que fièvre et asthénie (Layton et al. 2023). Une autre forme de la maladie plus sévère est la toxoplasmose oculaire, souvent d'origine congénitale, qui se manifeste par une choriorétinite, pouvant provoquer des douleurs oculaires et une baisse de la vision, voire la cécité si non traitée (Delair et al. 2011). Chez les sujets immunodéprimés (patients atteints du SIDA, greffés ou sous immunosuppresseurs), la toxoplasmose cérébrale et toxoplasmose disséminée sont les formes les plus fréquentes et les plus graves, qui sont induites par la réactivation des kystes latents. Elle se caractérise par des encéphalites aigües et des troubles neurologiques graves (Dian S et al. 2023, Scallan et al. 2011). Enfin, la toxoplasmose congénitale résulte de la transmission transplacentaire du parasite lors d'une primo-infection maternelle pendant la grossesse. Les tachyzoïtes traversent le placenta, envahissent les tissus fœtaux altérant le développement fœtal (Oz, 2014). Une relation inverse est observée entre la fréquence de transmission du parasite et la sévérité de l'infection (Dunn et al., 1999). Plus la grossesse progresse, plus le risque de transmission materno-fœtale augmente. Cependant, l'infection contractée précocement pendant la grossesse est généralement plus sévère, pouvant entraîner la mort fœtale in utero. Par ailleurs, chez les personnes immunocompétentes, la persistance parasitaire sous forme de kystes latents a longtemps été considérée comme asymptomatique. Cependant, la toxoplasmose chronique cérébrale est maintenant considérée comme un facteur de risque pour le développement de maladies mentales sévères (schizophrénie, syndrome bipolaire) (Sutterland et al. 2015) et de maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) (Torres et al. 2018).

1.3.3 Diagnostic et traitements

Le diagnostic de la toxoplasmose peut être réalisé indirectement, via la sérologie pour la détection des anticorps IgG et IgM anti-*Toxoplasma gondii,* permettant de déterminer le statut immunitaire et de dater une éventuelle infection. Des tests complémentaires, notamment chez les individus immunodéprimés, peuvent être réalisés tels que des réactions de PCR afin de détecter l'ADN

parasitaire, des biopsies (liquide amniotique chez la femme enceinte) ou encore un diagnostic via radiographies (lésions cérébrales) (Elsheikha et al. 2020, Guitard et al. 2024).

Concernant le traitement de la toxoplasmose, chez les personnes immunocompétentes, la toxoplasmose est généralement bénigne et ne nécessite pas de traitement spécifique. Cependant, en cas de symptômes sévères ou prolongés, un traitement associant pyriméthamine et sulfadiazine, supplémenté d'une prise d'acide folinique (pour palier l'activité anti-folique des antiparasitaires) (Montazeri et al. 2017). Chez la femme enceinte, en cas de séroconversion, un traitement par spiramycine est initié pour réduire le risque de transmission fœtale. Si une infection fœtale est confirmée par PCR sur le liquide amniotique, la même association de traitement est prescrite (pyriméthamine et sulfadiazine), de même pour les individus immunodéprimés. Cependant, ces traitements n'agissent que sur la phase aigüe de l'infection, et n'ont aucun impact sur les kystes latents. De nombreuses études sont ainsi en cours afin d'identifier un traitement contre la toxoplasmose chronique, qui impacterait les kystes (Suzuki et al. 2010 ; Suzuki et al. 2020).

2. Réponse immunitaire face à l'infection par *Toxoplasma gondii*

2.1 Réponse immunitaire innée

2.1.1 Réponse immunitaire au site de l'infection

Après ingestion par l'hôte, les kystes ou oocystes subissent une dégradation de leur paroi au niveau de l'estomac sous l'effet de l'acidité gastrique et des enzymes digestives. Ce processus libère les formes infectieuses du parasite, à savoir les bradyzoïtes ou les sporozoïtes. L'infection débute alors dans le tractus gastro-intestinal par la pénétration des cellules épithéliales intestinales, ou entérocytes. Une réponse immunitaire locale se met rapidement en place dans cet épithélium, constituant ainsi une première ligne de défense (Gregg et al., 2013) (Figure 4). Les entérocytes participent à la limitation de la multiplication parasitaire en sécrétant des substances toxiques comme le NO (oxyde nitrique) et en réduisant la disponibilité du fer (Dimier et al., 1998, Miller et al., 2009). Simultanément, ils produisent diverses cytokines (IL-1β, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, TNF-α) et chimiokines (MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2) qui favorisent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires sur le site infecté (Figure 4) (Mennechet et al., 2002).

Parmi les premières cellules à être recrutées figurent les neutrophiles, attirés par les chimiokines CCL1 et MIP-2 (également connue sous le nom de CXCL2) (Khan et al., 2001, Rio et al., 2001). Ces neutrophiles ont la capacité d'éliminer les parasites soit par phagocytose directe, soit par la libération de molécules microbicides telles que le NO ou les espèces réactives de l'oxygène (ROI), ou

encore via la formation de pièges extracellulaires appelés NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (Abdallah et al., 2012 ; Konishi et al., 1992 ; Miller et al., 2009). Toutefois, le parasite peut aussi envahir ces cellules, ce qui compromet leur élimination et facilite sa dissémination dans l'intestin grêle (Coombes et al., 2013). Les neutrophiles sécrètent également de l'IL-12, de l'IFN-γ et du TNF-α, qui favorisent la maturation des cellules dendritiques immatures. Ils produisent également des chimiokines comme MIP-1α et MIP-1β (CCL3 et CCL4), responsables du recrutement de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes (Figure 5) (Bliss et al., 1999 ; Sturge et al., 2013). En cours d'infection, les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 permettent une migration rapide des cellules dendritiques vers l'intestin (Cohen et al., 2015 ; Miller et al., 2009), où elles déclenchent une réponse IFN-γ-dépendante via la production d'IL-12, activant ainsi les cellules NK et les lymphocytes T (Dupont et al., 2012). Les cellules NK recrutées grâce à l'IL-15 et l'IL-18 participent à l'élimination du parasite par leurs fonctions cytotoxiques (sécrétion de perforines et granzymes) et par la production précoce d'IFN-γ (Gazzinelli et al., 1993 ; Schulthess et al., 2012). Elles produisent également du CCL3, qui attire d'autres cellules immunitaires comme les monocytes inflammatoires (Schulthess et al., 2012).

Les monocytes sont recrutés par les chimiokines MCP-1 (ou CCL2) et CCL3 et jouent un rôle crucial dans l'immunité de la muqueuse intestinale. En limitant la prolifération parasitaire, ils contribuent à prévenir les lésions tissulaires et la dissémination systémique du parasite (Dunay et al., 2008, 2010 ; Mordue et al., 2003 ; Robben et al., 2005 ; Schulthess et al., 2012). Ces cellules, ainsi que les macrophages, produisent de l'IL-12 et du TNF-α et peuvent activer des mécanismes antimicrobiens en réponse à l'IFN-γ produit par les cellules NK, les neutrophiles et les lymphocytes T (Yarovinsky et al. 2014) (Figure 5). De plus, les monocytes et macrophages sont les principales cellules phagocytaires impliquées dans l'élimination du parasite et jouent un rôle de cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T, contribuant ainsi à l'activation de l'immunité adaptative (Figure 5) (Buzoni-Gatel et al.,2006 ; Dunay et al., 2010). Enfin, les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) sont recrutés en réponse aux chimiokines CCL3 et CCL4. Ils exercent une cytotoxicité ciblée contre les entérocytes infectés et régulent l'inflammation en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β. Cela permet de réduire la production d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4+ intestinaux, évitant ainsi une inflammation excessive et dommageable pour le tissu intestinal (Figure 5) (Mennechet et al., 2004).

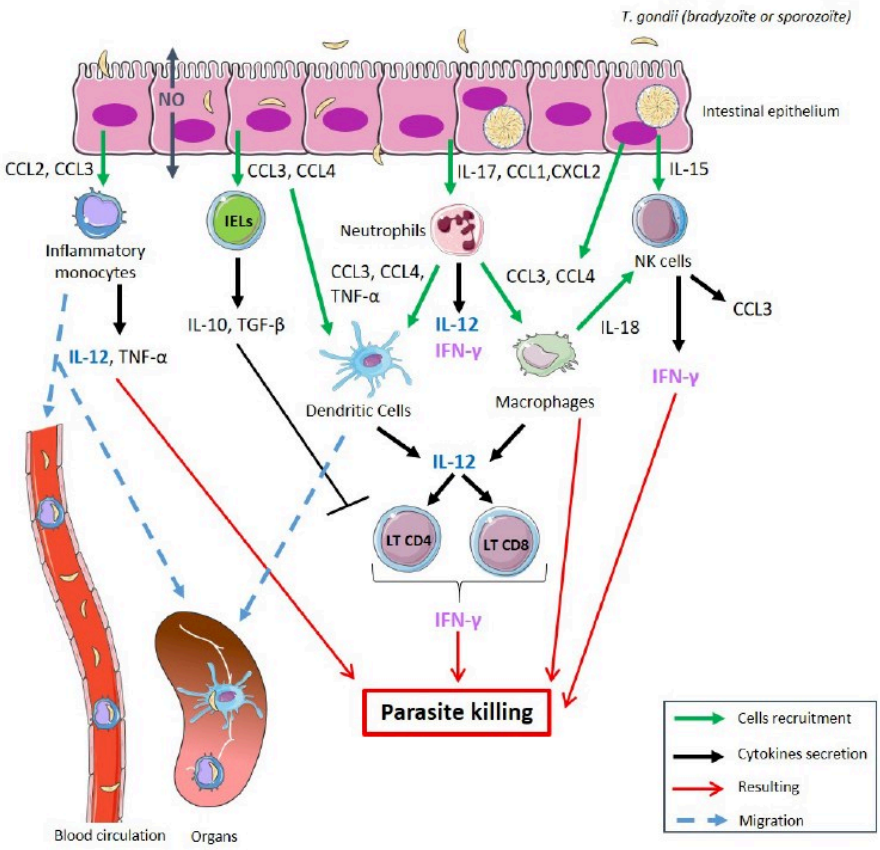


Figure 5 - Représentation schématique de l'importance des cellules immunitaires au site d'infection. (Anaïs Poncet). Les entérocytes infectés sécrètent du NO ainsi que de nombreuses cytokines et chimiokines permettant le recrutement des cellules immunitaires. En plus des entérocytes, les neutrophiles aident au recrutement des DCs et des macrophages qui sécrètent de l'IL-12 activant ainsi la production de l'IFNγ par les lymphocytes T. Les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs) régulent la réponse inflammatoire locale en sécrétant les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGFβ. Les neutrophiles, T CD4+, T CD8+ et les cellules NK sécrètent de l'IFNγ 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 La reconnaissance du parasite : PRRs et PAMPs

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'hôte et réagit immédiatement au site de l'infection. Les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires de la réponse innée dans la muqueuse détectent le parasite via des pattern recognition receptors (PRRs) tels que les Toll-like récepteurs (TLRs), ou encore les Nod-like récepteurs (NLRs), afin d'activer la réponse immunitaire.

2.1.2.1 Les Toll-like Récepteurs (TLRs)

Les TLRs sont impliqués dans la reconnaissance des infections parasitaires dont la toxoplasmose (Gazzinelli RT 2006), détectant des structures conservées chez les espèces microbiennes ou libérées par les cellules endommagées, appelées pathogen-associated (PAMP) et damage-associated molecular patterns (DAMP), respectivement (Takeuchi et al. 2010). Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR) impliqué dans la reconnaissance des PAMPs, ainsi qu'un domaine intracellulaire de type Toll/interleukine-1 (TIR), essentiel pour le recrutement de protéines adaptatrices telles que MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) ou TRIF, contenant elles aussi un domaine TIR (Lim et al. 2013). L'équipe de Scanga et al a montré que des souris déficientes pour l'adapteur MyD88 présentaient une très forte susceptibilité à à l'infection par *T. gondii*, associée à une baisse de production d'IL-12 et d'IFNγ : deux cytokines majeures dans la mise en place de la réponse cytotoxique contre *T. gondii* (Scanga et al. 2002). Il a également été montré que l'activation de MyD88 dans les cellules dendritiques joue un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires, en induisant la sécrétion d'IL-12, entrainant ainsi leur polarisation de type Th1, un processus qui est nécessaire à la survie de l'hôte infecté (Scanga et al 2002, Yarovinsky et al. 2006). L'activation de MyD88 dans les DCs participe également à l'activation des cellules NK et leur production d'IFNγ par la production d'IL-12 (Hou et al. 2011).

Le **TLR11** est reconnu comme un des principaux senseurs pour le parasite *T. gondii* dans les rongeurs. Il reconnaît la protéine profiline de *T. gondii*, un PAMP majeur, nécessaire à la motilité du parasite et à l'invasion cellulaire (Plattner et al. 2008). Il a été montré que l'interaction directe du TLR11 (en association avec le **TLR12**) avec la profiline du parasite à l'intérieur d'endolysosomes, recrute l'adapteur MyD88 et entraine des cascades de signalisation induisant les réponses pro-inflammatoires (Yarovinsky et al 2005, Pifer et al. 2010, Raetz et al. 2013) (Figure 6). Le modèle actuellement le plus largement accepté, notamment soutenu par les travaux des laboratoires de Gazzinelli et Yarovinsky, propose que les TLR11 et TLR12 forment un hétérodimère fonctionnel capable de lier directement la profiline de T. gondii. Cette reconnaissance conduit à l'activation de la voie de signalisation dépendante de l'adaptateur MyD88, recrutement assuré exclusivement par le TLR11 (Raetz et al. 2013) (Mercer et al. 2020). À l'inverse, une hypothèse alternative, formulée par les laboratoires de Ghosh et Sher, avance que le TLR12 seul pourrait suffire à déclencher une réponse immunitaire efficace en réponse à la profiline. Toutefois, cette proposition reste controversée, notamment car les données disponibles montrent que les cellules dendritiques issues de souris déficientes en TLR11 ne produisent pas de cytokines en réponse à l'antigène parasitaire (Yarovinsky et al. 2005, Plattner et al. 2008, Pifer

et al. 2010, Pepper et al. 2008). De plus, aucun mécanisme clair ne permet à ce jour d'expliquer comment le TLR12, en l'absence du TLR11 et sans capacité à recruter MyD88, pourrait initier une signalisation immunitaire efficace.

D'autre part, un autre modèle suggère que, bien que les TLR11-12 favorise l'activation de MyD88, les **TLR7** et **TLR9** dans les macrophages peuvent induire une activation suffisante de MyD88 en absence de reconnaissance parasitaire par le TLR11 (Andrade et al. 2013) (Figure 5). Le récepteur **TLR7** est spécialisé dans la détection des ARN simple brin présents dans les endolysosomes, principalement produits par les virus à ARN (Diebold et al. 2004, Heil et al. 2004). L'ARN de T. gondii peut activer le TLR7 (Pisitkun et al. 2006). Néanmoins, son rôle dans l'immunité dirigée contre T. gondii demeure mal compris, en particulier parce que sa contribution n'apparaît que dans des conditions où le TLR11 est absent. Par ailleurs, le TLR7 n'est pas exprimé dans les cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ (cDC1), qui constituent pourtant la sous-population principale impliquée dans la sécrétion d'IL-12 (Schulz et al. 2000). Par ailleurs, les souris délétées pour les TLR3, 7 et 9 n'induit pas d'augmentation de la susceptibilité à l'infection si les souris sont infectées en I.P (Andrade et al. 2013) A contrario, si les souris sont infectées par voie orale, ces souris délétées pour les TLR2, 4 et 9 présentent une susceptibilité accrue à l'infection, corrélée à un défaut de production d'IFNγ (Andrade et al. 2013, Benson et al. 2009, Debierre-Grockiego et al. 2007, Minns et al. 2006) (Figure 6).

En plus des TLR endosomaux, les récepteurs TLR2 et TLR4 présents à la surface cellulaire participent également à la détection du parasite en reconnaissant les glycosylphosphatidylinositols (GPI) du parasite, activant la production de Tumor Necrosis Facteur (TNF) et d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-12 (Sasai et al. 2013, Quinn et al. 2011, Beutler et al. 2006). Même si l'absence du TLR2 n'entraîne pas de diminution significative de la production d'IL-12 pendant l'infection (Scanga et al 2002), ce récepteur régule la production de TNF par les macrophages et de CC-chemokine ligand 2 (CCL2) par les neutrophiles (Debierre-Grockiego et al 2007, Del Rio et al. 2004, Chang et al. 1990, Sibley et al. 1991, Deckert-Schluter et al. 1998, Yap et al. 1998, Hunter et al. 1995). Le TNF agit en synergie avec l'IFNγ pour activer les macrophages/monocytes et promouvoir la production de NO (Hunter et al. 2012). Enfin, en plus du TLR2, le TLR4 peut également être activé par les GPI de T. gondii *in vitro* (Debierre-Grockiego et al 2007). Les TLR2 et 4 peuvent également être activé par la protéine *Tg*HSP70 du parasite (Béla et al. 2012). Cependant, l'absence de TLR4 ne semble pas affecter la résistance de l'hôte ni la production de cytokines pro-inflammatoires lors de l'infection, ce qui rend son rôle dans cette réponse encore incertain (Scanga et al. 2002) (Figure 6).

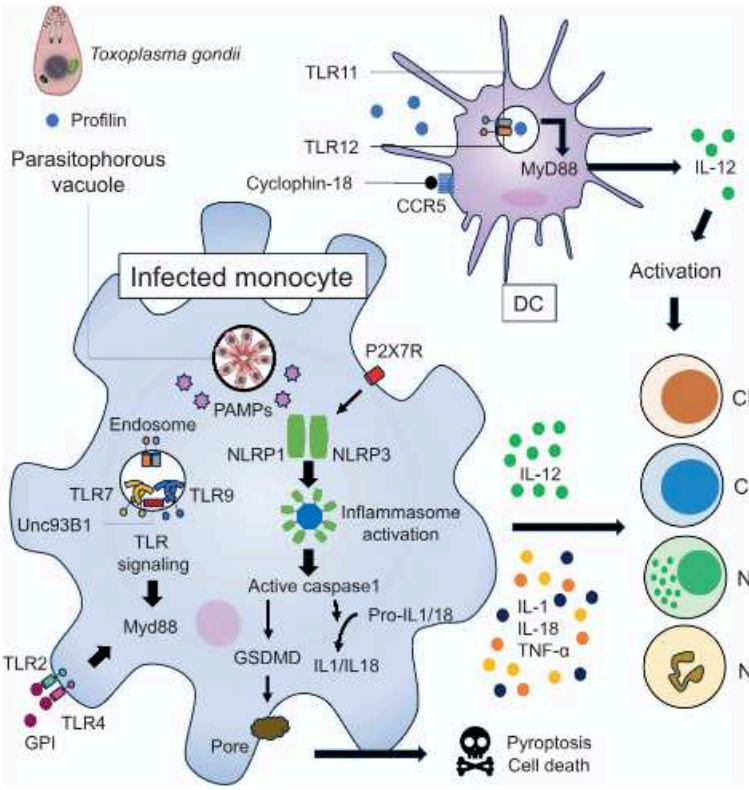


Figure 6 - Reconnaissance de *T. gondii* par les cellules immunitaires. Les cellules dendritiques (DC) et les monocytes sont les premières cellules hôtes à réagir à l'infection par T. gondii. Les interactions entre les PAMP dérivés de T. gondii et les capteurs immunitaires innés tels que les récepteurs de type Toll, CCR5 et les NLRP induisent la production de cytokines et de chimiokines, dont l'IL-12, et activent de nombreuses cellules immunitaires pour favoriser l'immunité antigénique. (Ihara and Yamamoto 2024).

2.1.2.2 Nod-Like Récepteurs (NLRs) et inflammasome

Les inflammasomes, activés via les récepteurs de type NLRs, sont des systèmes capteurs intracellulaires qui travaillent en coopération avec les TLRs pour reconnaître les pathogènes, ou encore détecter des signaux de stress cellulaire. Leur rôle principal est de détecter les composants microbiens présents dans le cytoplasme des cellules. Lorsqu'ils sont activés, ils déclenchent l'activation des caspases 1 et 11, ce qui conduit à une mort cellulaire par pyroptose (mort cellulaire inflammatoire), mais également la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (Schlee et al. 2016, López-Yglesias et al., 2019).

Parmi ces récepteurs, NLRP1 joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire induite par *T. gondii* au sein des monocytes humains, en favorisant la production d'IL-1β, IL-12 et IL-18 (Witola et al. 2010). Des études menées sur des macrophages ainsi que sur des modèles murins infectés ont montré que la prolifération parasitaire peut être contrôlée via l'activation coordonnée des récepteurs NLRP1,

NLRP3, de la caspase-1 et de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain), ce qui entraîne la production d'IL-1β et d'IL-18 sans pour autant provoquer la mort cellulaire (Chu et al. 2016, Ewald et al. 2013, Gorfu et al., 2014 ; Gov et al. 2013). Cette activation de l'inflammasome, et la sécrétion des cytokines qui en découle, semble dépendre en partie de la stimulation des voies de signalisation MAPK chez les souris infectées par une souche de type I de *T. gondii* (Wang et al. 2016). De façon notable, la production d'IL-1β varie selon la souche parasitaire impliquée. En particulier, la souche de type II, qui sécrète la protéine TgGRA15(II), active la voie NF-κB, nécessaire à la première étape de maturation des formes précurseurs pro-IL-1β et pro-IL-18 (Bando et al. 2018a, Gov et al. 2013). Bien que le rôle de l'inflammasome dans la défense immunitaire soit moins important que celui du récepteur TLR11, il devient néanmoins déterminant en l'absence de ce dernier.

En plus de NLRP1 et NLRP3, le récepteur NOD2 joue un rôle majeur dans la réponse adaptative de l'hôte. Une étude de référence a montré que NOD2 fournit un signal intrinsèque aux lymphocytes T, favorisant la réponse des cellules Th1 protectrices (Shaw et al. 2009). Chez les souris Nod2$^{-/-}$, la réponse adaptative est altérée, avec une production réduite d'IL-2 et une diminution de l'accumulation nucléaire du facteur de transcription c-Rel. Enfin, il est important de noter que NOD2 pourrait aussi interagir avec NLRP1 ou NLRP3, participant ainsi à la sécrétion d'IL-1β (Hsu et al. 2008, Kim et al. 2008, Pan et al. 2007, Watanabe et al. 2011).

2.1.3 Le rôle des Interférons : induction des défenses cellulaires intrinsèques contre *T. gondii*

2.1.3.1 Interféron de type II : L'interféron gamma (IFNγ)

- **Production d'interféron gamma**

Les cellules NK et les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ participent à l'immunité innée au cours de l'infection aiguë par T. gondii et jouent un rôle essentiel dans la protection précoce (Gazzinelli et al. 1993). Notamment, ces deux sous-types de cellules immunitaires assurent une protection en produisant de l'IFNγ, sécrété en réponse à l'IL-12 produite par des cellules immunitaires innées telles que les cellules dendritiques et les macrophages (Gazzinelli et al. 1993, Hunter et al. 1994, Bhadra et al. 2013). L'IFNγ produit par les cellules NK favorise également la différenciation des monocytes en macrophages inflammatoires ainsi qu'en cellules dendritiques dérivées des monocytes, produisant de façon importante de l'IL-12 (Goldszmid et al. 2012). Les lymphocytes T CD4^{+}, en se différenciant vers un profil Th1 sous l'effet de l'IL-12 produite par les cellules dendritiques, deviennent les principaux producteurs d'IFNγ dès les premiers jours suivant l'infection (Gazzinelli et al. 1994, Khan et al. 1996).

Cette cytokine est indispensable à l'activation des monocytes et macrophages, qui produisent alors des composés anti-microbiens tels que l'oxide nitrique après induction de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Yap et al. 1999). Parallèlement, les lymphocytes T $CD8^+$, activés via la présentation d'antigènes parasitaires par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), produisent eux aussi de l'IFNγ de manière importante (Bhadra et al. 2013). Cette production est accentuée par la signalisation synergique des cytokines IL-12 et IL-18 (Mordue et al. 2011) et s'accompagne d'une activité cytotoxique dirigée contre les cellules infectées, notamment via la libération de perforines et granzymes (Gazzinelli et al. 1993). Les cellules NK participent également à l'activation de la réponse adaptative dirigée contre T. gondii en contribuant à l'activation des LT CD4+ et LT CD8+ (Combe et al. 2005, (Goldszmid et al. 2007).

- **L'interféron gamma et le rôle de iNOS/IDO**

L'interféron gamma (IFNγ) joue un rôle central dans la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii*, en induisant l'expression de deux enzymes clés : l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et l'indoleamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1) (Figure 7). Ces enzymes contribuent à la restriction de la croissance parasitaire par des mécanismes distincts mais complémentaires (Ihara et al. 2024, Luder 2024, Yarovinsky et al. 2014). Chez la souris, l'activation des macrophages par l'IFN-γ entraîne l'expression de l'iNOS, responsable de la synthèse de la L-citulline et du NO à partir de l'acide aminé L-arginine. L'excès de NO produit réagit avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant une importante activité antiparasitaire (Nathan et al. 2000). Le NO agit en perturbant les fonctions métaboliques du parasite, notamment en provoquant une carence en L-arginine, essentiel pour *T. gondii*, qui est auxotrophe pour cet acide aminé (Fox et al. 2004). Il est également connu que cette déficience en arginine conduit à la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes dans le cerveau (Fox et al. 2004). Bien que l'absence d'iNOS chez la souris n'affecte pas le contrôle de l'infection aigue à a, les souris déficientes en iNOS sont très sensibles pendant la phase tardive de l'infection, ce qui entraîne une mortalité due à une charge parasitaire accrue dans le cerveau (Scharton-Kersten et al. 1997, Khan et al. 1997). En effet, le NO joue un rôle important dans la suppression de la toxoplasmose cérébrale du fœtus (Schluter et al. 1999). D'autres part, l'IFN*γ* induit l'expression de IDO1 qui catalyse la dégradation du L-tryptophane en kynurénine, réduisant ainsi la disponibilité de cet acide aminé essentiel pour *T. gondii*, qui est auxotrophe pour le tryptophane (Pfefferkorn et al. 1986).

- **L'interféron gamma et le rôle des IRG/GBP**

Par ailleurs, chez la souris, les GTPases de la famille IRG (Immunity-Related GTPases) et GBP (Guanylate-Binding Proteins) sont fortement induites par l'IFNγ et ciblent la vacuole parasitophore (PV) contenant *T. gondii* (Figure 6). La famille des IRG comprend trois protéines régulatrices IRG (Irgm1, Irgm2, Irgm3), quatre protéines effectrices IRG (Irga6, Irgb6, Irgb10, Irgd) et des leurres qui se lient principalement aux membranes internes de l'hôte, en particulier à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique (Bekpen et al. 2005). L'absence de régulateurs IRG, comme Irgm1 ou Irgm3, augmente la sensibilité à l'infection par *T. gondii*. Parmi les IRG effecteurs, Irga6 et Irgb6 sont connus pour s'accumuler autour des PV de *T. gondii*. Irgb6 est la première molécule à s'accumuler à la membrane de la PV. Les cellules déficientes pour Irgb6 présentent une réduction importante de la destruction parasitaire dépendante de l'IFN-γ et une diminution du recrutement d'autres molécules IRG effectrices, telles qu'Irga6 et Irgb10, ainsi que des GBP, vers la PV (Haldar et al. 2013). D'autre part, la famille des GBP contient 11 GBPs, réparties sur les chromosomes 3 (GBP1, GBP2, GBP3, GBP5, GBP7) et 5 (GBP4, GBP6, GBP8, GBP9, GBP10, GBP11), s'accumulant à la membrane de la PV de façon similaire aux IRGs (Degrandi et al. 2007). Les souris déficientes en ces GBP présentent sur le chromosome 3 montrent une susceptibilité accrue à l'infection, ainsi qu'un défaut dans la destruction de la PV dépendante de l'IFNγ dans des macrophages (Yamamoto et al.2012).

- **L'interféron gamma et le rôle de l'autophagie**

Pour finir, entre en jeu également le processus de dégradation cellulaire, **l'autophagie**, dans la réponse contre *T. gondii.* Des études ont montré que les cellules déficientes en Atg7 ou Atg16L1 présentent une diminution de l'accumulation des protéines IRG et GBP sur la membrane de la PV (Selleck et al. 2014). Des précédentes recherches ont aussi montré l'accumulation de microtubule-binding protein light chain 3 (LC3), protéine marqueur de l'autophagie, à la PV (Choi et al. 2014). LC3 fait partie de la famille Atg8, tout comme Gabarap et Gate-16. Chez les souris déficientes pour une ou plusieurs de ces protéines Atg8, la réponse immunitaire contre *T. gondii* reste fonctionnelle. Cependant, si Gabarap et Gabarap11 sont en plus absents en même temps que Gate-16, une perturbation importante dans le recrutement des protéines ubiquitine, p62/SQSTM1 est observée, un groupe de molécules importantes pour la présentation antigénique, ainsi que des IRG et GBP, entraînant une perturbation complète de la réponse immunitaire dépendante de l'IFNγ.

La réponse immunitaire médiée par l'IFN-γ est donc un mécanisme essentiel contre les agents pathogènes intracellulaires tels que *T. gondii.*

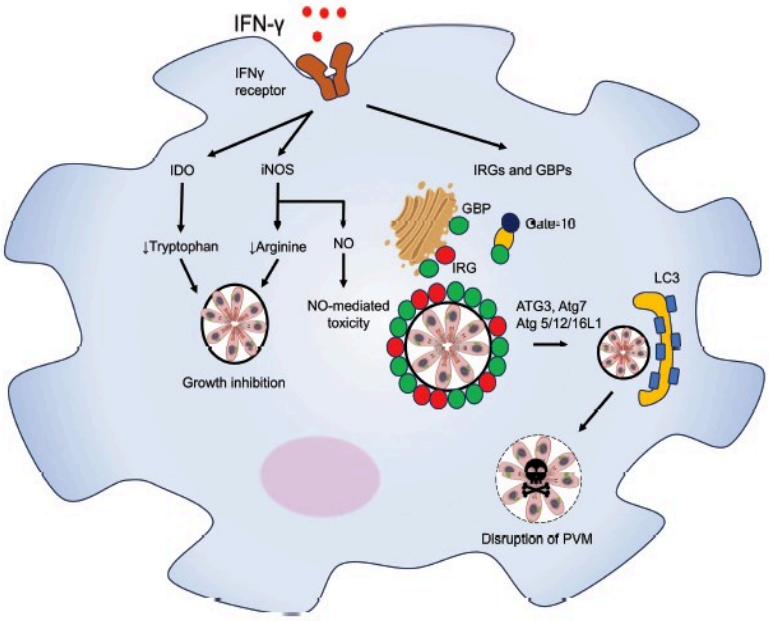


Figure 7 - Systèmes immunitaires cellulaires autonomes anti-*T. gondii*. L'IFN-γ possède de multiples activités anti-*Toxoplasma* dans les cellules infectées. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) épuise le tryptophane, un acide aminé essentiel à *T. gondii*. L'iNOS produit de l'oxyde nitrique, qui possède une activité antimicrobienne, tout en épuisant l'arginine, un acide aminé essentiel à la réplication du parasite. Les GTPases p47 (IRG) et p65 (GBP), liées à l'immunité et situées dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, sont recrutées sur la membrane de la vacuole parasitophore et induisent des molécules d'autophagie pour détruire la vacuole parasitaire (Ihara and Yamamoto 2024).

2.1.3.2 Interférons de type I

La production d'interférons de type I est induite après la reconnaissance des composés microbiens par les TLRs. Les TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés par les cellules dendritiques. Ces TLRs induisent la production d'IFN-I via la voie de signalisation dépendante de MyD88, dans laquelle le facteur TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) est recruté par MyD88 (Figure 8). Ce dernier interagit ensuite avec le facteur régulateur d'interféron 7 (IRF7), conduisant à sa phosphorylation (Figure 8). Une fois phosphorylé, IRF7 agit en synergie avec le facteur nucléaire NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et le facteur de transcription AP-1 (activator protein 1) pour induire la transcription des gènes codant pour les IFN de type I (Kim et al. 2007, Honda et al. 2006). Le TLR3, quant à lui, est spécialisé dans la reconnaissance de l'ARN double brin au sein des endosomes. Il recrute alors l'adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β), activant la cascade de signalisation TRIF–TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3)–TBK1 (TANK-binding kinase 1), qui mène à la phosphorylation du facteur IRF3 et, in fine, à la production d'IFN-I (Matsumoto et al. 2008, Matsumoto et al. 2004, Thompson et al. 2011). Le TLR4, activé par le lipopolysaccharide (LPS) à la surface cellulaire, peut induire la production de cytokines pro-inflammatoires via une voie dépendante de MyD88 (Figure 8). Cependant, une fois internalisé, le TLR4 est également capable d'induire la

production d'IFN-I ainsi que de cytokines inflammatoires via une voie dépendante de TRIF (O'Neill et al. 2007).

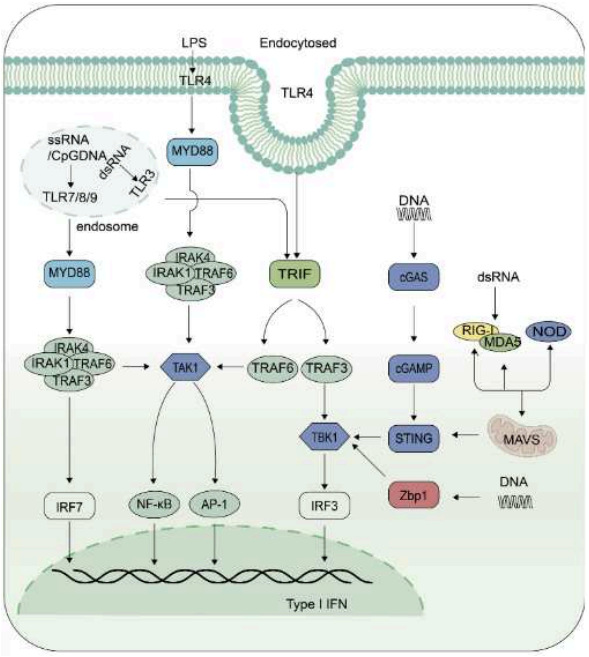


Figure 8 - Les voies de signalisation induisant l'expression des IFN de type I. Les récepteurs Toll-like 7/8/9 (TLR7/8/9) activent principalement la voie MyD88–TRAF6–IRF7–IFN-I, tandis que le TLR3 déclenche la voie TRIF–TRAF3–IRF3, et que le TLR4 active les deux. L'ADN est reconnu par la cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) et la protéine de liaison à l'ADN-Z 1 (Zbp1), activant ensuite la voie TBK1–IRF3–IFN-I. IRF7 ou IRF3 phosphorylé, en association avec le facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des cellules B (NF-κB) et le facteur activateur de transcription 1 (AP-1), induit la production d'interférons de type I. Le gène inductible par l'acide rétinoïque I (RIG-I) et la protéine 5 associée à la différenciation des mélanomes (MDA5) recrutent la protéine adaptatrice MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), qui recrute TRAF3, formant un complexe avec TBK1 et IRF3, initiant alors la production d'IFN-I. Les protéines contenant un domaine d'oligomérisation de type NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins) modulent également la production d'IFN-I. (Lingling Song *et al*. 2024)

Les interférons de type I (IFN-I) initient la cascade de signalisation JAK-STAT par la liaison à leurs récepteurs spécifiques, ce qui conduit à l'induction de l'expression de nombreux gènes stimulés par les interférons (ISG) (Figure 8). Plusieurs de ces ISG ont démontré des effets importants contre *Toxoplasma gondii*, notamment les GBPs, ISG15, la protéine kinase R (PKR) ainsi que la protéine TRIM21 (tripartite motif-containing 21), impliquée dans le processus de présentation des antigènes parasitaires. Les GBPs sont recrutées à la membrane de la vacuole parasitophore (PV), où elles induisent la lyse de cette structure, perturbant ainsi le microenvironnement du parasite et facilitant son élimination (Fisch et al. 2019, Fisch et al. 2022). ISG15 joue également un rôle clé au cours des phases précoces de l'infection : elle favorise la libération d'IFNγ et d'IL-1β, et agit comme molécule intermédiaire entre la signalisation de l'IFNγ et le processus d'autophagie, contribuant ainsi à la limitation de la prolifération de *T. gondii* (Bhushan et al 2020, Napolitano et al. 2018). PKR, est capable

d'activer la voie de l'autophagie, conduisant à l'élimination du parasite intracellulaire (Ogolla et al. 2013). Par ailleurs, il a été démontré que TRIM21 se localise à la vacuole contenant les souches de type II de *T. gondii* et participe de manière essentielle à la production de cytokines ainsi qu'au contrôle de la multiplication parasitaire (Foltz et al. 2017). Ces gènes ISG représentent ainsi de potentiels effecteurs moléculaires de la résistance médiée par les IFN-I contre *T. gondii*. En plus de ces mécanismes, les IFN-I induisent également la production de diverses cytokines et chimiokines. Des études antérieures ont mis en évidence la capacité des IFN-I à recruter les cellules NK et à stimuler leur production d'IFNγ (Hunter et al. 1997, Golszmid et al. 2012). L'IFN-β active la transcription de gènes antiviraux via les facteurs STAT1/STAT2, mais cette réponse est contrecarrée par la protéine parasitaire TgIST, qui bloque simultanément les voies IFN-I et IFN-II en recrutant le complexe NuRD, un répresseur de la transcription (Zhou et al. 2007, Matta et al. 2019). Des études sur des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN-I (Ifnar1−/−) montrent une susceptibilité accrue à l'infection, surtout à un stade chronique (Matta et al. 2019). Ainsi, la voie de signalisation de l'IFN-I est complémentaire à celle de l'IFN-γ et indispensable pour un contrôle optimal de l'infection à T. gondii.

2.2 Réponse immunitaire adaptative

2.2.1 Réponse immunitaire à médiation cellulaire : les lymphocytes T

Les mécanismes de présentation antigénique sont essentiels à l'initiation des réponses immunitaires adaptatives, en permettant la présentation de peptides antigéniques immunogènes à la surface des cellules sous forme de complexes avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**.** Ce processus mène à la formation de la synapse immunologique**,** structure fonctionnelle qui permet l'activation des lymphocytes T**,** centraux dans la défense immunitaire contre T. gondii. Les peptides d'origine endogène sont chargés sur les molécules de CMH de classe I (CMH-I), et présentés aux T CD8+ cytotoxiques. Les antigènes exogènes, sont chargés sur les molécules de CMH de classe II (CMH-II), afin d'activer les T CD4+ auxiliaires. Par ailleurs, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, telles que les DCs et les macrophages, sont capables de présenter des antigènes exogènes sur les molécules de CMH-I, activant ainsi des LT $CD8^+$, via un mécanisme appelé présentation croisée (cross-presentation).

2.2.1.1 Présentation antigénique par le CMH-I et présentation antigénique croisée

Plusieurs études ont identifié des antigènes de surface de T. gondii, ainsi que des protéines sécrétées issues des organites spécialisés du parasite, notamment les rhoptries**,** granules denses et micronèmes, comme étant des antigènes reconnus par les lymphocytes T (Jongert et al. 2010,

Beghetto et al. 2005, Khan et al. 1994, Reichmann et al. 2002, Scorza et al. 2003). Au cours de l'infection par T. gondii, la présentation antigénique via le CMH-I joue un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T $CD8^+$, cruciaux pour l'élimination des cellules infectées. T. gondii se réplique dans une vacuole parasitophore (VP), évitant ainsi son exposition directe au cytosol. Toutefois, plusieurs études ont démontré que certaines protéines parasitaires, notamment les protéines des granules denses (GRA) ou les protéines de rhoptries (ROP), sont retrouvées dans le cytosol de la cellule hôte (Goldszmid et al. 2009, Buaillon et al. 2017). Ces antigènes cytosoliques peuvent alors être capturés par le protéasome, qui les dégradent en petits peptides (Adiko et al. 2015; Cascio 2001; Kloetzel 2004). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la manière dont les antigènes de T. gondii accèdent à la voie de présentation par le CMH-I. Ces modèles sont principalement fondés sur l'utilisation de parasites exprimant un antigène modèle (comme l'OVA) et évaluent sa capacité à être présenté aux lymphocytes T CD8+ (Figure 9). (i) Le premier modèle propose une fusion entre le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte et la VP, permettant le transfert des protéines parasitaires dans le RE de l'hôte, suivie de leur translocation dans le cytosol via Sec61. Ce mécanisme reste encore hypothétique et nécessite des validations expérimentales plus directes, notamment *in vivo* (Goldszmid et al., 2009). (ii) Le deuxième modèle suggère une fusion de la VP avec des vésicules du compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC), médiée par la protéine SNARE Sec22b, entraînant le transfert des antigènes dans le cytosol via Sec61 (Cebrian et al. 2011, Buaillon et al. 2017). (iii) Le troisième modèle repose sur la rupture partielle de la membrane de la VP (MVP) **sous** l'action des protéines IRG (immunity-related GTPases)**,** permettant ainsi la libération des antigènes dans le cytosol (Yamamoto et al. 2012). (iv) Enfin, le quatrième modèle propose qu'une protéase clive la partie C-terminale de TgGRA6, une protéine de granules denses localisée à la MVP, entraînant sa libération dans le cytosol (Lopez et al. 2015) (Figure 9). Les peptides générés sont ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique (RE) via le complexe TAP (Transporter Associated with Antigen Processing). Ce transporteur vient de l'association des protéines transmembranaires TAP1 et TAP2, formant un canal appelé TAP localisé à la membrane du RE et qui permet la formation du complexe peptide/CMH-I (Momburg et al. 1994). Dans le RE, les peptides sont chargés sur les molécules de CMH-I, stabilisées par la β_2-microglobuline et un complexe chaperon (calréticuline, tapasin, ERp57), formant le complexe de chargement du CMH-I (Wearsch et al. 2008). Une fois le peptide fixé, le complexe CMH-I/peptide est exporté vers la surface cellulaire pour la reconnaissance par les lymphocytes T CD8+, et permettre leur activation (« priming ») (Figure 9).

La présentation croisée est un processus immunologique essentiel permettant aux cellules dendritiques (DC) d'activer les lymphocytes T $CD8^+$ à partir d'antigènes exogènes, en les présentant via les molécules de CMH de classe I. La présentation croisée permet ainsi aux DC de capturer des

antigènes parasitaires libérés par des cellules infectées ou présents dans l'environnement extracellulaire, puis de les apprêter pour la présentation sur CMH-I, déclenchant une réponse cytotoxique efficace même en l'absence d'infection directe (Blanchard et al. 2008). Deux mécanismes de présentation croisée ont été décrits : la voie cytosolique, où les antigènes capturés sont transloqués depuis les endosomes vers le cytosol, dégradés par le protéasome puis chargés sur CMH-I dans le réticulum endoplasmique. La translocation de ces peptides est dépendante de la machinerie ERAD (Ackerman et al. 2006, Zehner et al. 2015) ; et la voie vacuolaire, indépendante du protéasome, où les peptides sont générés directement dans les compartiments endo-lysosomaux et chargés localement sur le CMH-I (Embgenbroich et al. 2018, Joffre et al. 2012). Dans le cas de T. gondii, de précédentes études ont montré que la voie cytosolique est prédominante dans l'induction d'une réponse des T $CD8^+$ protectrice. En particulier, les cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ (cDC1) sont spécialisées dans cette fonction et jouent un rôle essentiel dans les premiers jours de l'infection (Gubbels et al. 2005). La présentation croisée est amplifiée par l'action de l'interféron gamma (IFN-γ), qui favorise l'expression du CMH-I, des composants du protéasome, ainsi que des transporteurs TAP. Toutefois, T. gondii peut restreindre ce processus : des protéines parasitaires comme TgIST ou ROP16 modulent la signalisation JAK/STAT et limitent l'expression des gènes induits par l'IFN-γ, ce qui peut perturber l'apprêtement antigénique et la présentation croisée (Saeij et al. 2007) (cf. 1.2.3).

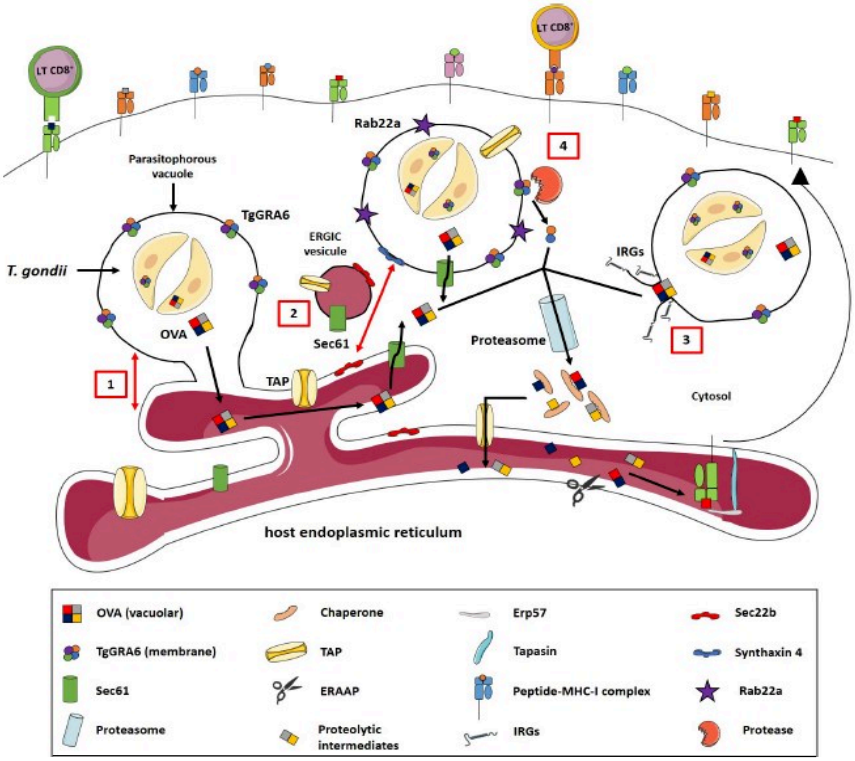


Figure 9 - Modèles proposés pour l'accès des antigènes et la présentation antigénique par le CMH-I de l'antigène OVA sécrété dans la VP et TgGRA6 localisée à la MVP lors de l'infection à *T. gondii*.
(Poncet, Marion & Blanchard, 2019)

La présentation des antigènes parasitaires via les molécules du CMH de classe I dépend fortement du mode d'invasion cellulaire par *T. gondii*, du mécanisme de sécrétion des antigènes et de leur localisation intracellulaire. Il a été démontré que l'activation des lymphocytes T CD8+ nécessite une invasion active de la cellule hôte par des tachyzoïtes vivants (Dupont et al., 2014 ; Goldszmid et al., 2009 ; Gubbels et al., 2005). À l'inverse, la phagocytose de parasites morts ou opsonisés ne conduit pas à une présentation antigénique efficace sur le CMH-I (Dupont et al. 2014, Dzierszinski et al. 2007). Ces résultats suggèrent donc que la sécrétion active des antigènes dans la VP puis leur translocation vers l'espace cytosolique est essentielle à leur transfert vers la voie de présentation du CMH-I (Dupont et al. 2014 ; Gregg et al. 2011 ; Grover et al. 2014 ; Kwok et al., 2003). Certains antigènes, tels que le peptide HF10 dérivé de la protéine TgGRA6, doivent être localisés à la MVP et accessibles au cytosol de la cellule hôte pour être efficacement dégradés par le protéasome et chargés sur le CMH-I, déclenchant ainsi une réponse T CD8+ protectrice (Dupont et al., 2014 ; Gregg et al., 2011 ; Grover et al. 2014 ; Kwok et al. 2003). Par ailleurs, bien que les DCs infectées soient les principales cellules initiant cette réponse, une étude a mis en évidence un rôle complémentaire pour les DCs voisines non infectées ("bystander"), capables de capturer des antigènes provenant de cellules infectées et d'initier une présentation antigénique croisée, contribuant ainsi à la réponse des T CD8+ (John et al. 2009).

2.2.1.2 Présentation antigénique par le CMH-II

Les molécules du CMH-II, synthétisées dans le RE, sont initialement associées à la chaîne invariante (Ii)**,** qui bloque le sillon de liaison aux peptides pour éviter le chargement prématuré. Les antigènes exogènes issus du parasite peuvent être capturés par les CPA via plusieurs mécanismes, notamment la phagocytose, la macropinocytose et la capture de complexes immuns. Une fois internalisés, les antigènes parasitaires sont dirigés vers le compartiment endosomal/lysosomal, où débute l'apprêtement antigénique. Dans ces compartiments acides, les protéines sont dégradées en peptides grâce à des protéases telles que la cathepsine S et la cathepsine L (Trombetta et al. 2005, Blum et al. 2013). Le complexe CMH-II/Ii transite vers les compartiments MIIC (MHC class II compartment), où la chaîne invariante est progressivement clivée, laissant un fragment appelé CLIP (Class II-associated Invariant chain Peptide) (Ghosh et al. 1995, Cresswell 1996)**.** Le complexe H2-DM catalyse alors l'échange de CLIP contre des peptides antigéniques dérivés de *T. gondii*, optimisant leur affinité pour le CMH-II. Les complexes CMH-II/peptide sont ensuite transportés vers la membrane plasmique, où ils sont présentés aux lymphocytes T $CD4^+$. Les antigènes présentés aux lymphocytes T $CD4^+$ via les molécules de CMH-II peuvent provenir aussi bien de l'environnement extracellulaire qu'intracellulaire de la cellule hôte. En général, les antigènes captés par endocytose sont les principaux à être présentés par le CMH-II, ce qui constitue le mécanisme principal d'acquisition des antigènes pour l'activation des LT $CD4^+$ (Neefjes et al. 2011). Cependant, des antigènes intracellulaires peuvent

également être présentés par le CMH-II. Il a notamment été montré que des peptides issus du cytosol peuvent être présentés aux LT CD4⁺ par des cellules B ou des macrophages (Dongre et al. 2001). De plus, des études *in vitro* ont révélé que des antigènes viraux ou des antigènes modèles, exprimés à l'intérieur de la cellule, peuvent être présentés à des lymphocytes T CD4⁺ sans passer par la phagocytose (Nuchtern et al. 1990, Malnati et al. 1992, Paludan et al. 2005, Nimmerjahn et al. 2003, Bonifaz et al. 1999, Aichinger et al. 1997).

Caractéristiques	CMH de classe I	CMH de classe II	Présentation croisée (cross-presentation)
Type d'antigènes présentés	Endogènes (intracellulaires)	Exogènes (captés dans l'environnement)	Exogènes, présentés sur le CMH-I
Origines des antigènes	Cytosol (protéines virales, intracellulaires)	Compartiments extracellulaires (bactéries, parasites, toxines)	Exogènes internalisés (phagocytose, pinocytose, apoptose)
Voie de dégradation	Protéasome (cytosolique)	Endo-lysosomal	Dépendante du protéasome ou du compartiment phagolysosomal
Molécules de présentation	CMH de classe I	CMH de classe II	CMH de classe I
Transport des protéines	TAP (vers RE)	Pas de transporteurs ; chargement dans l'endosome	Fusion RE et phagosome ou translocation cytosolique
Cellules concernées	Toutes les cellules nucléées	Cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA)	CPA (DCs)
Population T cible	T CD8+ (cytotoxiques)	T CD4+ (auxiliaires)	T CD8+ (cytotoxiques)
Fonction principales	Elimination des cellules infectées	Coordination de la réponse immunitaire	Activation des T CD8+ contre des antigènes exogènes
Exemple chez *T. gondii*	Présentation d'antigènes ancrés à membrane de la vacuole parasitaire aux T CD8+	Reconnaissance d'antigènes sécrétés ou phagocytés par les T CD4+	DC infectées ou ayant capté des débris parasitaires

2.2.1.3 Les antigènes immunodominants de *T. gondii*

Six antigènes majeurs de *T. gondii* ont été identifiés chez la souris, dont cinq sont reconnus par des molécules du CMH de classe I. L'épitope HF10 (HPGSVNEFDF), provient de la protéine TgGRA6(II), une protéine associée à la membrane de la vacuole parasitophore (MVP), et est présenté via la molécule H-2L^{d} (Blanchard et al. 2008). Son immunodominance marquée s'expliquerait par sa localisation en C-terminal, qui facilite son accès au cytosol de la cellule hôte, ainsi que par l'abondance de TgGRA6

libérée lors de l'infection (Feliu et al. 2013). Deux autres épitopes, IF9 (IPAAAGRFF) issu de TgROP7 et SM9 (SPMNGGYYM) dérivé de TgGRA4, sont eux aussi restreints par H-2L^{d} (Frickel et al. 2008). L'épitope SVL8 (SVLAFRRL), quant à lui, dérive de la protéine TgdO57, dont la fonction reste inconnue, et est présenté par H-2K^{b} (Wilson et al. 2010). Un autre peptide, YAL9 (YAVANYFFL), provient de TgROP5 et est reconnu par la molécule H-2K^{b} Des recherches ont montré que ce peptide, lorsqu'il est placé en position C-terminale de TgGRA6, permet une protection efficace contre l'infection, soulignant l'importance de la localisation de l'épitope dans la protéine pour assurer une bonne présentation (Grover et al. 2014). Enfin, un antigène présenté par le CMH de classe II, l'épitope AS15 (AVEIHRPVPGTAPPS) issu de la protéine TgCD4Ag28m, est présenté par H-2IA^{b}. L'immunisation avec ce peptide a permis de réduire significativement la charge parasitaire cérébrale et le nombre de kystes chez la souris, mettant en lumière le rôle des lymphocytes T CD4+ dans la lutte contre l'infection chronique dans le cerveau (Grover et al. 2012).

2.2.1.4 Rôle des lymphocytes T CD4+

Lors de l'infection par *T. gondii*, les LT CD4+ activés jouent un rôle central dans la mise en place et le maintien de l'immunité adaptative. La mise en place de cette réponse repose sur l'activation des cellules T naïves par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques, via des signaux antigéniques (MHC II), co-stimulateurs (CD28, ICOS) et cytokiniques (notamment IL-12) (Wilson et al. 2005) (Figure 9). Après infection, plusieurs populations de DC, telles que les cDC1 et les DC plasmacytoïdes (pDC), se développent et présentent des peptides parasitaires via le complexe CMH-II, assurant ainsi l'activation des LT CD4+ (Reis e Sousa, 2006). Les principaux sous-types de LT CD4+ sont les lymphocytes T régulateurs (Treg), les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1), 2 (Th2) et 17 (Th17). La différenciation des LT CD4+ naïfs en sous-populations effectrices dépend du contexte inflammatoire, notamment de la présence d'IL-12, qui les oriente vers un profil Th1. Cette polarisation est essentielle dans l'infection à *T. gondii*, car les lymphocytes Th1 produisent de grandes quantités d'IFNγ. De plus, les LT CD4+ assurent une aide aux LT CD8^{+} et aux LB, renforçant la mémoire immunitaire et la production d'anticorps neutralisants. Une fois activés, ces lymphocytes sécrètent des cytokines clés telles que l'IFNγ et l'IL-2, indispensables à la défense contre ce pathogène intracellulaire. L'IL-2 est essentielle à la résistance lors de la phase aiguë. Des études ont montré que des souris déficientes en IL-2 (IL-2^{-}/$^{-}$) succombent rapidement à l'infection malgré une production normale d'IL-12, en raison d'une forte parasitémie et d'une diminution importante de la sécrétion d'IFNγ. Ce déficit ne peut être compensé par l'ajout d'IL-2 ou d'IL-12, soulignant l'importance de l'IL-2 dans l'induction d'une réponse IFN-γ spécifique (Villegas et al. 2002). Les cytokines IFNγ et IL-2 produites par les LT CD4+ contribuent également à l'activation optimale des LT CD8+, en particulier les LT CD8+

cytotoxiques. Bien que les LT CD8+ producteurs d'IFNγ soient considérés comme les principaux effecteurs de la protection contre *T. gondii*, plusieurs études ont démontré que leur efficacité maximale dépend de la coopération avec les LT CD4+ (Gazzinelli et al. 1991 ; Denkers et al. 1997). Les LT CD4+ jouent également un rôle clé dans le maintien à long terme de l'immunité cellulaire. Des souris $CD4^{-/-}$ infectées génèrent initialement des LT CD8+ cytotoxiques et produisent de l'IFNγ de manière similaire à des souris sauvages. Cependant, lors de la mise en place de l'infection chronique ces souris présentent une perte de la population des LT CD8+ et une baisse de leur capacité à produire de l'IFNγ (Casciotti et al. 2002). Par ailleurs, leur expression du ligand CD40L permet l'activation de macrophages et autres cellules innées via l'interaction avec CD40, favorisant ainsi l'élimination des cellules infectées (Reinhardt et al. 2009). Au niveau du système nerveux central, la déplétion des LT CD4+ n'altère pas la cinétique de recrutement des LT CD8+ spécifiques de *T. gondii*, mais réduit leur fonction : les T CD8+ cérébraux présentent une diminution de la production d'IFNγ et une baisse de leur activité cytotoxique. . Durant la phase chronique, les LT $CD4^{+}$ restent essentiels pour prévenir la réactivation des kystes de bradyzoïtes, en maintenant une production soutenue de cytokines protectrices (Lütjen et al. 2006). En résumé, les lymphocytes T CD4+ sont indispensables au développement et au maintien d'une immunité cellulaire efficace contre *T. gondii*, à travers leurs fonctions de production de cytokines, d'aide aux autres effecteurs immunitaires et de régulation de la réponse protectrice à long terme.

2.2.1.5 Rôle des LT CD8+

La réponse immunitaire contre de nombreux pathogènes intracellulaires, qu'il s'agisse de virus, de bactéries ou de protozoaires, repose sur une réponse robuste des LT CD8+ (Bhadra et al. 2011). Les LT CD8+ naïfs se trouvent au niveau des organes lymphoïdes secondaires, où ils rencontrent, après une infection, une CPA (Bhadra et al. 2011), présentant des antigènes dérivés du pathogène via les molécules du CMH-I (Figure 9). Les CPA vont également participer à l'activation des LT CD8+ via la sécrétion d'IL-12 lors de la réponse immunitaire innée (M. F. Mescher et al. 2006, Sharpe 2009, Gazzinelli et al. 1993). L'IL-12 produite lors d'une infection à *T. gondii* peut inciter les lymphocytes T CD8+ à produire de l'IFNγ, à se différencier, à proliférer et à se développer (Gazzinelli et al. 1993, Gazzinelli et al. 1994, Trinchieri G et al., 2003). Une autre voie de signalisation est importante dans l'activation des LT CD8+, celle des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86. Cette activation repose principalement sur l'interaction entre deux grandes familles de protéines : les membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig), tels que B7 (CD80/CD86) et CD28, et ceux de la superfamille des récepteurs du TNF (tumor necrosis factor) (Sharpe 2009) (Suzuki et al. 2023). Des études réalisées chez la souris ont révélé que CD28, récepteur principal de CD80 et CD86, n'était pas

indispensable à l'acquisition d'une immunité protectrice primaire contre le parasite, cependant la production d'IFNγ par les lymphocytes T est diminuée lors de sa délétion (Reichmann et al. 1999). Par ailleurs, une observation intéressante a été faite lors d'une réinfection avec la souche virulente de type I (RH) : les souris déficientes pour CD28 succombaient rapidement à l'infection, contrairement aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent que l'absence de CD28 impacte le développement et/ou la fonctionnalité de la mémoire T, compromettant ainsi la protection à long terme (Zammit et al. 2005).

Une fois activés, les T CD8+ exercent leur fonction cytotoxique en produisant de manière importante de l'IFNγ, mais également d'autres cytokines aux capacités cytotoxiques, tel que le TNF (Mehta et al. 2018). Le rôle du TNF (tumor necrosis factor) dans le contrôle de l'infection par *Toxoplasma gondii* a été mis en évidence dès les premières études étudiant la réponse immunitaire contre le parasite (Sibley et al. 1991). Une autre étude a montré que, chez des souris C57BL/6 infectées par voie orale, la délétion du TNF entraînait la mort des animaux, soulignant son rôle protecteur crucial (Johnson et al. 1992). Par ailleurs, dans un modèle murin de toxoplasmose encéphalique, il a été observé que l'inactivation du TNF chez des souris chroniquement infectées provoquait une réactivation rapide du parasite (Gazzinelli et al. 1993). Ces résultats suggèrent que le TNF joue un rôle tout aussi essentiel que l'IFNγ dans le contrôle de l'infection par *T. gondii*. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) éliminent leurs cellules cibles principalement en libérant, au niveau de la synapse immunologique, le contenu de granules cytotoxiques spécialisés. Ces granules, similaires à des lysosomes sécrétoires, contiennent notamment de la perforine**,** une protéine capable de former des pores dans la membrane de la cellule cible, et des granzymes, des sérine-protéases. Une fois les pores formés, les granzymes, en particulier le granzyme B, pénètrent dans la cellule cible et déclenchent des voies de signalisation apoptotiques**,** entraînant sa mort programmée (Chowdhury et al. 2008). Le rôle central des cellules T CD8+ dans la protection contre l'infection à *T. gondii* a également été confirmé par d'autres travaux. Par exemple, il a été démontré que des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8+, générés après immunisation avec une souche vaccinale du parasite, permettait une protection efficace contre une infection par une souche virulente (Gazzinelli et al. 1991). De même, une étude a mis en évidence l'implication directe des LT CD8+ dans la régulation du nombre de kystes lors de l'infection chronique (Brown et al., 1990). De nombreux autres travaux ont confirmé le rôle dominant et indispensable des lymphocytes T CD8+ dans l'établissement d'une immunité à long terme contre *T. gondii*, nécessaire au maintien de l'infection à un état latent (Gazzinelli et al., 1992, Khan et al. 1994, Khan et al. 1996). Leur rôle protecteur, en phase tardive de l'infection aiguë, repose en grande partie sur leur capacité à produire de l'IFNγ (Gazzinelli et al. 1992). En revanche, lors de la phase chronique de la toxoplasmose, la cytotoxicité dépendante de la perforine desLT CD8+ joue un rôle prépondérant dans le maintien du parasite sous forme kystique et dans la prévention de la réactivation (Suzuki et al.

2010). Ainsi, les lymphocytes T CD8$^+$ constituent un pilier de l'immunité cellulaire anti-*Toxoplasma*, par leurs fonctions cytotoxiques et sécrétrices, indispensables au contrôle de l'infection aiguë et à la prévention de la réactivation chronique.

Caractéristiques	Lymphocytes T CD8+	Lymphocytes T CD4+
Type de peptides reconnus	Peptides endogènes présentés par CMH-I	Peptides exogènes présentés par CMH-II
Cellules présentatrices	Toutes les cellules nucléées + CPA pour présentation croisée	Uniquement CPA professionnelles (DCs, macrophages)
Activation dépendante de…	Présentation d'un parasite vivant et actif dans la cellule, sécrétion dans la VP	Présence d'antigènes accessibles aux compartiments endosomaux
Cytokines sécrétées	TNF-α, IFNγ	IFNγ, IL-2
Fonctions effectrices principales	Cytotoxicité directe (via perforines, granzymes)	Aide à l'activation et au maintien des T CD8+, activation des macrophages
Phase de l'infection	Aiguë et chronique	Aiguë, chronique et mémoire
Rôle dans l'immunité adaptative	Destruction des cellules infectées, contrôle de la parasitémie	Activation des T CD8+, orientation Th1, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires
Rôle dans la mémoire immunitaire	Effet mémoire, mais dépend du soutien des T CD4+ pour être maintenu à long terme	Induction et maintien des réponses mémoires T CD8+
Conséquences de leur absence	Réduction de la clairance parasitaire, infection persistante	Réduction de l'activation T CD8+, baisse IFNγ, défaut d'immunité mémoire
Spécificité cérébrale	Présents dans le cerveau, mais moins fonctionnels sans l'aide des T CD4+	Induisent une activation optimale des T CD8+ cérébraux
Particularité de l'antigénicité	Réponse dépend de la sécrétion de protéines parasitaires dans la vacuole parasitophore	Réponse dépend du recyclage

2.2.1.6 Synapse immunologique

L'activation des lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires dépend d'un contact direct avec les CPA, formant une structure spécialisée appelée synapse immunologique (Figure 10). Cette interaction débute par une adhérence non spécifique entre les deux cellules, médiée notamment par des molécules comme LFA-1 (présente sur les lymphocytes T) qui se lie à ICAM-1 (CD54) exprimée sur les CPAs (Dustin, 2014). L'activation complète des lymphocytes T repose ensuite sur trois signaux distincts. Le premier est l'engagement du récepteur T (TCR) avec le complexe peptide-CMH, accompagné par la fixation des corécepteurs CD4 ou CD8 selon le type de CMH présenté (II ou I, respectivement). Le second signal implique des interactions co-stimulatrices entre, par exemple, CD28 ou CD40L sur les lymphocytes T, et CD80, CD86 ou CD40 à la surface des CPAs, renforçant l'activation et empêchant l'état de tolérance en favorisant la production d'IL-2 (Figure 10). Enfin, le troisième signal oriente la différenciation des lymphocytes T en fonction du contexte cytokinique : la présence d'IL-12 favorise par exemple une polarisation vers un profil Th1. Ainsi, l'efficacité de l'activation des lymphocytes T repose sur la présentation de l'antigène, la signalisation co-stimulatrice et les cytokines

présentes, des éléments également essentiels à la formation d'une mémoire immunitaire durable (Figure 10) (Laethem et al. 2014).

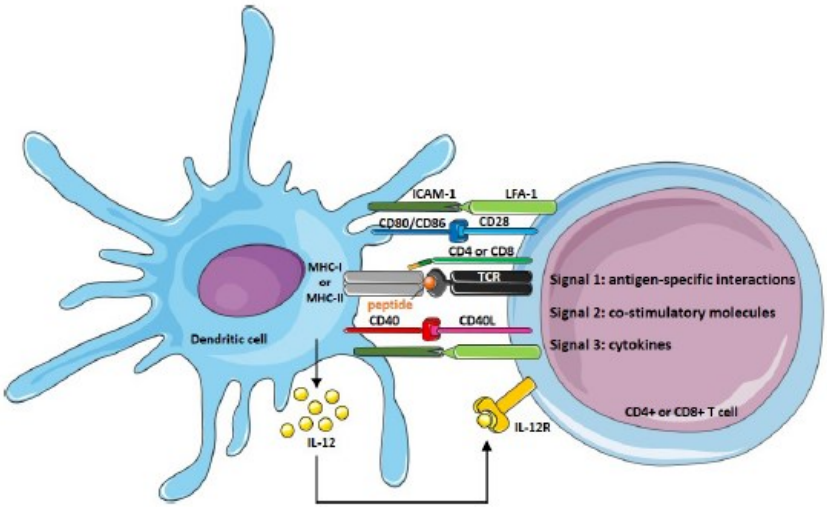


Figure 10 - Schéma de la mise en place d'une synapse immunologique entre une DC et un LT. Pour activer un LT, il est nécessaire que la CPA (comme la DC) expose l'antigène à sa surface et qu'une interaction s'effectue entre les deux cellules. Pour cela, différents signaux sont requis. Le TCR reconnaît 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. (Schéma issu de la thèse d'Anais Poncet)

2.2.2 Réponse immunitaire à médiation humorale : les lymphocytes B (LB) et la production d'anticorps

Bien que la réponse cellulaire soit prépondérante dans l'immunité contre *T. gondii*, les cellules B et les anticorps produits par les plasmocytes contribuent significativement à la limitation de la dissémination parasitaire, en particulier dans les phases précoces de l'infection. La réponse humorale repose sur la production d'immunoglobulines spécifiques (IgA, IgM, IgE, IgG) tout au long de la vie. La présence d'anticorps sériques permet le dépistage de l'infection. De plus, ils ont une importance fonctionnelle : par exemple, des souris déficientes en LB survivent à la phase aiguë mais succombent après 3–4 semaines, en raison d'une prolifération incontrôlée des tachyzoïtes et d'une augmentation du nombre de kystes cérébraux, malgré une réponse IFNγ intacte (Kang et al. 2000). En effet, les anticorps anti-ESA (antigènes excréto-sécrétoires) favorisent l'agglutination et la lyse des tachyzoïtes extracellulaires via le complément et l'ADCC (Costa-Silva et al. 2008). Les IgM spécifiques peuvent inhiber l'invasion cellulaire et limiter la dissémination parasitaire (Couper et al., 2005). Les LT CD4+ sont indispensables à l'activation des LB et à la production d'anticorps. Leur absence entraîne une

diminution des Ig et une mortalité accrue**,** évitable par transfert d'anticorps spécifiques (Johnson et al. 2002). Les LB participent également à l'activation des T CD4+ producteurs d'IFNγ *in vivo* (Menard et al. 2007).

3. Cellules dendritiques : sous-types et fonctions dans la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii*

3.1 Généralités et sous-types

En tant que cellules sentinelles de l'organisme, les DC sont disséminées dans l'organisme, avec une forte présence dans les organes lymphoïdes secondaires et aux interfaces avec l'environnement, telles que la peau et l'intestin. Les DC sont des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes et jouent un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires ainsi que dans l'induction de la tolérance.

Sous-types	Marqueurs de surface	Facteurs de transcription clés	Fonctions principales
cDC1 **(DC conventionnelles de type 1)**	XCR1$^+$ CD8α$^+$ CD103$^+$ Clec9A$^+$	BATF3 IRF8 ID2 Zbtb46	Présentation croisée aux LT CD8+ Réponse antivirale Induction de la tolérance Production d'IL-12
cDC2 **(DC conventionnelles de type 2)**	CD11b$^+$ CD172a$^+$	IRF4 Notch2 KLF4 ZEB2	Présentation aux LT CD4+ Réponse Th2 / Th17 Immunité antifongique et antiparasitaire
pDCs **(DC plasmacytoïdes)**	B220$^+$ Siglec-H$^+$ PDCA-1$^+$ Ly6C$^+$ BST2$^+$	E2-2 (TCF4) IRF7	Production d'IFN-α Rôle antiviral précoce Tolérance et régulation
moDCs **(DCs dérivées de monocytes)**	CD11b$^+$ CD64$^+$ Ly6C$^+$ CD115$^+$ F4/80$^+$	IRF4 PU.1 STAT1	Présentation d'antigène en conditions inflammatoires (CMH-II) Production de TNF-α, IL-6, iNOS Immunité en contexte infectieux/inflammatoire

3.2 Les cellules dendritiques conventionnelles de type I : cDC1

3.2.1 Maturation des cDC1

L'une des caractéristiques essentielles des DC est leur capacité à mûrir fonctionnellement**.** Ce processus complexe de maturation est associé à l'acquisition progressive de propriétés essentielles telles que la capacité d'internalisation, la présentation des antigènes, la migration vers les organes lymphoïdes secondaires, ainsi que l'activation des lymphocytes T (Mellman et al. 2001). La maturation

des cDC1 est un processus hétérogène, capable de fournir aux cDC1 des fonctions immunitaires distinctes. Le type de maturation adopté dépend du contexte dans lequel l'antigène est perçu au moment de son internalisation par la cellule dendritique : s'il est interprété comme un danger ou un pathogène, ou au contraire comme un élément du soi. Cette perception initiale influence profondément la manière dont les DC orienteront la réponse du système immunitaire adaptatif. Les cDC1 peuvent se différencier selon deux voies distinctes de maturation : l'une immunogénique, l'autre homéostatique (également appelée tolérogénique) (Ardouin et al. 2016, Dalod et al. 2014).

Maturation homéostatique des cDC1

Contrairement à la maturation immunogénique, qui est déclenchée par des signaux de danger tels que les infections, la maturation tolérogénique des cDC1 survient en conditions homéostatiques. Ce processus permet d'induire ou de maintenir la tolérance périphérique, notamment envers les auto-antigènes, et joue un rôle crucial dans la suppression des réponses auto-immunes. Le rôle essentiel des cellules dendritiques conventionnelles (cDC) dans le maintien de la tolérance au soi a été confirmé par plusieurs études. La suppression de toutes les cDC entraîne une auto-immunité systémique chez différents modèles murins (Birnberg et al. 2008, Yogev et al. 2012, Darrasse-Jeze et al. 2009, Ohnmacht et al. 2009). La tolérance induite par les cDC dépend d'un dialogue moléculaire spécifique avec les lymphocytes T, menant à leur différenciation en cellules T régulatrices (Treg). Cela a été démontré dans différents modèles expérimentaux, notamment dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaques (Iberg et al. 2020, Bourque et al. 2023, Iberg et al. 2017). Cette capacité des cDC à promouvoir la tolérance pourrait résulter d'un processus appelé « maturation homéostatique », un développement qui débute depuis les précurseurs de la moelle osseuse, observé à la fois *in vivo* et *in vitro* chez la souris (Baratin et al. 2015, Ardouin et al. 2016). L'équipe de Sophie Janssens vient récemment de conduire une étude sur la maturation tolérogénique des cDC1 induite par l'injection de cellules apoptotiques (AC), afin de mieux caractériser ce processus, en particulier les similitudes ou différences avec la maturation immunogénique (Bosteels et al 2023). Grâce à une approche de CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing), ils ont pu identifier plusieurs étapes dans ce processus, caractérisées par des stades distincts de maturation (Figure 11) : 1) les pré-cDC1 (Ccr2+, Fcer1g+, Cd24a+), 2) les « proliferating cDC1 » exprimant des marqueurs du cycle cellulaire tels que Mki67, 3) les cDC1 immatures précoces (« early immature ») caractérisées par l'expression de CD62L et de gènes liés au stress du réticulum endoplasmique (Hspa5, Pdia3), 4) les cDC1 immatures tardives (« late immature ») exprimant CD103, CD207 et ESAM, 5) les cDC1 matures précoces (« early mature ») avec une faible expression de CCR7,

une induction des gènes de la voie de l'IFN de type I (Cxcl9, Cxcl10) et une diminution de XCR1, et finalement 6) les cDC1 matures tardives (« late mature ») présentant une expression élevée de CCR7, CD63 (LAMP3), Fscn1 et Il4i1 et des marqueurs de co-activation CD80 et CD86.

L'injection chez la souris d'ACs marquées au CTV a permis d'observer que seules les cDC1, et non les cDC2, capturent ces ACs, et que leur maturation (passage de CCR7− à CCR7+) est induite et dépend de l'ingestion des ACs. Chez les souris déficientes pour l'endocytose (Rac1ΔDC/Rac2−/−), ils ont observé un défaut de cette maturation, corrélant ainsi l'internalistion des ACs et le processus de maturation tolérogénique. Ce processus est également caractérisé par une accumulation transitoire de cholestérol intracellulaire suivie de l'activation de la voie LXR (Liver X Receptor). Les gènes associés à cette voie incluent ceux de l'efflux du cholestérol (Abcg1, Apoe, Apol7c, Apol10b), tandis que la biosynthèse du cholestérol est réprimée (Fdps, Sqle, Ldlr). Le gène Apoe apparaît particulièrement dépendant de LXRβ (Nr1h2), principal facteur de transcription actif dans les cDC1. Par ailleurs, l'absorption de nanoparticules lipidiques sans adjuvant (eLNPs) reproduit l'effet des ACs en induisant un programme tolérogénique caractérisé par une maturation des cDC1 en cellules CCR7+, mais présentant une expression modérée de CD86 et CD40, ce processus étant indépendant de la stimulation par les récepteurs Toll-like (confirmé chez des souris TRIF−/−MyD88−/−). De manière intéressante, l'ingestion de LNPs couplés à du poly(I:C), un ligand du TLR3, inhibe la voie LXR et favorise une maturation immunogénique. Enfin, chez des souris déficientes en LXRα/β spécifiquement dans les cellules dendritiques, les cDC1 présentent un phénotype activé (augmentation de CD40, CD86, CCR7), une réduction de l'expression des gènes tolérogéniques (Scube3, Slco5a1) et une réponse accrue des LT CD8 spécifiques à un antigène associé aux ACs, illustrant une perte de tolérance périphérique. Ces résultats démontrent que la signalisation via LXR est indispensable à la maturation tolérogénique des cDC1 et au maintien de la tolérance immunitaire.

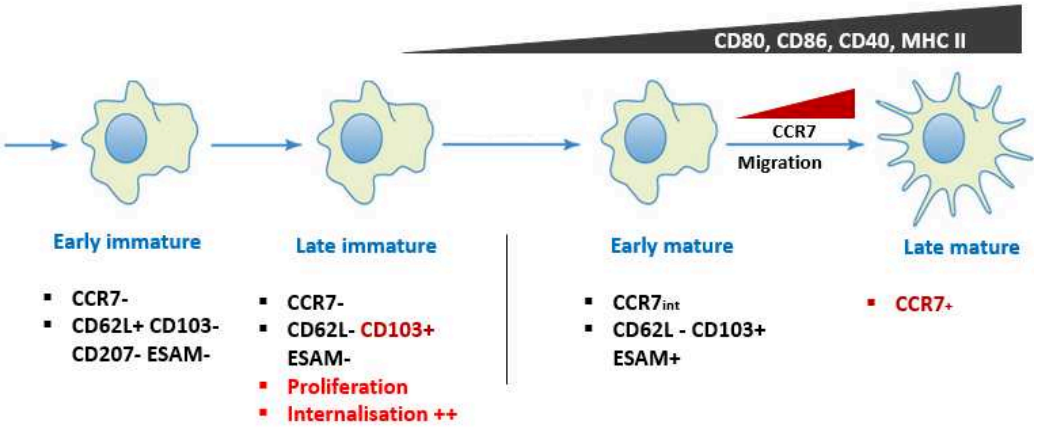


Figure 11 – **Les différents stades de maturation tolérogénique des cDC1 spléniques.** Les différents stades de maturation et marqueurs associés ont été identifiés par CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes) permettant de combiner l'étude du protéome de surface cellulaire au transcriptome, obtenu par scRNA Sequencing, dans des souris WT après internalisation de cellules apoptotiques (cf Intro ; partie 3 DC) (Bosteels et al. 2023).

Maturation immunogénique des cDC1

En conditions homéostatiques, les cellules dendritiques conventionnelles des tissus non lymphoïdes (NLT-cDC) et des tissus lymphoïdes (LT-cDC) présentent un phénotype dit immature, caractérisé par une faible expression à leur surface des molécules du CMH-II ainsi que des molécules co-stimulatrices telles que CD80, CD86 et CD40. En réponse à une stimulation induite par une infection, comme par exemple après reconnaissance d'un pathogène via les TLRs, les cDC1 initient un programme de maturation immunogénique passant par différents stades (Probst et al., 2003 ; Spörri et al. 2005 ; Gatto et al., 2013). La notion de maturation des DC, introduite par Steinman (Steinman 1991), fait référence au développement de leur capacité à activer les lymphocytes T et à déclencher des réponses adaptatives. Ce processus s'accompagne de modifications phénotypiques, telles qu'une hausse de l'expression des molécules du CMH, des co-stimulateurs CD80, CD86 et CD40, ainsi que du récepteur CCR7, qui permet la migration des cellules depuis les tissus périphériques vers les organes lymphoïdes. Bien que cette maturation soit généralement induite par l'activation des PRRs, elle peut aussi se produire dans des contextes non infectieux, orientant alors les cellules vers des fonctions de tolérance plutôt que de stimulation immunitaire (Reis e Sousa et al. 2006). L'activation des cDC a principalement été étudiée dans le contexte de leur capacité à amorcer des réponses T, ce qui est essentiel pour la vaccination et l'immunothérapie anticancéreuse. Bien que des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et les interférons de type I induisent une maturation phénotypique des cDC, ces cellules ne produisent pas spontanément des cytokines clés comme l'IL-12 nécessaires à la différenciation des LT naïfs en cellules effectrices, une production qui requiert l'activation des PRRs

(Schaupp et al. 2020, Jonuleit et al. 1997, Schulz et al. 2000). Certaines réponses immunitaires, comme les réponses cytotoxiques ou Th2 induites par des infections virales ou des allergènes, peuvent se déclencher indépendamment de la reconnaissance directe des PAMPs par les cDC (Hammad et al. 2010, Pang et al. 2013). Par exemple, lors d'une infection par le virus de la grippe A, le signal via IL-1R suffit à activer les cDC pour initier la réponse CTL (Pang et al. 2013). Par ailleurs, les médiateurs inflammatoires, notamment les interférons de type I, amplifient fortement l'activation des cDC déclenchée par les PRRs (Le Bon et al. 2001, Longhi et al. 2009). L'interaction avec les LT, via la liaison CD40–CD40L, renforce également cette activation et augmente la production de cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-10 (Schulz et al. 2000, Edwards et al. 2002). Enfin, bien que certains signaux de danger (DAMPs) puissent agir en synergie avec les PAMPs pour activer les cDC, leur capacité intrinsèque à induire une activation complète en l'absence de pathogènes reste à démontrer, et certaines formes d'activation des cDC, notamment celles favorisant les réponses B, pourraient suivre des voies encore mal comprises (Land et al. 2005, Caminschi et al. 2008, Zelenay et al. 2012, Canton et al. 2021, Zelenay et al. 2013).

L'équipe de Sophie Janssens, a également comparé dans son étude la maturation tolérogénique à la maturation immunogénique. Pour mimer un contexte inflammatoire, les auteurs ont mis en place deux modèles expérimentaux : l'injection intrapéritonéale de poly(I:C) ou l'administration de nanoparticules lipidiques couplées au poly(I:C) (pIC-LNP), enrichies en cholestérol. Ces particules ciblent préférentiellement les cDC1 et reproduisent un environnement mimant une alerte virale dans un contexte riche en lipides. Au cours de cette maturation, les cDC1 évoluent d'un stade immature vers un stade mature en plusieurs étapes, dont les premières étapes sont similaires à la maturation tolérogénique. Lors de la phase précoce, l'engagement du TLR3 active rapidement la voie NF-κB et déclenche un pic de production d'interférons de type I. Sur le plan phénotypique, cette phase est marquée par une diminution de l'expression du marqueur XCR1, tandis que le marqueur CCR7 commence à être exprimé à bas niveau. À un stade plus avancé, les cDC1 matures présentent une forte expression du marqueur CCR7 et du marqueur lysosomal CD63, corrélée à une diminution de l'expression du marqueur XCR1, traduisant leur préparation à migrer vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules montrent également une forte expression des molécules CMH-II, CD70, CD40, CD86 et surtout CD80, ce dernier étant exprimé à un niveau bien supérieur à celui observé lors de la maturation tolérogénique. Sur le plan transcriptionnel, cette maturation est caractérisée par l'expression importante des IFN-I, avec l'expression accrue de gènes tels que *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ifit*, *Isg15* et *Oas*, absents ou faiblement exprimés dans les cDC2. En parallèle, les gènes associés à la tolérance, tels que *Scube3*, *Slco5a1*, *Icosl* ou *Tmem176a*, restent faiblement exprimés après internalisation des pIC-LNP, contrairement à ce qui est observé suite à l'ingestion d'AC ou de LNP sans adjuvant. Cette

maturation immunogénique est également associée à un remodelage métabolique profond. L'inflammation bloque l'activation du récepteur nucléaire LXRβ, qui normalement contrôle l'efflux du cholestérol. Par conséquent, les transporteurs tels que *Abca1*, *Abcg1* et *Apoe* sont peu ou pas induits, ce qui entraîne une accumulation persistante de cholestérol libre et d'esters de cholestérol dans les cDC1, comme le montre la coloration BODIPY. Simultanément, les enzymes de la biosynthèse du cholestérol, telles que *Fdps*, *Sqle* et *Ldlr*, sont activées via la voie SREBP2, permettant de soutenir la demande lipidique élevée requise pour la présentation croisée et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Bosteels et al 2023).

Caractéristique	Maturation tolérogénique/homéstatique	Maturation immunogénique
Signal déclencheur	Engulfement continu de cellules apoptotiques (AC) ou de LNPs sans adjuvant riches en cholestérol	Reconnaissance d'un motif de danger : poly(I:C) (TLR3) seul ou couplé à des LNPs (pIC-LNP)
Marqueurs clés des stades de maturation	Progression CD62L$^+$ → CD103$^+$/ESAM$^+$ → CCR7^{dally} puis CCR7^{hi}; XCR1 diminue progressivement	CCR7 augmente rapidement, XCR1 chute ; passage à une population CCR7^{hi} /CD63$^+$ migratrice après activation TLR3
Profil co-stimulateurs	CD86↑, CD40↑ mais CD80 très bas (Tregs/CTLA-4 limitent)	CD80, CD86, CD40 tous élevés (notamment après pIC-LNP)
Signature génique dominante	Gènes « tolérants » : Scube3, Slco5a1, Tmem176a, Icosl ; suppression des gènes IFN-I	Fort module IFN-I : Cxcl9/10, Ifi47, Gbp2/5, Oas3, Irf7 ; répression des gènes tolérogéniques
Métabolisme du cholestérol	Accumulation transitoire puis efflux : activation LXRβ → Abcg1, Apoe, Apol7c/10b; Fdps/Sqle bas puis induction tardive via SREBP2	Voie LXR réprimée ; efflux faible, cholestérol reste élevé ; SREBP2 (Fdps, Sqle, Ldlr) maintenu actif
Phagocytose / endocytose	Maintenue jusqu'au stade CD103$^+$/ESAM$^+$ puis s'éteint ; dépend de Rac1/2 pour l'ingestion des ACs	Rapidement perdue ; la signalisation TLR3 suffit même quand l'endocytose est réduite (Rac1ΔDC/Rac2−/−)
Effet fonctionnel sur les lymphocytes T	Induction/entretien de Tregs ; présentation d'auto-antigènes sans activation CTL (tolérance périphérique)	Activation robuste des CTL CD8$^+$ (Ly6C$^+$, cytotoxicité anti-OVA) et réponse Th1

3.2.2 Modulation de l'activité des DC par *T. gondii*

T. gondii est un parasite intracellulaire particulièrement habile à manipuler les cellules de l'immunité innée, y compris les DC. Dès les premiers stades de l'infection, *T. gondii* est capable d'infecter à la fois les cDC et pDC. Cette interaction induit une activation partielle de ces cellules, caractérisée par une augmentation de l'expression de molécules de présentation antigénique (MHC II) et de costimulation (CD86), ainsi qu'une production marquée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, essentielle à la mise en place d'une réponse Th1 protectrice via l'induction d'IFN-γ par les

cellules NK et les lymphocytes T $CD4^+$. Toutefois, cette activation reste incomplète, suggérant une maturation altérée des DC. En effet, plusieurs travaux ont montré que *T. gondii* peut inhiber l'expression de certaines molécules de maturation et réduire la capacité des DC à activer efficacement les lymphocytes T naïfs, limitant ainsi le développement d'une réponse immunitaire pleinement fonctionnelle (Blanchard et al., 2008 ; Courret et al., 2006).

La modulation des DC par le parasite est similaire à celle décrite pour les macrophages et est en grande partie médiée par l'injection de protéines effectrices sécrétées par les organites apicaux du parasite, telles que Tg ROP16 et la protéine GRA15 (Figure 12). Ces effecteurs moduleraient les voies de signalisation intracellulaire de l'hôte (notamment STAT3/6 et NF-κB), de manière souche-dépendante, et influenceraient le profil fonctionnel des DC infectées (Saeij et al., 2007 ; Butcher et al., 2011). De plus, des mécanismes impliquant des effecteurs parasitaires ont été associés à la modulation de la présentation antigénique via le CMH-I. Notamment, l'effecteur TgROP18 sécrété lors de l'invasion, est un facteur clé de la virulence de *T. gondii*, comme en témoigne la perte de virulence observée chez des souches délétées pour ce gène. Il a été démontré que TgROP18 favorise la dégradation du facteur de transcription ATF6β, connu pour son rôle dans l'activation de la réponse UPR (Yamamoto et al. 2011). De plus, les DC provenant de souris déficientes pour d'ATF6β présentent une capacité réduite à restimuler les LT CD8+ (mais pas les LT CD4+) issus de souris infectées, ce qui suggère une implication d'ATF6β dans la présentation par le CMH-I encore mal comprise. En parallèle, une production plus élevée d'IFNγ est observée chez les souris infectées par une souche déficiente pour l'effecteur TgROP18, aussi bien par les lymphocytes CD4+ que CD8+, ce qui laisse penser que TgROP18 pourrait agir sur d'autres éléments de la réponse Th1 (Yamamoto et al. 2011). Par ailleurs, la localisation des antigènes parasitaires dans la VP influence fortement leur présentation par le CMH-I. L'étude de Lopez et al. (2015) montre qu'en l'absence du réseau intravacuolaire (IVN), la protéine TgGRA6 s'accumule davantage à la MVP, entraînant une meilleure présentation de l'antigène HF10 par le CMH-I et une réponse renforcée des LT CD8+. Ces résultats suggèrent que certaines structures parasitaires peuvent limiter l'accès des antigènes au cytosol, réduisant ainsi leur présentation aux cellules immunitaires (Lopez et al. 2015).

Par ailleurs, *T. gondii* induit un comportement migratoire singulier chez les DC infectées, qualifié de phénotype « hypermigratoire » (Lambert et al., 2006, Hoeve et al. 2022, Ross et al. 2022, Courret et al. 2006), résultant de la réorganisation du cytosquelette et de l'activation de voies comme les PI3K et MAPK. Cette motilité accrue permettrait au parasite de se disséminer rapidement à travers l'organisme en utilisant les DC comme « cheval de Troie ». Notamment, des BMDC infectées disséminent plus efficacement *in vivo* que des tachyzoïtes libres (Lambert et al. 2006). Cette

hypermigration semble dépendre de l'infection active et de la sécrétion d'effecteurs parasitaires (cf. 1.2.3), car elle n'est pas induite par des parasites tués ou des lysats parasitaires (Lambert et al. 2006, 2009). Un effet de souche a également été observé, les DC infectées par une souche de type II montrant une migration accrue par rapport à celles infectées par une souche de type I (Kanatani et al. 2015, Hoeve et al. 2022, Ross et al. 2022). Plusieurs voies de signalisation semblent impliquées : la sécrétion de GABA, qui via les récepteurs GABA_A et le canal calcique Cav1.3, active la migration chimiotactique CCR7-dépendante (Fuks et al. 2012 ; Kanatani et al. 2017), mais aussi une voie TIMP-1/CD63/ITGB1/FAK qui stimule une migration de type amiboïde (Olafsson et al. 2018). Des modifications précoces du cytosquelette d'actine et des podosomes, ainsi qu'une redistribution des intégrines, précèdent ces réponses migratoires (Weidner et al. 2013), de manière indépendante de CCR7 et du système GABAergique (Kanatani et al. 2015). Certains effecteurs parasitaires ont été identifiés comme potentiels inducteurs de ces réponses, notamment TgGRA5, dont un peptide N-terminal active CCR7 et la migration via JNK (Persat et al. 2012), et Tg14-3-3, qui pourrait agir en interagissant avec les protéines de l'hôte au sein de la vacuole parasitophore (Weidner et al. 2016). L'ensemble de ces données suggère qu'une coopération entre plusieurs effecteurs parasitaires module les voies de signalisation et les programmes transcriptionnels impliqués la migration des DC après infection par T. gondii.

Enfin, au-delà de la manipulation de l'activation et de la migration, *T. gondii* interfère également avec les fonctions de tolérance des DC. En particulier, certains travaux suggèrent que le parasite pourrait empêcher l'induction de cellules T régulatrices (Treg) via une modulation ciblée des signaux de costimulation ou de cytokines, ce qui pourrait favoriser une inflammation chronique ou un état d'infection latente contrôlé mais non éliminé (Leroux et al. 2015, Mckee et al. 2004). Ainsi, l'interaction entre *T. gondii* et les cellules dendritiques illustre une stratégie parasitaire sophistiquée, équilibrant activation immunitaire suffisante pour éviter une réponse létale de l'hôte, et subversion des mécanismes de défense pour établir une infection persistante. Les interactions entre DC et *T. gondii* ont été détaillées dans le revue Poncet et al. 2019.

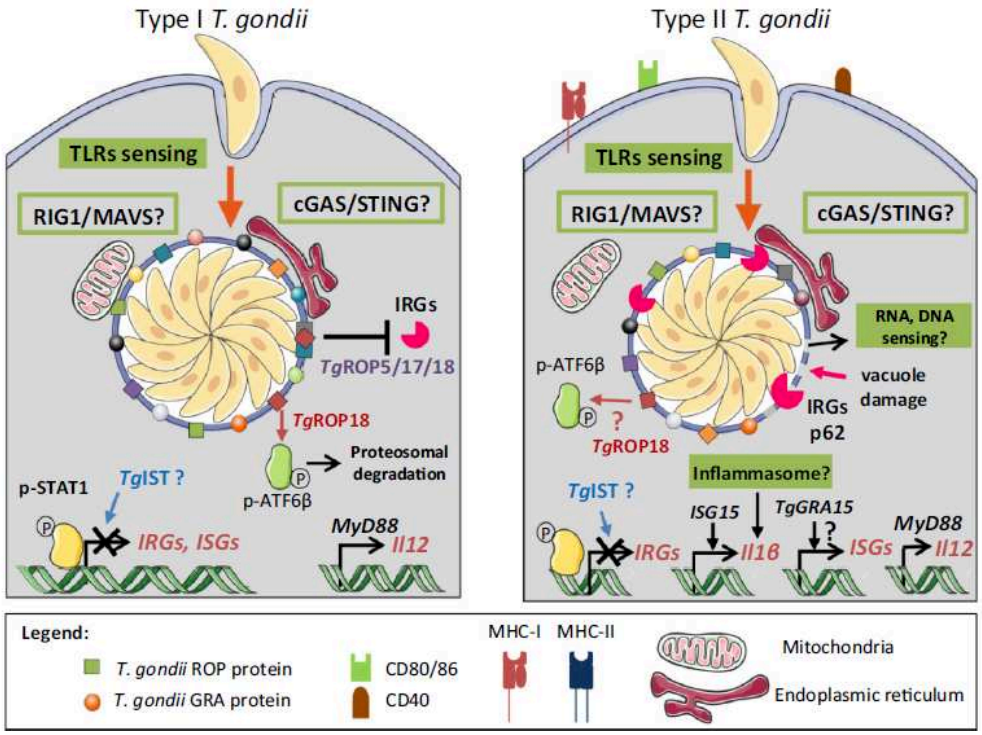


Figure 12 - La détection innée des parasites *Toxoplasma gondii* de type I par les cellules dendritiques (DC) dépend principalement des récepteurs TLRs activés via la voie MyD88. D'autres capteurs intracellulaires, comme RIG-1 et STING, pourraient également intervenir, en raison de leur proximité avec la vacuole parasitaire (PV). Cependant, même en présence d'IFN-γ qui active STAT1, la réponse immunitaire est freinée : les parasites de type I inhibent l'expression des gènes effecteurs comme les IRG via l'effecteur TgIST, bloquent les dommages à la vacuole et réduisent l'activation des lymphocytes T CD8+ en dégradant ATF6β. De plus, l'expression des molécules MHC-I/MHC-II et co-stimulatrices est diminuée. Les parasites de type II déclenchent aussi une réponse via MyD88, mais induisent en plus des mécanismes de détection différents, liés à des altérations de la vacuole. Après stimulation par IFN-γ, la vacuole est partiellement détruite, ce qui permet la libération d'antigènes dans le cytosol grâce aux protéines d'autophagie, IRG et GBP. Cela entraîne l'expression de gènes ISG via NF-κB et possiblement l'activation de capteurs cytosoliques par l'ADN/ARN parasitaire. L'ISG15 favorise également la production d'IL-1β. Malgré cela, TgIST continue d'atténuer la réponse immunitaire en inhibant les effets de STAT1 et en réduisant l'expression du MHC-II (Poncet al. 2019).

4. Unfolded Protein response (UPR)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un réseau intracellulaire de tubules, jouant un rôle central dans la biosynthèse, la production et le transport des macromolécules cellulaires telles que les protéines, les glucides et les lipides (Braakman et al. 2013 ; Rapoport, 2007 ; Reid et al. 2015 ; Westrate et al., 2015). Par ailleurs, le RE constitue le principal site d'apprêtement des antigènes pour la présentation antigénique par les molécules du CMH-I et CMH-II (Roy et al., 2006). Une de ses fonctions

clés est d'assurer le repliement des protéines sécrétées et membranaires, processus qui s'opère dans le RE de toutes les cellules eucaryotes (Schröder, 2006). Ce repliement est facilité par des chaperonnes résidentes du RE dont l'une des plus connues est GRP-78/BiP (Binding Immunoglobulin Protein) (Adams et al., 2019). Malgré cette capacité de repliement efficace, divers stress cellulaires, tels que les infections ou les altérations dans certains métabolismes comme le métabolisme lipidique peuvent compromettre l'homéostasie du RE. Ces perturbations conduisent à une accumulation de protéines mal repliées dans le RE, induisant ainsi un stress du RE (Zhang et al. 2008). En réponse, la cellule active un mécanisme adaptatif appelé réponse aux protéines mal repliées (UPR, Unfolded Protein Response), qui permet d'activer des capteurs du stress du RE dans le but de rétablir l'homéostasie et de réduire la charge protéique (Bravo et al., 2013 ; Liu et al. 2003) (Figure 13). Lors de l'activation de la réponse UPR, la cellule augmente la synthèse de chaperonnes résidentes du RE ainsi que d'enzymes catalysant le repliement des protéines, dans le but de renforcer la capacité de repliement du RE. Parallèlement, la charge protéique est réduite par une diminution globale de la traduction des ARNm et par l'élimination accrue des protéines mal repliées via le système de dégradation associé au RE (ERAD). L'UPR permet également d'étendre la taille du RE en augmentant la capacité d'extension des membranes à travers l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Lee et al. 2008, Volmer et al. 2015, Walter et al. 2011). Toutefois, lorsque le stress du RE persiste ou devient trop intense, cette réponse adaptative cède la place à l'activation de la branche pro-apoptotique de la signalisation UPR via le facteur de transcription CHOP, conduisant potentiellement à la mort cellulaire (Lin et al. 2008). La réponse UPR est régulée par trois capteurs transmembranaires majeurs situés dans le réticulum endoplasmique : Inositol-Requiring protein 1 (IRE1), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) et la Protein Kinase R (PRK)-like ER, dite PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase). En conditions de stress du RE, ces trois capteurs sont activés et jouent le rôle de gardiens moléculaires de la réponse UPR, orchestrant l'équilibre entre adaptation cellulaire et signalisation apoptotique (Tavernier et al. 2017).

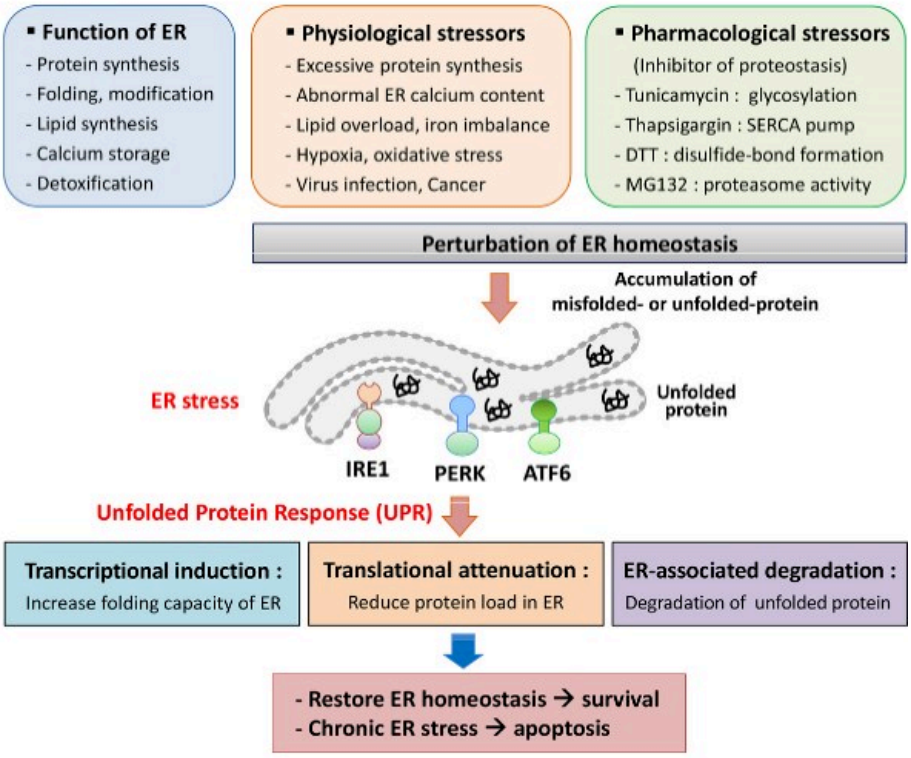


Figure 13 – (Jae-Seon So 2018) Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle fondamental dans la synthèse, le repliement et la maturation des protéines, ainsi que dans la biosynthèse des lipides, le stockage du calcium et la détoxification cellulaire. Lorsque l'homéostasie du RE est perturbée — en raison de conditions physiopathologiques ou de stress pharmacologiques — des protéines mal repliées s'accumulent, déclenchant une réponse de stress appelée Unfolded Protein Response (UPR)**.** Cette réponse adaptative repose sur trois senseurs transmembranaires : IRE1, PERK et ATF6. Chacun d'eux active des programmes transcriptionnels spécifiques visant à restaurer l'équilibre du RE, notamment par l'augmentation de la capacité de repliement des protéines, l'expansion du RE, la réduction de la traduction globale des protéines et l'activation du processus ERAD (ER-associated degradation), qui permet l'élimination des protéines défectueuses via le protéasome. Toutefois, en cas de stress prolongé ou excessif, la réponse UPR peut également déclencher l'apoptose.

4.1 Les trois voies de l'UPR

4.1.1 La voie IRE1/XBP1

La protéine IRE1 possède deux domaines fonctionnels dans sa portion cytoplasmique : une kinase sérine/thréonine et une endoribonucléase (RNase). Ces domaines sont fortement conservés entre les levures et les homologues mammifères IRE1α et IRE1β. Tandis que IRE1α est exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus, IRE1β est principalement restreinte aux cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Bertolotti et al. 2001). (Figure 14 – A). L'activation d'IRE1 est initiée par oligomérisation et autophosphorylation, ce qui active son activité endoribonucléase. Cette dernière catalyse un épissage non conventionnel de l'ARNm de *XBP1* chez les mammifères (équivalent de *HAC1*

chez la levure), retirant un intron de 26 nucléotides. Ce clivage entraîne un décalage du cadre de lecture, générant une forme épissée, XBP1s, dotée d'un nouveau domaine C-terminal (Figure 14 – A) (Calfon et al., 2002 ; Lee et al., 2003). XBP1s contient un domaine de type bZIP (basic leucine zipper) qui lui confère une fonction de facteur de transcription. Une fois activé, XBP1s stimule l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans la réponse UPR, tels que des chaperonnes (ERdj4, Grp58, p58^IPK^), des composants du système ERAD (EDEM, Herp, Hrd1), des isomérases comme PDI-P5, ainsi que la translocase du RE Sec61α. Ces gènes sont régulés via une séquence promotrice appelée UPRE (Unfolded Protein Response Element), qui contient un motif consensus spécifique (Yamamoto et al., 2004). L'ensemble de ces effecteurs participe à des fonctions variées, notamment la sécrétion protéique, le métabolisme lipidique, l'homéostasie glucidique, et la régulation de l'inflammation (Acosta-Alvear et al., 2007 ; Byrd et al. 2012).

4.1.2 La voie PERK/CHOP

La protéine PERK (PKR-like ER kinase) est un capteur transmembranaire du stress du réticulum endoplasmique (RE), doté d'un domaine luminal de détection du stress et d'un domaine kinase cytosolique de type sérine/thréonine. En conditions normales, PERK est maintenu inactif par son interaction avec la chaperonne Grp78. Lorsqu'un stress perturbe l'homéostasie du RE, Grp78 se dissocie, permettant l'oligomérisation de PERK et son autophosphorylation, événements indispensables à son activation fonctionnelle (Figure 14 – B) (Bertolotti et al., 2001). Une fois activée, PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2α sur la sérine 51, ce qui entraîne une inhibition globale de la synthèse protéique. Ce blocage temporaire permet de réduire l'afflux de nouvelles protéines dans le RE. Paradoxalement, cette inhibition favorise la traduction sélective de certains ARNm, en particulier celui du facteur de transcription ATF4. Ce phénomène s'explique par la présence de séquences régulatrices appelées uORF (upstream open reading frames) dans la région 5' non traduite de l'ARNm d'ATF4. En absence de stress, ces uORF empêchent la traduction d'ATF4. En revanche, la phosphorylation d'eIF2α permet de contourner ces éléments inhibiteurs, activant la traduction d'ATF4 (Lu et al., 2004). ATF4 contrôle l'expression de plusieurs gènes cibles de l'UPR, dont CHOP (C/EBP Homologous Protein) et GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 34). Ce dernier forme un complexe avec la protéine phosphatase 1 (PP1) pour déphosphoryler eIF2α, assurant ainsi un rétrocontrôle négatif qui restaure la synthèse protéique lorsque le stress est résolu (Harding et al. 2009 ; Novoa et al., 2003). En revanche, si le stress persiste, CHOP promeut l'apoptose, notamment en activant l'expression des gènes codant pour le récepteur de mort DR5 et la protéine pro-apoptotique Bim (Zinszner et al., 1998, Puthalakath et al., 2007). DR5 initie la voie extrinsèque de l'apoptose via l'activation de la caspase-8 par l'adaptateur FADD, tandis que Bim agit sur la voie

intrinsèque en induisant la perméabilisation mitochondriale via l'activation de Bax et Bak, entraînant la libération du cytochrome c (Urra et al., 2013).

4.1.3 La voie ATF6

ATF6 (Activating Transcription Factor 6) est une protéine transmembranaire de type II localisée dans le réticulum endoplasmique. Elle est composée d'un domaine de détection du stress orienté vers la lumière du RE, et d'un domaine bZIP situé dans le cytoplasme, lui conférant une fonction de facteur de transcription une fois activée (Adachi et al., 2008). En conditions basales, ATF6 est retenue dans le RE via son interaction avec la chaperonne Grp78, ce qui empêche son activation. Lorsqu'un stress perturbe l'homéostasie du RE, Grp78 se dissocie, ce qui permet à ATF6 d'être redirigée vers l'appareil de Golgi (Figure 14 – C). C'est là qu'elle subit un clivage protéolytique successif par deux protéases résidentes, S1P (site-1 protease) et S2P (site-2 protease) (Ye et al., 2000). Ce clivage libère la portion amino-terminale active, appelée ATF6-N, qui est transloquée dans le noyau. ATF6-N agit comme facteur de transcription en se liant à des éléments spécifiques appelés ERSE (ER Stress Response Elements), contenant une séquence consensus du type CCAAT-N9-CCACG. Par cette interaction, ATF6-N induit l'expression de plusieurs gènes cibles impliqués dans la gestion du stress du RE, notamment ceux codant pour des chaperonnes moléculaires, des composants du système ERAD, ainsi que pour XBP1, renforçant ainsi la synergie entre les différentes branches de la réponse UPR (Yamamoto et al., 2004 ; Yoshida et al., 2001).

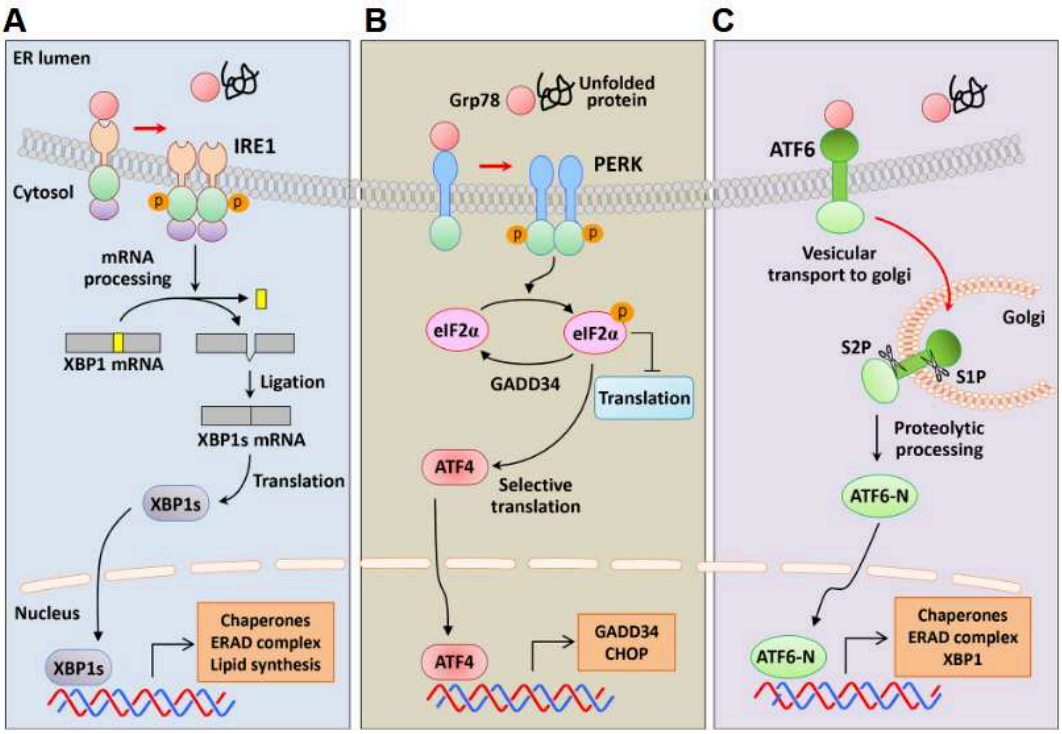


Figure 14 - La réponse UPR (Unfolded Protein Response) est initiée par trois capteurs transmembranaires résidant dans le RE : IRE1, PERK et ATF6. En conditions physiologiques, ces capteurs sont maintenus inactifs par leur association avec la chaperonne Grp78 (ou BiP). En situation de stress du RE, Grp78 se détache pour se lier aux protéines mal repliées, ce qui permet l'activation des capteurs UPR. IRE1 possède deux domaines fonctionnels du côté cytoplasmique : une kinase sérine/thréonine et une endoribonucléase (RNase)**.** En réponse au stress, IRE1 s'oligomérise, s'autophosphoryle, puis active son activité RNase. Celle-ci réalise un épissage non conventionnel de l'ARNm de XBP1, générant une forme épissée, XBP1s, qui agit comme facteur de transcription. XBP1s induit alors l'expression de gènes codant pour des chaperonnes du RE, des composants du système ERAD (dégradation des protéines mal repliées) et des enzymes de biosynthèse lipidique. PERK est également une kinase Ser/Thr qui s'active par oligomérisation et autophosphorylation. Une fois activée, elle phosphoryle eIF2α, un facteur d'initiation de la traduction, ce qui provoque une inhibition globale de la synthèse protéique. Toutefois, cette phosphorylation favorise la traduction sélective d'ATF4, un facteur de transcription qui induit CHOP (pro-apoptotique) et GADD34, ce dernier jouant un rôle de rétrocontrôle négatif en facilitant la déphosphorylation d'eIF2α pour restaurer la traduction une fois le stress résolu. Sous stress, ATF6 migre du RE vers l'appareil de Golgi, où il est clivé par les protéases S1P et S2P. Ce clivage libère son domaine N-terminal (ATF6-N), qui pénètre dans le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans la réponse UPR, notamment ceux codant pour des chaperonnes, des composants de l'ERAD, et XBP1.

4.2 UPR et immunité

Les agents pathogènes ont la capacité d'altérer les fonctions du RE de la cellule hôte au cours de leur cycle infectieux, ce qui peut conduire à l'activation de la réponse UPR. Cette activation peut jouer un double rôle : elle peut favoriser une réponse immunitaire de l'hôte visant à éliminer l'infection, mais elle peut aussi être détournée par le pathogène pour exploiter les mécanismes cellulaires, facilitant ainsi sa survie, sa réplication et sa propagation (Celli et al. 2014 ; Galluzzi et al. 2017 ; Smith 2018). La réponse UPR a été étudiée dans le cadre des infections bactériennes et virales, mais son implication dans les infections parasitaires reste encore peu explorée. L'infection par *Plasmodium berghei* a révélé que les trois branches de la réponse UPR sont activées dans les hépatocytes *in vitro*. Chez la souris, l'absence de XBP1 entraîne une réduction de la charge parasitaire hépatique, suggérant que cette voie favorise le développement du parasite dans le foie (Inacio et al. 2015). Dans un modèle murin de neuropaludisme, l'activation des voies de l'UPR dans le cerveau est associée à une élévation de CHOP, corrélée à une mort neuronale accrue (Anand et al. 2013). Concernant *T. gondii*, l'infection déclenche l'apoptose de cellules souches neurales murines via CHOP, JNK et la caspase-12 (Wan et al. 2015 ; Zhou et al. 2015), un processus auquel TgROP18 contribuerait. Cet effecteur parasitaire cible également ATF6β, dont il induit la dégradation par phosphorylation, compromettant ainsi la réponse immunitaire Th1 (Yamamoto et al. 2011). Un autre facteur, TgGRA15II, active des éléments de la réponse UPR (BiP, XBP1s, CHOP) via la voie TRAF2/Ask1/JNK lorsqu'il est exprimé transitoirement dans des cellules trophoblastiques, ce qui mène à l'apoptose des cellules (Wei et al. 2018). Pour *Cryptosporidium parvum*, l'induction de p-eIF2α, CHOP et BiP favorise l'expression de l'ornithine

décarboxylase, enzyme clé pour le développement du parasite (Morada et al. 2013). Enfin, dans les macrophages infectés par *Leishmania amazonensis*, la voie IRE1 est activée via TLR2, stimulant XBP1s et la production d'IFN-β tout en réduisant les ROS, ce qui soutient la survie du parasite (Dias-Teixeira et al. 2016). Une activation modérée de la réponse UPR est également observée avec *L. infantum*, suggérant un mécanisme d'adaptation favorisant la persistance parasitaire (Galluzzi et al. 2016). La modulation de l'activation de l'UPR et son rôle lors de l'infection par *T. gondii* est expliqué plus en détails par la suite (cf 4.4).

4.3 UPR et cellules dendritiques

4.3.1 UPR et survie des DC

Le développement, la survie et les fonctions effectrices des DC sont étroitement régulés par la signalisation induite par le stress du RE**.** Parmi les branches de la réponse UPR, la voie IRE1/XBP1s apparaît comme un régulateur majeur de l'homéostasie et de l'activité des DC (Iwakoshi et al. 2007, Mahadevan et al. 2012). En effet, chez des souris déficientes en XBP1, on observe une réduction du nombre de cDC et pDC dans la rate, accompagnée d'une augmentation des phénomènes apoptotiques, qui n'est plus observé dès par la réintroduction de XBP1s dans les progéniteurs hématopoïétiques (Iwakoshi et al. 2007). Par ailleurs, les DC de souris sauvages montrent une meilleure résistance à l'activation des récepteurs TLR4 et TLR9 après stimulation par leurs ligands comparativement aux souris sans XBP1. Il est intéressant de noter que l'expression forcée d'XBP1 dans des progéniteurs hématopoïétiques FLT3+ déficients en XBP1 permet de diminuer l'apoptose observée chez les DC (Iwakoshi et al., 2007). Une autre étude a démontré que l'activation constitutive de la voie IRE1 à l'état basale dans les DC spléniques est limitée à la sous-population des cDC1 (Osorio et al., 2014). De plus, chez les souris déficientes en IRE1 ou en XBP1, aucun défaut majeur n'a été détecté dans le développement des DC de la rate. En revanche, l'activité endoribonucléasique d'IRE1 contribue à la survie des cDC1 présentes dans l'intestin et les poumons, par un mécanisme dépendant d'ATF4 et de la forme épissée XBP1s (Tavernier et al., 2017). Ainsi, la suppression d'XBP1 entraîne l'apoptose des cDC1 pulmonaires, sans activation des voies CHOP ou JNK, tandis que dans les cDC1 intestinales, cette apoptose dépend de l'activité RIDD et d'une inhibition de la synthèse protéique via la phosphorylation d'eIF2α (Tavernier et al., 2017). Ces résultats soulignent l'importance de la voie IRE1 dans la régulation du développement des cDC1 (Osorio et al., 2014 ; Tavernier et al., 2017).

4.3.2 UPR et fonctions immunitaires des DC

- **Sécrétion cytokinique**

Dans les BMDC infectées, XBP1s régule l'expression de gènes liés à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-12, essentielles pour la stimulation des lymphocytes T et la coordination d'une réponse immunitaire efficace contre le parasite (Poncet et al. 2021). En parallèle, IRE1 améliore la capacité des BMDC à présenter des antigènes via le CMH-I, favorisant ainsi la reconnaissance des cellules infectées par les LT cytotoxiques (Poncet et al. 2021). La stimulation des DC par divers composants peut déclencher la réponse UPR et influencer leur profil de sécrétion cytokinique. Par exemple, l'activation du TLR3 via le poly(I:C) induit l'expression de XBP1s et de GADD34, ce qui conduit à la production d'IL-6 et d'IFN-β (Clavarino et al. 2012a, Hu et al. 2011). Il a également été montré que la stimulation simultanée de plusieurs PRRs dans des DC engendre une production synergique de certaines cytokines, notamment l'IL-23. Par exemple, la co-stimulation par le TNF et le LPS provoque une sécrétion importante d'IL-23, alors que l'activation isolée de l'un ou l'autre a peu ou pas d'effet (Goodall et al. 2010). Cette production d'IL-23 dépend notamment de l'activation du facteur de transcription CHOP (Goodall et al. 2010). La sécrétion de l'IL-23, via l'activation de XBP1s et CHOP, peut aussi survenir suite à une inhibition de la glycolyse et d'une production accrue de radicaux libres mitochondriaux (mtROS) (Mogilenko et al. 2019). Ces observations réalisées *in vitro* dans des BMDC, ont été confirmés *in vivo* chez la souris : la réduction de la formation de mtROS ou la suppression spécifique d'XBP1 dans les DC diminue l'expression d'IL-23 et l'inflammation cutanée dans un modèle murin de psoriasis (Mogilenko et al. 2019). Par ailleurs, la voie IRE1/XBP1 joue un rôle clé dans la production des cytokines IL-6, TNF-α et IL-10 lors de la capture d'extraits tumoraux solubles par les BMDC (Medel et al. 2019).

- **Présentation antigénique**

Les travaux d'Osorio et al. (2014) ont mis en évidence que chez les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1s) dépourvues de XBP1, l'hyperactivation d'IRE1 entraîne un défaut de présentation croisée d'antigènes du soi issus de cellules apoptotiques. Ce défaut s'explique par la dégradation de certains ARNm clés de la voie de présentation antigénique par le CMH-I (comme celui de la tapasine), via l'activité RIDD, un phénomène absent en l'absence d'IRE1, confirmant son rôle dans ce processus. À l'inverse, XBP1s semble favoriser la présentation antigénique par le CMH-I en induisant l'expression de protéines du RE impliquées dans ce mécanisme (Osorio et al. 2018 ; Shoulders et al. 2013). Dans un contexte tumoral, l'influence de la voie UPR sur la fonction des DC varie selon l'environnement. Par exemple, la surexpression de XBP1 dans des DC améliore la réponse des LT CD8+

contre les antigènes tumoraux lors d'une vaccination (Tian et al. 2012). En revanche, dans les tumeurs ovariennes, le stress du réticulum induit par les ROS tumoraux active XBP1, ce qui favorise l'accumulation de lipides dans les DC et bloque leur capacité à présenter les antigènes tumoraux par le CMH-I (Cubillos-Ruiz et al. 2015 ; Herber et al. 2010). La suppression de XBP1 restaure alors cette fonction et améliore la réponse antitumorale. Par ailleurs, une étude de Medel et al. (2019) a montré que l'exposition de BMDC à des extraits tumoraux solubles active la voie IRE1/XBP1 sans induire RIDD, ce qui stimule efficacement la présentation croisée des antigènes tumoraux via le CMH-I, sans interférer avec la voie CMH-II. Ainsi, selon le contexte et les signaux présents, l'activation d'IRE1 peut soit favoriser, soit entraver la présentation antigénique par les DC.

4.4 UPR et infection par *Toxoplasma gondii*

Trois études se sont intéressées au rôle de l'UPR lors de l'infection par *T. gondii.*

Tout d'abord, l'étude de Yamamoto et al. (2011) décrit un mécanisme par lequel le parasite *T. gondii* inhibe la réponse immunitaire adaptative de l'hôte via l'action de l'effecteur TgROP18. TgROP18, une kinase sécrétée dans la cellule hôte au moment de l'invasion, est connue pour contribuer à la virulence des souches de type I. Les auteurs ont montré que TgROP18 interagit spécifiquement avec le facteur de transcription ATF6β. Cette interaction conduit à la phosphorylation d'ATF6β, marquant la protéine pour une dégradation rapide par le protéasome. En conséquence, l'activation transcriptionnelle de gènes cibles d'ATF6β est fortement inhibée, compromettant certaines fonctions cellulaires clés, notamment celles associées à la présentation antigénique. Les souris déficientes en ATF6β montrent une susceptibilité accrue à l'infection par *T. gondii*, caractérisée par une réduction de la réponse Th1 protectrice, en particulier une production diminuée d'IFN-γ par les LT CD8+. Cette observation suggère que la voie ATF6β contribue à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace contre le parasite. De plus, l'étude démontre que la dégradation d'ATF6β altère la capacité des cellules dendritiques à stimuler correctement les LT CD8+, sans affecter la présentation aux LT CD4+, pointant vers une implication spécifique d'ATF6β dans la présentation croisée via le CMH de classe I.

Une deuxième étude de Leonardo Augusto et al. (2020) met en lumière une stratégie originale par laquelle *T. gondii* détourne la réponse UPR pour favoriser sa dissémination dans l'organisme. Les auteurs ont montré que l'infection par *T. gondii* entraîne une mobilisation rapide des réserves calciques du RE dans les MEF (mouse embryonic fibroblasts) *in vitro*. Cette libération de calcium induit l'activation de la voie IRE1. De manière intéressante, cette activation se produit indépendamment de l'activité endoribonucléase classique d'IRE1, suggérant une fonction non canonique de cette voie dans le contexte de l'infection parasitaire. L'activation d'IRE1 dans les MEF infectées s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette d'actine via une interaction directe avec la protéine filamine A, une

actine-binding protein. Cette interaction favorise l'oligomérisation d'IRE1 et initie des changements morphologiques qui confèrent aux cellules infectées un comportement migratoire amplifié. En stimulant la mobilité des cellules hôtes, le parasite exploiterait ainsi la signalisation UPR pour faciliter sa propre dissémination dans l'organisme. Les expériences *in vivo* réalisées chez la souris soutiennent ce mécanisme. En effet, l'invalidation par siRNA d'IRE1 dans des BMDC infectées puis injectées dans la souris, limite la propagation du parasite vers des organes distants par comparaison à l'injection de BMDC sauvages infectées. Ces travaux suggèrent un mécanisme inédit de subversion de la cellule hôte par un pathogène eucaryote. Cependant, il est à noter que les auteurs n'ont pas examiné si les BMDC délétées pour IRE1 infectées par *T. gondii* étaient affectées dans leur survie après leur injection dans la souris.

Pour finir, l'étude précédente du laboratoire a montré que l'infection de BMDC par *T. gondii* induit une signature UPR spécifique, marquée par une activation de la voie IRE1, dépendante de MyD88, et une répression de la voie ATF6 (Poncet al. 2021). Contrairement à l'induction pharmacologique classique (e.g. tunicamycine), l'infection n'active pas de manière générale le stress du RE, mais déclenche une activation partielle et ciblée, principalement via l'induction de XBP1s. En revanche, la branche PERK de la réponse UPR reste non activée. Ils ont également montré que l'activation de la voie IRE1/XBP1 régule la production de cytokines pro-inflammatoires par les BMDC. Plus précisément, l'induction de XBP1s favorise l'expression de l'IL-6 et l'IL-12, deux cytokines clés dans l'activation des réponses Th1. L'absence de MyD88 abolit l'activation de XBP1, indiquant que la stimulation des TLRs est indispensable pour initier la voie IRE1. Cependant, en absence de l'activation de la voie IRE1 par les TLR (BMDC Myd88 KO) la présence de parasites vivants entraîne une atténuation de cette réponse UPR, suggérant que le parasite pourrait sécréter des facteurs parasitaires qui inhiberaient la voie IRE1. Outre la modulation des cytokines, *in vitro* dans les BMDC, IRE1 contribue à la présentation croisée des antigènes parasitaires via le complexe CMH-I, favorisant l'activation des LT $CD8^+$. Cette fonction est dépendante de IRE1 mais indépendante de XBP1s, soulignant un rôle spécifique d'IRE1 dans la présentation antigénique. Dans cette étude, il a également été observé *in vivo*, que l'activation de la voie IRE1/XBP1 est induite uniquement dans les cDC1 spléniques, et non dans les cDC2 ou les autres cellules immunitaires. Les souris déficientes pour IRE1 et XBP1 dans les DC (CD11c-Cre) présentent une susceptibilité accrue à *T. gondii* avec une mortalité précoce lors de la phase aiguë, associée à une charge parasitaire plus élevée. Cette plus grande susceptibilité est corrélée à une réduction de la prolifération desLT CD8+. Cette diminution de la réponse des LT CD8+, est corrélée à la diminution de l'expansion des cDC1 spléniques, suggérant un rôle de la voie IRE1/XBP1 dans l'expansion et les fonctions des cDC1 spléniques lors de l'infection par *T. gondii*.

Objectifs de la thèse

Les cellules dendritiques jouent un rôle primordial dans la mise en place de la réponse immunitaire contre *T. gondii*. Une étude préalable du laboratoire avait montré que l'activation de la voie IRE1/XBP1 dans les DC est essentielle à la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice contre l'infection (Poncet et al. 2021). En particulier, cette étude avait montré que la délétion de IRE1 et XBP1 entrainait une perte de l'expansion des cDC1, normalement observée chez les souris sauvages lors de l'infection, suggérant que cette voie est essentielle à la maturation immunogénique des cDC1. Cependant, les mécanismes par lesquels la voie IRE1 régule la maturation immunogénique des cDC1 et les fonctions de ces dernières, assurant ainsi l'activation des LT, étaient encore inconnus à mon arrivée au laboratoire.

Mon projet de thèse a été divisé en 2 parties. J'ai tout d'abord caractérisé en détail le processus de maturation immunogénique des cDC1 lors de l'infection par *T. gondii* dans les souris sauvages. En effet, de manière générale, ce processus n'avait pas ou peu été décrit dans la littérature et l'expansion des cDC1 induit par l'infection par *T. gondii* n'est pas un phénomène qui est systématiquement observé lors d'une infection par un micro-organisme pathogène. Nous souhaitions donc notamment caractériser cette population de cDC1, la cinétique de son expansion et celle de l'activation de la voie IRE1.

Dans une deuxième partie, en utilisant des souris délétées pour IRE1 et XBP1 spécifiquement dans les cDC1 (et non plus dans les DC), nous avons cherché à mieux caractériser le rôle de la voie IRE1 dans le processus de maturation des cDC1 lors de l'infection par *T. gondii* et à identifier certains mécanismes régulateurs par lesquels la voie IRE1 pouvait induire l'expansion des cDC1 ou réguler des fonctions clés de ces cellules impliquées dans l'activation des LT CD8+, telles que la présentation antigénique ou la migration cellulaire.

Matériel et Méthodes

1. Cultures cellulaires et parasitaire

1.1 Fibroblastes humains

La lignée primaire de fibroblastes humains (Human Foreskin Fibroblasts ; HFF), CCD-1112Sk (ATCC® CRL-2429™), est cultivée dans des flasques à 37 °C, sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Le milieu de culture utilisé est du DMEM complet, composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose GlutaMAX™ (Gibco™ by Life Technologies), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco™) et 1 % de pénicilline-streptomycine (Gibco™). Les cellules sont entretenues par passages réguliers lorsque la confluence est atteinte. Pour cela, le tapis cellulaire est détaché à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA à 0,25 % (Gibco™) pendant 5 minutes à 37 °C. Afin de garantir la qualité des cultures et d'éviter toute contamination, les fibroblastes sont régulièrement testés pour la présence de mycoplasmes à l'aide du kit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

1.2 Culture parasitaire et préparation des STAgs

Les souches parasitaires utilisées pour les expériences (Table 1) sont cultivées dans des HFF dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco™ par Life Technologies), supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de veau (Gibco™ par Life Technologies) et 1 % de pénicilline-streptomycine (Gibco™ par Life Technologies). Pour l'infection des souris, les parasites sont extraits des HFF en raclant les flasques, puis la suspension cellulaire est passée cinq fois à travers une aiguille de calibre 18G pour lyser les cellules, puis deux fois à travers une aiguille de calibre 27G pour lyser les vacuoles parasitophores. La solution contenant les parasites est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre en polycarbonate de 3 µm afin d'obtenir uniquement des tachyzoïtes isolés. Les tachyzoïtes ainsi purifiés sont comptés puis injectés par voie intrapéritonéale (i.p), la dose parasitaire variant en fonction des expériences réalisées. Pour certaines expériences, des STAgs (Soluble Tachyzoites Antigen) ont été injectés dans les souris. Pour cela, les parasites purifiés sont centrifugés et re-suspendus à une concentration de 200.10^6 parasites/ml dans du PBS 1X. Les parasites sont détruits par sonication (6 cycles de 20 secondes dans la glace). La solution est ensuite centrifugée à 13 000g pendant 30min à 4°C, puis le surnageant est récupéré et filtré (filtre de 0,22µm). Pour finir, un test BCA (BiCinchoninic acid Assay) est réalisé afin de déterminer la concentration protéique de la solution. 25µg de STAgs sont injectés par souris.

Souche	Type	Provenance
Pru TdTomato SAG1-OVA	Type II	Schaeffer *et al.* 2009
Pru Luc GFP	Type II	J. Boothroyd
Pru Toxifilin Cre	Type II	Koshi *et al*. 2010
RH Luc GFP	Type I	J. Boothroyd

Table 1 – Différentes souches parasitaires utilisées pour le projet. Pru TdTomato SAG1-OVA : la souche a été génétiquement modifiée afin d'exprimer de manière constitutive sous le promoteur SAG1 la protéine soluble OVA, qui est retrouvée dans la lumière de la vacuole parasitophore (Schaeffer *et al.,* 2009). Pru Luc GFP et RH Luc GFP : souches qui expriment constitutivement la protéine fluorescente GFP et l'enzyme luciférase. Pru Toxofilin Cre : souche qui sécrète la protéine de fusion Toxofilin-Cre contenue dans les rhoptries lors de l'invasion cellulaire. La protéine de fusion Toxifilin-Cre peut transloquer dans le noyau grâce à une cassette NLS (Nucleus Localization Signal)

2. Modèles murins

Différents modèles murins ont été utilisés pour le projet. Les souris sont infectées à l'âge de 8-10 semaines, avec différentes doses/souches parasitaires ou temps d'infection en fonction des expériences réalisées.

2.1 Les souris ERAI

Les souris **ERAI** (ER stress-Activated Indicator) (Figure 1 - A) provenant du laboratoire de S. Janssens (VIB/IRC, Université de Gand), sont génétiquement modifiées pour surexprimer 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 IRE1a, 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 IRE1a par cytométrie en flux.

2.2 Les souris IRE1^{trunc} XBP1ΔXCR1-Cre

Les souris **IRE1^{trunc} XBP1ΔXCR1-Cre** (Figure 1 - B) ont été produites avec le système Cre-LoxP. Les souris homozygotes $^{fl/fl}$ ("floxées") ont été générées en flanquant le gène d'intérêt par deux sites LoxP localisés dans le premier et deuxième intron pour le gène Xbp1 et encadrant les exons 20 et 21 pour le gène Ern1 (codant pour la protéine IRE1a). Les souris IRE1$^{fl/fl}$ XBP1$^{fl/fl}$ ont été ensuite croisées avec

les souris transgéniques XCR1-Cre, afin d'obtenir des souris transgénique délétées pour XBP1 et une partie d'IRE1 (IRE1^{trunc} : pas d'activité endoribonucléasique) spécifiquement dans les cDC1 (XCR1 positives). Les souris sont élevées à l'Institut Pasteur de Lille selon le protocole (référencé sous le numéro APAFIS #40568-2023012709228135 v5) approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale N°75 et le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. Les souris sont génotypées à l'âge de 4 semaines pour identifier les souris Cre positive par extraction de l'ADN provenant d'un échantillon d'oreille 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™ Red Taq Mastermix (highQu) avec les primers spécifiques (XCR1 mutF: AGGTGACCGTTTACGAGAGC, XCR1 commonR: GAGTGCACGAAGTGTTGCTT, XCR1 wtF: CTTCACCGTCGTGGTAGCAT, XBP1 F : ACTTGCACCAACACTTGCCATTTC, XBP1 R : CAAGGTGGTTCACTGCCTGTAATG, XBP1 germline deletion check : AAATGCTCGCTCTTTGTGGTCGT) utilisant le cycle PCR suivant : 95°C 1min, [95°C 15sec, 62°C 15sec, 72°C 30sec] x40, 72°C 5min.

2.3 Les souris Ai6

Les souris **Ai6** (Figure 1 – C ; Madisen et al. 2010) provenant du laboratoire de N. Blanchard (INFINITY, Toulouse) ont été génétiquement modifiées afin de modifier le locus Rosa26 (ubiquitaire) par l'insertion ciblée d'une construction contenant le promoteur CAG, connu pour être fort et ubiquitaire, suivi d'un gène rapporteur fluorescent ZsGreen contrôlé par une cassette Stop encadrée de sites loxP (Madisen *et al.* 2010). Ces souris sont infectées avec la souche parasitaire transgénique Pru Toxofilin-Cre, permettant ainsi d'observer un signal GFP dans les cellules ayant été infectées ou qui sont rentrées en contact avec le parasite (Figure 1-C).

2.4 Lignées de souris utilisées pour la génération des souris chimères MyD88$^{fl/fl}$CD11c Cre et IFNAR1$^{fl/fl}$CD11c Cre

- Les souris WT C57Bl/6 proviennent de l'élevage de Charles River, et sont utilisées à l'âge de 8 semaines.
- Les souris MyD88 CD11c Cre ou IFNAR1 CD11c Cre ont été produites avec le système Cre-LoxP. Les souris homozygotes $^{fl/fl}$ ont été générées en flanquant le gène d'intérêt MyD88 ou IFNAR1 par deux sites LoxP. Les souris MyD88$^{fl/fl}$ ou IFNAR1$^{fl/fl}$ (données par le laboratoire de Bart Lambrecht, VIB U-Ghent) ont été ensuite croisées avec les souris transgéniques CD11c-Cre pa le laboratoire de Sophie Janssens, afin d'obtenir des souris transgéniques délétées pour

MyD88 ou IFNAR1 spécifiquement dans les DC (CD11c positives). Le protocole de génération des souris chimères est expliqué dans la sous-partie suivante (2.5).

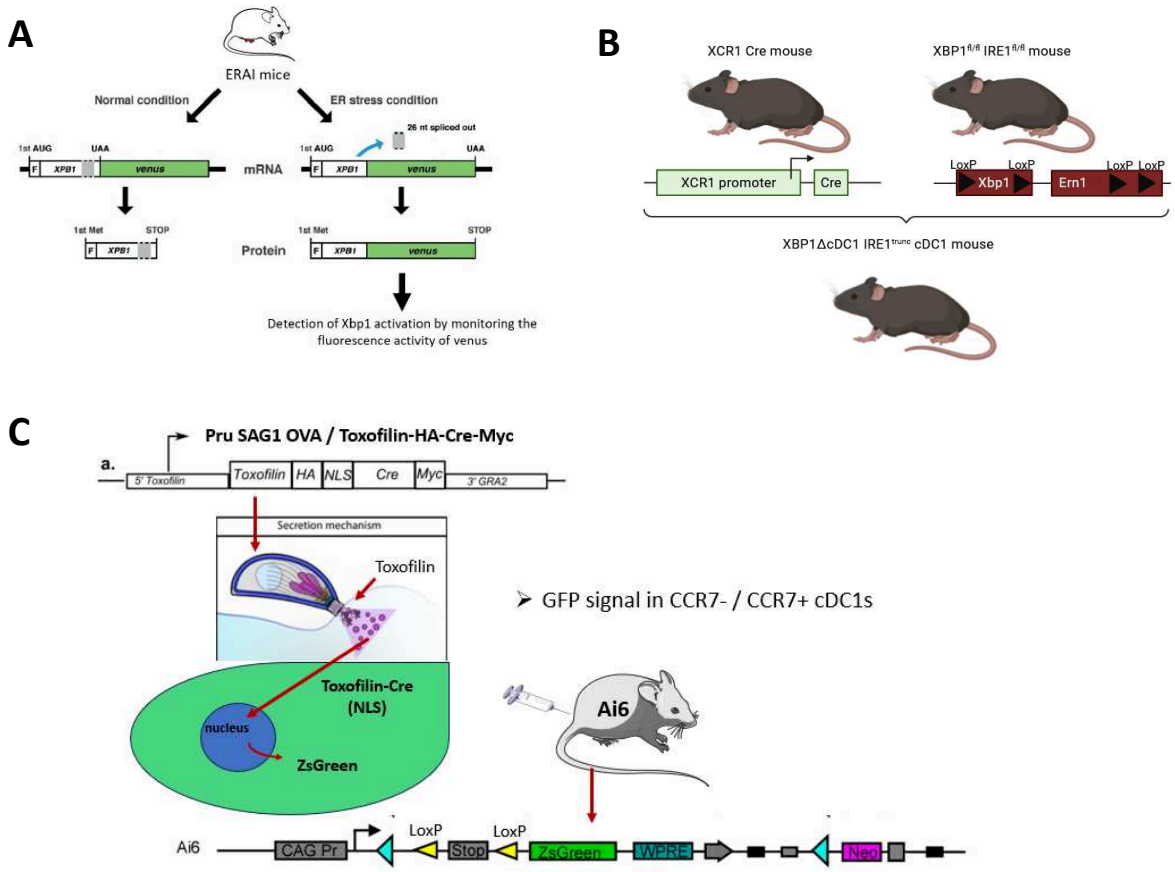
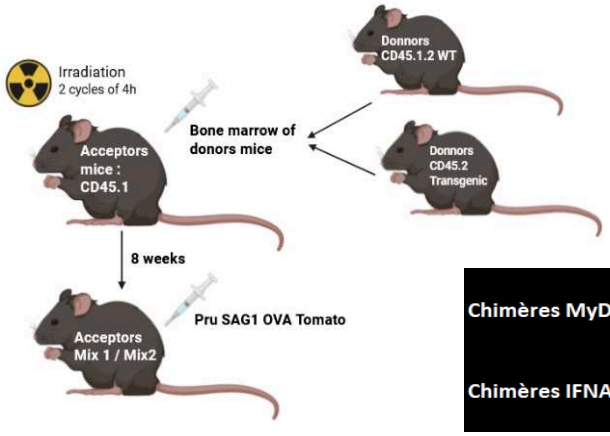


Figure 1 – Constructions des différents modèles murins utilisés pour le projet. **(A)** Souris ERAI (Iwawaki *et al*. 2003). **(B)** Souris IRE1^{trunc} XBP1ΔXCR1-Cre (S. Janssens, Mattiuz *et al.* 2010) **(C)** Souris Ai6 (Madisen *et al*. 2010). **(D)** Lignées de souris utilisées pour la génération des souris chimères.

2.5 Génération des souris chimères MyD88$^{fl/fl}$ CD11c-Cre et IFNAR1$^{fl/fl}$CD11c-Cre

Les souris chimères ont été générées selon le protocole suivant. Les souris receveuses sont irradiées durant 2 cycles à 400cGy avec 4h d'intervalles. En parallèle, la moelle osseuse des souris donneuses : C57/Bl6 (CD45.1.2) et gène d'intérêt$^{fl/fl}$CD11c Cre (MyD88$^{fl/fl}$, IFNAR1$^{fl/fl}$) (CD45.2) contrôles et transgéniques (knock out) est extraite des fémurs et des tibias. Pour cela, les os sont broyés au mortier dans 1ml de PBS puis filtrés à travers un filtre de 100µM. Après la lyse des globules rouges, la solution cellulaire est reprise à 20.10^6 cellules/ml. Les mix 1 et 2 sont ensuite préparés comme indiqué dans le tableau de la figure 1 - D, en mélangeant 50% de moelle osseuse WT et 50% de moelle osseuse provenant des souris transgéniques d'intérêt (soit WT soit KO). Avant injection par I.V en souris, 100µl

des différents mix sont marqués avec des anticorps CD45.1 et CD45.2 afin de vérifié le ratio 50:50 de la moelle osseuse des souris WT et des souris d'intérêts. Les souris sont ensuite injectées par I.V à hauteur de 4.10^6 cellules par souris du mélange de moëlles. Après 8 semaines de régénération de la moelle osseuse, 100µl de sang des souris est prélevé afin de vérifier par cytométrie en flux, comme précédemment expliqué, le ratio 50:50 la moelle osseuse des souris WT et des souris d'intérêts. Les souris sont ensuite infectées à hauteur de 500 parasites Pru SAG1-OVA TdTomato par souris pendant 6 jours pour les différentes analyses par immunophénotypage.



Chimères MyD88	Mix 1	50% CD45.1.2 WT	50% CD45.2 MyD88$^{fl/fl}$
	Mix 2	50% CD45.1.2 WT	50% CD45.2 MyD88ΔCD11c
Chimères IFNAR1	Mix 1	50% CD45.1.2 WT	50% CD45.2 IFNAR1$^{fl/fl}$
	Mix 2	50% CD45.1.2 WT	50% CD45.2 IFNAR1ΔCD11c

Figure 2 – Protocole de génération des souris chimères réalisées et de la composition des mix de moëlles osseuses injectées pour la construction des chimères.

2.6 Courbe de survie des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées

Pour réaliser la courbe de survie, 8 souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1 Cre (Contrôles) et 8 souris IRE1/XBP1ΔcDC1 ont été infectées par I.P avec la souche de type II Pru SAG1-OVA, à hauteur de 500 parasites par souris. Les souris sont pesées tous les jours après infection afin de suivre l'évolution de l'infection, et sont euthanasiées lorsque les points limites validés par le comité d'éthique sont atteints.

3. Expériences réalisées in vivo

3.1 Analyse immunophénotypique des différentes populations immunitaires de la rate murine par cytométrie en flux multiparamétrique

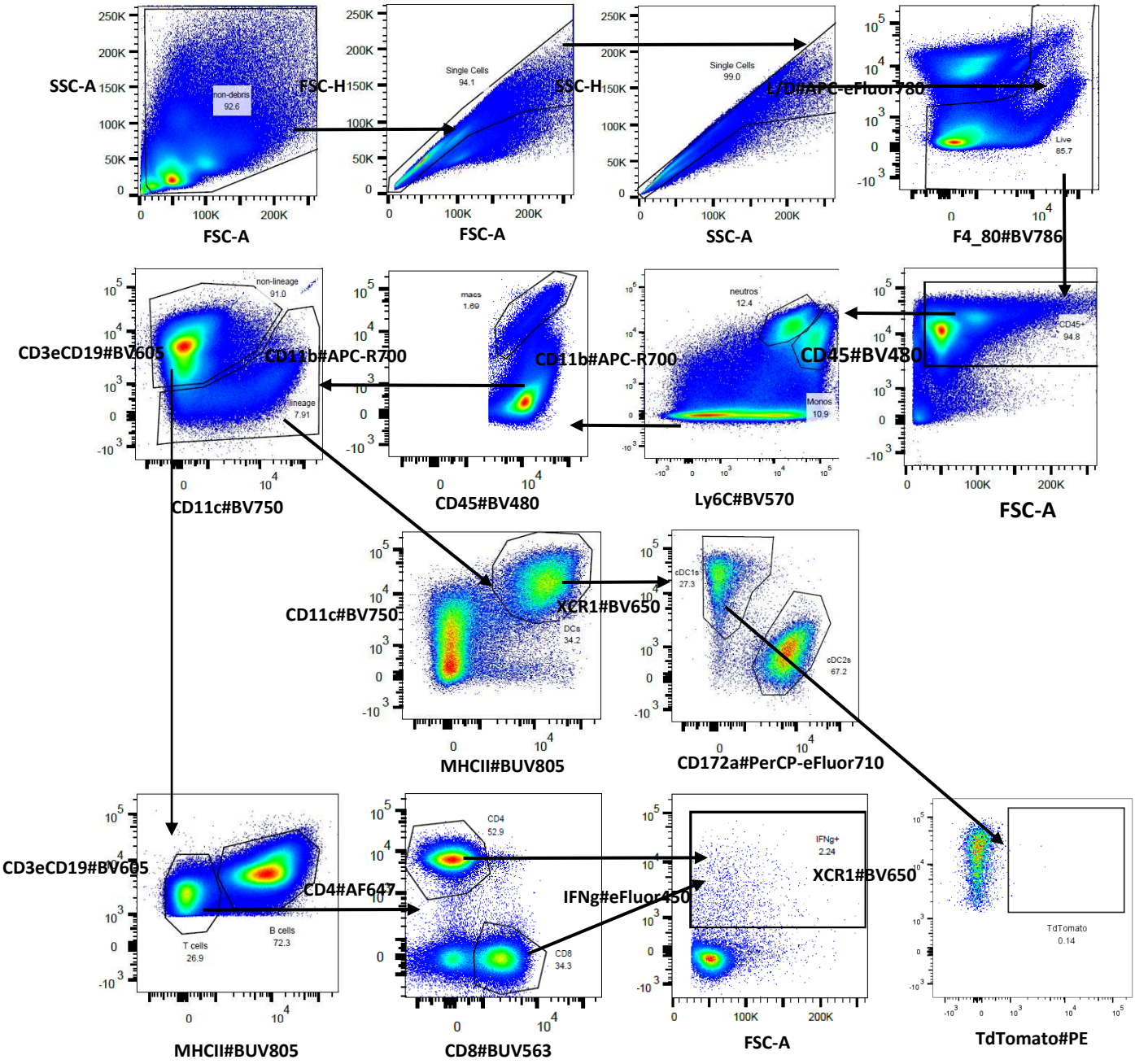
Après différents temps d'infection, les rates sont extraites des souris, puis digérées 20 min à 37°C dans une solution de collagénase (1 mg/ml, SIGMA-ALDRICH®) et de DNAse I (2 µg/ml, Roche). La rate est ensuite déposée sur un filtre en monofilaments de polyamide PA 90/35 (SAATI) puis dissociée à l'aide

du piston d'une seringue. La suspension cellulaire obtenue est ensuite filtrée une seconde fois à travers un filtre en monofilaments, et un total de 4.10^6 splénocytes sont ensuite incubés avec un cocktail d'anticorps fluorescents (voir tableau). Dans un premier temps, les cellules sont marquées avec un anticorps anti-CCR7 biotinylé en présence du bloqueur FcBlock, pendant 45 min dans l'obscurité à 4 °C. Après un lavage, une seconde incubation avec le reste du cocktail d'anticorps, également en présence de FcBlock, a été effectuée pendant 35 min dans l'obscurité à 4 °C. Pour les marquages intracellulaires, après le lavage du second marquage, les splénocytes ont été fixés pendant 20 min avec la solution de fixation/perméabilisation (BD Cytofix/Cytoperm) à 4°C, puis incubés avec l'anticorps dirigé contre le marqueur intracellulaire pendant 35 min dans l'obscurité à 4 °C. L'acquisition et l'analyse des cellules marquées ont été réalisées sur un cytomètre ARIA IV FACS Symphony (BD Biosciences) et/ou Aurora Cytek. Les fichiers FCS ont été analysés avec le logiciel FlowJo v10.10. Les différents gating réalisés pour l'analyse des populations des cellules immunitaires spléniques (Annexe 1) et des différents stades de maturation des cDC1 spléniques (Annexe 2) sont présentés ci-dessous.

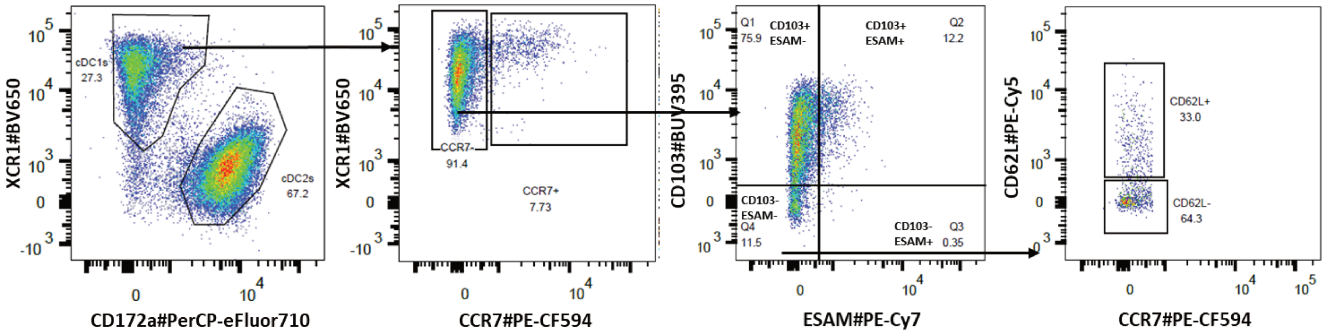
Fluorochrome	Anticorps	Dilution	Fournisseur	Cat#
BUV395	CD103	200	BD Biosciences	568715
BUV563	CD8a	600	BD Biosciences	748535
BUV737	CD80	200	BD Biosciences	612773
BUV805	MHCII	600	BD Biosciences	748844
eFluor450	IFNg	100	Thermo Fisher Scientific	48-7311-82
BV480	CD45	400	BD Biosciences	566095
BV570	Ly-6C	200	BioLegend	128030
BV605	CD3e	100	BioLegend	100351
BV605	CD19	400	BioLegend	115540
BV650	XCR1	200	BioLegend	148220
BV750	CD11c	100	BioLegend	117357
BV786	F4/80	100	BioLegend	123141
PerCP-eFluor710	CD172a	200	Thermo Fisher Scientific	46-1721-82
PE-CF594	SAV	1500	BD Biosciences	562284
PE-Cy5	CD62L	1000	BioLegend	104410
PE-Cy7	ESAM	200	BioLegend	136212
AF647	CD4	600	BD Biosciences	557681
RedFluor710	CD11b	800	BD Biosciences	564985
APC-eFluor780	L/D	200	Thermo Fisher Scientific	65-0865-14
Biotin	CCR7	100	Thermo Fisher Scientific	13-1971-85

Table 2 – Liste des différents anticorps de cytométrie en flux utilisés pour les expériences d'immunophénotypage sur les populations spléniques des souris.

Annexe 1 – Dot plot représentant la stratégie de gating par cytométrie en flux des différentes **populations de cellules de la rate** des souris, grâce au logiciel FlowJo v10.10, utilisé pour toutes les expériences d'immunophénotypage.



Annexe 2 – Dot plot représentant la stratégie de gating par cytométrie en flux des différents **stades de maturation des cDC1 spléniques** des souris, grâce au logiciel FlowJo v10.10, utilisé pour toutes les expériences d'immunophénotypage.



3.2 Suivi de la migration des cDC1 dans la rate

Le protocole suivant a été réalisé en suivant les étapes décrites par l'équipe de S. Eisenbarth (Calabro *et al.* 2016). Les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre et contrôles sont tout d'abord infectées durant 6 jours avec la souche Pru SAG1-OVA TdTomato, puis 3min avant leur sacrifice, l'anticorps CD11c-APC (Biolegend, #117310) est injecté en intraveineuse à hauteur de 3µg par souris. L'anticorps ne passant pas dans la zone « White pulp » ou zone T de la rate, cela permet de tracer la migration des cellules qui se dirigent vers la zone T, la diminution du signal APC marquant la migration des DC. Après les 3min, les souris sont sacrifiées et les rates digérées puis les splénocytes marqués comme indiqué précédemment (cf. Table 2). L'acquisition et l'analyse des cellules marquées ont été réalisées sur un cytomètre ARIA IV FACS Symphony (BD Biosciences). Les fichiers FCS ont été analysés avec le logiciel FlowJo v10.10.

3.3 Tri des cellules dendritiques et analyse par RT-qPCR des transcrits issus des cellules triées

Afin de faciliter le tri cellulaire des cDC1 spléniques, après extraction des splénocytes et lyse des globules rouges (cf. 3.1), la suspension cellulaire splénique totale a été enrichie en cellules dendritiques par sélection négative des autres populations de la rate, à l'aide d'anticorps monoclonaux biotinylés (Table 4) et de billes de sélection négative MagniSort Streptavidin (Invitrogen™) suivant le protocole du fournisseur. La population de splénocytes enrichies en DCs est ensuite marquée avec les anticorps suivants : MHCII, CD11c, CD103, CD45, CD172a, CD8a, XCR1, CCR7 (Table 2), afin de trier les sous-types « immature » (CD103+/CCR7-) et « mature » (CCR7+). Les cellules cDC1 triées ont été directement resuspendues dans le tampon RLT Plus (Qiagen), supplémenté en β-mercaptoéthanol, puis conservées à −80 °C. L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy Plus Micro (Qiagen), conformément aux instructions du fabricant. La synthèse et l'amplification de l'ADNc ont été ensuite réalisées avec le kit Ovation PicoSL WTA System V2 (NuGEN). L'ADNc amplifié a été purifié à l'aide du kit MinElute PCR Purification (Qiagen). La RT-qPCR a été effectuée sur un appareil LightCycler 480 (Roche) en utilisant

le SYBR® Select Master Mix (Life Technologies) et des amorces spécifiques des gènes d'intérêts (Table 5). L'expression des gènes a été normalisée à celle de gènes de ménage.

Anticorps Biotinylés	Dilution	Fournisseur	Cat#
CD3	200	BioLegend	100243
CD3e	200	Thermo Fisher Scientific	13-0031-85
TCRb	200	BioLegend	109203
CD19	100	BioLegend	101504
CD64	300	BioLegend	139318
CD49b	300	BioLegend	103521
TER119	300	BioLegend	116203
Ly6G	300	BioLegend	127603
SiglecF CD170	300	BioLegend	155512

Table 4 – Liste des anticorps biotinylés utilisés pour l'enrichissement en DCs par sélection négative des splénocytes.

3.4 Analyse par RT-qPCR des transcrits issus de la rate entière de souris

Afin d'estimer la quantité relative des transcrits de gènes d'intérêt dans la rate, l'ARN total est extrait à partir d'un cinquième de l'organe. Pour cela, le morceau de rate est lysé dans un 1ml de tampon comprenant du tampon RA1 (MACHEREY-NAGEL) et 1/100e de β-mercapthoéthanol, avec le Polytron® PT 1200 E, en réalisant deux cycle de 30sec, avec 15 sec de pause dans la glace entre les deux cycles. Par la suite, 200µl de lysat sont utilisés afin d'extraire l'ARN à l'aide du kit **NucleoSpin RNA** (MACHEREY-NAGEL), conformément au protocole du fabricant. Le reste du lysat est conservé à -80°C. L'ADNc est synthétisé grâce à l'utilisation du kit Kit RNA-to-cDNA™ High Capacity (Applied Biosystems™) selon les instructions du fabricant. Les séquences des primers des gènes d'intérêt utilisées pour les réactions de qPCR sont détaillées en table 5. Les réactions de qPCR sont effectuées en présence du **SYBR™ Select Master Mix** (Applied Biosystems™), avec 2 µM de chaque amorce (Forward et Reverse) et 20 ng d'ADNc, sur un système **QuantStudio 5 Real-Time PCR** (Applied Biosystems™). Le programme thermique est le suivant : 50 °C pendant 2 min, 95 °C pendant 10 min, suivi de 40 cycles [95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min], puis 95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min, et enfin 95 °C pendant 15 s. Pour chaque gène étudié et pour chaque condition, les qPCR sont réalisées en duplicat technique, avec un minimum de quatre souris. L'expression relative des gènes est normalisée par rapport au gène de référence ***Rpl13a*.**

Abcg1 (Forward) CTTTCCTACTCTGTACCCGAG	**Ifi47 (Forward) TCTCCAGAAACCCTCACTGGT**
Abcg1 (Reverse) CGGGGCATTCCATTGATAAGG	**Ifi47 (Reverse) TCAGCGGATTCATCTGCTTCG**
Apol10b (Forward) TACGACCACCGTTGTGGAAG	**Ifit1 (Forward) CTGAGATGTCACTTCACATGGAA**
Apol10b (Reverse) GTGATCCCTGAGGATTTTGACTG	**Ifit1 (Reverse) GTGCATCCCCAATGGGTTCT**
Apol7c (Forward) GAAGCTGCCTTGCGAGAGT	**Ifit2 (Forward) AGTACAACGAGTAAGGAGTCACT**
Apol7c (Reverse) TTGTGCCACAGGTCATTTTGG	**Ifit2 (Reverse) AGGCCAGTATGTTGCACATGG**
Ifng (Forward) CAGCAACAGCAAGGCGAAA	**Isg20 (Forward) GAACATCCAGAACAACTGGCG**
Ifng (Reverse) TTCCTGAGGCTGGATTCCG	**Isg20 (Reverse) GTAGAGCTCCATTGTGGCCCT**
Il12 (Forward) ACCAAATTACTCCGGACGGT	**Oas3 (Froward) TCTGGGGTCGCTAAACATCAC**
Il12b (Reverse) TGGTCCAGTGTGACCTTCTC	**Oas3 (Reverse) GATGACGAGTTCGACATCGGT**
CHOP (Ddit3) (Forward) AAGCCTGGTATGAGGATCTGC	**TgTubulin (Forward)** TCCTCGCTCCTTTTGATGTC
CHOP (Ddit3) (Reverse) TTCCTGGGGATGAGATATAGGTG	**TgTubulin (Reverse)** ATTGGAGACAATCCCGTCAG
Trib3 (Forward) GCAAAGCGGCTGATGTCTG	**TgSag1 (Forward) CCTCAAGACAACAATCAG**
Trib3 (Reverse) AGAGTCGTGGAATGGGTATCTG	**TgSag1 (Reverse) CACCATTATCACTCGAAG**
Ifnb (Forward) TGGGTGGAATGAGACTATTGTTG	**Rpl13a (Forward) CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA**
Ifnb (Reverse) CTCCCACGTCAATCTTTCCTC	**Rpl13a (Reverse) TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA**
Irf7 (Forward) GAGACTGGCTATTGGGGGAG	
Irf7 (Reverse) GACCGAAATGCTTCCAGGG	

Table 5 – Séquences des différents primers utilisés en RT-qPCR, synthétisées par IDT (abbréviations). Sens 5'->3'.

3.5 Analyse par bioplex des cytokines de la rate

Afin d'estimer la quantité et la production de cytokines dans la rate, des bioplex ont été réalisés. Pour cela, la rate est lysée dans 60µl de lysis buffer (0.5% Chaps (détergent), PBS 1X, Protease inhibitor (1/100e) à l'aide de billes metal (Quiagen, #69989), durant 5 min, à 20Hz. Le lysat est ensuite centrifugé à froid durant 5min, et un test de Bradford est réalisé en suivant le protocole du fournisseur, sur le surnageant pour le dosage protéique. Les Bioplex sont ensuite réalisés grâce au kit Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays, (Biorad), en suivant le protocole fournit, sur une quantité finale de 200µg de protéines.

3.6 Analyse par immunophénotypage des différents stades de maturation des cDC1 spléniques après injection de cytokines

Les solutions contenant les protéines des cytokines suivantes : IFNα, IFNγ et GM-CSF (ThermoFisher) sont préparés le jour-même. Les différentes cytokines (Table 6) sont diluées dans du PBS 1X à une

concentration de 5µg pour 100µl. 100µl de cytokines diluées sont injectés dans des souris WT C57Bl/6 âgées de 8 semaines, à hauteur de 5 souris/cytokines. 5 souris contrôles ont été injectées avec seulement 100µl de PBS 1X. 16h après l'injection, les groupes de souris sont sacrifiées et les rates sont extraites. La rate est digérée, et les splénocytes marqués de manière similaire à celle décrite pour les expériences d'immunophénotypage précédentes, avec le même mélange d'anticorps (cf. 3.1, Table 2). L'acquisition et l'analyse des cellules marquées ont été réalisées sur un cytomètre ARIA IV FACS Symphony (BD Biosciences). Les fichiers FCS ont été analysés avec le logiciel FlowJo v10.10.

Cytokines	Concentration	Fournisseur
Mouse IFN-alpha 2 Recombinant Protein	5µg/100µl/souris	ThermoFisher #14-8312-80
Mouse IFN-γ Recombinant Protein	5µg/100µl/souris	ThermoFisher #315-05-100UG
Mouse GM-CSF Recombinant Protein	5µg/100µl/souris	ThermoFisher #315-03-50UG

Table 6 – Liste des cytokines injectées en souris afin de suivre le processus de maturation des cDC1 spléniques par cytométrie en flux.

3.7 Analyse du priming des T CD8+ dans les rates de souris infectées

Les parasites Pru SAG1-OVA sont préparés comme expliqué dans la partie 1.2, puis irradiés à 120Gy durant 20min. Les souris WT contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 sont infectés à hauteur de 5.10^6 parasites irradiés par souris. 3 semaines plus tard, les souris sont réinfectées avec 1000 parasites vivants afin de booster l'immunité. 7 jours après la seconde immunisation, les rates des souris sont extraites puis marquées comme expliqué dans la partie 3.1, avec un mélange d'anticorps ciblant spécifiquement les lymphocytes T (Table 7), ainsi qu'un marquage TetraOVA (Tetramer Class I iTAg MHC SIINFEKL peptide) afin de suivre le priming des lymphocytes T. Le marquage TetraOVA est quantifié par MFI (Mean Fluorescence Intensity) dans les lymphocytes T CD8+. L'acquisition et l'analyse des cellules marquées ont été réalisées sur un cytomètre spectral Aurora CS (Cytek Bioscience). Les fichiers FCS ont été analysés avec le logiciel FlowJo v10.10.

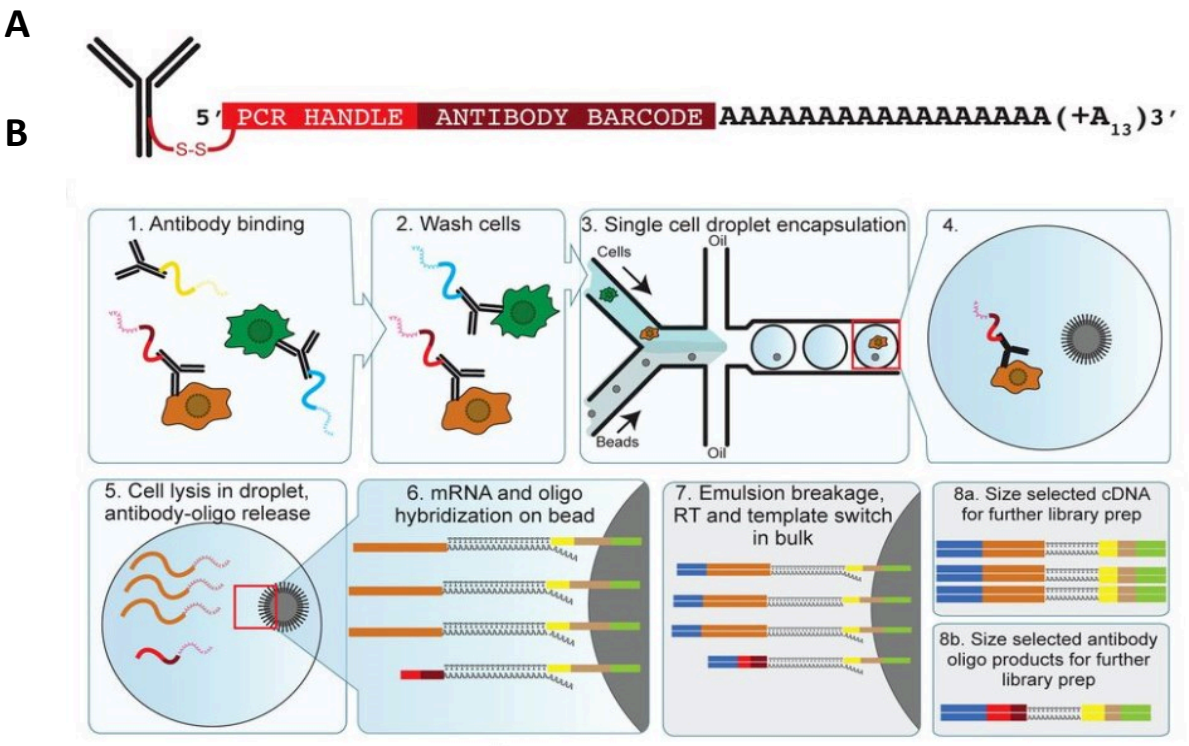
Fluorochrome	Anticorps	Dilution	Fournisseur	Cat#
BUV805	MHCII	600	BD Biosciences	748844
eFluor450	IFNg	100	Thermo Fisher Scientific	48-7311-82
BV480	CD45	400	BD Biosciences	566095
BV711	CD8a	600	BioLegend	100747
PE-Cy5	CD62L	1000	BioLegend	104410
PE-Cy7	CD3	100	BioLegend	100219
AF647	CD4	600	BD Biosciences	557681
APC-eFluor780	L/D	200	Thermo Fisher Scientific	65-0865-14
PE	Tetramer Class I iTAg MHC SIINFEKL peptide	50	Sanbio	TB-5001-1

Table 7 – Liste des anticorps utilisés pour suivre le priming des lymphocytes T de la rate de souris infectées par cytométrie en flux.

3.8 CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing)

- **Généralités**

Cette méthode consiste à marquer les splénocytes en suspension par un mélange d'anticorps liés à un



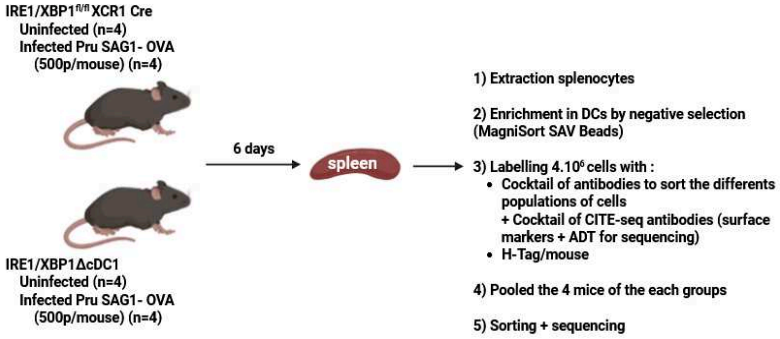
barcode (séquence oligonucléotide) spécifique d'un anticorps donné (Antibody-Derived Tags (ADTs). Chaque cellule est ensuite encapsulée dans une gouttelette contenant une microbille et lysée libérant les ARNm et les ADTs. Chaque microbille porte un plusieurs barcode possédant chacun : (i) une même

signature unique à la bille donc à la cellule, (ii) une séquence d'ADN unique permettant d'identifier chaque ADNc qui va s'hybrider, (iii) une queue polydT permettant d'hybrider les ADT et les ARNm de la cellule (Figure 2 – A). Puis les séquences hybridées aux billes (ADT barcodes et mRNA) sont converties en cDNA par Reverse Transcriptase et amplifiées par PCR. Les cDNA des ADT et des mRNA sont séparées par leur taille pour réaliser les librairies puis regroupées et séquencées ensemble (Figure 2 – B).

Figure 3 - **CITE-seq** : **(A)** Schéma indiquant la composition du barcode possédant, une signature unique à la bille, une séquence ADN unique permettant d'identifier chaque ADNc qui va s'hybrider, une queue polydT permettant d'hybrider les ADT et les ARNm de la cellule. **(B)** Processus de séquençage après tri cellulaire et construction des librairies (Stoeckius and Smibert 2018).

- **Protocole expérimental**

Pour notre expérience, les splénocytes des souris (n= 4 réplicats biologiques / condition) sont extraits 6 jours après l'infection, la population est enrichie en DC par sélection négative (cf. Tri cellulaire), 4.10^6 cellules ont été marquées avec des anticorps FACS (Fluorescence-activated cell sorting) ainsi qu'un panel d'anticorps ciblant les protéines de surface des cellules immunitaires de la rate des souris, comprenant 185 anticorps conjugués à des oligonucléotides (TotalSeq-A, BioLegend) et 9 contrôles isotopiques TotalSeq-A (Figure 4). De plus, un H-tag est attribué aux 4 souris de chaque condition, avant de pooler ces 4 mêmes souris avant le tri cellulaire. Un total par rate de 18 000 cDC1, 3000 cDC2, ainsi que 1000 cellules de chaque population cellulaire splénique (Neutrophiles, Macrophages, Monocytes, cellules NK, Eosinophiles, Basophiles, cellules T et B), ont été triées pour chaque condition constituée d'un pool de 4 souris (Figure 4). Les cDC1 sont triées en plus grand nombre afin de pouvoir différencier les différentes sous-populations de cDC1 représentant un très faible nombre des splénocytes. L'intérêt de trier les autres populations de la rate est d'étudier la modulation de l'environnement des DC, participant à leur maturation et activation. Les cellules triées sont directement placées en carboglace puis envoyées à la plateforme VIB Nucleomics Core (VIB, Université de Gand). Les suspensions cellulaires uniques ont été re-suspendues à une concentration finale estimée de 1000 cellules/µl et chargées sur un instrument Chromium GemCode (10x Genomics). Les bibliothèques scRNA-seq ont été préparées avec le kit 5' Gel Bead and Library v2 (10x Genomics).



Sorting of immune cells populations	Number of cells sorted/ spleen
cDC1	18 000
cDC2	3000
pDC	1000
Neutrophiles	1000
Macrophages	1000
Monocytes	1000
NK cells	1000
Eosinophiles	1000
Basophiles	1000
T cells	1000
B cells	1000

Figure 4 – Schéma résumant le protocole de marquage des splénocytes des souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 et la préparation des échantillons pour le tri cellulaire, ainsi que la quantité de chaque population cellulaire immunitaire triée dans chaque rate de souris.

- **Analyse CITE-seq**

Les bibliothèques ont été séquencées sur un Illumina NovaSeq 6000 avec les paramètres recommandés par 10x Genomics. Les données ont été démultiplexées via Cell Ranger (v7.1.0), les lectures mappées sur le génome de référence (souris mm10-2020-A) avec STAR. Le comptage des gènes et la quantification des lectures CITE-seq ont été effectués. Quatre bibliothèques ont été analysées, représentant 84 605 cellules. Ces objets Seurat ont été fusionnés puis sous-échantillonnés pour ne conserver que les cDC1.

L'analyse des résultats de séquençage a été réalisée par Clint DeNolff ; ingénieur au plateau bioinformatique du VIB-UGhent selon les méthodes décrites ci-dessous.

- **Prétraitement des données**

Le prétraitement de la matrice d'UMI RNA a été effectué avec les packages R `scater` et `scran`, selon le protocole du Marioni Lab. Les cellules aberrantes ont été identifiées selon 3 critères (taille, nombre de gènes exprimés, proportion gènes mitochondriaux). Un premier filtrage a été effectué. Ensuite, l'objet Seurat a été généré et normalisé (log, scale factor = 10 000), les gènes hautement variables identifiés (2000 gènes), la PCA réalisée (jusqu'à 150 composantes principales), et le clustering exploré. DoubletFinder (v2.0.4) a été utilisé pour détecter les doublons restants. Le traitement des données ADT a suivi une normalisation CLR et des analyses PCA/UMAP similaires, avec le même filtrage des

cellules que pour l'ARN. Le nombre optimal de PC pour les données RNA et ADT a été déterminé automatiquement (Résolution de clustering standard : 0.8). L'annotation des sous-populations a été réalisée avec la fonction `FindAllMarkers` de Seurat. L'assay HTO a aussi été normalisé (CLR) et démultiplexé avec `MULTIseqDemux`.Après filtrage des doublons et des cellules de mauvaise qualité, tous les échantillons ont été fusionnés dans un objet unique. Une nouvelle pipeline Seurat a été appliquée avec nettoyage supplémentaire.

- **Intégration des données et correction de batch**

Étant donné les différences importantes entre les échantillons, la correction de batch a été effectuée avec Harmony (v1.2.0), en utilisant les 40 premières PC (valeur $\theta = 2$), sur les données RNA et ADT. Cela a permis une meilleure intégration des cDC1. Les UMAP finaux ont été produits avec 20 (RNA) et 15 (ADT) dimensions corrigées. Une analyse multimodale a été conduite avec le workflow WNN de Seurat. L'objet final contenait 58 306 cellules et 24 clusters annotés. Ensuite, un sous-ensemble cDC1 a été créé et ré-analysé de manière similaire. L'objet final contenait 32 106 cellules, 11 clusters annotés en détail et 7 selon les stades de maturation des cDC1.

- **Analyse différentielle d'état (DS)**

La comparaison entre les cDC1 de souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1 dans les conditions infectées et non infectées a été réalisée avec le package muscat (v1.16.0), en utilisant une approche pseudobulk par sous-population. La méthode DESeq2 a été utilisée, les résultats filtrés selon un p-value ajusté < 0.05 et logFC absolu > 1.

- **Annotation fonctionnelle**

Des analyses d'enrichissement ont été effectuées avec clusterProfiler (v4.10.0), couvrant les ontologies : Voie biologique, Composant cellulaire et Fonction moléculaire, avec un seuil de $p < 0.05$. Les jeux de gènes provenant de muscat ont servi de base à ces analyses.

Résultats

1. Maturation immunogénique des cDC1 *in vivo* après infection par *T. gondii*

1.1 L'infection par *T. gondii* induit une importante expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques

Les résultats obtenus par l'équipe d'accueil avaient montré que l'infection par *T. gondii* induit une augmentation du nombre des cDC1 qui était abolie dans les souris délétées pour IRE1 et XBP1 (Poncet et al, 2021). D'une part, le processus de maturation immunogénique des cDC1 lors de l'infection n'avait pas été étudiée en détail à mon arrivée au laboratoire. D'autre part, notre collaboratrice Sophie Janssens avait mené une étude approfondie du processus de maturation tolérogénique des cDC1 (cf. partie 3 introduction, Bosteels *et al.* 2023). Nous avons donc débuté notre projet par une caractérisation approfondie des différents stades du processus de maturation des cDC1 induite par l'infection à *T. gondii* afin d'identifier quel stade pouvait être régulée par la voie IRE1. Pour cela, une analyse d'immunophénotypage des cellules spléniques, utilisant la cytométrie multiparamétrique, a été réalisée à jour 4, 6, 8 et 10 post-infection (pi) dans des souris WT infectées par une souche parasitaire de type II (Pru-Tomato SAG1-OVA). Nous avons défini les différents stades de maturation par l'utilisation des marqueurs de surface CD62L, CD103, ESAM, CCR7 préalablement identifiés par l'équipe de S. Janssens lors de la maturation tolérogénique (Bosteels *et al.* 2023) (Figure 1).

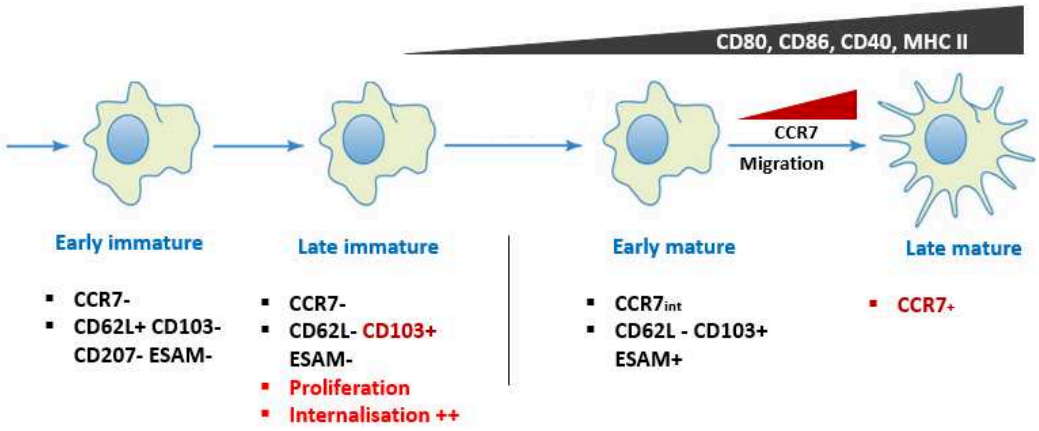


Figure 1 – Les différents stades de maturation tolérogénique des cDC1 spléniques. Les différents stades de maturation et marqueurs associés ont été identifiés par CITE-seq (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes) permettant de combiner l'étude du protéome de surface cellulaire au transcriptome, obtenu par scRNA Sequencing, dans des souris WT après internalisation de cellules apoptotiques (cf Intro ; partie 3 DCs). (Bosteels et al. 2023).

Lors de l'infection, nous avons observé une augmentation transitoire des cDC1 à J6 pi (Figure 2 - A) comme préalablement observé par le laboratoire (Poncet et al. 2021). En détaillant les différents

stades de maturation des cDC1, nous avons observé que cette augmentation correspondait à une expansion importante du sous-type « late immature » (CD62L^{-}/**CD103^{+}**/ESAM$^{+/-}$/CCR7-) qui représentait alors 80% des cDC1 spléniques totales (Figure 2 – B). Cette augmentation était corrélée à une forte diminution des cDC1 « early immature » (**CD62L+/**CD103-/ESAM-/CCR7-) indiquant l'initiation du processus de maturation immunogénique ((Figure 2 – B). Par ailleurs, nous avons observé que le stade « late mature » (CD62L-/CD103+/ESAM+/**CCR7^{+}/CD80^{hi}**), sous-type essentiel qui migre et présente les antigènes parasitaires aux lymphocytes T, ne représentait alors que 10% des cDC1 totales à J6pi. A J8 et J10 pi, nos résultats montraient que le pourcentage des cDC1 « late immature » (CD103+) (Figure 2 – C) restait élevé et que les cellules « late mature » (CCR7+) n'augmentaient que très faiblement avec un total de 15% à J10 pi (Figure 2 – C). Ces premiers résultats ont donc montré que l'expansion des cDC1 que nous avions observé lors de l'infection par *T. gondii* correspond à la prolifération de cellules immatures et non à une augmentation des cellules matures CCR7+. De plus, ces résultats ont suggéré une différence phénotypique entre la maturation tolérogénique et immunogénique des cDC1 spléniques. En effet lors de la maturation tolérogénique l'injection de cellules apoptotiques conduit à une expansion de 30% de cDC1 « late immature » (CD103+), contrairement aux 80% observés en condition immunogénique, et toutes atteignent le dernier stade de maturation « late mature » (CCR7+) au cours du temps, contrairement au faible pourcentage de ce sous-type après infection par *T. gondii* (Bosteels et al. 2023).

1.2 L'infection par *T. gondii* induit une faible expansion du sous-type « late mature »

Afin de déterminer si cette faible quantité de cDC1 « late mature » (CCR7+) pouvait augmenter à des temps plus tardifs d'infection, nous avons mené la même analyse par immunophénotypage dans des souris WT infectées avec 500 parasites Pru-SAG1-OVA, en ajoutant les temps J12 et J20 pi. Nos résultats n'ont pas montré d'augmentation, voire une diminution, de ce sous-type « late mature » à des temps plus tardifs, avec seulement 5% de cDC1 « late mature » (CCR7+) à J12 et 3% à J20 pi (Figure 3 – A).

Nous avons également réalisé une expérience d'infection dose-dépendante en augmentant la quantité de parasites injectés en i.p (10 000p/souris) et en utilisant également une souche de type I RH plus virulente afin d'examiner si ces conditions pouvaient induire une augmentation du nombre de cDC1 « late mature » (CCR7+). Notre analyse par immunophénotypage a montré un pourcentage similaire de cDC1 « late mature » (CCR7+) de 15% quel que soit la dose parasitaire ou la souche injectée (Figure 3 – B). Par ailleurs, nous avons examiné leur activation en mesurant l'intensité d'expression du marqueur de co-stimulation CD80. Nous avons observé une activation importante des cDC1 « late

mature » (CCR7+) avec 500 parasites injectés, comparé à nos souris non infectées, qui reste de niveau similaire avec une plus forte dose parasitaire, et avec notre souche de type I plus virulente (Figure 3 – C).

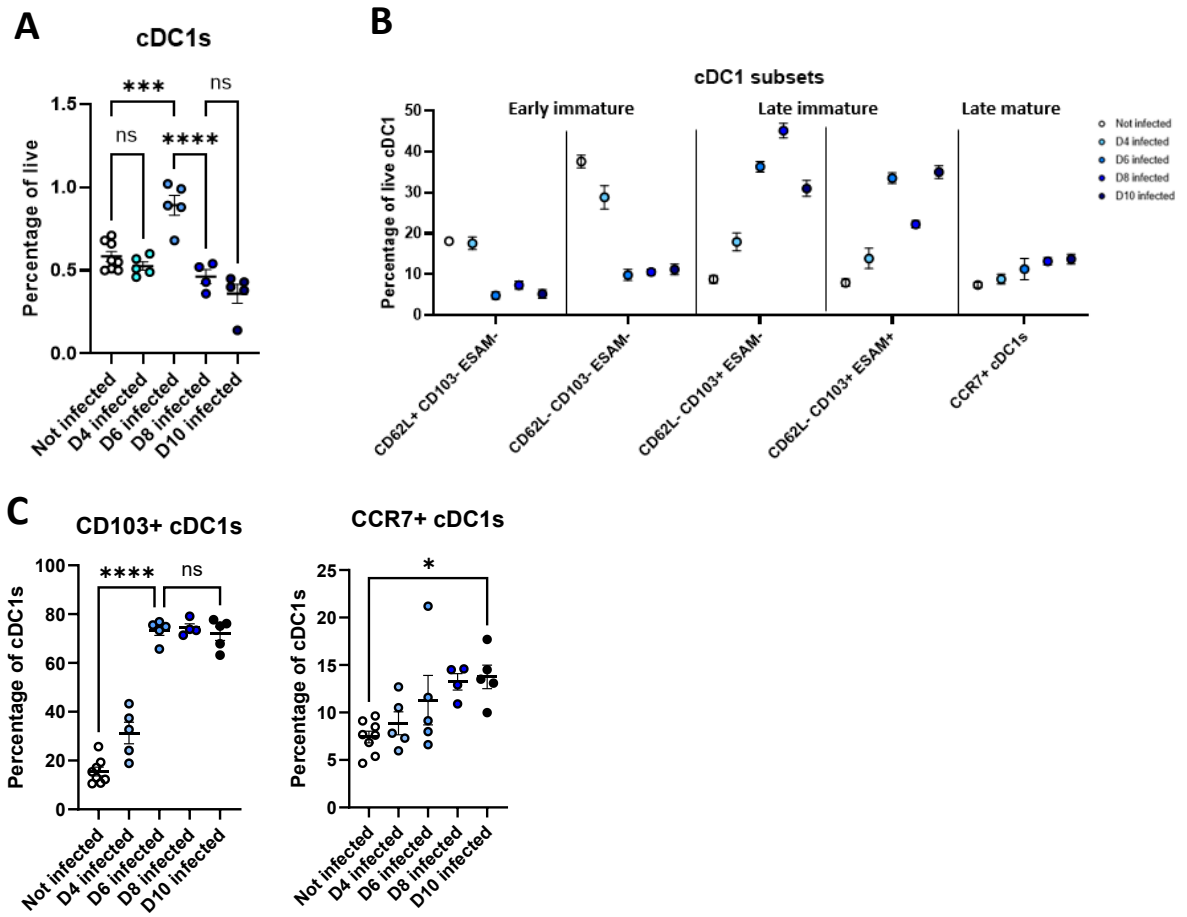


Figure 2 – **L'infection par *T. gondii* induit une importante expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques.** (A) Etude, par cytométrie en flux multiparamétrique, de la fréquence des cDC1 spléniques, dans des souris WT contrôles non infectées et infectées pendant 4, 6, 8 et 10 jours par la souche de type II Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). (B et C), Analyse détaillée des différents stades de maturation des cDC1 spléniques, dont les sous-types majeurs : « early immature » (CD103-), « late immature » (CD103+) et « late mature » (CD103+ / CCR7+). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=5 souris/condition).

Cependant, l'injection par I.V. de STAgs (soluble *T. gondii* antigens) dans des souris WT, induit une maturation rapide et complète des cDC1 avec 60% de cDC1 CCR7+ à 1,5h post-injection, et 100% de cDC1 CCR7+ après 6h (Figure 3 – D).

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'amplitude de maturation immunogénique des cDC1 en cDC1 « late mature » (CCR7+) est « limitée » à une faible proportion des cDC1 qui ont initié leur processus

de maturation lors de l'infection par des parasites vivants et ceci, de manière indépendante de la dose infectante.

Cette faible population de cDC1 matures par rapport à la forte quantité de cDC1 « late immature » (CD103+) lors de l'infection, nous a amené à proposer plusieurs mécanismes hypothétiques régulant le processus de maturation immunogénique. L'augmentation très importante des cDC1 « late immature » (CD103+), majoritaires à J6-J10 pi, pouvait être induite par un stimulus cytokinique provenant de l'environnement inflammatoire et seule la rencontre de ces cDC1 « late immature » avec des antigènes parasitaires (débris ou parasites entiers) stimulerait leur étape finale de maturation immunogénique (induction de leur migration et présentation antigénique dans la zone T). Ce mécanisme impliquait donc que peu de matériel parasitaire atteigne la rate lors de l'infection par des parasites vivants puisque nous retrouvions seulement 15% de cDC1 matures à J6 pi. Cette hypothèse était soutenue par le fait que l'injection par I.V. d'une grande quantité d'antigènes soluble était suffisante pour induire une maturation totale des cDC1 spléniques en quelques heures.

Nous avons également considéré que le parasite pourrait bloquer de manière active les étapes finales de maturation des cDC1 en sécrétant des effecteurs parasitaires, ce qui impliquait à l'opposé que beaucoup de parasites atteignent la rate. Cependant, cette hypothèse n'a pas été soutenue par notre analyse en cytométrie en flux qui a montré un pourcentage extrêmement faible de parasites TdTomato+ détectés dans la rate (voir chapitre M e& M. **Annexe 1**).

Un 2e mécanisme régulateur hypothétique émanant de nos observations était qu'un processus actif (signal intrinsèque ou extrinsèque à la cellule) pouvait bloquer la maturation d'une trop grande quantité de cDC1 « late immature » induite par le stimulus cytokinique afin de limiter la réponse immunogénique, qui, si excessive, pourrait être délétère pour l'organisme. Cette inhibition de maturation finale pouvait être levée pour certaines cellules par la rencontre avec des composants parasitaires.

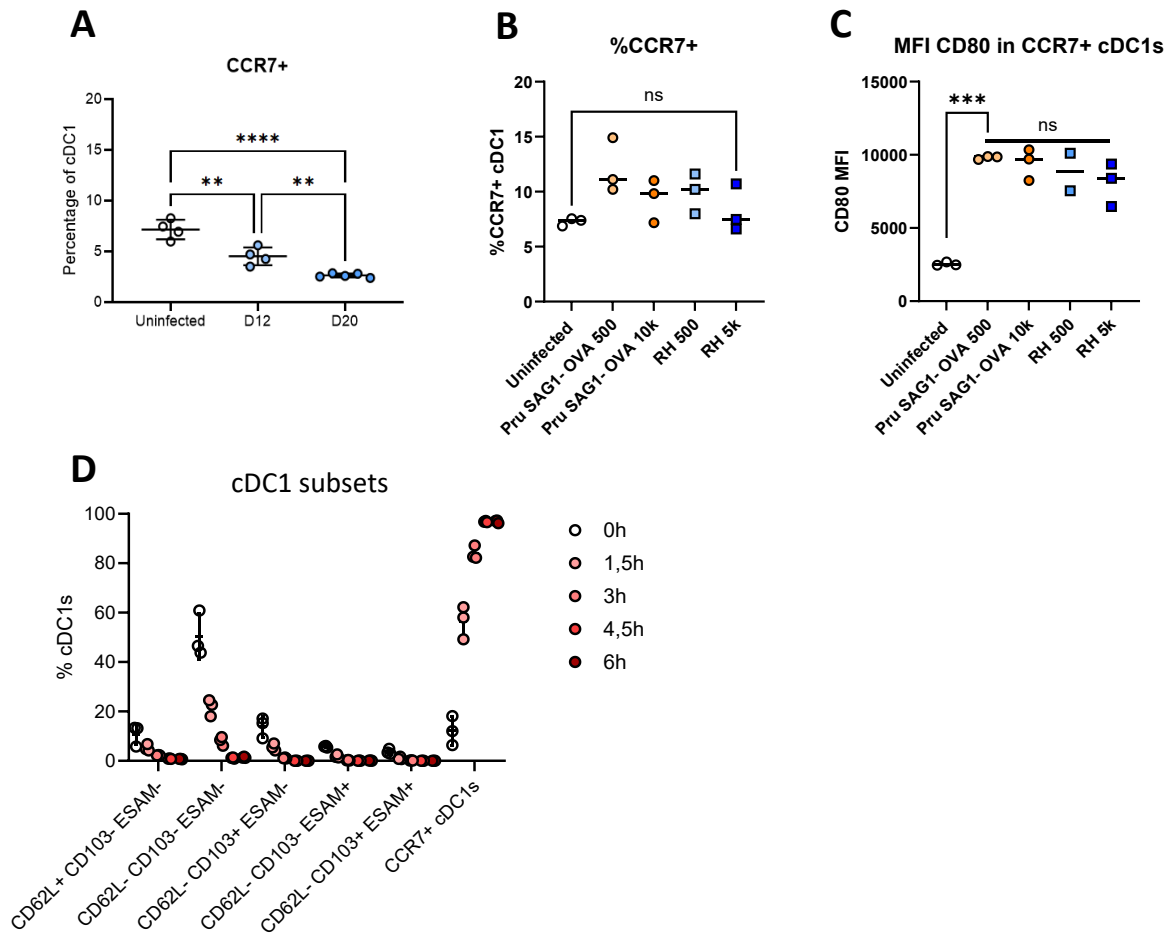


Figure 3 - L'infection par *T. gondii* induit une faible expansion du sous-type « late mature » (CCR7+). (A) Fréquences des cDC1 spléniques « late mature » (CCR7+) déterminées par cytométrie en flux multiparamétrique lors de l'infection des souris WT à des temps plus tardifs (J12 et J20 pi) par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris) (n=5 souris/conditions). (B et C) Fréquence du sous-type cDC1 « late mature » (CCR7+) et quantification de l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 comme marqueur d'activation dans des souris WT infectées par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500 parasites/souris ou 10 000 parasites/souris), ou par une souche de type I RH-YFP (500 parasites/ souris ou 5000 parasites/souris) (n=2-3 souris/condition). (D) Fréquences des différents stades de maturation des cDC1 spléniques déterminés par cytométrie en flux lors d'une cinétique d'injection par I.V de STAgs (Soluble T. gondii Antigens) (25µg/souris) dans des souris WT. Les splénocytes sont extraits après 1.5h, 3h, 4.5h, 6h post-injection (n=3 souris/conditions). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

1.3 L'expression des gènes parasitaires est identifiée uniquement dans les cDC1s spléniques « late mature » (CCR7+)

Afin d'examiner notre hypothèse selon laquelle la rencontre avec le parasite serait nécessaire et suffisante pour induite la dernière étape de maturation des cDC1 en cellules matures CCR7+, nous avons dans un premier temps réalisé des RT-qPCR visant à détecter l'expression de certains gènes parasitaires. Pour cela, nous avons trié les cDC1 CD103+ / CCR7- ou CCR7+ à partir de la rate de souris

WT infectées pendant 6 jour par la souche Pru Tomato SAG1-OVA. Nous avons détecté l'expression des gènes parasitaires *TgTubulin* et *TgSAG1* uniquement dans la sous-population de cDC1 « late mature » (CCR7+) et non dans la population des cDC1 immatures CCR7-, confortant ainsi notre hypothèse (Figure 4).

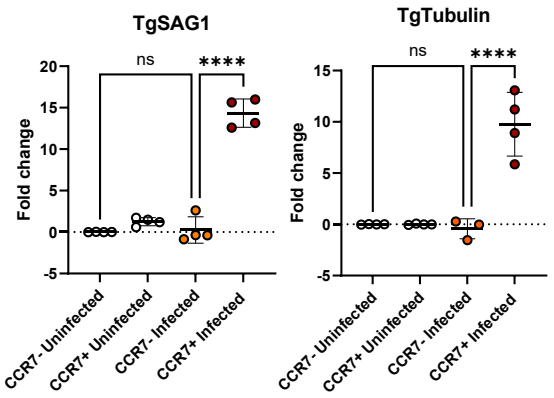


Figure 4 – L'expression des gènes parasitaires est détectée uniquement dans les cDC1 spléniques « late mature » (CCR7+) au cours de l'infection. Etude de l'expression des transcrits de deux gènes parasitaires *TgSag1* et *TgTubulin* par RT-qPCR dans les cDC1 CCR7- et CCR7+ triées, après réalisation d'un enrichissement en DC à partir de rates de souris WT non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris) (n=4 souris/conditions). Les résultats sont exprimés en Fold Change, et sont normalisés par rapport au gène de ménage *Hprt*. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

1.4 Identification du signal parasitaire dans les cDC1 « late mature » (CCR7+) dans des souris Ai6 infectées.

Par ailleurs, toujours dans l'idée de notre hypothèse que la rencontre avec du matériel parasitaire est nécessaire à la dernière étape de maturation des cDC1 spléniques, nous avons réalisé une expérience d'immunophénotypage comme dans les précédentes expériences, dans des souris Ai6. Pour cette expérience, nous avons utilisé une souche transgénique du parasite qui sécrète via les rhoptries la protéine de fusion : Toxofilin-Cre lors de l'invasion de la cellule hôte (Koshi *et al*. 2010). En effet, lorsque le parasite vivant rencontre la cellule hôte, il sécrète grâce aux rhoptries la protéine Toxofilin-Cre qui est transloquée dans le noyau grâce à une cassette NLS (Nuclear localization sequence) (voir aussi le chapitre M&M pour le modèle expérimental). Nous avons infecté des souris Ai6 qui expriment la protéine ZsNeon green flanquée de sites LoxP, induisant un signal GFP uniquement dans les cellules où la protéine Cre excise les loxP, donc ici uniquement dans les cellules

qui ont été envahies par le parasite ou qui sont entrées en contact avec un parasite vivant sécrétant la Toxofilin-Cre. Notre but était d'identifier le ou les sous-types de cDC1 qui sont entrées en contact avec le parasite vivant (devenant GFP+). Les souris Ai6 ont été infectées avec une forte dose parasitaire (10 000p/souris) de la souche Pru Toxofilin-Cre, étant donné que nos premières expériences avec la dose habituelle de 500 parasites / souris n'avaient révélé aucun signal GFP détectable par cytométrie en flux dans les cDC1. Nous avons également infecté des souris Ai6 avec notre souche Pru SAG1-OVA, afin d'avoir un contrôle négatif n'exprimant pas la recombinase Cre.

Les différents sous-types de cDC1 ne représentant qu'un très faible pourcentage des cellules de la rate (0,05% pour les cDC1 CCR7+), nous avons en amont de l'analyse et après 6 jours d'infection, réalisé un enrichissement en DC par sélection négative afin de concentrer nos populations cellulaires d'intérêt.

Nous n'avons observé aucun signal GFP dans les populations de cDC1 provenant des souris Ai6 infectées par la souche Pru n'exprimant pas la Cre recombinase (Figure 5 – A). Les souris infectées par la souche Pru Toxofilin-Cre, présentaient un signal GFP dans les sous-types CD103+/ CCR7- et CCR7+, mais de manière plus élevée dans les cDC1 « late mature » (CCR7+), avec 0.04% de CD103+ GFP positives et 0.2% pour les CCR7+ (Figure 5 – A). Ces résultats suggéraient qu'une très faible proportion de cDC1 matures pouvait avoir été en contact avec le parasite vivant et donc que la maturation finale se ferait également par détection de débris parasitaires. Cependant, nous avons observé un signal GFP+ dans les cellules immatures, contredisant notre expérience de RTqPCR précédente (Figure 5 – B). Il est important cependant de souligner que le système Ai6/parasite Cre présente des limitations importantes, qui exigent de prendre ces résultats avec beaucoup de précautions. Notamment, de nombreuses expériences d'infection ont été réalisées utilisant différentes conditions, cependant le pourcentage de cellules GFP+ dans la rate est toujours resté très faible, quelle que soit la dose parasitaire injectée ou la voie d'injection. De plus, des expériences contrôles *in vitro* réalisées avec des BMDC différentiées à partir de souris Ai6 ont montré que seulement 20% des DC infectées deviennent GFP positives suggérant que l'activité de la Cre recombinase n'est pas optimale après invasion des cellules par le parasite (Figure 5 – C).

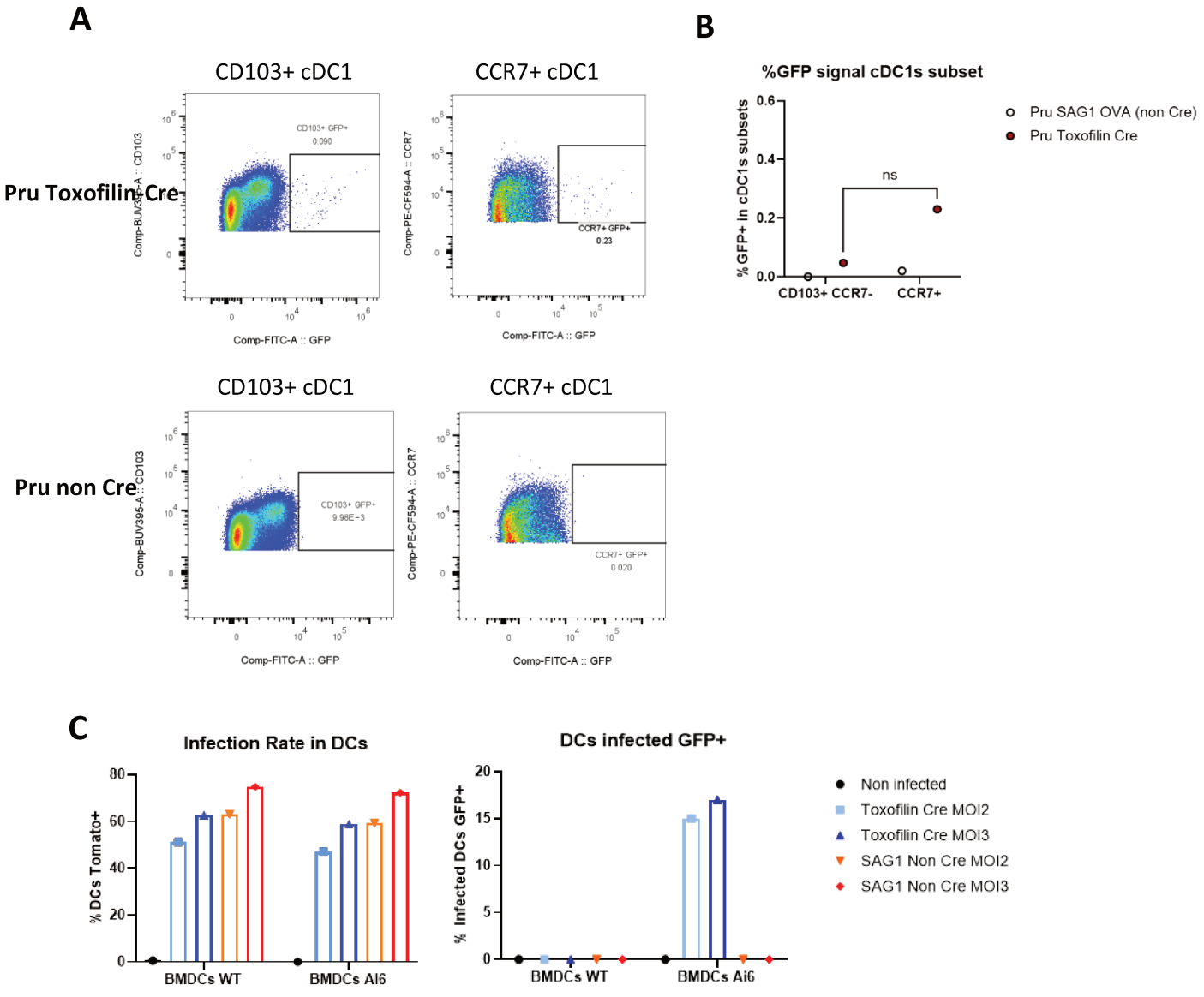


Figure 5 - Identification du signal GFP dans les cDC1 « late mature » (CCR7+) des souris Ai6 infectées. **(A)** Dot plot montrant le pourcentage de cellules GFP+ au sein des deux stades « late immature (CD103+) et « late mature (CCR7+) des cDC1 spléniques dans les souris Ai6 infectées par la souche Pru SAG1-OVA Tomato non Cre (haut) et par la souche Pru Toxofilin-Cre (bas). **(B)** Fréquences des cDC1 « late immature » (CD103+) et « late mature » (CCR7+) positives pour le signal GFP (10kp/souris) (n=1 souris/condition). **(C)** Etude du signal GFP par cytométrie en flux dans des BMDCs issues de souris Ai6, infectées par les souches Pru SAG1-OVA ou Pru Toxofilin Cre pendant 16h.

1.5 La stimulation des TLR est nécessaire pour atteindre le dernier stade de maturation (CCR7+) des cDC1 spléniques

Afin de continuer d'explorer et de conforter l'hypothèse de la nécessité de la rencontre des cDC1 avec le parasite pour atteindre leur stade final de maturation (CCR7+), nous avons réalisé des

souris chimères délétées pour l'adapteur MyD88 uniquement dans les cellules dendritiques (MyD88$^{fl/fl}$ CD11c Cre). Notre but était d'examiner si le blocage de la signalisation induite par la détection des antigènes parasitaires par les TLR bloquait l'étape finale de maturation des cDC1. Pour cela nous avons irradié nos souris receveuses afin de détruire la moelle osseuse de départ, nous avons ensuite injecté un mélange de moelle osseuse : 50% de moelle osseuse de souris WT et 50% de moelle osseuse provenant de souris MyD88$^{fl/fl}$ CD11c-Cre. Nous avons choisi de réaliser des souris chimères possédant des cDC1 sauvages afin de préserver la production de cytokines pro-inflammatoires lors des stades précoces de l'infection, permettant ainsi la mise en place des étapes précoces de la réponse immunitaire, et notamment l'initiation du processus de maturation des cDC1. Les souris chimères ont été infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA avant d'en extraire les splénocytes. Nos résultats ont montré qu'un processus de maturation similaire aux souris WT (Figure 6– A) était initié jusqu'au stade « late immature » avec une forte expansion du sous-type (CD103+/CCR7-), représentant alors 80% des cDC1 dans les souris chimères MyD88$^{fl/fl}$ WT et MyD88ΔCD11c (Figure 6 – B). Cependant, la maturation finale en cDC1 « late mature » (CCR7+) n'a plus été observée dans les souris MyD88ΔCD11c, contrairement aux souris MyD88$^{fl/fl}$ WT (Figure 6 – C).. De plus, nous avons également observé une diminution de l'activation de ces cDC1 « late mature », avec une diminution de l'expression du marqueur d'activation CD80 dans les souris MyD88ΔCD11c infectées (Figure 6 – C). Ces résultats ont donc démontré que la stimulation des TLR n'est pas nécessaire à l'expansion des cDC1 immatures mais est nécessaire pour induire le dernier stade de maturation des cDC1 (cellules CD103+/CCR7+) lors de l'infection par *T. gondii*, confortant l'hypothèse que la rencontre avec des composants parasitaires est nécessaire à cette étape.

1.6 L'infection par *T. gondii* entraîne une importante expression des cytokines pro-inflammatoires dans la rate

L'ensemble de ces résultats nous a permis de dresser un premier modèle de travail : la première vague de maturation corrélée à la prolifération des cDC1 « late immature » (CD103+) pourrait dépendre d'un signal cytokinique circulant ou provenant des cellules avoisinantes de la rate. L'étape finale de maturation dépendrait de la rencontre des cellules immatures avec des molécules parasitaires atteignant la rate en faible quantité.

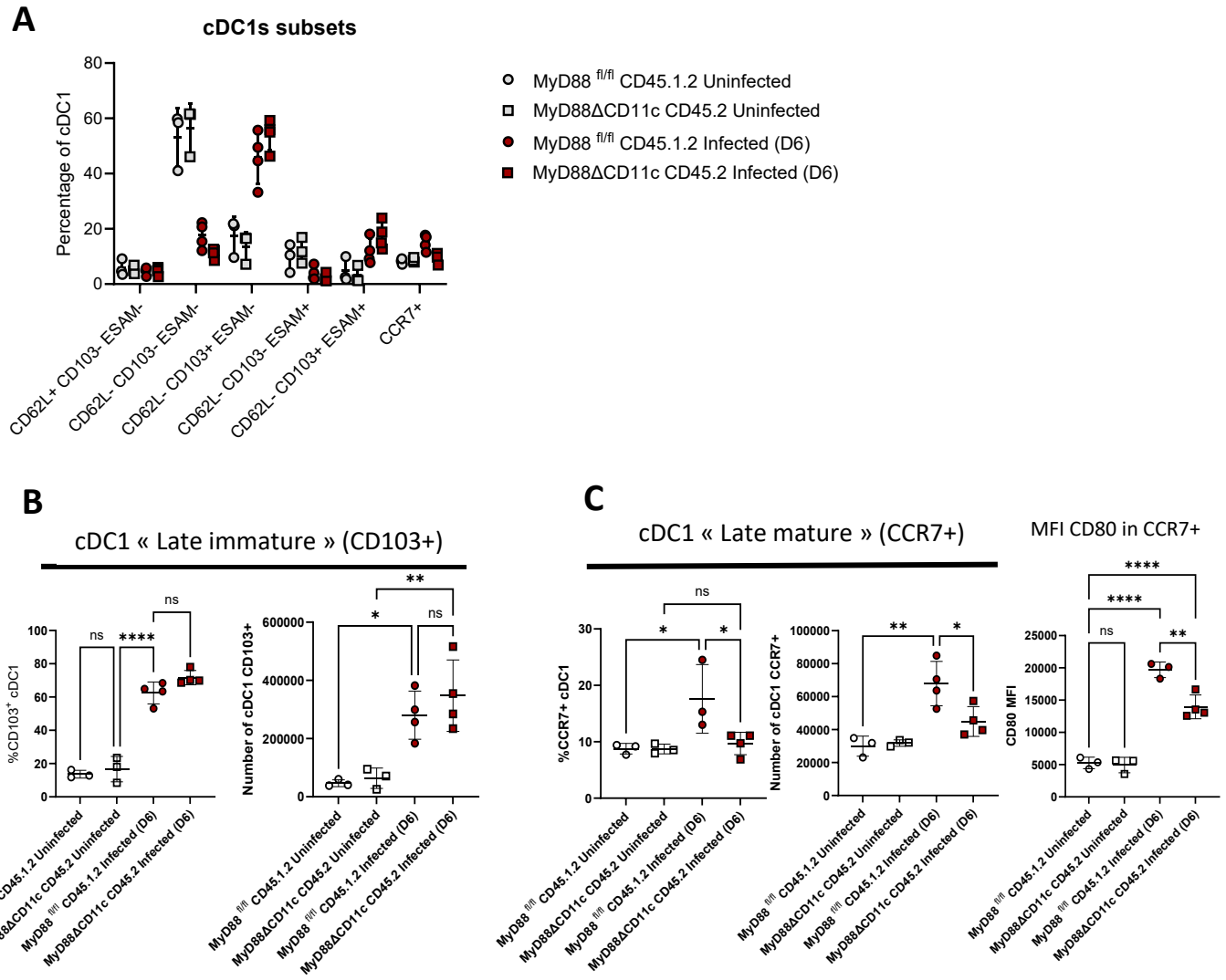


Figure 6 - **La reconnaissance du parasite via l'adapteur des TLR MyD88 est nécessaire pour atteindre le dernier stade de maturation (CCR7+) des cDC1 spléniques. (A)** Fréquences des différents stades de maturation des cDC1 spléniques déterminés par cytométrie en flux multiparamétrique dans des souris chimères MyD88$^{fl/fl}$ ou MyD88ΔCD11c CD45.**2** non infectées et infectées pendant 6 jours avec la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). **(B et C)** Fréquence et nombre du sous-type « late immature » (CD103+) **(B)** et du sous-type « late mature » (CCR7+), ainsi que la quantification de l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 **(C),** déterminés par cytométrie en flux multiparamétrique dans les souris chimères contrôles et MyD88ΔCD11c CD45.2 non infectées ou infectées par la souche Pru SAG1-OVA (500p/souris) pendant 6 jours (n=4 souris/conditions). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Afin de déterminer quelles cytokines de l'hôte pouvaient être engagées dans l'induction de la première vague de maturation, nous avons réalisé des RT-qPCR (Figure 7 – A) et des Bioplex (Figure 7 – B) sur des lysats de rates de souris WT infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato sur des cytokines majeures impliquées dans la réponse immunitaire contre *T. gondii,* notamment l'IL-12 et l'IFNγ, mais également le GM-CSF, connu pour être impliqué dans l'activation et la prolifération

des cDC1 lors d'un stimulus inflammatoire (Van de Laar *et al*. 2012). Nous avons observé une augmentation des cytokines IL-6, IL-12, IFNγ et GM-CSF au niveau des transcrits (Figure 7 – A) et des protéines (Figure 7 – B) suite à l'infection.

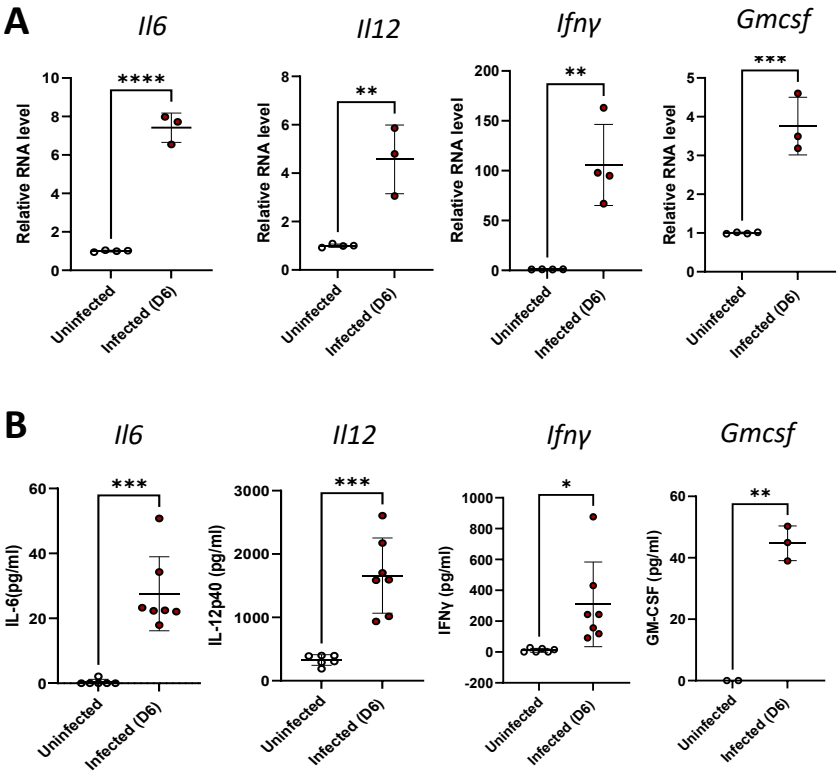


Figure 7 – **L'infection par *T. gondii* entraîne une augmentation d'expression et de production des cytokines pro-inflammatoires.** Analyses par RT-qPCR (A) ou par Bioplex (B) de l'expression des gènes et de la quantité protéique des cytokines IL-12, IL-6, IFNγ et GM-CSF dans des lysats de rate des souris WT non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). Les résultats sont exprimés en expression relative d'ARN comparé aux souris contrôles non infectées, et normalisés sur le gène de ménage *Hprt*. (A) (n=3/4 souris/conditions), (B) Pool de deux expériences indépendantes (n=4 souris/conditions/ expériences). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

1.7 L'injection de GM-CSF induit l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+)

Afin d'éprouver l'hypothèse selon laquelle un signal cytokinique serait nécessaire à l'expansion du sous-type de cDC1 « late immature » (CD103+), et notamment le GM-CSF augmenté dans la rate des souris infectées, nous avons injecté les cytokines suivantes : IFNα, IFNγ et GM-CSF, dans des souris WT afin d'observer leur impact sur le processus de maturation des cDC1 spléniques, incluant un groupe de souris « contrôle » recevant seulement du PBS.

Nos résultats ont montré que l'injection de PBS, IFNα et IFNγ n'induisait pas le processus de maturation des cDC1 spléniques (Figure 8 - A). Cependant, l'injection de GM-CSF entraînait une

expansion modérée du sous-type « late immature » (CD103+) passant de 10-15% après injection de PBS à 30% après injection de GM-CSF (Figure 8 - B). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le GM-CSF contribuerait à l'expansion du sous-type de cDC1 « late immature » (CD103+). Par ailleurs, aucune modulation n'a été observée pour le sous-type « late mature » (CCR7+) après injection de GM-CSF et d'IFNγ, représentant 5% des cDC1 totales, de manière similaire aux souris contrôles (PBS) (Figure 8 - B). De manière intéressante, l'injection d'IFNα induisait une expansion du sous-type « late mature » (CCR7+) représentant alors 15% des cDC1, comparé aux 5% observés dans les conditions contrôles. Ces résultats suggèrent donc une implication des interférons de type I dans le processus de maturation des cDC1 spléniques « late mature » (CCR7+).

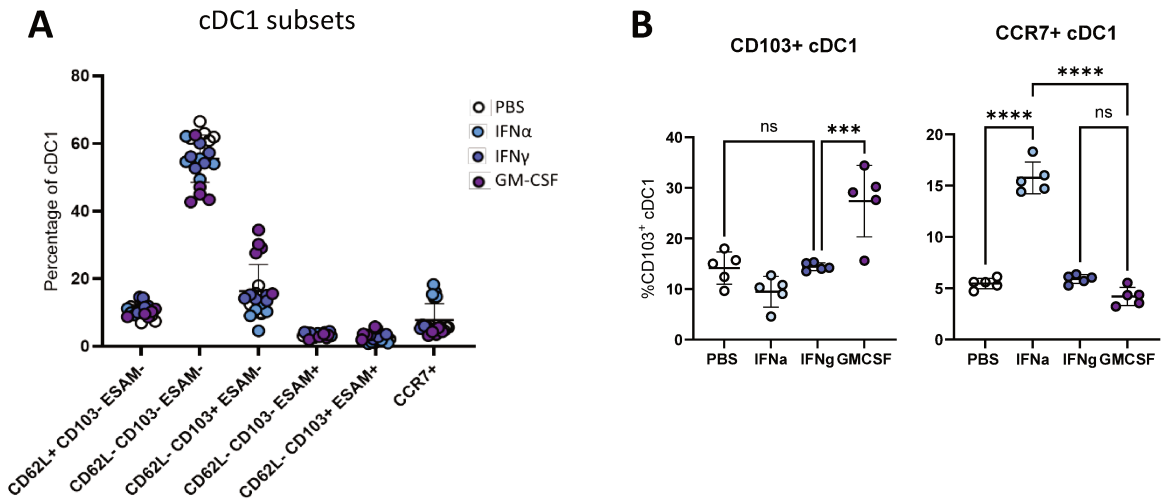


Figure 8 - L'injection de GM-CSF induit l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) dans la rate. (A) Fréquence des différents stades de maturation des cDC1 spléniques, **(B)** Fréquence des sous-types « late immature » (CD103+) et « late mature » (CCR7+) déterminées par cytométrie en flux dans des souris WT contrôles injectées avec du PBS ou injectées avec de l'IFNa, l'IFNg, et du GM-CSF (n=5 souris/conditions). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=5 souris/condition).

1.8 La voie de l'IFNβ n'est pas impliquée dans la prolifération des cDC1 spléniques infectées par *T. gondii*

Au vu des résultats précédents et afin d'examiner le potentiel rôle des interférons de type I dans le processus de maturation immunogénique des cDC1 spléniques lors de l'infection à *T. gondii*, nous avons réalisé un tri des différents sous-types de cDC1 à partir de la rate de souris WT infectées pendant 6 jours par la Pru SAG1-OVA. De manière intéressante, nous avons observé une forte induction de l'expression du gène codant pour l'IFNβ ainsi que des gènes induits en aval de l'IFNβ, appelés aussi ISG (IFN-stimulated genes), dont Ifit1, Ifit2, Ifi47, Isig20 et Oas3, dans le sous-type

CD103+/CCR7-. (Figure 9 – A). Ceci suggère que ces cellules même à un stade immature (et potentiellement avant la rencontre avec l'antigène), sécrètent cette cytokine connue pour activer leurs fonctions (Liang et al. 2021, Mattiuz et al. 2021). De plus, ces résultats peuvent être mis en corrélation avec l'étude de S. Janssens sur la maturation tolérogénique des cDC1, qui a montré une induction transitoire de la voie de l'IFNβ, avec une expression importante dans le sous-type « late immature » (CD103+/CCR7-), mais qui n'est plus observée dans les cDC1 « late mature » (CCR7+) (Bosteels et al. 2023).

Afin de tester le rôle intrinsèque que pouvait avoir cette cytokine sur le profil de maturation des cDC1, nous avons réalisé une analyse par immunophénotypage (similaire à celle réalisée précédemment pour MyD88) dans des souris chimères IFNAR1 KO (délétées pour le récepteur des interférons de type I) spécifiquement dans les DC (IFNAR1$^{fl/fl}$ CD11c-Cre). Après 6 jours d'infection par la souche Pru SAG1-OVA, nos résultats ont montré un processus de maturation des cDC1 spléniques identique à celui observé précédemment dans les souris WT, avec une expansion importante du sous-type « late immature » (CD103+) représentant 80% des cDC1 dans les souris IFNAR1ΔCD11c infectées et les souris contrôles (Figure 9 – B et C). Concernant, le sous-type « late mature » (CCR7+), nous n'avons pas observé de modulation dans le pourcentage de ce sous-type lors de l'infection dans les souris contrôles et IFNAR1ΔCD11c (Figure 9 – D), suggérant que l'IFNβ ne joue pas de rôle dans la très faible expansion de ce sous-type mature. Cependant, un taux plus faible de cDC1 CCR7+ a été mesuré au sein de cette expérience par rapport à nos expériences précédentes, qui a ensuite été identifié comme étant causé par un problème de marquage avec l'anticorps anti-CCR7. Cette expérience sera donc répétée afin de confirmer ces premiers résultats. De plus, le sous-type « late mature » (CCR7+) ne présentait pas de défaut d'expression de la molécule de co-stimulation CD80 qui augmente de manière similaire avec l'infection dans les souris contrôles et IFNAR1ΔCD11c (Figure 9 – D).

Ces résultats ont donc montré donc que la signalisation par les interférons de type I n'est pas impliquée dans l'expansion des cDC1 immatures bien que ces dernières expriment fortement cette cytokine et les gènes induits en aval de l'IFNAR. Ceci suggère donc que cette signalisation par les IFN-I pourrait avoir un rôle dans la régulation de leurs fonctions mais pas dans leur prolifération.

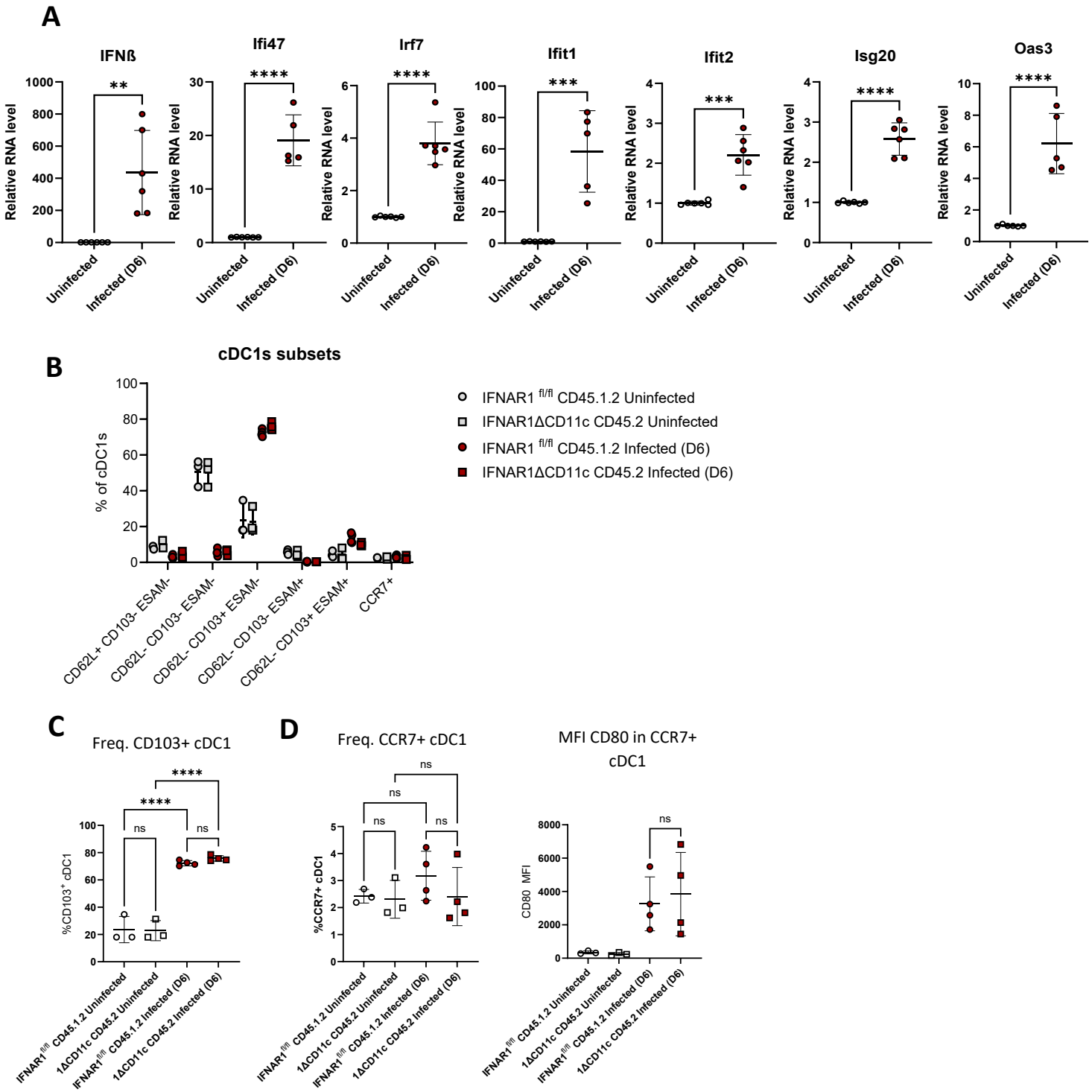
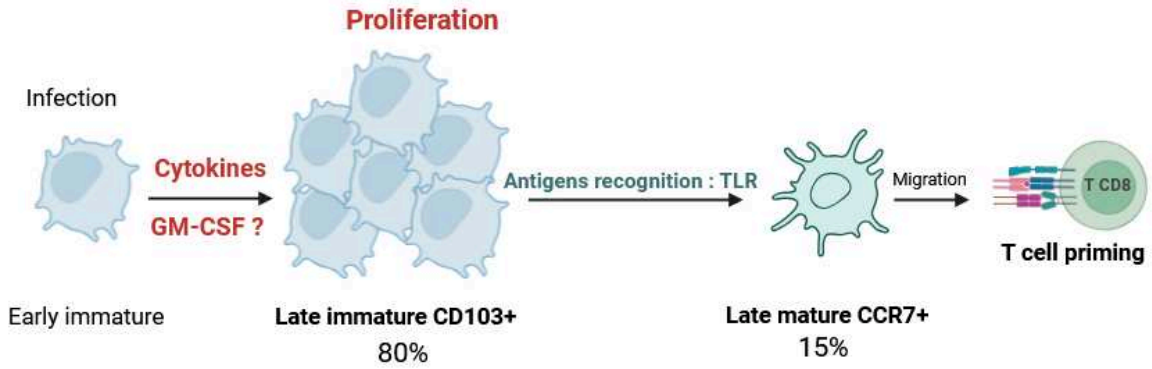


Figure 9 - **La voie de l'IFNβ n'est pas impliquée dans la prolifération des cDC1 spléniques infectées par *T. gondii*. (A)** Etude de l'expression des transcrits des gènes de la voie IFNb par RT-qPCR dans les cDC1s « late immature » (CD103+) triées, après réalisation d'un enrichissement en DC des splénocytes extraits de rates de souris WT non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris) (n=6 souris/conditions). Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARN, et ont été normalisés en fonction du gène de ménage *Rpl13a*. Unpaired Student T-test ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001. **(B)** Fréquences des différents stades de maturation des cDC1 spléniques déterminés par cytométrie en flux multiparamétrique dans des souris chimères IFNAR1$^{fl/fl}$ ou IFNAR1ΔCD11c CD45.2 non infectées ou infectées par la souche Pru SAG1-OVA (500p/souris) pendant 6 jours. **(C)** Fréquence des sous-types « late immature » (CD103+) et « late

mature » (CCR7+), ainsi que la quantification de l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 dans ces cellules des souris chimères IFNAR1$^{fl/fl}$ ou IFNAR1ΔCD11c CD45.2 non infectées ou infectées par la souche Pru SAG1-OVA (500p/souris) pendant 6 jours, obtenus par cytométrie en flux multiparamétrique. (n=3/4 souris/condition). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Résumé première partie :

Caractérisation du processus de maturation immunogénique des cDC1 spléniques lors de l'infection par *T. gondii*.



Pour résumé cette première partie du projet sur la caractérisation du processus de maturation des cDC1 spléniques lors de l'infection à *T. gondii*, nous avons identifié deux grandes vagues de maturation des cDC1. Tout d'abord, nos résultats ont permis de proposer que la première vague de maturation serait initiée par un signal cytokinique intrinsèque ou extrinsèque à la cellule et non pas par la détection de composants parasitaires. Notamment, l'injection de GM-CSF dans des souris WT induit une expansion du sous-type « late immature » (CD103+) suggérant son implication dans le processus de maturation de cette première vague de cellules immatures. Par ailleurs, ce sous-type « late immature » (CD103+) est caractérisé par l'expression importante des gènes de la voie de l'IFNβ, voie qui n'est pas impliquée dans l'expansion de ce sous-type mais probablement dans la régulation de certaines activités ou fonctions qui restent à être identifiées. Concernant la deuxième vague de maturation des cDC1 « late mature » (CCR7+), il semblerait que la rencontre avec le parasite ou des débris parasitaires soit nécessaire pour initier cette dernière étape de maturation, ceci ayant été confirmé i) par la détection de l'expression des gènes parasitaires TgSAG1 et TgTubulin uniquement dans le sous-type « late mature », et ii) par le défaut de maturation et d'activation de ce sous-type lors de la délétion de l'adapteur des TLR MyD88. De manière intéressante, l'expansion de ce sous-type « late mature » (CCR7+) reste limitée à une très faible proportion lors de l'infection par des parasites vivants comparé à leur maturation complète en présence de STAgs. Ces résultats suggèrent qu'un

mécanisme régulateur qui reste à être identifié pourrait soit limiter la maturation d'une trop grande quantité de cellules CCR7+ qui migrent dans la zone T, soit que les cellules immatures jouent un rôle important dans l'activation précoce des LT avant leur migration. .

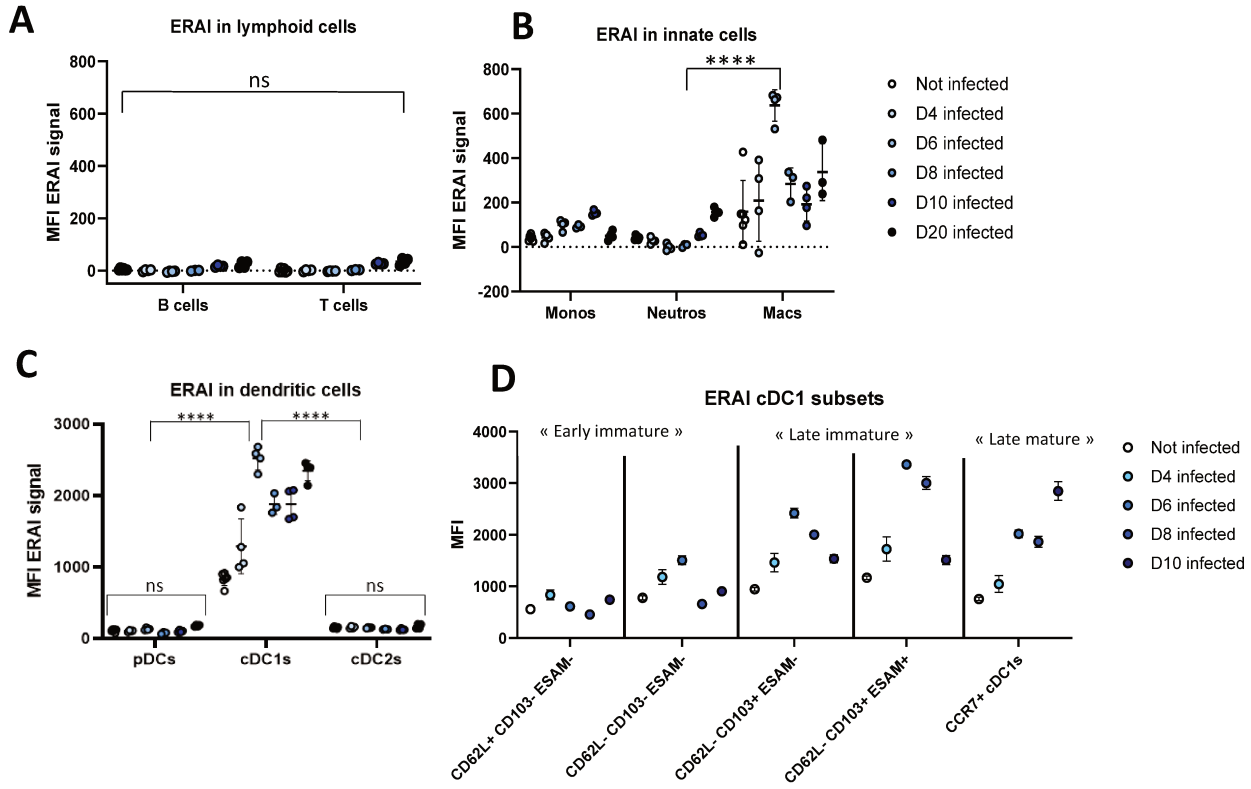
2. Rôle de la voie IRE1 de l'UPR dans la maturation immunogénique des cDC1 spléniques

2.1 La voie IRE1 de l'UPR est activée dans les cDC1 « late immature » et « mature » lors de l'infection par *T. gondii*

Afin de corréler le processus de maturation des cDC1 avec l'activation de la voie IRE1, nous avons utilisé des souris ERAI rapportrices de l'activité de IRE1 (cf. M&M pour la description du modèle). Ces souris sont génétiquement modifiées pour surexprimer une version partielle du gène *Xbp1* fusionné au gène codant pour la protéine fluorescente Venus (VenusFP). Lors d'un stress du RE, l'épissage de *Xbp1* induit par IRE1 activé permet l'expression d'une protéine chimérique XBP1s-VenusFP. Ce système nous a permis d'étudier l'activation de IRE1 par cytométrie en flux dans les cellules de la rate dans les souris contrôles non infectées et infectées par la souche Pru SAG1-OVA TdTomato (500parasites/souris). Nous avons réalisé une cinétique d'infection, afin d'observer plus spécifiquement la modulation de l'expression de la voie IRE1, en quantifiant le signal ERAI dans les différentes populations de la rate. De manière intéressante, nous n'avons observé aucune expression de la voie IRE1 dans les cellules lymphocytaires (Figure 10 – A), à tous les temps d'infection étudiés. De même, nous n'avons observé aucune expression de la voie IRE1 dans les monocytes et les neutrophiles (Figure 10 – B), cependant une activation de la voie IRE1 était détectée dans les macrophages, avec une expression de la GFP-Venus plus importante à J6 pi (Figure 10 -B). L'étude de l'activation de la voie IRE1 a également indiqué que seules les cDC1 présentaient une expression importante du signal ERAI, qui n'était pas observé ni dans les pDC, ni dans les cDC2s (Figure 10 – C). Ces résultats étaient en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire (Poncet et al. 2021). Cette activation de IRE1 dans les cDC1 était bien plus importante que celle observée dans les macrophages et maximale à J6 pi, temps d'infection où l'expansion des cDC1 est aussi maximale (Figure 2). Le signal ERAI diminuait légèrement dans les cDC1 à partir de J8 (Figure 10 – C).

En étudiant plus en détail l'activation de la voie IRE1 dans les différents stades de maturation des cDC1, nous avons pu observer que la voie IRE1 était activée dans le sous-type « late immature » (CD103+), sous-type majoritaire des cDC1 de J6-J10 pi (Figure 10 – D). De manière intéressante, une activation (un peu moins élevée) de la voie IRE1 était également observée dans les stades plus tardifs de maturation des cDC1 « late mature » (CCR7+) à J8 et J10 pi (Figure 10 – D). Ces résultats suggéraient donc un rôle de IRE1 à différentes étapes du processus de maturation des cDC1, pouvant être corrélé à la régulation possible par la voie IRE1 de différentes fonctions cellulaires des cDC1.

Figure 10 – La voie IRE1 est exprimée de manière plus importante dans les cellules dendritiques conventionnelles de type I dès jour 6 post-infection. Fréquences des différentes populations cellulaires spléniques positives pour le signal ERAI déterminées par cytométrie en flux multiparamétrique lors d'une cinétique d'infection dans des souris ERAI non infectées et infectées par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris) : les cellules lymphoides (Lymphocytes B/ Lymphocytes T) **(A)**, les cellules leucocytaires (Monocytes, Neutrophiles, Macrophages) **(B)**, ainsi que les différents sous-types de cellules dendritiques (pDCs, cDC1s, cDC2s) **(C),** et les différents stades de maturation des cDC1 **(D).** Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=4-5 souris/condition).



2.2 L'induction de la voie IRE1 est essentielle pour la survie des souris lors de l'infection par *T. gondii*

Afin d'évaluer si et comment le programme de maturation immunogénique des cDC1 induit par *T. gondii* était modulé par la voie IRE1, nous avons effectué une analyse par immunophénotypage (similaire à celle menée dans les souris WT) dans des souris déficientes pour IRE1 et XBP1 spécifiquement dans les cDC1 (IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre, XCR1 étant spécifiquement exprimé par les cDC1) (cf. M&M pour la construction du modèle murin). Les précédentes études avaient été réalisées dans le modèle de souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ CD11c-Cre, contestable car le marqueur CD11c est exprimé par d'autres types cellulaires que les cDC1 et manquait donc de spécificité pour notre étude de l'activation de la voie IRE1 dans les cDC1. Ainsi, nous avons changé pour un modèle de souris dans lequel la recombinase Cre est sous l'influence du promoteur régulant l'expression de la protéine XCR1, exprimée uniquement dans les cDC1. Dans un premier temps, afin d'étudier si des résultats similaires

aux souris IRE1/XBP1 $^{fl/fl}$ CD11c-Cre (Poncet *et al*. 2021) étaient obtenus dans ce nouveau modèle, nous avons réalisé plusieurs expériences préliminaires. D'une part, nous avons réalisé une courbe de survie, après infection des souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre en parallèle de souris contrôles. Comme pour les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ CD11c-Cre, nous avons observé une sensibilité accrue à l'infection des souris IRE1/XBP1 KO, avec 100% de mortalité à jour 12 pi (Figure 11 – A). D'autre part, nous avons infecté les souris et récupéré la rate à J6 pi, afin d'examiner par RT-qPCR l'expression de cytokines pro-inflammatoires induites lors de l'infection. La délétion de IRE1/XBP1 spécifiquement dans les cDC1, entraînait une diminution de l'expression de l'IL-12 et de l'IFNγ, deux cytokines jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre *T. gondii*, ce qui avait été également observé dans le premier modèle de souris CD11c-Cre (Figure 11 – B) (Poncet *et al*. 2021). Ces premiers résultats suggéraient que l'activation de la voie IRE1 dans les cDC1 est essentielle pour la survie des souris face à l'infection, et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

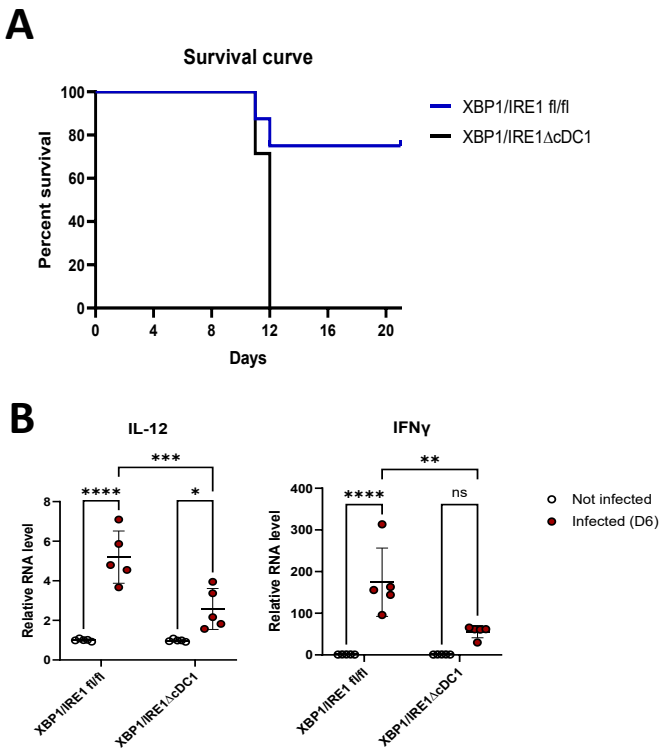


Figure 11 – **La délétion de la voie IRE1/XBP1 spécifiquement dans les cDC1s mènent à un défaut de l'expression des cytokines essentielles dans la clairance du parasite *Toxoplasma gondii*, résultant en la mort des souris XBP1/IRE1ΔcDC1**. **(A)** Courbe de survie réalisée sur des souris contrôles (XBP1$^{fl/fl}$ IRE1$^{fl/fl}$) et XBP1/IRE1ΔcDC1 infectées par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). Log-rank (Mantel-Cox) test, p value = 0,0097 (n=8 souris/condition). **(B)** Analyses par RT-qPCR de l'expression des cytokines *Il12* et *Ifnγ* dans la rate des souris contrôles et XBP1/IRE1ΔcDC1 non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). Les résultats sont exprimés en expression relative d'ARN comparé aux souris contrôles non infectées, et normalisés sur le gène de ménage *Hprt*. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=4-5 souris/condition).

2.3 L'activation de la voie IRE1 est cruciale pour la mise en place de l'activation des lymphoyctes T CD8+ et l'expansion des cDC1 spléniques

Au vu de la sensibilité accrue à l'infection des souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre et la diminution de l'expression du gène de l'IFNγ, nous avons examiné l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, essentiels dans la réponse immunitaire face à *T. gondii*. Après 6 jours d'infection, nous avons observé dans les souris contrôles infectées une augmentation des LT CD8+ et des LT CD4+ activés, positif pour l'IFNγ (Figure 12 – A). Cependant, la quantification du nombre de cellules exprimant l'IFNγ a montré un défaut d'activation des LT CD8+ mais pas des LT CD4+ chez les souris infectées IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre par rapport aux souris infectées contrôles (Figure 12 – A). Nous avons donc examiné les cDC1, sous-type de DC essentiel pour l'activation des LT CD8+ via la présentation antigénique par le CMH-I. Les souris contrôlent infectées présentaient une expansion des cDC1 et cDC2. De manière intéressante, nous avons observé une absence d'expansion des cDC1 mais pas des cDC2 dans les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre infectées, de manière similaire à ce que nous avions observé dans les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ CD11c-Cre (Figure 12 – B). Ces résultats ont permis de confirmer que le rôle de la voie IRE1 dans la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice contre l'infection était bien causée par son activation spécifique dans les cDC1 et la régulation de fonctions clés de ce sous-type de DC.

2.4 La voie IRE1 est essentielle à l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques lors de l'infection

Afin de déterminer le rôle de la voie IRE1 dans la maturation des cDC1, nous avons infecté des souris contrôle et IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre avec la souche Pru-Tomato SAG1-OVA afin d'examiner (par cytométrie multiparamétrique) la modulation du processus de maturation des cDC1. Après 6 jours d'infection, nous avons observé une diminution drastique de l'expansion des cDC1 « late immature » (CD103+) normalement observée dans les souris WT infectées (20% des cDC1 totales au lieu de 80% dans les souris contrôles) (Figure 13 – A/B). La perte du stade « late immature » était corrélée à une augmentation des stades précoces de maturation « early immature » (CD62L$^{+/-}$/**CD103**$^{-}$/ESAM^{-}) représentant 30% dans les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre infectées comparé à 10% dans les souris WT (Figure 13 – A). En quantifiant le nombre de cDC1 aux différents stades de maturation, nos résultats ont également indiqué que l'absence de IRE1/XBP1 entrainait non seulement un défaut de maturation mais aussi un défaut de prolifération ou une mort cellulaire des cDC1 « late immature » (CD103+) lors

de l'infection, qui pourrait expliquer l'absence globale d'expansion des cDC1 dans les souris infectées délétées pour IRE1 et XBP1 (Figure 13 – B).

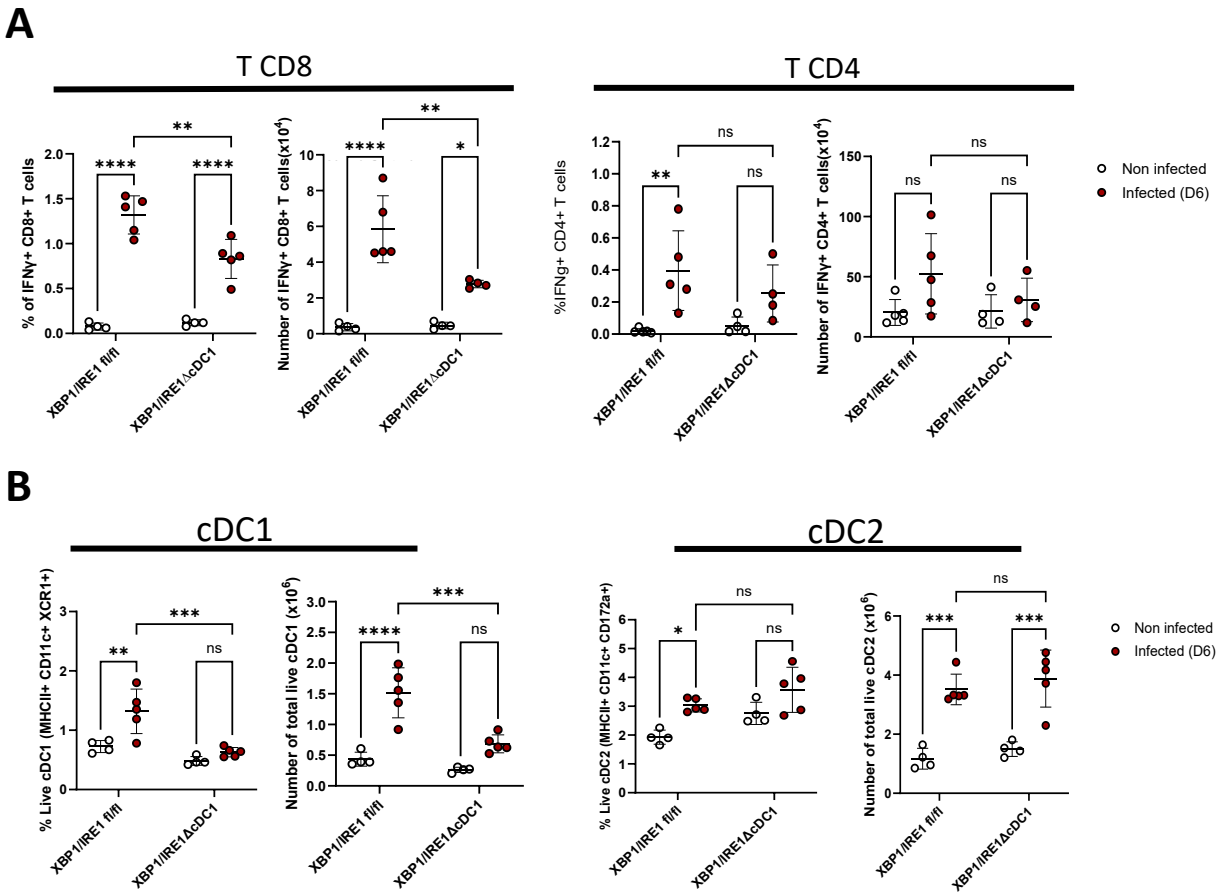


Figure 12 - **La délétion de la voie IRE1/XBP1 spécifiquement dans les cDC1 entraine un défaut d'expansion et d'activation des lymphocytes T CD8, et des cDC1. (A)** Quantification par cytométrie en flux de la fréquence et du nombre de lymphocytes T CD8 et T CD4 positifs pour l'IFNγ et donc activés. (B) Fréquence et nombre des deux sous-types cDC1 et cDC2 déterminés par cytométrie en flux. Les expériences ont été réalisées sur des souris contrôles et XBP1/IRE1ΔcDC1 non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris), avant d'être sacrifiées et les splénocytes analysés. Two-way ANOVA Tukey's multiple comparaisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=4-5 souris/condition).

Par ailleurs, nous avons également observé une diminution du nombre de cellules matures CCR7+, mais pas de leur pourcentage au sein des cDC1 totales, ces cellules représentant 15% des cDC1 dans les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre infectées, de manière similaire aux souris WT (Figure 12 – B). De plus, en absence de la voie IRE1, nous avons observé une diminution de l'activation des cDC1 « late mature » (CCR7+), avec la diminution de l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 (Figure 13 – C). Le pourcentage similaire de ce sous-type « late mature » en absence ou non de l'expression de IRE1 lors de l'infection à *T. gondii*, mais une diminution de leur activation a suggéré un défaut fonctionnel de ce

sous-type en absence de la voie IRE1 plutôt qu'un défaut dans la dernière étape de transition depuis le sous-type late immature CD103+ vers le sous-type mature CCR7+.

Ces résultats suggèrent donc que la voie IRE1 est cruciale pour assurer le passage du stade « early immature » vers le stade « late immature » ainsi que la survie de ces dernières, mais pourrait également jouer un rôle dans l'activation des cDC1 « late mature » (CCR7+), notamment pour assurer leur fonctions migratoires et/ou de présentation antigénique.

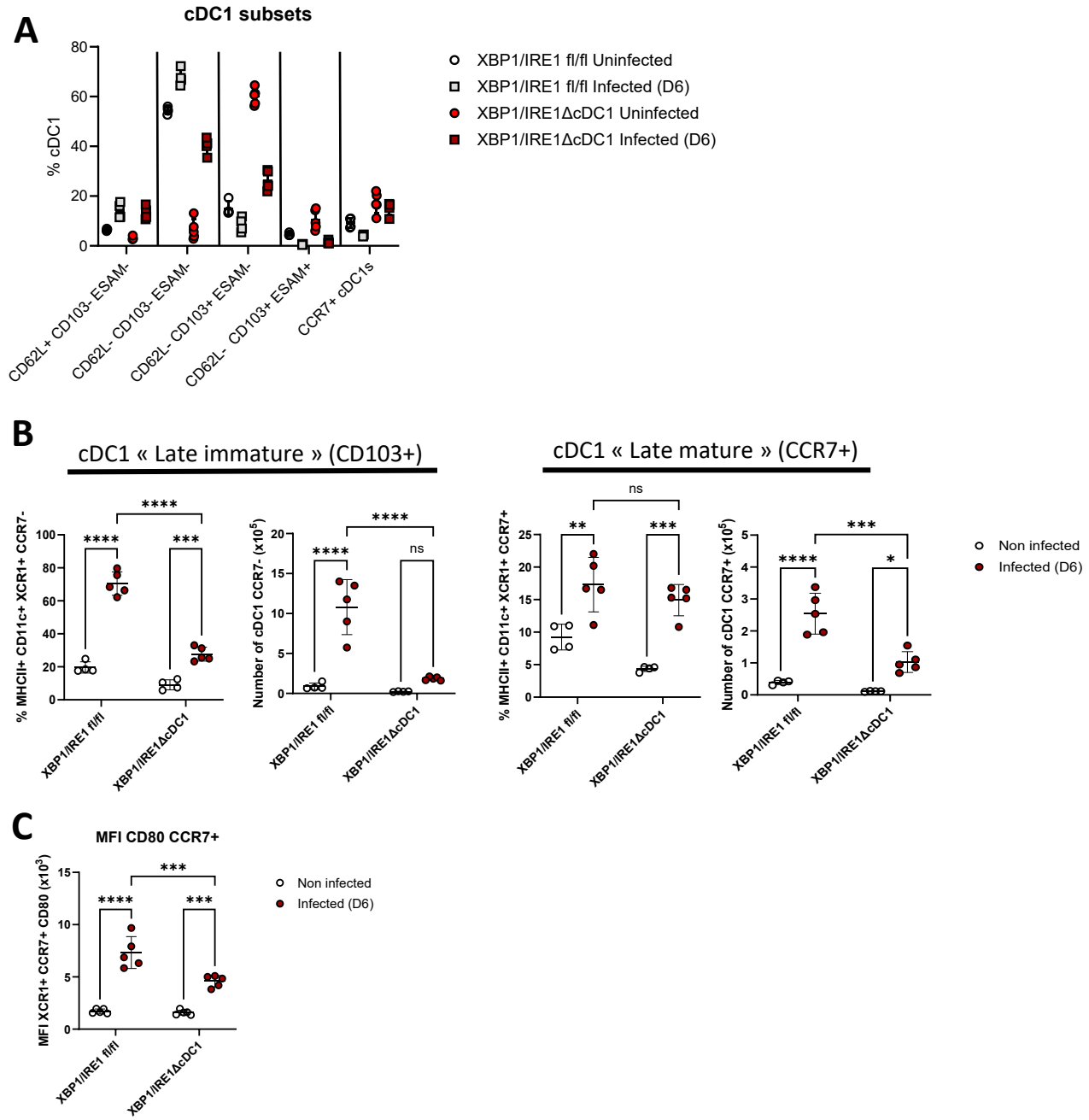


Figure 13 - **L'absence de la voie IRE1 entraîne un défaut d'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) des cDC1 spléniques lors de l'infection à *T. gondii*.** Etude par cytométrie en flux de l'impact de la délétion de la voie IRE1/XBP1 sur les différents stades de maturation des cDC1 (A), de la fréquence et du nombre des sous-types « late immature » (CD103+) et « late mature » (CCR7+) (B), ainsi que l'expression du marqueur d'activation CD80 (MFI) dans le sous-type « late mature » (CCR7+), dans la rate des souris contrôles et XBP1/IRE1ΔcDC1 non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=4-5 souris/condition).

2.5 L'absence de la voie IRE1 n'entraîne pas de défaut migratoire des cDC1 « late mature » (CCR7+) lors de l'infection par *T. gondii*

Au vu des précédents résultats obtenus dans les souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre infectées, montrant un défaut d'activation des LT CD8+ spléniques et une baisse du marqueur d'activation CD80 dans les cDC1 « late mature » (CCR7+), nous avons émis l'hypothèse qu'en absence de la voie IRE1, ces cDC1 pourraient présenter un défaut fonctionnel que nous avons cherché à caractériser.

Le défaut d'activation des T CD8+ pourrait notamment s'expliquer par un défaut de migration du sous-type « late mature » vers la pulpe blanche de la rate pour présenter les antigènes parasitaires. Cette hypothèse était soutenue par l'étude de Augusto et al. ayant montré un rôle de la voie IRE1 dans la migration des MEFs et des BMDCs (Augusto et al. 2020). Nous avons donc étudié la migration cellulaire de ce sous-type « late mature » (CCR7+) afin d'observer si l'absence de la voie IRE1 influait sur leur capacité migratoire. Pour réaliser cette expérience, après 6 jours d'infection par la souche Pru SAG1-OVA TdTomato de souris IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre et contrôles, nous avons injecté par I.V. l'anticorps CD11c-APC qui ne marque alors que les DC présentes dans la pulpe rouge mais pas celles ayant migré dans la pulpe blanche (M&M – 3.2). Tout d'abord, l'étude du pourcentage de cDC1 positives au signal APC de l'anticorps CD11c- APC, a montré une bonne efficacité de marquage des cellules présentes dans la pulpe rouge, en condition non infectée, dans les souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1, avec 80% des sous-types immatures des cDC1 positif pour l'anticorps (Figure 14 – A). Nous avons également observé, toujours en condition non infectée dans les souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1, une diminution du pourcentage de cellules CCR7+ positives pour le signal APC, en accord avec leur migration vers la pulpe blanche (Figure 14 – B). Lors de l'infection, nous avons observé les mêmes pourcentages de cellules marquées dans les différents sous-types de cDC1 dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 et dans les souris WT, avec notamment une diminution similaire du signal APC dans le sous-type « late mature » (CCR7+) indiquant leur migration vers la pulpe blanche, de façon similaire que ce soit en l'absence ou présence de la voie IRE1 (Figure 14 -A). Cependant, il est à noter que la fréquence des différents sous-types de cDC1 positif pour le signal APC diminueait lors de l'infection, que ce soit dans les souris contrôles ou dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 (Figure 14 – A), une

observation qui a été reproduite lors d'une deuxième expérience indépendante et que nous n'avons pas su expliquer.

Ces résultats ont donc suggéré que l'absence de la voie IRE1/XBP1 n'entraîne pas de défaut migratoire des cDC1 « late mature » (CCR7+) vers la zone T (pulpe blanche) de la rate lors de l'infection par *T. gondii*.

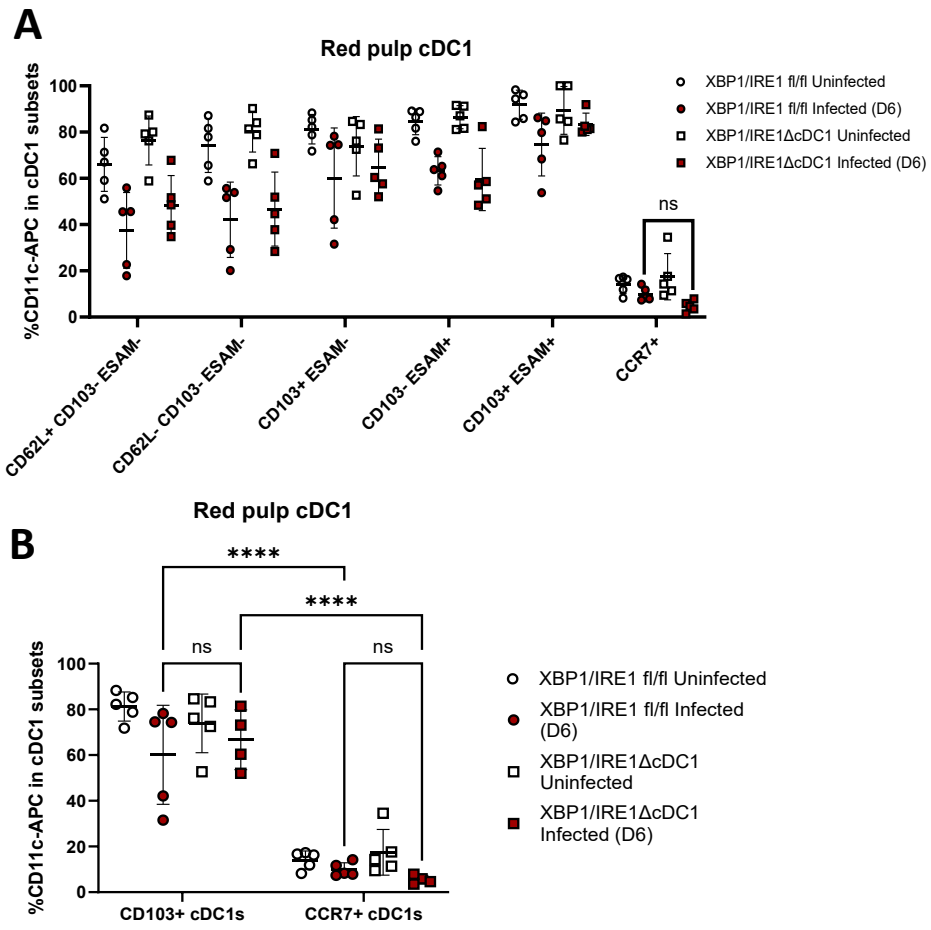


Figure 14 - **L'absence de la voie IRE1 n'entraîne pas de défaut migratoire des cDC1 « late mature » (CCR7+) lors de l'infection par *T. gondii.*** (A) Fréquence des cellules marquées par l'anticorps CD11c-APC dans les différents sous-types de cDC1 spléniques. (B) Fréquence des cDC1 « late immature » (CD103+) et « late mature » (CCR7+) positives pour le signal APC, donc présentes dans la pulpe rouge. Ces expériences ont été réalisées dans des souris contrôles et XBP1/IRE1ΔcDC1 non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 (n=4-5 souris/condition).

2.6 L'absence de la voie IRE1 ne semble pas entrainer de défaut de priming des LT CD8+ lors de l'infection par *T. gondii*

Les résultats obtenus dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées, montrant un défaut d'activation des LT CD8+ spléniques, mais ne semblant pas provenir d'un défaut de migration des cDC1 « late mature » (CCR7+), pourrait résulter d'un défaut dans le mécanisme de présentation des antigènes parasitaires aux LT CD8+ et donc un défaut dans leur « priming ». Pour étudier cette question, nous avons mené deux expériences examinant le priming des LT CD8+ après injection de parasites irradiés exprimant l'antigène modèle OVA. Nous ne pouvions utiliser des parasites vivants au vu de la sensibilité accrue des souris déficientes pour IRE1/XBP1 à l'infection avec une mortalité à j12 pi. En effet, nos premières expériences n'avaientpas permis de détecter par cytométrie en flux de LT CD8+ « primés » après injection de parasites vivants à J8 ou J10 post-infection, temps trop précoces pour ce processus se fasse de manière efficace.

Dans une première expérience (Figure 15 – A), nous avons injecté par I.P au sein des souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1 5.10^6 parasites irradiés de la souche Pru SAG1-OVA, puis ré-injecté nos souris 3 semaines plus tard avec des parasites irradiés afin de booster l'immunisation. 6 jours après la deuxième injection, les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1 étaient sacrifiées, et la rate et les cellules du péritoines extraites. Pour la deuxième expérience, nous avons reproduit le même protocole, excepté la deuxième injection que nous avons réalisé avec 1000 parasites vivants afin d'examiner si nous obtenions une meilleure réponse après l'immunisation (Figure 15 – B). Nous avons procédé à un marquage TetraOVA, qui reconnaît spécifiquement le complexe TCR-antigène OVA. Pour la première expérience, nous observé une augmentation du signal TetraOVA au sein des LT CD8+ de la rate et du péritoine (Figure 15 – A) dans les souris WT. De manière intéressante, nous avons observé une diminution du signal TetraOVA dans les LT CD8+ de la rate et du péritoine au sein des souris délétées pour la voie IRE1/XBP1. Ces résultats ont donc montré que l'absence de la voie IRE1/XBP1 pouvait mener à un défaut du priming des LT CD8+. Cependant, nous avons reproduit cette expérience, en ajoutant une immunisation avec des parasites vivants après 3 semaines comme expliqué ci-dessus, et nous n'avons observé aucune différence dans le signal TetraOVA des LT CD8+ entre les souris WT et IRE1/XBP1 KO infectées. Nous avons pourtant confirmé que l'immunisation a fonctionné, avec une augmentation du signal TetraOVA dans les souris ayant reçu des parasites irradiés, puis des parasites vivants (Immunized), comparé aux souris non infectées ou ayant reçu seulement les parasites vivants 6 jours avant le sacrifice (non immunized). Ces résultats ne permettent donc pas de conclure définitivement sur un rôle de la voie IRE1/XBP1 dans le priming des LT CD8+ et devra donc être reproduite.

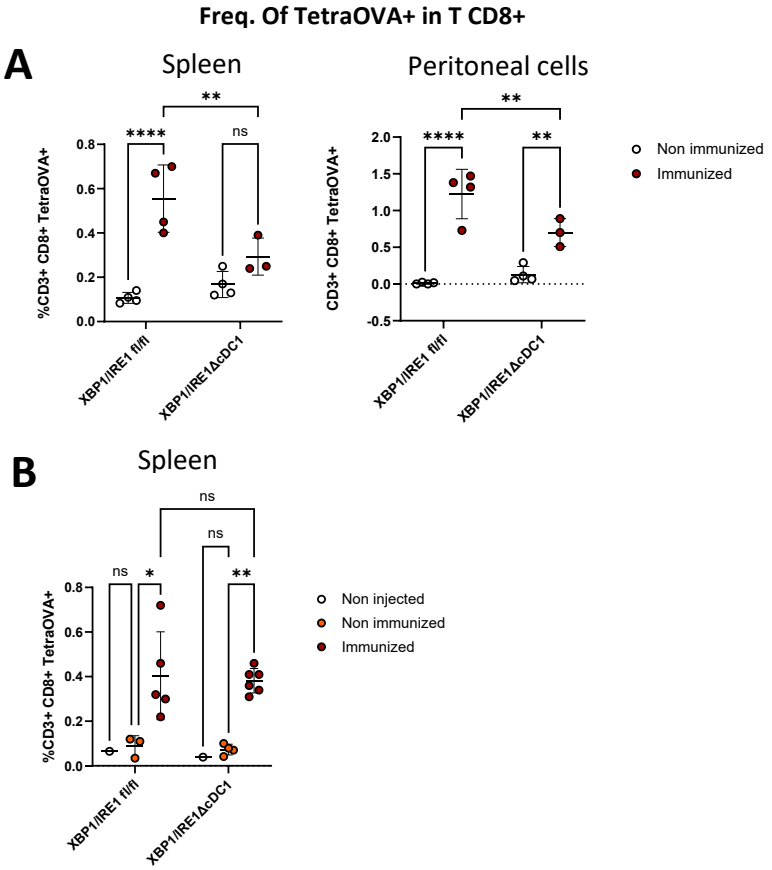


Figure 15 - L'absence de la voie IRE1 n'entraine pas de défaut de priming des T CD8+ lors de l'infection par *T. gondii*. (A) Fréquence des LT CD8+ positifs pour le signal TetraOVA dans la rate ou le péritoine des souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1, infectées par des parasites irradiés Pru SAG1-OVA (5.10^6 parasites/souris) pendant 3 semaines, puis réinjecté avec des parasites irradiés ((5.10^6 parasites/souris) pendant 6 jours (n=4 souris/conditions) **(B)** Fréquence des LT CD8+ positifs pour le signal TetraOVA dans la rate des souris WT ou IRE1/XBP1ΔcDC1, infectées par des parasites irradiés (5.10^6 parasites/souris) Pru SAG1-OVA pendant 3 semaines, puis réinjectées avec des parasites vivants (1000 parasites/souris) pendant 6 jours (n=1 souris non infectée, n= 3 souris infectées avec 1000 parasites vivants, n=6 souris immunisées pendant 3 semaines). Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

2.7 La délétion de la voie IRE1 dans les cDC1 « late immature » (CD103+) entraîne l'expression de la voie PERK/CHOP

Afin de continuer notre étude du rôle de la voie IRE1/XBP1 sur la maturation et les fonctions des cDC1 spléniques lors de l'infection par *T. gondii*, nous avons trié les cDC1 « late immature » (CD103+) et « mature » (CCR7+) de souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées et non infectées, afin de réaliser des RT-qPCR pour étudier la modulation de certaines voies de signalisation d'intérêt. La Figure 16 montre les résultats obtenus pour les cDC1 « late immature » (CD103+). Les résultats obtenus pour les cDC1 matures CCR7+ n'ont pas permis d'émettre des conclusions claires, les mesures obtenues

entre les différentes souris d'une même condition étant très dispersées. Ceci est en partie dû au fait que les cDC1 matures étant très minoritaire dans la rate (10% des cDC1 totales, à peu près 40 000 cellules / rate), il a fallu regroupés 2 à 3 souris pour obtenir un nombre suffisant de cellules triées et exploitable pour une analyse transcriptomique. Cette expérience a été réalisée à nouveau et les résultats sont en cours d'analyse.

cDC1 « Late immature » (CD103+/CCR7-)

- **Unfolded Protein response (UPR)**

En étudiant la modulation de l'expression des différentes voies de l'UPR dans ce sous-type « late immature », nous avons observé dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées une augmentation importante de l'expression de la voie PERK/CHOP, et de leur cible Trib3, qui n'était pas observé dans les souris contrôles infectées (Figure 16 – A). Cette voie est connue pour être activée lors d'un stress prolongé (stress oxydatif ou lipidique) et contribue à l'induction de la mort cellulaire programmée par apoptose. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection par *T. gondii*, pourrait entrainer un stress cellulaire pouvant conduire à leur mort. Concernant la voie ATF6 de l'UPR et sa cible Herpud1, nous n'avons pas observé de modulation de la voie dans les souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées.

- **Métabolisme du cholestérol**

Par la suite, nous avons également étudié l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. En effet, l'étude de S. Janssens sur la maturation tolérogénique des cDC1, avait montré que le sous-type « late immature » (CD103+) lors de l'ingestion d'AC, était caractérisé par une augmentation du taux lipidique dans la cellule (marquage Bodipy) dû à l'internalisation des corps apoptotiques. Cela entraîne une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes d'efflux du cholestérol libre, toxique pour la cellule, tels que *Lxrb*, *Lxra*, *Apol7c*, *Apol10b* ou encore *Abcg1*. De plus, ils avaient observé une importante expression de la voie IRE1/XBP1, connu pour être activé lors d'un déséquilibre dans l'homéostasie lipidique afin de la restaurer (Moncan *et al.* 2021).

Nous avons observé dans les souris WT infectées une augmentation des gènes *Apol10b* et *Abcg1* qui sont des pompes à efflux pour le cholestérol libre (Figure 16 – B) par rapport aux souris non infectées. De manière intéressante, l'expression de ces deux gènes diminuait fortement dans les cDC1 « late immature » (CD103+) des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées comparé aux souris WT infectées (Figure 16 – B). Par ailleurs, l'expression du gène Apol7c n'augmentait pas avec l'infection dans les souris contrôles, mais ce gène était down-régulé dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées ou non

infectées, suggérant un rôle plus global de la voie IRE1 dans l'homéostasie lipidiques des cDC1 immatures à l'état basal (Figure 16 – B). Ces résultats ont donc suggéré une régulation du métabolisme lipidique par la voie IRE1 lors de l'infection par *T. gondii*, comme observé lors de la maturation tolérogénique.

- **La voie des interférons de type I**

Nos résultats de RT-qPCR sur le sous-type « late immature » (CD103+) dans les souris WT ont montré une importante activation de la voie IFNβ lors de l'infection. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de l'absence de la voie IRE1/XBP1 dans cette activation. Comme indiqué précédemment, nous avons observé une forte induction de la voie IFNβ, avec une forte augmentation de l'expression du gène *Ifnb* et de son inducteur *Irf7*, ainsi que d'autres gènes impliqués dans cette voie tels que *Ifi47, Ifit1, Ifit2, Ifi47, Islg20* et *Oas3* dans les souris contrôles infectées (Figure 16 – C). En l'absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection, nous avons pu observer une diminution partielle de l'expression des gènes *Ifnb, Irf7,* et *Ifi47,* mais aucune différence d'expression n'a été observée pour les autres gènes de la voie IFNβ étudiés ici, dont l'expression augmente lors de l'infection de façon similaire dans les souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 lors de l'infection (Figure 16 – C). Ces résultats ont donc suggéré un rôle partiel ou indirect de la voie IRE1 dans l'activation de la voie IFNβ dans les cDC1 « late immature » (CD103+) lors de l'infection à *T. gondii*.

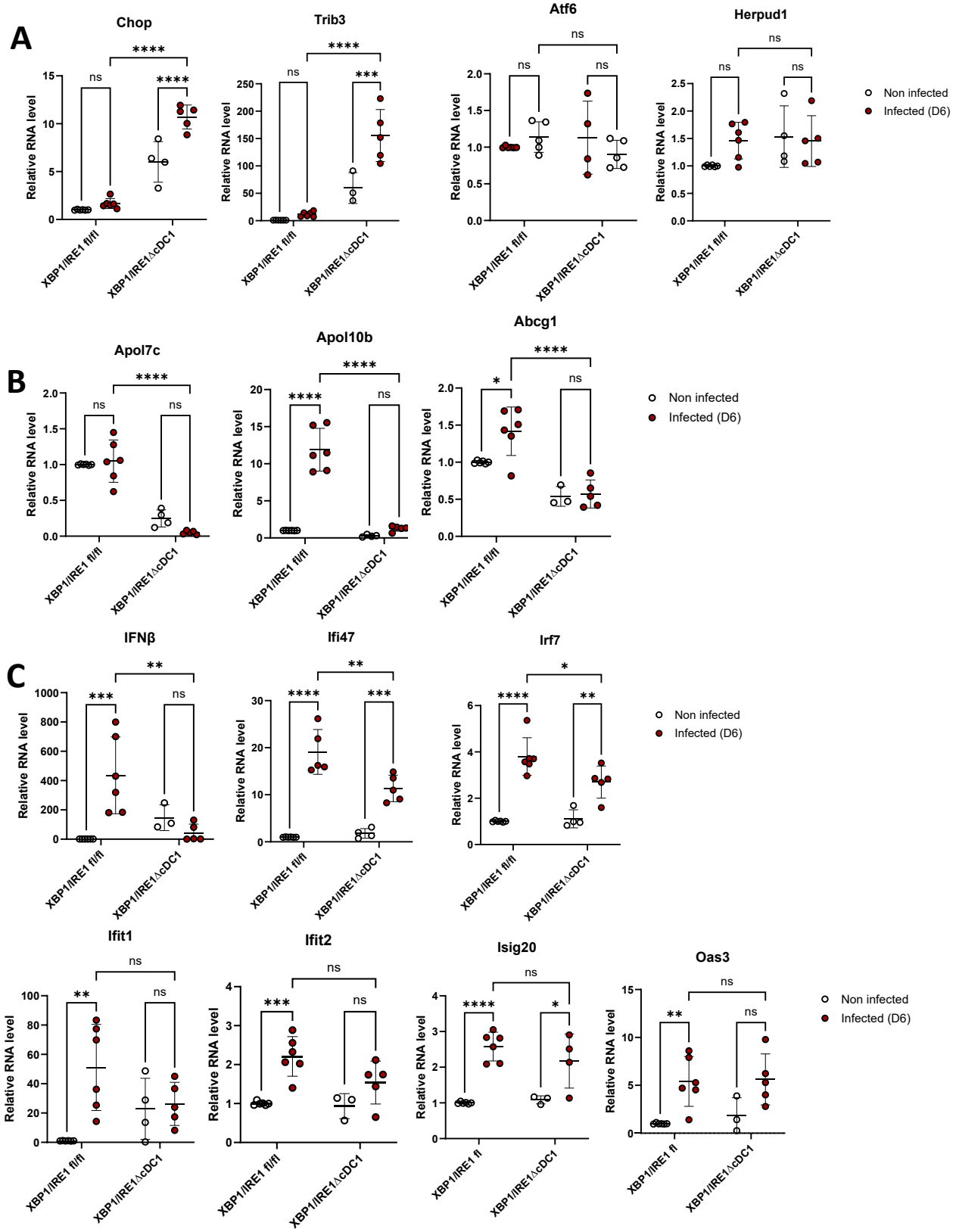


Figure 16 - (A) Etude de l'expression des transcrits des gènes des voies de l'UPR : PERK/CHOP, ATF6 (A), des gènes impliqués dans l'efflux du cholesterol Apol7c, Apol10b et Abcg1 (B) et de la voie IFNβ (C) par RT-qPCR sur cDC1 « late immature » (CD103+) triées, après réalisation d'un enrichissement en

DC des splénocytes extraits de rates de souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 non infectées et infectées pendant 6 jours par la souche Pru SAG1-OVA Tomato (500p/souris) (n=6 souris/conditions). Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARN, et ont été normalisés en fonction du gène de ménage *Rpl13a*. Unpaired Student T-test ns p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

2.8 L'analyse transcriptomique associé au protéome de surface (CITEseq) a permis d'identifier un nouveau cluster minoritaire de maturation des cDC1 appelé ISG+ cDC1

Afin de caractériser plus en détail les mécanismes par lesquels la voie IRE1/XBP1 pourrait réguler les fonctions des cDC1 lors de l'infection à *T. gondii,* nous avons réalisé une approche de CITE-seq qui permet de combiner l'étude du protéome de surface cellulaire (identification de chaque sous-ensemble des cDC1) au transcriptome, obtenu par RNA Sequencing de cellules uniques (sc-RNAseq) (cf M&M). Pour cela nous avons infecté des souris WT et IRE1/XBP1$^{fl/fl}$ XCR1-Cre avec la souche Pru-Tomato SAG1-OVA et extrait les splénocytes à J6 pi, qui représente le jour où l'activation de IRE1 dans les cDC1 est maximale. Nous avons trié les cDC1 et les cDC2 mais également les autres populations de cellules immunitaires telles que les pDCs, les LT, les LB, les Natural Killer, les macrophages, mais en nombre plus faible (Voir chapitre M&M pour la procédure expérimentale). Nous avons débuté notre analyse par l'étude des différents clusters de maturation des cDC1. L'analyse non biaisée des clusters dans les souris WT et IRE1/XBP1 KO nous as permis de retrouver tous les clusters identifiés dans nos précédentes expériences d'immunophénotypage : « proliferating cDC1 », « early immature », « Late immature », « early mature » et « late mature » (Figure 17 – A). De manière intéressante, un nouveau cluster très minoritaire, est apparu dans cette analyse, qui a été appelé ISG+ cDC1, caractérisé par une expression augmentée de nombreux gènes de la voie des IFN de type I (Figure 17 – A). Il est à noter que ce cluster est représenté de façon plus importante dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 non infectées et infectées, contrairement aux souris contrôles (Figure 17 – B).

L'étude de la trajectoire potentielle de maturation des cDC1, lors de l'infection par *T. gondii*, a mis en lumière deux trajectoires : l'une suggère que les cDC1 passent par tous les différents stades de maturation (« proliferating cDC1 », « early immature », « Late immature », « early mature » et « late mature »), et de manière intéressante, la deuxième trajectoire suggère que, lors de l'infection, un passage rapide pourrait avoir lieu des cDC1 early immature vers les cDC1 late mature CCR7+ en passant par ce cluster ISG+, sans passer par le sous-type « late immature » (CD103+) (Figure 17 – C).

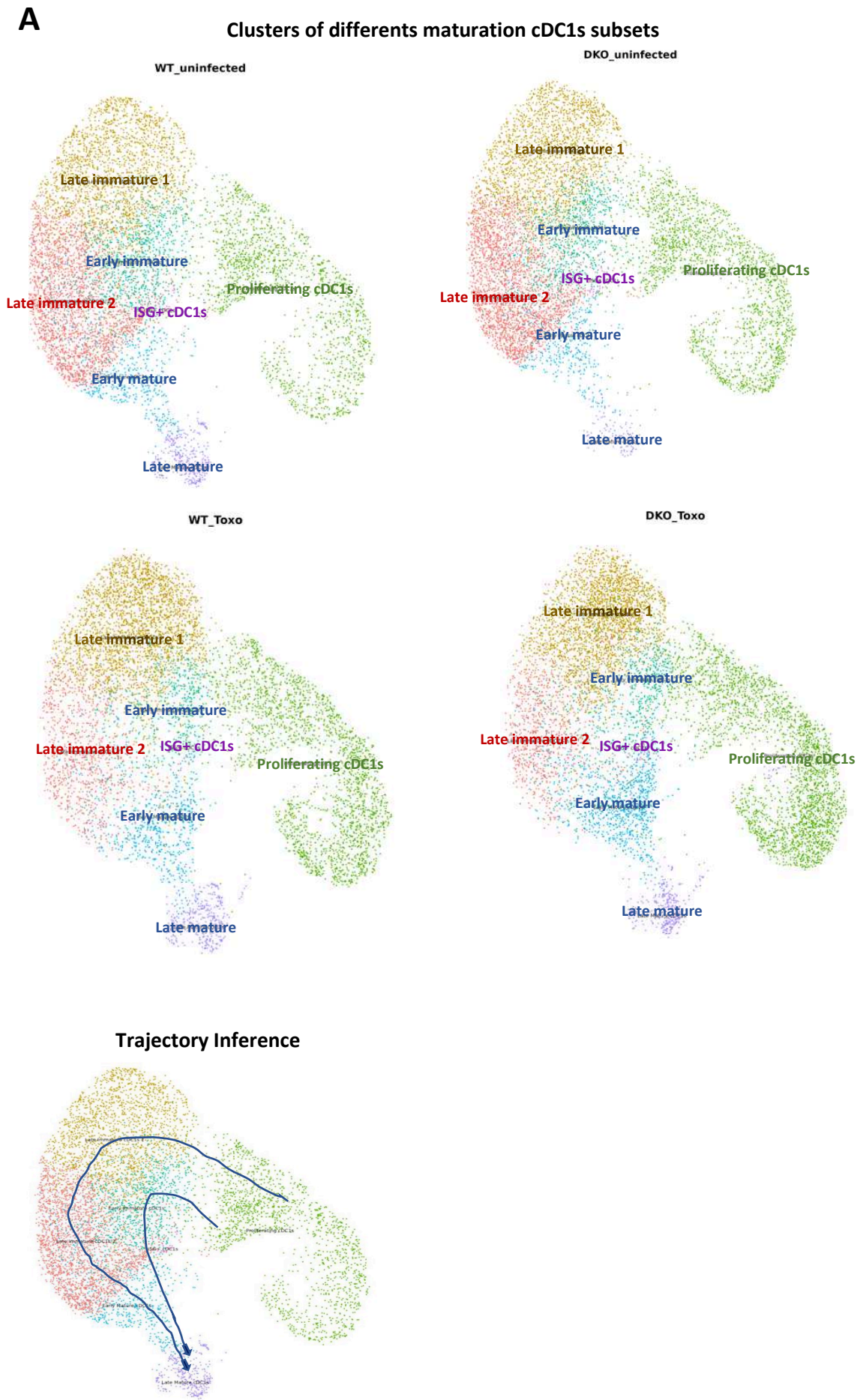

A
Clusters of differents maturation cDC1s subsets
WT_uninfected
Late immature 1
Early immature
Late immature 2
ISG+ cDC1s
Proliferating cDC1s
Early mature
Late mature
DKO_uninfected
Late immature 1
Early immature
ISG+ cDC1s
Proliferating cDC1s
Late immature 2
Early mature
Late mature
WT_Toxo
Late immature 1
Early immature
Late immature 2
ISG+ cDC1s
Proliferating cDC1s
Early mature
Late mature
DKO_Toxo
Late immature 1
Early immature
Late immature 2
ISG+ cDC1s
Proliferating cDC1s
Early mature
Late mature
Trajectory Inference

Figure 17 – Analyses bioinformatiques du CITE-seq : (A) Clusters de maturation des cDC1 spléniques dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1 non infectées et infectées, réalisés grâce aux méthodes détaillées dans la partie Matériel et Méthodes. **(B)** Trajectoire potentielle de la maturation des cDC1 spléniques infectées après analyse des ARN des cellules ainsi que des ADT.

2.9 L'absence de la voie IRE1/XBP1 dans le sous-type « late immature » (CD103+) entraîne un stress cellulaire important engageant les voies de l'apoptose

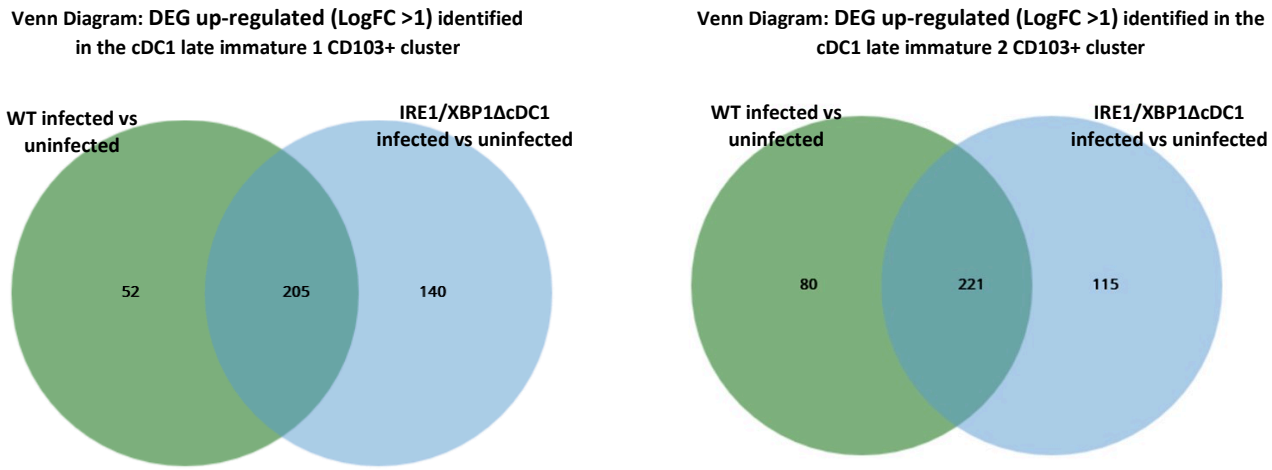
Afin de caractériser le profil transcriptomique des cDC1 « late immature » (CD103+) lors de l'infection, nous avons analysé les gènes modulés par l'infection dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1. Nous avons commencé par réaliser des Venn Diagram sur les gènes dont l'expression est augmentée (LogFC>1, pAdjvalue < 0.05) lors de l'infection dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1, nous permettant ainsi de distinguer les gènes exprimés spécifiquement pour chaque génotype (Figure 18 – A). Nous avons systématiquement réalisé les mêmes analyses pour les deux sous-types de cDC1 « late immature 1 » et « late immature 2 », nous permettant ainsi de caractériser chaque sous-type. En analysant les Venn Diagram, nous avons pu observer que la moitié des gènes up-régulés dans les souris infectées WT et IRE1/XBP1 ΔcDC1 au sein des cDC1 immatures 1 et 2, sont exprimés par les deux génotypes, et ¼ spécifiquement exprimés par les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées. Tout d'abord, en étudiant les GO pathways des DEG (Differentially Expressed Genes) up-régulés dans les cDC1 immatures des souris WT infectées, nous pouvons observer que ces cDC1 immatures sont caractérisées par l'expression des voies des interférons, appuyant les résultats précédents obtenus par RT-qPCR (Figure 18 – B). A contrario, dans les cDC1 « late immature » provenant des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées, nous avons observé parmi les DEG down-régulés, des GO pathways impliqués dans la production cytokinique, la réponse des cellules B et la prolifération lymphocytaire, reflétant un défaut dans la mise en place des réponses immunogéniques en absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection (Figure 18 – C). Ces résultats suggèrent donc que la voie IRE1 pourrait avoir un rôle dans l'induction de voies impliquées dans la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice dès le stade cDC1 « immature » et pas seulement au stade des cDC1 matures. Les cellules immatures lors de la maturation immunogénique pourrait donc elle aussi représenter des acteurs majeurs de l'immunité contre *T. gondii*.

Par la suite, en étudiant plus spécifiquement les gènes up-régulés dans le sous-cluster « cDC1 immature **1 »** des souris WT infectées, nous avons observé des GO pathways impliqués dans le transport ou le métabolisme des acides gras (AG), mais aussi la protéine Rac2, impliquée dans l'activité d'internalisation du sous-type immature (CD103) (Figure 18 – D). Par ailleurs, ce sous-type immature 1 présente également une activation des voies impliquées dans la réponse inflammatoire, avec

notamment l'expression induite de CD40, facteur important dans l'activation des réponses LT (Figure 18 – D) et des voies impliquées dans la respiration mitochondriale, reflétant probablemnt une activité cellulaire plus importante lors de la stimulation immunogénique. De manière intéressante, dans les souris délétées pour la voie IRE1/XBP1 infectées, les cDC1 « late immature 1 », présentent une up-régulation de gènes impliqués dans l'apoptose, et la modulation de l'activité des lymphocytes T, avec par exemple, l'augmentation de l'expression de CD274 (PD-L1), facteur qui inhibe l'activation des lymphocytes T et la production cytokinique (Figure 18 – E). Ces résultats suggèrent donc un rôle potentiel du sous-type cDC1 « late immature » dans l'activation des lymphocytes T. Ces résultats sont également en accord avec nos résultats précédemment obtenus par RTqPCR montrant une augmentation de la voie PERK/CHOP dans ces cDC1 late immature, montrant un stress cellulaire important en absence de la voie IRE1/XBP1.

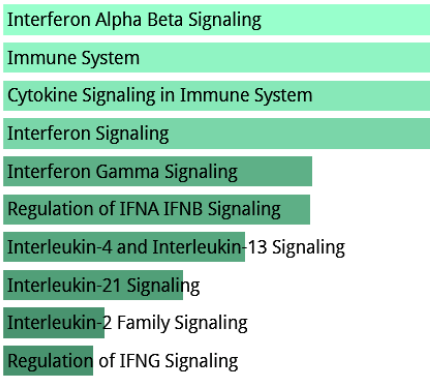
De la même manière, en étudiant les GO pathways des DEG up-régulés dans le cluster cDC1 « late immature **2** » dans les souris WT infectées, nous avons observé l'activation de voies impliquées dans les réponses inflammatoires et la production cytokinique (Figure 18 – F). Dans les souris IRE1/XBP1 ΔcDC1 infectées, nous avons détecté dans le sous-type « late immature 2 », de manière similaire aux cDC1 « late immature **1** », l'up-régulation de gènes impliqués dans l'apoptose, tel que Lgals3 (Galectine 3), suggérant une fois de plus que la voie IRE1/XBP1 pourrait jouer contribuer à la survie de ce sous-type, et pouvant expliquer la diminution importante de l'expansion de ce sous-type observée par cytométrie en flux en absence de la voie IRE1 lors de infection (Figure 18 – G).

A



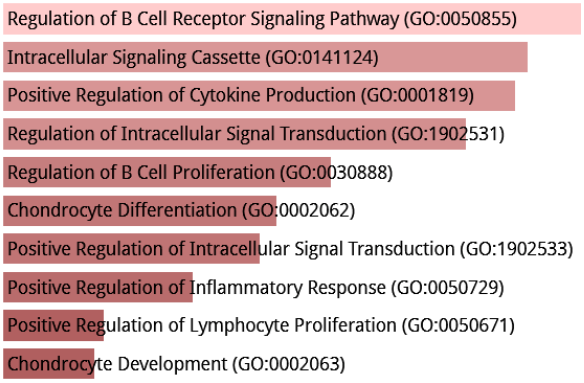
B

GO pathways associatied to the DEG up-regulated (LogFC >1) identified in the cDC1 Late immature CD103+ cluster in WT infected



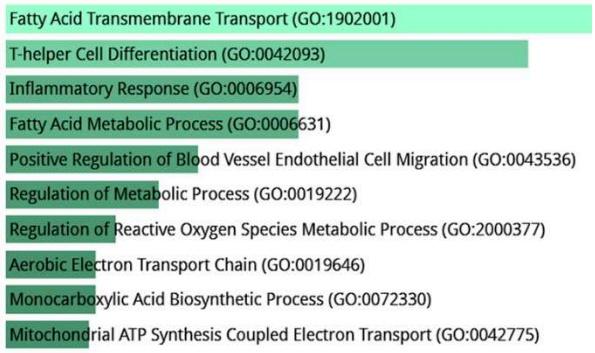
C

GO pathways associatied to the DEG down-regulated (LogFC <-1) identified in the cDC1 Late immature CD103+ cluster in IRE1/XBP1ΔcDC1 infected



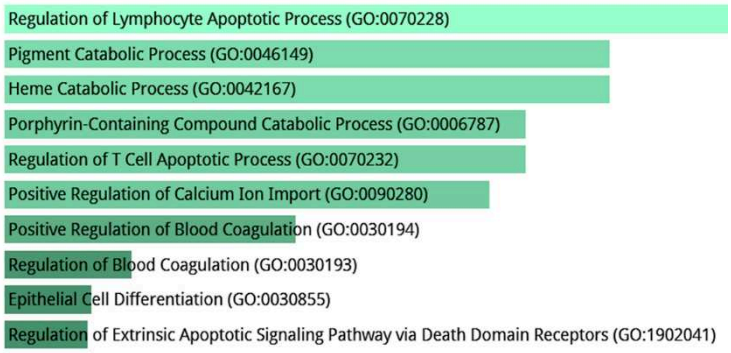
D

WT infected vs uninfected, expressed only in WT



E

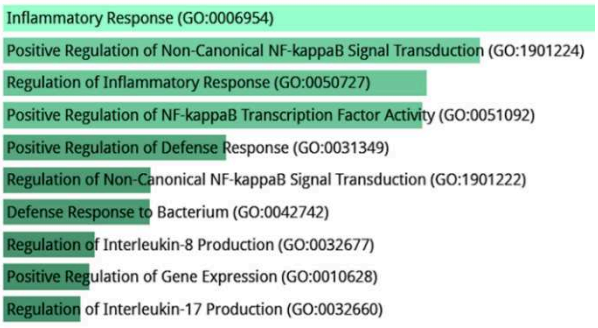
IRE1/XBP1ΔcDC1 infected vs uninfected, expressed only in IRE1/XBP1 ΔcDC1



GO pathways associatied to the DEG up-regulated (LogFC >1) identified in the cDC1 late immature 1

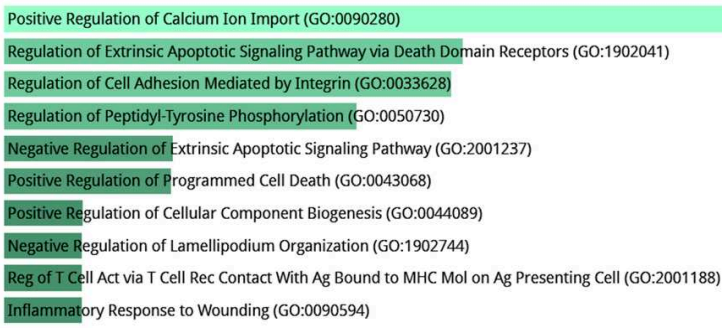
F

WT infected vs uninfected, expressed only in WT



G

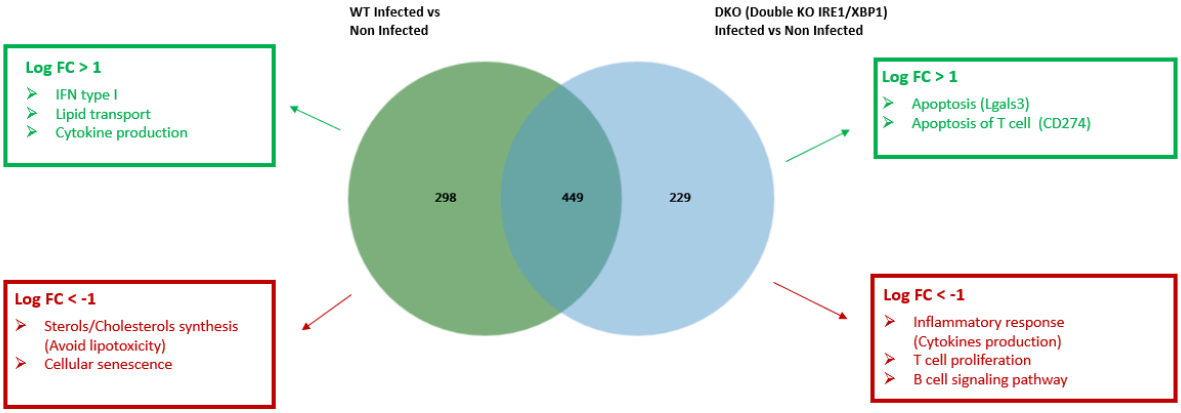
IRE1/XBP1ΔcDC1 infected vs uninfected, expressed only in IRE1/XBP1 ΔcDC1



GO pathways associatied to the DEG up-regulated (LogFC >1) identified in the cDC1 late immature 2

Figure 18 – Etude des GO pathways des DEGs significatifs (P.adj <0.005), identifiés par CITE-seq dans les différents génotypes (WT et IRE1/XBP1ΔcDC1) non infectées et infectées, par l'utilisation de la plateforme EnrichR : **(B)** Up-régulés uniquement dans les cDC1 Late immature 1 des souris contrôles infectées vs non infectées, **(C)** Up-régulés uniquement dans les cDC1 Late immature 1 des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées vs non infectées, **(D)** Up-régulés uniquement dans les cDC1 Late immature 2 des souris contrôles infectées vs non infectées, **(E)** Up-régulés uniquement dans les cDC1 Late immature 2 des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées vs non infectées.

Résumé des GO pathways des DEGs exprimés par le sous-type « late immature » (CD103+)

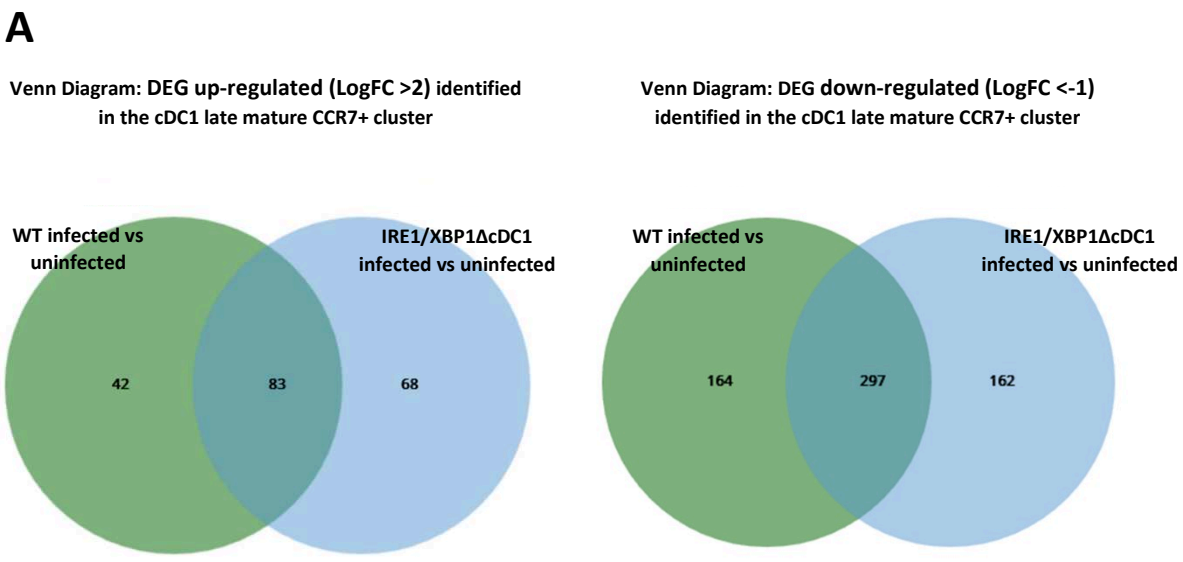


2.10 L'absence de la voie IRE1/XBP1 active les voies de l'apoptose dans les cDC1 « late mature » (CCR7+)

Par la suite, afin de caractériser un potentiel défaut fonctionnel dans le sous-type « late mature » (CCR7+) en absence de la voie IRE1, nous avons concentré notre analyse sur le profil transcriptomique de ce sous-type. Nous avons analysé les gènes modulés par l'infection dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1. Nous avons commencé par réaliser des Venn Diagram sur les gènes qui voient augmenter leur expression lors de l'infection dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1, nous permettant ainsi de distinguer les gènes exprimés spécifiquement pour chaque génotype (Figure 19 – A). Sur les 193 gènes possédant un LogFC supérieur à 2 (pAdjvalue < 0.05), nous avons pu observer 42 gènes spécifiquement exprimés par les souris contrôles infectées, et 68 gènes exprimés uniquement par les souris IRE1/XBP1ΔcDC1. Nous avons réalisé le même procédé pour les gènes qui voient leur expression diminuée (LogFC<-1, pAdjvalue < 0.05) dans les génotypes infectés, et nous avons pu observer qu'¼ des gènes sont spécifiquement down-régulés dans les souris contrôles infectées, et ¼ également ne sont down-régulés uniquement dans IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées (Figure 19 – B).

L'analyse des GO pathways des DEG qui sont up-régulés lors de l'infection uniquement dans les souris WT a montré une augmentation des gènes impliqués dans les réponses immunitaires, telles

que la prolifération et l'activation des lymphocytes T, la production cytokinique, ou encore la chaîne de transports des électrons impliqués dans la respiration mitochondriale, qui a été montrée comme participant à l'activation des DC in vitro et in vivo (Guak *et al.* 2018) (Figure 19 – B). L'analyse des GO pathways des DEG qui sont up-régulés lors de l'infection dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1, mais pas dans les cDC1 des souris contrôles, nous a permis d'identifier deux voies principales impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (Figure 19 – C). Nous avons également observé une régulation positive des gènes PYCARD et de Casp8, impliqués dans les mécanismes de l'apoptose cellulaire (Figure 19 – C). Ces résultats mettent en lumière qu'en l'absence de la voie IRE1/XBP1 les cDC1 « late mature » (CCR7+) semblent présenter un stress cellulaire important. A contrario, l'analyse des GO pathways des DEG qui sont down-régulés (LogFC<-1) lors de l'infection uniquement dans les souris contrôles lors de l'infection, mais pas dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1, a permis d'identifier la down-régulation de la voie TGFβ, connue pour être activée en conditions tolérogéniques, en accord avec l'induction d'une réponse immunogénique de ces cDC1 « late mature » (CCR7+) (Figure 19 – D). L'analyse des GO pathways des DEG qui étaient down-régulés lors de l'infection dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1, mais pas dans les cDC1 des souris contrôles, nous a permis d'identifier une down-régulation des voies impliquées dans l'endocytose, pouvant suggérer un défaut du trafic cellulaire en absence de IRE1/XBP1, mais aussi des voies impliquées dans l'activation des lymphocytes T, comme Cadm1, et dans la prolifération des lymphocytes et leur différenciation, comme Lfng (Figure 19 – E). Ces résultats indiquent que l'absence de la voie IRE1 dans les cDC1 matures pourrait entrainer un stress cellulaire important contribuant à un défaut de prolifération et d'activation des lymphocytes T, en accord avec la diminution de l'activation des LT CD8+ observée dans les souris IRE1/XBP1 ΔcDC1 infectées.



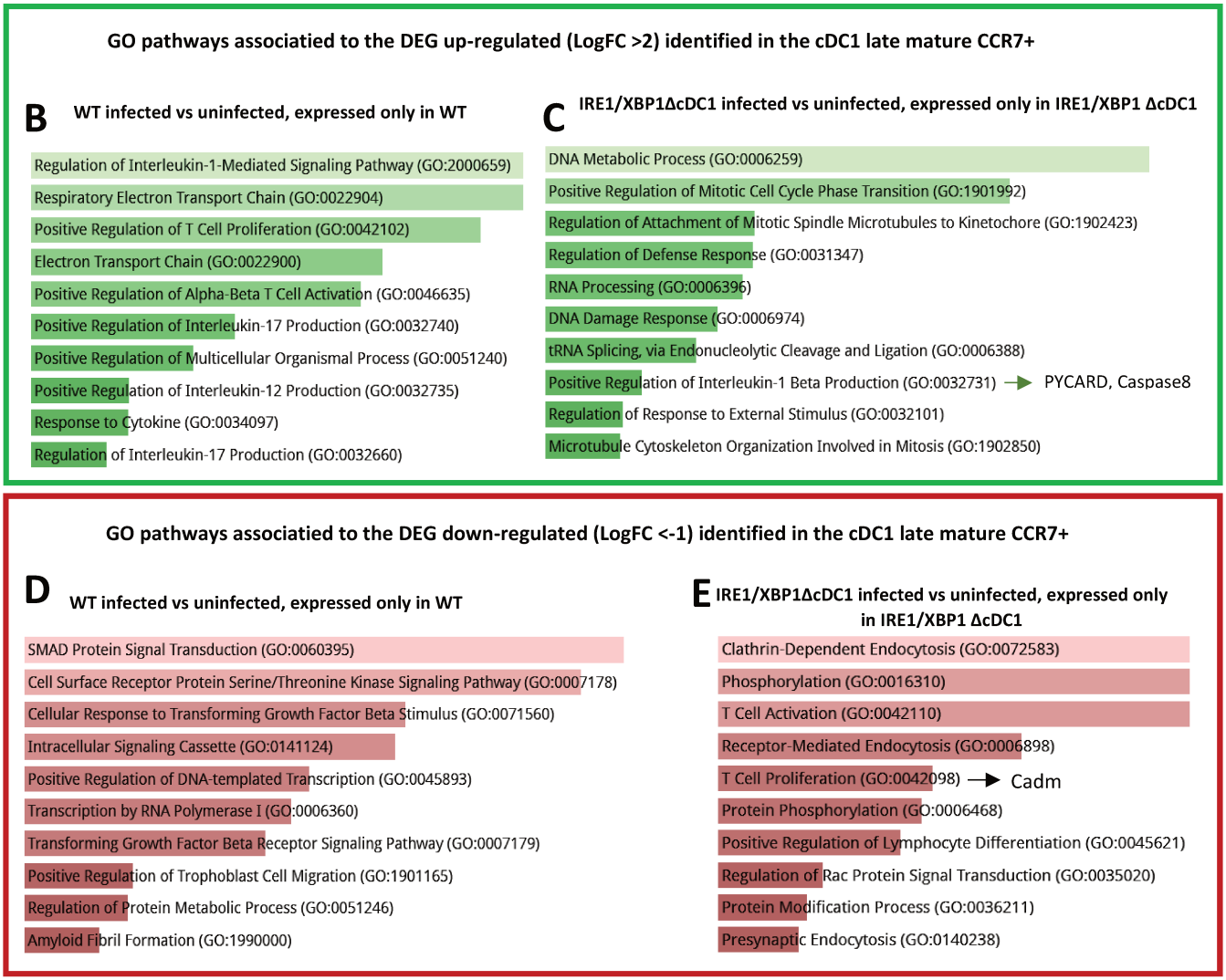


Figure 19 – Etude des GO pathways des DEGs significatifs (P.adj <0.005), identifiés par CITE-seq dans les différents génotypes (WT et IRE1/XBP1ΔcDC1) non infectées et infectées, par l'utilisation de la plateforme EnrichR : **(A)** Up-régulés uniquement dans les souris contrôles infectées vs non infectées, **(B)** Up-régulés uniquement dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées vs non infectées, **(C)** Down-régulés uniquement dans les souris contrôles infectées vs non infectées, **(D)** Down-régulés uniquement dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées vs non infectées.

Résumé des GO pathways des DEGs exprimés par le sous-type « late mature » (CCR7+)

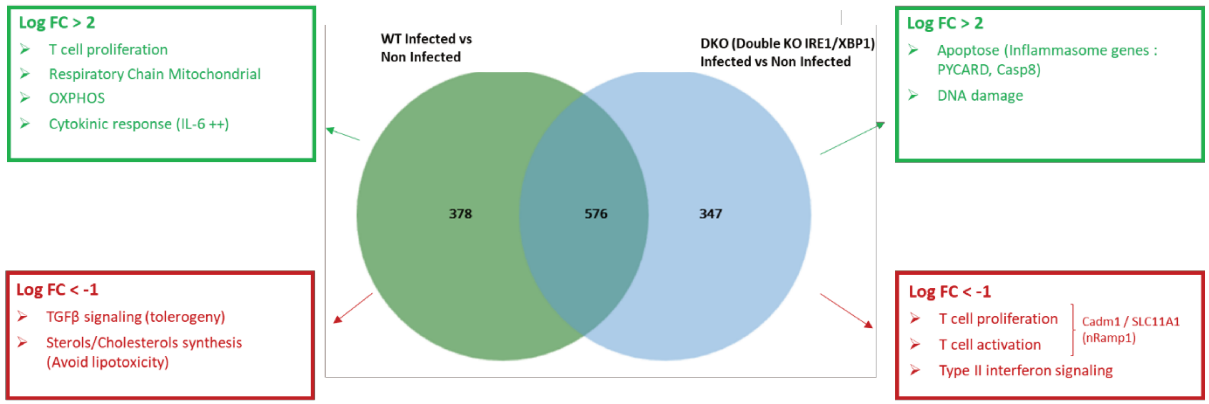
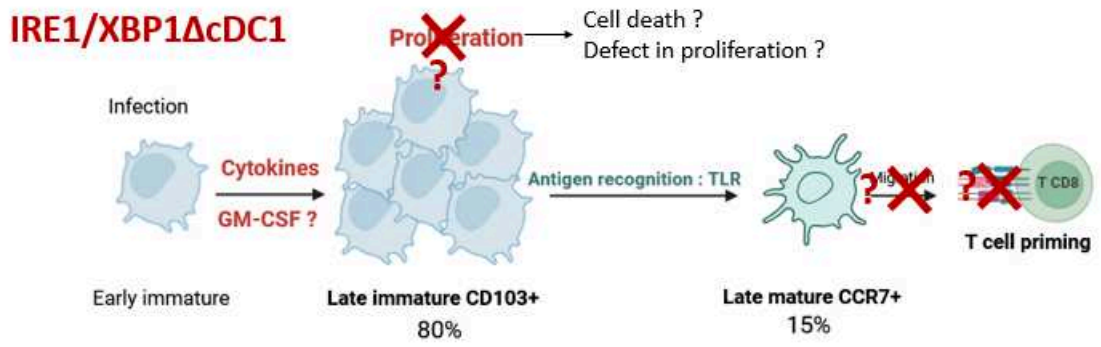


Schéma résumant les résultats obtenus **dans la deuxième partie du projet de thèse : Caractérisation du rôle de la voie IRE1/XBP1 dans le processus de maturation immunogénique des cDC1 spléniques lors de l'infection par *T. gondii*.**

Conclusions



Pour résumer nos résultats, nous avons observé, en l'absence de la voie IRE1/XBP1, un défaut d'activation des LT CD8+ et de la production d'IFNγ lors de l'infection pouvant être corrélé à la diminution de l'expansion totale des cDC1 de la rate. En étudiant plus en détail la modulation du processus de maturation des cDC1 spléniques en absence de la voie IRE1/XBP1, nous avons pu corréler cette diminution des cDC1 totales à la diminution drastique du sous-type « late immature » (CD103+). Nous avons observé qu'en l'absence de la voie IRE1/XBP1, la signature transcriptomique de ces cellules immatures reflétait un stress cellulaire intense, notamment avec l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus d'apoptose. De manière intéressante, nous n'avons pas observé de diminution dans le pourcentage de cellules du sous-type « late mature » (CCR7+) dans les souris délétées pour la voie IRE1/XBP1 infectées, mais une diminution de leur activation. En cherchant à déterminer à quoi pouvait être dû ce défaut d'activation des LT CD8+, nous n'avons pas pu observer de défaut de migration de ces cDC1 matures. Par ailleurs, nous avons observé un défaut du signal TetraOVA dans les LT CD8+ des souris KO pour IRE1/XBP1, mais seulement dans une des deux expériences, donc ces résultats doivent être confirmés. En étudiant, le profil transcriptomique de ces cDC1 mature CCR7+, nous avons également observé de nombreuses voies de l'apoptose activées dans les souris KO pour IRE1/XBP1, mais également la diminution de voies impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T. De manière surprenante, nous avons également observé dans les cDC1 « late immature » (CD103+), l'activation de voies impliquées dans l'apoptose des lymphocytes T

et dans la modulation de leur activité, suggérant peut-être un rôle de ce sous-type immature dans la survie et la réponse des LT CD8+.

Discussion

1. Processus de maturation des cDC1 « late immature »

1.1 Quels mécanismes initient l'expansion du sous-type cDC1 « late immature » (CD103+) lors de l'infection par *T. gondii* ?

L'expansion importante du sous-type de cDC1 spléniques « late immature » (CD103+) lors de l'infection par *T. gondii*, représentant alors 80% des cDC1 spléniques, contrairement aux 30% observés dans l'étude S. Janssens sur la maturation tolérogénique (Bosteels *et al*. 2023), semble suggérer un stimulus soit distinct ou si similaire, plus intense, dans l'initiation du processus du maturation immunogénique comparé à la maturation tolérogénique. Nous avons donc cherché à comprendre ce qui induit cette expansion importante de ce sous-type lors de l'infection à *T. gondii*. Ce signal ne semble pas provenir d'un signal immunogénique, car la stimulation des TLR via MyD88 n'est pas impliquée dans l'expansion de ce sous-type immature (Figure 6 - B), et nous n'avons pas détecté de matériel parasitaire par RTqPCR dans ces cellules (Figure 4).

De plus, l'injection de STAgs induit une maturation complète et rapide des cDC1 avec 100% de cDC1 CCR7+ à 2h post-injection, sans identification d'un stade intermédiaire « late immature » (CD103+) à des temps précoces de l'injection, soutenant à nouveau l'hypothèse que l'expansion du sous-type CD103+ serait initié par un signal cytokinique, et non par la reconnaissance d'un composant microbien. De manière intéressante, nous avons observé par RTqPCR sur cellules triées que le sous-type « late immature » exprime fortement le GM-CSF, que son expression est induite dans la rate entière (Figure 7) et l'injection de cette cytokine à des souris contrôles non infectées est suffisante pour induire l'expansion partielle de ce sous-type CD103+ (Figure 8).

Plusieurs études ont déjà démontré le rôle important du GM-CSF dans la prolifération et la différenciation des DC en conditions inflammatoires (Van de Laar et al. 2012 ; Zhan et al. 2011). Il serait donc intéressant d'étudier si l'expansion de ce sous-type de cDC1 immatures, qui semblent être à l'origine de l'expansion des cDC1 totales que nous avions précédemment observée lors de l'infection (Poncet al al., 2021), est dépendante de cette cytokine, par l'utilisation de souris délétées pour le récepteur au GM-CSF.

De manière intéressante, l'étude de S. Janssens sur la maturation tolérogénique des cDC1 nous a permis d'observer que les premières étapes du processus de maturation immunogénique étaient assez similaires à celles identifiées en condition tolérogénique, bien que l'expansion des cDC1 immatures soit plus importante lors de l'infection par *T. gondii*. Notamment, S. Janssens a observé que ce sous-type possède une importante capacité d'internalisation de cellules mortes, ou autres débris

cellulaires. L'utilisation de souris délétées pour les GTPases Rac1/Rac2 a permis de démontrer que cette activité d'internalisation est essentielle à leur processus de maturation (Bosteels *et al.* 2023). Ces cellules immatures CD103+ en condition tolérogénique sont également caractérisées par l'expression des gènes de la voie de l'IFNβ, comme observé dans notre étude lors de la maturation immunogénique (Figure 9 – A). De plus, ce sous-type « late immature » (CD103+) induit également très fortement la voie IRE1/XBP1 de l'UPR lors de la maturation tolérogénique mais aussi lors de l'infection par *T. gondii*. Aussi, l'étude de la maturation immunogénique des cDC1 spléniques lors de l'infection par *T. gondii* dans des souris délétées pour les GTPases Rac1/Rac2 permettrait d'examiner si la modulation de l'expansion du sous-type « late immature » (CD103+) est également dépendante de leur capacité d'internalisation. Par ailleurs, une analyse par RT-qPCR sur les cDC1 CD103+ triées issues de ces souris permettrait d'examiner si l'activation de la voie de l'IFNβ et de la voie IRE1 est déclenchée par leur activité d'internalisation.

1.2. Quel est le rôle de ce sous-type « late immature » (CD103+) lors de l'infection par *T. gondii* ?

De manière intrigante, il semblerait que les cDC1 immatures CD103+ restent « bloquées » à ce stade au vu de la faible expansion du sous-type « late mature » (CCR7+) bien qu'elles restent en très grand nombre dans la rate. Ces observations amènent à questionner leur rôle dans l'établissement d'une réponse immunitaire protectrice contre l'infection, et notamment dans l'activation et le priming des lymphocytes T CD8+. L'utilisation de souris délétées pour CD103 spécifiquement dans les cDC1 pourrait permettre d'examiner leur rôle dans l'établissement d'une immunité T spécifique mais aussi de déterminer si le sous-type « late mature » (CCR7+) provient des cDC1 « late immature » mais que seule une faible portion de ces dernières atteint le stade final de maturation.

1.3 Quels mécanismes induisent l'activation de la voie de l'IFNβ au sein des cDC1 immatures ?

Nos expériences utilisant des souris chimères délétées pour le récepteur IFNAR1 au sein des DC n'ont montré aucun défaut d'expansion de sous-type « late immature » lors de l'infection par *T. gondii*, suggérant que la voie de l'IFNβ n'est pas impliquée dans la prolifération des cDC1 CD103+. Il serait donc intéressant de comprendre ce qui induit l'activation de la voie IFNβ, si ce stimulus est similaire dans les conditions tolérogénique et immunogénique et quel est son rôle dans l'activité des cDC1 « late immature » (CD103+).

L'hypothèse émise par le laboratoire de S. Janssens est que l'internalisation de cellules mortes ou débris entraîne une augmentation du niveau de lipides dans la cellule, pouvant conduire à un choc

lipotoxique, contre-carré par la voie IRE1, qui effectivement joue un rôle important dans l'homéostasie lipidique notamment lors de l'augmentation du cholestérol libre (Feng et al. 2003, Devries-Seimon et al. 2005, Kedi et al. 2009). L'induction de la voie de l'IFNβ et l'expression des ISGs que nous avons observée par RTqPCR et CITE-seq sur cDC1 immatures triées pourrait donc s'expliquer par une perturbation dans le métabolisme lipidique qui induirait la voie IRE1. En effet, un déséquilibre dans la composition lipidique des membranes induit un stress du RE et déclenche l'activation de l'UPR (Volmer et al. 2013, Volmer et al. 2015). De plus, il a été montré que la voie IRE1 pouvait induire l'expression de l'IFNβ (Studencka et al. 2019, Sprooten et al. 2019, Hu et al. 2011). Il serait donc intéressant d'une part de procéder à un dosage lipidique (marquage des cellules au bodipy et quantification du cholestérol libre par l'utilisation d'un kit enzymatique) dans les cDC1 immatures triées à partir de souris contrôles infectées par *T. gondii* afin d'examiner si une augmentation du taux lipidique est également observée en conditions immunogéniques.

D'autre part, il a également été montré que la voie des interférons de type I pouvait être activée suite à la reconnaissance de DAMPs, notamment l'ADN et l'ARN des cellules mortes détectés par les PRRs cytosoliques (Brice at al. 2019, Janeway et al. 2002). La reconnaissance de DAMPs pourrait donc également expliquer l'induction de la voie des interférons de type I dans les cDC1 immatures sans stimulation par des composants microbiens.

Finalement, afin de comprendre le rôle de l'induction des interférons de type I dans les cDC1 immatures lors de l'infection par *T. gondii* et l'impact de son inhibition dans l'établissement du processus de maturation immunogénique et l'activation des LT, il serait intéressant de réaliser une expérience de Single cell RNA-seq de cDC1 spléniques triées à partir de souris contrôles et IFNAR KO. Des expériences de priming et d'activation des lymphocytes T pourraient être réalisées, comme nous l'avons effectué pour les souris IRE1/XBP1 KO.

Cependant, il est à noter que l'IFNβ a été montré comme un régulateur du taux lipidique cellulaire, en diminuant la synthèse de cholestérol et en induisant le stockage des acides gras et cholestérol sous forme de de gouttelettes lipidiques (Monson et al. 2021). La voie des interférons de type I pourrait donc contribuer après son induction par la voie IRE1 à un « feedback loop » positif, notamment par son effet autocrine et paracrine, à la diminution du taux de lipides dans la cellule et donc éviter un stress lipotoxique. Les gouttelettes lipidiques ont été également montrées comme des armes anti-microbiennes efficaces en conditions inflammatoires (Bosch et al. 2021), aussi la modulation du métabolisme lipidique par les interférons de type I à un stade de cDC1 immatures pourrait « préparer » la cellule à devenir une cellule mature détruisant et présentant efficacement les antigènes aux lymphocytes T. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les cDC1 CD103+ résidant dans les tissus sont celles qui présentent le plus efficacement les antigènes viraux étant protéger d'une infection active par l'expression des interférons de type I (Helft et al. 2012)

2. Processus de maturation des cDC1 « late mature » (CCR7+)

2.1 Quels mécanismes initient l'expansion du sous-type de cDC1 « late mature » (CCR7+) lors de l'infection par *T. gondii* ?

La très faible expansion du sous-type « late mature » (CCR7+) comparé à l'importante prolifération des cDC1 « late immature » (CD103+) implique qu'un mécanisme spécifique initie la dernière étape de maturation des cDC1 spléniques lors de l'infection. Le sous-type « late mature » (CCR7+) est connu pour être le sous-type qui migre de la pulpe rouge de la rate vers la pulpe blanche ou zone T, afin de présenter les antigènes et initier l'activation des lymphocytes T CD8+. Nos résultats ont indiqué l'expression des gènes parasitaires *Tg*Tubulin et *Tg*Sag1 uniquement dans le sous-type mature (Figure 4). Par ailleurs, le défaut d'expansion et d'activation du sous-type CCR7+ dans les souris délétées pour l'adapteur des TLR MyD88 implique que la reconnaissance du parasite par les TLR est nécessaire pour cette dernière étape de maturation. Tout comme les cDC1 « late immature » (CD103+), les analyses CITE-seq ont démontré une importante expression des gènes de la voie l'IFNβ et des ISGs dans ce sous-type « late mature » (CCR7+). Il est connu que les protéines codées par les ISG possèdent des activités antimicrobiennes intrinsèques dans les cellules infectées et induisent ses mêmes défenses dans les cellules voisines, limitant ainsi la propagation des agents infectieux, en particulier des virus (Schneider et al. 2014). En outre, les interférons de type I modulent les réponses immunitaires innée et adaptative en favorisant la présentation antigénique et les fonctions des cellules NK, en régulant la production de cytokines inflammatoires, et en activant des réponses spécifiques des lymphocytes T et B (Schneider et al. 2014). Il serait donc intéressant d'observer le processus de maturation des cDC1 « late mature » (CCR7+) dans des souris délétées pour le récepteur IFNAR1, afin d'examiner un potentiel rôle autocrine de cette cytokine dans l'activation des cDC1 matures, en se focalisant sur l'expression des différents marqueurs d'activation tels que CD80, CD86, CD40, CMH-I et CMH-II et de gènes impliqués dans les défenses cellulaires tels que iNOS et IDO. De plus, des résultats préliminaires du laboratoire obtenus dans des DC dérivées de la moelle osseuse de souris infectées par *T. gondii* ont montré que l'activation de la voie de l'IFNβ dépendait de MyD88 et de la reconnaissance de matériel parasitaire par notamment, le TLR9. Il serait donc intéressant de trier puis réaliser une analyse transcriptomique des cDC1 « late mature » (CCR7+) dans les souris MyD88 KO afin d'observer la modulation de la voie de l'IFNβ, et son implication dans l'activation des cDC1 « late mature » (CCR7+).

2.2 Pourquoi l'expansion des cDC1 « late mature » (CCR7+) est limitée à une faible proportion ?

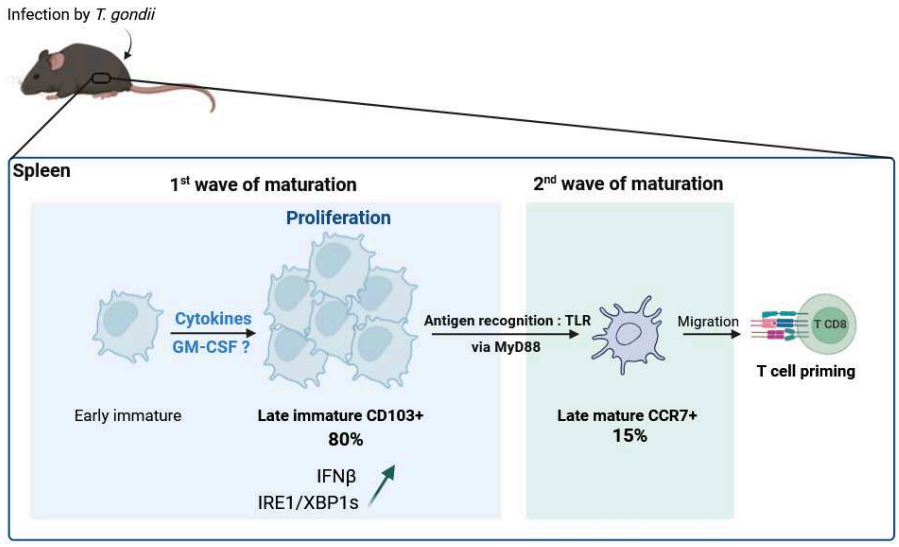
La reconnaissance du parasite étant nécessaire à cette dernière étape de maturation, nous avons tout d'abord pensé que la charge parasitaire dans la rate était tellement faible que cela expliquait ce faible nombre de cDC1 « late mature » (CCR7+). Cependant, de manière surprenante, l'expansion de ce sous-type reste limitée à une faible proportion, quel que soit la charge parasitaire injectée (jusqu'à 10 000 parasites) ou la virulence de la souche parasitaire (Figure 3 – A, B), alors que l'injection de STAgs en IV entraîne une maturation complète avec 100% de cDC1 CCR7+ après 6h. Cela impliquerait que lors de l'infection par des parasites vivants, peu de matériel parasitaire immunogénique atteigne la rate après 6 jours d'infection. Supportant cette hypothèse, nous n'avons pas détecté par cytométrie en flux de signal TdTomato (souche SAG1-OVA TdTomato) au sein des cDC1. De même, nous expériences utilisant des souris Ai6 (Figure 5 – A, B) ont suggéré que les cDC1 CCR7+ pouvaient avoir rencontré des parasites vivants, cependant cette expérience n'a pu apporter de résultats conclusifs. Afin de confirmer que les cDC1 matures sont entrées en contact avec des parasites vivants, nous pourrions marquer les parasites avec du Cell Tracker avant injection par I.P en souris, réaliser une cinétique d'infection, et suivre le trajet des parasites en déterminant quels sous-types de cDC1 (quels stades de maturation) est rentré en contact avec le parasite et à quel stade de l'infection.

Par ailleurs, bien que peu probable, la faible proportion de cDC1 matures pourrait révéler un rôle actif des effecteurs parasitaires, pouvant inhiber une maturation excessive des cDC1 « late immature » CD103+. En effet, il a été montré que les souches de type I pouvait sécréter les protéines effectrices TgROP5(I), TgROP17 et TgROP18, formant ainsi un complexe empêchent les protéines IRGs de se fixer à la VP, ce qui protège le parasite de la destruction (Etheridge et al., 2014). TgROP18 de la souche de type I peut aussi bloquer l'activation des lymphocytes T CD8+ en dégradant la protéine ATF6β de l'UPR (Yamamoto et al., 2011). Il a également été montré que les souches de type I et de type II pouvaient induire la protéine TgIST qui inhibe la production des IRGs et GBPs (Schneider et al. 2013). Ainsi, une analyse par immunophénotypage dans des rates de souris infectées par des souches mutantes du parasite, pour différents effecteurs parasitaires, permettrait d'observer le profil de maturation des cDC1 spléniques, et si cette faible expansion du sous-type « late mature » (CCR7+) proviendrait d'un blocage actif par le parasite.

Finalement, il serait également intéressant de mener une analyse similaire du processus de maturation des cDC1 dans des souris infectées par d'autres pathogènes intracellulaires, afin d'observer si ce profil de maturation des cDC1 splénique observée, en particulier la très faible proportion de cDC1 matures CCR7+, est spécifique à *T. gondii* ou ne l'est pas. Il reste intrigant que ces 15% de cDC1 matures activées soient suffisantes pour induire une réponse T spécifique très efficace en protégeant à long terme contre une ré-infection.

2.3 D'où proviennent les cDC1 « late mature » (CCR7+) ?

Pour finir, l'analyse par CITEseq de la trajectoire potentielle de maturation des cDC1 dans les rates de souris infectées, a permis de déterminer une deuxième trajectoire de maturation, autre que celle passant par les différents stades de maturation des cDC1, indiquant un passage rapide et direct des « early immature » aux « late mature » (CCR7+) en passant par un nouveau cluster identifié par CITE-seq nommé ISG+ cDC1. Ce sous-type est caractérisé par une expression importante des gènes de la voie des interférons de type I, notamment les ISGs. Cette faible expansion des cDC1 « late mature » comparé à la forte expansion des cDC1 « late immature » pourrait être expliqué par le fait qu'elles ne transitent par ce stade immature lors de l'infection par *T. gondii*, passant directement au stade mature par un mécanisme encore inconnu. Pour cela, différentes analyses sur des souris délétées pour CD103 ou CCR7 spécifiquement dans les cDC1, permettrait de comprendre le rôle de chaque sous-type lors de l'infection par *T. gondii*. Par ailleurs, des expériences de présentation antigénique avec des parasites irradiés et un marquage TetraOVA, ou de prolifération lymphocytaire avec l'injection d'OT-I naïfs, dans ces même souris délétées pour CD103 ou CCR7 permettrait de déterminer quel sous-type de cDC1 est impliqué dans ces processus lors de l'infection par *T. gondii*.



3. Rôle de la voie IRE1 sur la maturation et les fonctions des cDC1 spléniques

3.1 Quel est l'impact de l'absence de la voie IRE1 sur l'expansion des cDC1 « late immature » (CD103+) ?

La diminution drastique de l'expansion des cDC1 « late immature » (CD103+) lors de l'infection en absence de la voie IRE1/XBP1 implique un rôle important de cette voie sur la modulation de son

expansion. Ce défaut d'expansion des cDC1 immatures pourrait impliquer que l'absence de la voie IRE1/XBP1 restreint la prolifération des cDC1 immatures ou est nécessaire à leur survie en cas de choc lipotoxique causé par leur activité accrue d'internalisation.

En se basant sur les résultats obtenus par le laboratoire de S. Janssens lors de la maturation tolérogénique et de nos résultats en conditions immunognéique, il parait plus probable qu'un signal cytokinique induise leur expansion mais que la voie IRE1 soit nécessaire à leur survie. En effet, nos analyses CITE-seq et RT-qPCR ont démontré que ces cDC1 immatures souffraient d'un stress cellulaire important lors de l'infection en absence de la voie IRE1, activant les voies de l'apoptose, avec notamment la forte expression de la voie PERK/CHOP de l'UPR. Il serait intéressant de procéder à un marquage Annexin V (marqueur apoptotique) et un marquage Ki67 (marqueur de prolifération), et ainsi observer la maturation des cDC1 spléniques « late immature » (CD103+) à différents temps d'infection en absence ou non de la voie IRE1. En effet, cela permettrait d'examiner si l'absence de la voie IRE1 entraîne un défaut de prolifération de ces cellules immatures, ou si elles s'expandent à des temps plus précoces que 6 jours d'infection, mais qu'elles entrent en apoptose suite un stress trop important ne pouvant être régulé.

Cette mort cellulaire pourrait résulter d'un défaut dans l'homéostasie lipidique, induit suite à l'internalisation de débris ou de cellules mortes par les cDC1 « late immatures » (CD103+), causant une accumulation du cholestérol libre toxique pour la cellule. En accord avec cette hypothèse, nos résultats de CITE-seq et RT-qPCR dans les souris IRE1/XBP1 KO ont démontré une diminution de l'expression des gènes Apol7c, Apol10b et Abcg1 impliqué dans l'efflux du cholestérol à l'extérieur de la cellule. Afin de conforter cette hypothèse, nous pourrions examiner si l'inhibition au sein des cDC1 de ces transporteurs de cholestérol ou des facteurs de transcription LXRα et LXRβ qui sont connus pour induire ces gènes, entraine un phénotype similaire à celui observé en absence de IRE1 et XBP1.

3.2 Quel est l'impact de l'absence de la voie IRE1 sur l'expansion des cDC1 « late mature » (CCR7+) ?

De manière étonnante, nous n'avons pas observé de défaut dans le pourcentage de cDC1 « late mature » (CCR7+) dans les souris délétées pour la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection. Cependant, nous avons observé une baisse de leur activation, et une diminution de leur nombre dans les souris infectées KO pour la voie IRE1/XBP1. Ce pourcentage similaire observé de cDC1 « late mature » (CCR7+) dans les souris WT et IRE1/XBP1ΔcDC1, pourrait être corrélé à l'idée que ces cDC1 matures empruntent une trajectoire de maturation différente, ne passant pas par le sous-type « late immature » (CD103+), mais par ce nouveau cluster ISG+ cDC1 présent de manière plus importante dans les souris IRE1/XBP1ΔcDC1

infectées. Cependant, les analyses CITE-seq ont révélé un profil transcriptomique différent entre les cDC1 « late mature » des souris WT infectées et des souris IRE1/XBP1ΔcDC1 infectées. En effet, alors que les cDC1 « late mature » (CCR7+) provenant des souris WT infectées adoptent un profil immunogénique et inhibent les réponses tolérogéniques telle que la voie du TGFβ, et se caractérisent aussi par l'induction de voies impliquées dans l'activation des lymphocytes T, les cDC1 « late mature » des souris KO pour la voie IRE1 présentent un profil de stress cellulaire comme observé pour les cDC1 « late immature ». En effet, nous avons pu observer l'activation des voies de l'apoptose, et des réparations liées aux dommages de l'ADN, reflétant un stress cellulaire causé par l'absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection. Ces cellules ne semblent pas non plus activer la voie des interférons de type I.

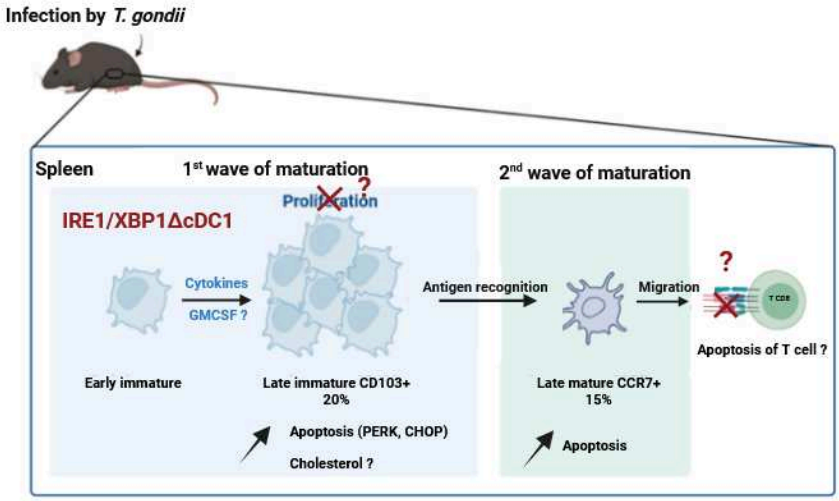
3.3 Quel est l'impact de l'absence de la voie IRE1 sur les fonctions des cDC1 « late immature » (CD103+) et « late mature » (CCR7+) ?

La diminution de l'activation des LT CD8+ et de la production d'IFNγ en l'absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection par *T. gondii* pourrait refléter un ou plusieurs défauts fonctionnels des cDC1. Tout d'abord, nous n'avons pas observé de défaut de migration des cDC1 « late mature » (CCR7+) en l'absence de la voie IRE1/XBP1, cependant le pourcentage de ces cDC1 matures n'augmentant quasiment pas avec l'infection, il est difficile de poser un résultat clair. Il serait donc intéressant de réaliser des coupes de rates des souris contrôles et IRE1/XBP1ΔcDC1 et de procéder à des analyses par immunohistochimie afin d'observer les proportions des différents sous-types de maturation des cDC1 dans la pulpe blanche et rouge de la rate, et ainsi confirmer de manière définitive si nous observons un défaut de migration des cDC1 matures CCR7+ dans la pulpe blanche.

D'autre part, les analyses CITE-seq ont révélé que les cDC1 « late mature » (CCR7+) présentaient un profil de stress cellulaire important en engageant notamment les voies de l'apoptose. Ces cellules matures semblent induire des voies assurant leur survie en absence de la voie IRE1/XBP1, et ne présentent pas le profil immunogénique identifié dans les cDC1 mature provenant des souris contrôle infectées, en particulier les voies d'activation et de prolifération des lymphocytes T. Ce stress cellulaire semble donc dominer le phénotype de ces cellules ce qui rend plus difficile une analyse plus précise d'autres voies qui seraient modulées directement par la voie IRE1, par exemple celles impliquer dans la présentation antigénique.

Il serait donc intéressant de procéder à une expérience d'analyse de priming et prolifération des T CD8+ en injectant des LT naïfs provenant de souris OT-I (reconnaissant spécifiquement l'antigène OVA) dans des souris contrôles ou IRE1/XBP1ΔcDC1 afin d'observer un potentiel défaut de présentation antigénique entrainant un défaut de prolifération des LT CD8+ en absence de la voie IRE1/XBP1 lors de l'infection à *T. gondii*. Cette expérience a été initiée mais n'a pas été finalisée au moment de l'écriture de ce manuscrit.

Pour finir, il est possible de considérer que le sous-type « late immature » (CD103+) contribue à l'activation des T CD8+ (à déterminer avec les expériences proposées dans le chapitre 1 de la discussion). Il serait donc important d'analyser la population des lymphocytes T dans nos expériences de CITEseq, ces dernières ayant été aussi incluses dans les différents types cellulaires triées pour cette analyse. De plus, tout comme les cDC1 « late mature » (CCR7+), les cDC1 immatures (CD103+) présentent un profil important de stress cellulaire, avec également une activation des voies de l'apoptose, indiquant une souffrance cellulaire importante qui pourrait perturber l'activation de voies impliquées dans une polarisation immunogénique précoce, qui serait déjà initié à ce stade. Une comparaison détaillée du profil des cDC1 immatures CD103+ en conditions immunogénique et tolérogénique est en cours afin d'adresser ce point important.



Références Bibliographiques

Abdallah et al. 2012. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. Infect Immun Feb;80(2):768-77. doi: 10.1128/IAI.05730-11

Ackerman et al. 2006. A Role for the Endoplasmic Reticulum Protein Retrotranslocation Machinery during Crosspresentation by Dendritic Cells. Immunity 25.4, pp. 607–617. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.017.

Acosta-Alvear et al. 2007. XBP1 controls diverse cell type- and conditon- specific transcriptional regulatory networks. Mol Cell Jul 6;27(1):53-66. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.011.

Adachi et al. 2008. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Cell Struct Funct;33(1):75-89. doi: 10.1247/csf.07044. Epub 2008 Mar 18.

Adams et al. 2019. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. Front Mol Biosci Mar 12:6:11. doi: 10.3389/fmolb.2019.00011. eCollection 2019

Adiko et al. 2015. Intracellular Transport Routes for MHC I and Their Relevance for Antigen Cross-Presentation". Frontiers in Immunology 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00335.

Aichinger et al. 1997. Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. J Biol Chem Nov 14;272(46):29127-36. doi: 10.1074/jbc.272.46.29127.

Anand et al. 2013. Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration in Experimental Cerebral Malaria. Neurosignals 21.1-2, pp. 99–111. doi: 10.1159/000336970.

Andrade et al. 2013. Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to Toxoplasma gondii in Mice. Cell Host & Microbe 13.1, pp. 42–53. doi: 10.1016/j.chom.2012.12.003.

Ardouin et al. 2016. Broad and largely concordant molecular changes characterize tolerogenic and immunogenic dendritic cell maturation in thymus and periphery. Immunity Aug 16;45(2):305-18. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.019.

Attias et al. 2020. The life-cycle of Toxoplasma gondii reviewed using animations. Parasit Vectors Nov 23;13(1):588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z

Augusto et al. 2020. Toxoplasma gondii co-opts the unfolded protein response to enhance migration and dissemination of infected host cells**.** mBioJul 7;11(4):e00915-20. doi: 10.1128/mBio.00915-20

Bando 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. mBio 9.5. Ed. by E. Y. Denkers and J. C. Boothroyd. doi: 10.1128/mbio.01738-18.

Baratin et al. 2015. Homeostatic NF-kappaB signaling in steady-state migratory dendritic cells regulates immune homeostasis and tolerance. Immunity Apr 21;42(4):627-39. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.003

Beghetto et al. 2005. A combination of antigenic regions of Toxoplasma gondii microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. J Infect Dis Feb 15;191(4):637-45. doi: 10.1086/427660

Behnke et al. 2011. Virulence differences in Toxoplasma mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. Proc Natl Acad Sci U S A Jun 7;108(23):9631-6. doi: 10.1073/pnas.1015338108.

Bekpen et al. 2005). The interferon-inducible p47 IRG GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. Genome Biology 6.11. doi: 10.1186/gb-2005-6-11-r92.

Béla et al. 2012. Impaired innate immunity in mice deficient in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 leads to defective type 1 T cell responses, B cell expansion, and enhanced susceptibility to infection with Toxoplasma gondii. Infect Immun Dec;80(12):4298-308. doi: 10.1128/IAI.00328-12

Benson et al. 2009. Gut Commensal Bacteria Direct a Protective Immune Response against Toxoplasma gondii. Cell Host & Microbe 6.2, pp. 187–196. doi: 10.1016/j.chom.2009.06.005.

Bertolotti et al. 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1betadeficient mice. Journal of Clinical Investigation 107.5, pp. 585–593. doi: 10.1172/jci11476.

Beutler 2009. TLRs and innate immunity. Blood Feb 12;113(7):1399-407. doi: 10.1182/blood-2008-07-019307

Bhadra et al. 2011. The CD8 T-cell road to immunotherapy of toxoplasmosis. Immunotherapy Jun;3(6):789-801. doi: 10.2217/imt.11.68.

Bhadra et al. 2013. Psychiatric disorders in toxoplasma seropositive patients-theCD8 connection. Schizophr Bull May;39(3):485-9. doi: 10.1093/schbul/sbt006

Bhushan et al. 2020 ISG15 connects autophagy and IFN-γ- Dependent control of Toxoplasma gondii in human cells. mBio 2020 Oct 6;11(5):e00852-20. doi: 10.1128/mBio.00852-20

Birnberg et al. 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. Immunity Dec 19;29(6):986-97. doi: 10.1016/j.immuni.2008.10.012

Bishop et al. 2005. Cell surface heparan sulfate promotes replication of Toxoplasma gondii. Infect Immun Sep;73(9):5395–5401. doi: 10.1128/IAI.73.9.5395-5401.2005

Blader et al. 2015. Lytic cycle of Toxoplasma gondii : 15 years later. Annu Rev Microbiol 69:463-85. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104100

Blanchard et al. 2008. Immunodominant, protective response to the parasite Toxoplasma gondii requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. Nature Immunology 9.8, pp. 937–944. doi: 10.1038/ni.1629.

Bliss et al. 1999. Murine neutrophil stimulation by Toxoplasma gondii antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. The Journal of Immunology. Aug 15;163(4):2081-8.

Blum et al. 2013. Pathways of antigen processing. Annu Rev Immunol :31:443-73. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.

Bonifaz et al. 1999. Endogenous and exogenous forms of the same antigen are processed from different pools to bind MHC class II molecules in endocytic compartments. Eur J Immunol Jan;29(1):119-31. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<119::AID-IMMU119>3.0.CO;2-O

Bosch et al. 2021. Lipid droplets and the host-pathogen dynamic : FATal attraction ? J Cell Biol Aug 2;220(8):e202104005. doi: 10.1083/jcb.202104005.

Bosteels et al. 2023. LXR signaling controls homeostatic dendritic cell maturation. Sci Immunol May 12;8(83):eadd3955. doi: 10.1126/sciimmunol.add3955

Bourque et al. 2023. Life and death of tolerogenic dendritic cells. Trends Immunol Feb;44(2):110-118. doi: 10.1016/j.it.2022.12.006

Braakman et al. 2013. Protein folding in the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb Perspect Biol May 1;5(5):a013201. doi: 10.1101/cshperspect.a013201

Bravo et al. 2013. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response : dynamics and metabolic integration. Int Rev Cell Mol Biol 301:215-90. doi: 10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1.

Brice et al. 2019. Type I interferon and interferon-stimulated gene expression in oral epithelial cells. Mol Oral Microbiol Dec;34(6):245-253. doi: 10.1111/omi.12270.

Brown et al. 1990. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in Toxoplasma gondii infection. Journal of Immunology.

Buaillon et al. 2017. MHC I presentation of Toxoplasma gondii immunodominant antigen does not require Sec22b and is regulated by antigen orientationat the vacuole membrane. European Journal of Immunology 47.7, pp. 1160–1170. doi: 10.1002/eji.201646859.

Butcher et al. 2011. Toxoplasma gondii rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. PLoS Pathog Sep;7(9):e1002236. doi: 10.1371/journal.ppat.1002236.

Buzoni-Gatel et al. 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on Toxoplasma gondii infections. Cellular Microbiology 8.4, pp. 535–544. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00692.x.

Byrd et al. 2012. Intricately regulated : a cellular toolbox for fine-tuning XBP1 expression and activity. Cells Oct 15;1(4):738-53. doi: 10.3390/cells1040738.

Calfon et al. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature 415.6867, pp. 92–96. doi: 10.1038/415092a.

Caminschi et al. 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. Blood Oct 15;112(8):3264-73. doi: 10.1182/blood-2008-05-155176.

Canton et al. 2021. The receptor DNGR-1 signals for phagosomal rupture to promote cross-presentation of dead-cell-associated antigens. Nat Immunol Feb;22(2):140-153. doi: 10.1038/s41590-020-00824-x.

Cascio, P. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. The EMBO Journal 20.10, pp. 2357–2366. doi: 10.1093/emboj/20.10.2357.

Casciotti et al. 2002. CD8+-T-cell immunity against Toxoplasma gondii can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4+ T cells. Infect Immun Feb;70(2):434–443. doi: 10.1128/IAI.70.2.434-443.2002

Carruthers et al. 2007. Pulling together : an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Curr Opin Microbiol. Feb;10(1):83-9. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.017.

Carruthers et al. 2008. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell Biochem 47:33-45. doi: 10.1007/978-0-387-78267-6_2.

Cebrian et al. 2011. Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells. Cell 147.6, pp. 1355– 1368. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.021.

Celli et al. 2014. Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolde protein response: friends or foes? Nature Reviews Microbiology 13.2, pp. 71–82. doi: 10.1038/nrmicro3393.

Chang et al. 1990. Role of TNF and IL-1 in infections with Toxoplasma gondii. Immunology Jan;69(1):337

Choi et al. 2014. The parasitophorous vacuole membrane of Toxoplasma gondii is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. ImmunityJun 19;40(6):924-35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.006

Chowdhury et al. 2008. Death by a thousand cuts : granzyme pathways of programmed cell death. Annu Rev Immunol 26:389-420. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404

Chu et al. 2016. Production of IL-1beta and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in Toxoplasma gondii-Infected THP-1 Macrophages. The Korean Journal of Parasitology 54.6, pp. 711–717. doi: 10. 3347/kjp.2016.54.6.711.

Clavarino et al. 2012a. Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acidstimulated dendritic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 109.8, pp. 3006–3011. doi: 10.1073/pnas.1104491109.

Cohen et al. 2015. Impact of Toxoplasma gondii on dendritic cell subset function in the intestinal mucosa. J Immunol Sep 15;195(6):2754-62. doi: 10.4049/jimmunol.1501137

Combe et al. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against Toxoplasma gondii in the absence of CD4(+) T cells. Infect Immun Aug;73(8):4913-21. doi: 10.1128/IAI.73.8.4913-4921.2005

Coombes et al. 2013. Motile invaded neutrophils in the small intestine of Toxoplasma gondii-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. Proc Natl Acad Sci U S A May 21;110(21):E1913-22. doi: 10.1073/pnas.1220272110

Costa-Silva et al. 2008. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for Toxoplasma gondii. Experimental Parasitology 120.3, pp. 227–234. doi: 10.1016/j.exppara.2008.07.015.

Couper et al. 2005. Toxoplasma gondii-Specific Immunoglobulin M Limits Parasite Dissemination by Preventing Host Cell Invasion". Infection and Immunity 73.12, pp. 8060–8068. doi:10.1128/iai.73.12.8060-8068.2005.

Courret et al. 2006. CD11c- and CD11b- expressing mouse leukocytes transport single Toxoplasma gondii tachyzoite to the brain. Blood Jan 1;107(1):309-16. doi: 10.1182/blood-2005-02-0666.

Cresswell 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. Cell Feb 23;84(4):505-7. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81025-9

Cubillos-Ruiz et al. 2015. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. Cell 161.7, pp. 1527–1538. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.025.

Dalod et al. 2014. Dendritic cell maturation : functionnal specialization through signaling specificity and transcriptional programming. EMBO J May 16;33(10):1104-16. doi: 10.1002/embj.201488027

Darrasse-Jeze et al. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. J Exp Med Aug 31;206(9):1853-62. doi: 10.1084/jem.20090746. Epub 2009 Aug 10.

Dardé et al. 2008. Toxoplasma gondii, « new » genotypes and virulence. Parasite Sep;15(3):366-71. doi: 10.1051/parasite/2008153366.

Debierre-Grockiego et al. 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from Toxoplasma gondii. The Journal of Immunology 179.2, pp. 1129–1137. doi: 10.4049/ jimmunol.179.2.1129.

Deckert-Scluter et al. 1998. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. J Immunol Apr 1;160(7):3427-36

Degrandi et al. 2012. Murine Guanylate Binding Protein 2 (mGBP2) controls Toxoplasma gondii replication. Proceedings of the National Academy of Sciences 110.1, pp. 294–299. doi: 10.1073/pnas.1205635110.

Delair et al. 2011. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. Ocul Immunol Inflamm Apr;19(2):91-102. doi: 10.3109/09273948.2011.564068

Del Rio et al. CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during Toxoplasma gondii infection. J Immunol Dec 1;167(11):6503-9. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6503

Denkers et al. 1997. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to Toxoplasma gondii. Journal of Immunology Aug 15;159(4):1903-8

Devries-Seimon et al. 2005. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. J Cell Biol Oct 10;171(1):61-73. doi: 10.1083/jcb.200502078.

Dian et al. 2023. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients : a review. Pathog Glob Health Feb;117(1):14-23. doi: 10.1080/20477724.2022.2083977

Dias-Teixeira et al. 2016. The integrated endoplasmic reticulum stress response in Leishmania amazonensis macrophage infection: the role of X-box binding protein 1 transcription factor. The FASEB Journal 30.4, pp. 1557–1565. doi: 10.1096/fj.15-281550.

Diebold et al. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science Mar 5;303(5663):1529-31. doi: 10.1126/science.1093616

Dimier et al. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication : a role for intracellular iron. Immunology Aug;94(4):488-95. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00553.x

Dobrowolski et al. 1997. Actin in the parasite Toxoplasma gondii is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarlarly in a globular form. Cell Motil Cytoskeleton 37(3) :253-62. Doi : 10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:3<253::AID-CM7>3.0.CO;2-7.

Dongre et al. 2001. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. Eur J Immunol May;31(5):1485-94. doi: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1485::AID-IMMU1485>3.0.CO;2-A

Dubey et al. 1998. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clinical Microbiology Reviews 11.2, pp. 267–299. doi: 10.1128/cmr.11.2.267.

Dubey et al. 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans. *Parasites Vectors* **3**, 112. Doi :10.1186/1756-3305-3-112

Dunn et al. 1999. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis : risk estimates for clinical counselling. Lancet May 29;353(9167):1829-33. doi: 10.1016/S0140-6736(98)08220-8.

Dunay et al. 2008. Gr1(+) Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen Toxoplasma gondii. Immunity 29.2, pp. 306–317. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.019.

Dunay et al. 2010. Monocytes mediate mucosal immunity to Toxoplasma gondii. Current Opinion in Immunology 22.4, pp. 461–466. doi: 10.1016/j.coi.2010.04.008.

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 et al. 2014. Parasite Fate and Involvement of Infected Cells in the Induction of CD4+ and CD8+ T Cell Responses to Toxoplasma gondii. PLoS Pathogens 10.4. Ed. by G. S. Yap, e1004047. doi: 10.1371/journal.ppat.1004047.

Dustin 2014. The Immunological Synapse. Cancer Immunology Research 2.11, pp. 1023–1033. doi: 10.1158/2326-6066.cir-14-0161.

Dzierszinski et al. 2007. Presentation of Toxoplasma gondii Antigens via the Endogenous Major Histocompatibility Complex Class I Pathway in Nonprofessional and Professional Antigen-Presenting Cells. Infection and Immunity 75.11, pp. 5200–5209. doi: 10.1128/iai.00954-07.

Edwards et al. 2002. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. J Immunol Oct 1;169(7):3652-60. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3652

Elsheikha et al. 2020. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev Nov 25;34(1):e00115-19. doi: 10.1128/CMR.00115-19

Embgenbroich et al. 2018. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. Frontiers in Immunology 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01643.

Etheridge et al. 2014. The Toxoplasma peseudokinase ROP5 forms complexes with the ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. Cell Host Microbe May 14;15(5):537-50. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.002

Ewald et al. 2013. NLRP1 Is an Inflammasome Sensor for Toxoplasma gondii. Infection and Immunity 82.1. Ed. by J. H.Adams, pp. 460–468. doi: 10.1128/iai.01170-13.

Feliu et al. 2013. Location of the CD8 T Cell Epitope within the Antigenic Precursor Determines Immunogenicity and Protection against the Toxoplasma gondii Parasite. PLoS Pathogens 9.6. Ed. by E. Y. Denkers, e1003449. doi: 10.1371/journal.ppat.1003449.

Feng et al. 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. Nat Cell Biol Sep;5(9):781-92. doi: 10.1038/ncb1035

Fisch et al. 2019. Human GBP1 is a microbe-specific gate keeper of macrophage apoptosis and pyroptosis. EMBO J Jul 1;38(13):e100926. doi: 10.15252/embj.2018100926

Fisch et al. 2022. Toxoplasma-proximal and distal control by GBPs in human macrophages. Pathog Dis7;79(9):ftab058. doi: 10.1093/femspd/ftab058

Fleckenstein et al. 2012. A Toxoplasma gondii pseudokinase inhibits host IRG resistance proteins. PLoS Biol 10(7):e1001358. doi: 10.1371/journal.pbio.1001358. Epub 2012 Jul 10.

Foltz et al. 2017. TRIM21 is critical for survival of Toxoplasma gondii infection and localises to GBP-positive parasite vacuoles. Sci Rep Jul 12;7(1):5209. doi: 10.1038/s41598-017-05487-7

Fox et al. 2004. Toxoplasma gondii lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. Int J Parasitol Mar 9;34(3):323-31. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.12.001.

Frickel et al. 2008. Parasite Stage-Specific Recognition of EndogenousToxoplasma gondii–Derived CD8+ T Cell Epitopes. The Journal of Infectious Diseases 198.11, pp. 1625–1633. doi: 10.1086/593019.

Fucks et al. 2012. GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected Toxoplasma gondii. PLoS Pathog;8(12):e1003051. doi: 10.1371/journal.ppat.1003051.

Galluzzi et al. 2016. Leishmania infantum Induces Mild Unfolded Protein Response in Infected Macrophages. PLOS ONE 11.12. doi: 10.1371/journal.pone.0168339.

Galluzzi et al. 2017. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in infection by intracellular parasites. Future Science OA 3.3. doi: 10.4155/fsoa-2017-0020.

Gatto et al. 2013. The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. Nat Immunol May;14(5):446-53. doi: 10.1038/ni.2555

Gay et al. 2016. Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-γ-mediated host defenses. J Exp Med Aug 22;213(9):1779-98. doi: 10.1084/jem.20160340. Epub 2016 Aug 8.

Gazzinelli et al. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine. Journal of Immunology.

Gazzinelli et al. 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proceedings of the National Academy of Sciences 90.13, pp. 6115–6119. doi: 10.1073/pnas.90.13.6115.

Gazzinelli et al. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with Toxoplasma gondii. Journal of Immunology. Jul 1;149(1):175-80.

Gazzinelli et al. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii. J Immunol Sep 15;153(6):2533-43

Ghosh et al. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation : CLIP bound to HLA-DR3. NatureNov 30;378(6556):457-62. doi: 10.1038/378457a0.

Goldszmid et al. 2007. TAP-1 indirectly regulates CD4+ T cell priming in Toxoplasma gondii infection by controlling NK cell IFN-γ production. J Exp Med Oct 29;204(11):2591–2602. doi: 10.1084/jem.20070634

Goldszmid et al. 2009. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in Toxoplasma gondii-infected dendritic cells. The Journal of Experimental Medicine 206.2, pp. 399–410. doi: 10.1084/jem.20082108.

Goldszmid et al. 2012. NK cell-derived interferon-γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. Immunity Jun 29;36(6):1047-59. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.026

Goodall et al. 2010. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 107.41, pp. 17698–17703. doi: 10.1073/pnas.1011736107.

Gorfu et al. 2014. Dual Role for Inflammasome Sensors NLRP1 and NLRP3 in Murine Resistance to Toxoplasma gondii. mBio 5.1. Ed. by L. M. Weiss. doi: 10.1128/mbio.01117-13.

Gov et al. 2013. Human Innate Immunity to Toxoplasma gondii Is Mediated by Host Caspase-1 and ASC and Parasite GRA15. mBio 4.4. Ed. by L. M. Weiss. doi: 10.1128/mbio.00255-13.

Gregg et al. 2011. Subcellular Antigen Location Influences T-Cell Activation during Acute Infection with Toxoplasma gondii". In: PLoS ONE 6.7. Ed. by Y. A. Kwaik, e22936. doi: 10.1371/ journal.pone.0022936.

Gregg et al. 2013. Replication and distribution of Toxoplasma gondii in the small intestine after oral infection with tissue cysts. Infect Immun May;81(5):1635-43. doi: 10.1128/IAI.01126-12

Grover et al. 2012. The Toxoplasma gondii Peptide AS15 Elicits CD4 T Cells That Can Control Parasite Burden. Infection and Immunity 80.9. Ed. by J. L. Flynn, pp. 3279–3288. doi: 10.1128/iai.00425-12.

Grover 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 et al. 2005. Class I Major Histocompatibility Complex Presentation of Antigens That Escape from the Parasitophorous Vacuole of Toxoplasma gondii. Infection and Immunity 73.2, pp. 703– 711. doi: 10.1128/iai.73.2.703-711.2005.

Guitard et al. 2024. Multicenter evaluation of the Toxoplasma gondii Real-TM (Sacace) kit performance for the molecular diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol Apr 10;62(4):e0142823. doi: 10.1128/jcm.01428-23

Hakimi et al. 2017. Toxoplasma effectors targeting host signaling and transcription. Clin Microbiol Rev Jul;30(3):615-645. doi: 10.1128/CMR.00005-17.

Haldar et al. 2013. IRG et GBP host resistance factors target aberrant « non-self » vacuoles characterized by the missing of « self » IRGM proteins. PLoS Pathog;9(6):e1003414. doi: 10.1371/journal.ppat.1003414.

Hammad et al. 2010. Inflammatory dendritic cells – not basophils- are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. J Exp Med Sep 27;207(10):2097-111. doi: 10.1084/jem.20101563.

Harding et al. 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2a) dephosphorylation in mammalian development. Proc Natl Acad Sci U S A Jan 30;106(6):1832–1837. doi: 10.1073/pnas.0809632106

Heil et al. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science Mar 5;303(5663):1526-9. doi: 10.1126/science.1093620

Helft et al. 2012. Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. J Clin Invest Nov;122(11):4037-47. doi: 10.1172/JCI60659.

Herber et al. 2010. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. Nature Medicine 16.8, pp. 880–886. doi: 10.1038/nm.2172.

Hill et al. 2002. Toxoplasma gondii : transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect Oct;8(10):634-40. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x.

Hill et al. 2005. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. Anim Health Res Rev Jun;6(1):41-61. doi: 10.1079/ahr2005100

Hill et al. 2010. Seroprevalence of and risk factors for Toxoplasma gondii in the USA swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring survey. Zoonoses Public Health Feb;57(1):53-9. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01275.x.

Hoeve et al. 2022. The Toxoplasma effector GRA28 promotes parasite dissemination by inducing dendritic cell-like migratory properties in infected macrophages. Cell Host Microbe Nov 9;30(11):1570-1588.e7. doi: 10.1016/j.chom.2022.10.001

Honda et al. 2006. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. Immunity Sep;25(3):349-60. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.009

Hou et al. 2010. Critical coordination of innate immune defense against Toxoplasma gondii by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences 108.1, pp. 278–283. doi: 10.1073/pnas.1011549108.

Hsu et al. 2008. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. Proc Natl Acad Sci U S A Jun 3;105(22):7803-8. doi: 10.1073/pnas.0802726105

Hu et al. 2011. ER stress and its regulator X-box-binding protein-1 enhance polyIC-induced innate immune response in dendritic cells. European Journal of Immunology 41.4, pp. 1086–1097. doi: 10.1002/eji.201040831.

Hunter et al. 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice : regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. Infect Immun Jul;62(7):2818-24. doi: 10.1128/iai.62.7.2818-2824.1994

Hunter et al. 1995. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular. J Immunol Nov 1;155(9):4347-54

Hunter et al. 1997. Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells. Immunol Lett Oct;59(1):1-5. doi: 10.1016/s0165-2478(97)00091-6

Hunter et al. 2012. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. Nature Reviews Microbiology 10.11, pp. 766–778. doi: 10.1038/nrmicro2858.

Iberg et al. 2017. Dendritic cells as inducers of peripheral tolerance. Trends Immunol Nov;38(11):793-804. doi: 10.1016/j.it.2017.07.007

Iberg et al. 2020. Natural and induced tolerogenic dendritic cells. J Immunol Feb 15;204(4):733-744. doi: 10.4049/jimmunol.1901121.

Ihara et al. 2024. The role of IFN-γ-mediated host immune responses in monitoring and the elimination of Toxoplasma gondii infection. Int Immunol Apr 3;36(5):199-210. doi: 10.1093/intimm/dxae001

Inacio et al. 2015. Parasite-induced ER stress response in hepatocytes facilitates Plasmodium liver stage infection. EMBO reports 16.8, pp. 955–964. doi: 10.15252/embr.201439979.

Iwakoshi et al. 2007. The transcription factor XBP- 1 is essential for the development and survival of dendritic cells. The Journal of Experimental Medicine 204.10, pp. 2267–2275. doi: 10.1084/jem.20070525.

Janeway et al. 2002. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol :20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Jensen et al. 2012. Toxoplasma polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. Cell Host Microbe Jun 16;9(6):472-83. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.015.

Joffre et al. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. In: Nature Reviews Immunology 12.8, pp. 557–569. doi: 10 . 1038 / nri3254.

John et al. (2009). Dynamic Imaging of CD8+ T Cells and Dendritic Cells during Infection with Toxoplasma gondii. PLoS Pathogens 5.7. Ed. by E. M. Riley, e1000505. doi: 10.1371/journal.ppat.1000505.

Johnson et al. 1992. TNF-alpha augments pulmonary vasoconstriction via the inhibition of nitravasodilator activity. J Appl Physiol Dec;73(6):2483-92. doi: 10.1152/jappl.1992.73.6.2483

Johnson et al. 2002. Aging and developmental transitions in the B cell lineage. *International Immunology*, Volume 14, Issue 11, November 2002, Pages 1313–1323. Doi : 10.1093/intimm/dxf092

Jongert et al. 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. Vaccine 28.13, pp. 2556–2564. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.031.

Jonuleit et al. 1997. Pro-infllammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritric cells under fetal calf serum-free conditions. Eur J Immunol Dec;27(12):3135-42. doi: 10.1002/eji.1830271209

Kanatani et al. 2015. Infection by Toxoplasma gondii induces amoeboid-like migration of dendritic cells in a three-dimensional collagen matrix. PLoS One Sep 25;10(9):e0139104. doi: 10.1371/journal.pone.0139104

Kanatani et al. 2017. Voltage-dependent calcium channel signaling mediates GABAA receptor-induced migratory activation of dendritric cells infected by Toxoplasma gondii. PLoS Pathog Dec 7;13(12):e1006739. doi: 10.1371/journal.ppat.1006739

Kang et al. 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. The Journal of Immunology 164.5, pp. 2629–2634. doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2629.

Kedi et al. 2009. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway. Atherosclerosis Nov;207(1):123-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.019.

Khan et al. 1994. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute Toxoplasma gondii infection in mice. Journal of Immunology. Feb 15;152(4):1856-60.

Khan et al. 1996. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute Toxoplasma gondii infection in mice. Int Immunol Jun;8(6):887-96. doi: 10.1093/intimm/8.6.887

Khan et al. 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute Toxoplasma gondii infection in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 94.25, pp. 13955–13960. doi: 10.1073/pnas.94. 25.13955.

Khan et al. 2001. Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to Toxoplasma gondii. J Immunol Feb 1;166(3):1930-7. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1930

Kim et al. 2007. Toxoplasma gondii Dysregulates IFN-gamma-Inducible Gene Expression in Human Fibroblasts: Insights from a Genome- Wide Transcriptional Profiling. The Journal of Immunology 178.8, pp. 5154–5165. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5154.

Kim et al. 2008. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. Immunity Feb;28(2):246-57. doi: 10.1016/j.immuni.2007.12.012

Kim et al. 2016. The rhoptry pseudokinase ROP54 modulates Toxoplasma gondii virulence and host GBP2 loading. mSphere Mar 23;1(2):e00045-16. doi: 10.1128/mSphere.00045-16. eCollection 2016 Mar-Apr.

Kloetzel, P. M. 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. Nature Immunology 5.7, pp. 661–669. doi: 10.1038/ni1090.

Konishi et al. 1992. Naturally occuring immunoglbulin M antibodies : enhancement of phagocytic and microbicidal activities of human neutrophils against Toxoplasma gondii. Parasitology Jun:104 (Pt 3):427-32. doi: 10.1017/s003118200006368x

Kwok 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. The Journal of Immunology 170.4, pp. 1949–1957. doi: 10.4049/jimmunol.170. 4.1949.

Laathem et al. 2014. Crucial role of CD4 and CD8 coreceptors in antigen recognition of αβT lymphocytes. Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 511–513. Doi : 10.1051/medsci/20143005012

Lambert et al. 2006. Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination. Cell Microbiol Oct;8(10):1611-23. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x

Lambert et al. 2009. The Toxoplasma gondii-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. Infect Immun Apr;77(4):1679-88. doi: 10.1128/IAI.01289-08.

Layton et al. 2023. Clinical spectrum, radiological findings, and outcomes of severe Toxoplasmosis in immunocompetent hosts : a systemic review. Pathogens Mar 31;12(4):543. doi: 10.3390/pathogens12040543.

Land et al. 2005. The role of postischemic reperfusion injury to allografts : its impact on T-cell alloactivation via upregulation of dendritic cell-mediated stimulation, co-stimulation, and adhesion. Transplantation Mar 15;79(5):505-14. doi: 10.1097/01.tp.0000153160.82975.86.

Le Bon et al. 2001. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. Immunity Apr;14(4):461-70. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00126-1

Lee et al. 2003. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. Molecular and Cellular Biology 23.21, pp. 7448–7459. doi: 10.1128/mcb.23.21. 7448-7459.2003.

Lee et al. 2008. Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1. Science 320.5882, pp. 1492–1496. doi: 10.1126/science.1158042.

Leroux et al. 2015. Parasite manipulation of the invariant chain and the peptide editor H2-DM affectsmajor histocompatibility complex class II antigen presentation during Toxoplasma gondii infection. Infect. Immun. 83, 3865–3880. Infect Immun Oct;83(10):3865-80. doi: 10.1128/IAI.00415-15. Epub 2015 Jul 20.

Lim et al. 2013. Toxoplasma gondii infection enhances testicular steroidogenesis in rats. Mol Ecol Jan;22(1):102-10. doi: 10.1111/mec.12042

Lin et al. 2008. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. Ann. Rev of Path. Doi : 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434

Liu et al. 2003. The unfolded protein response. J Cell Sci May 15;116(Pt 10):1861-2. doi: 10.1242/jcs.00408

Longhi et al. 2009. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly(I :C) as adjuvant. J Exp Med Jul 6;206(7):1589-602. doi: 10.1084/jem.20090247.

Lopez et al. 2015. Intravacuolar Membranes Regulate CD8 T Cell Recognition of Membrane-Bound Toxoplasma gondii Protective Antigen. Cell Reports 13.10, pp. 2273–2286. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.001.

López-Yglesias et al. 2019. TLR11-independent inflammasome activation is critical for CD4+ T cellderived IFN-gamma production and host resistance to Toxoplasma gondii. PLOS Pathogens 15.6. Ed. by J. P. J. Saeij, e1007872. doi: 10.1371/journal.ppat.1007872.

Lu et al. 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. J Cell Biol Oct 11;167(1):27-33. doi: 10.1083/jcb.200408003

Lüder et al. 2024. IFNs in host defence and parasite immune evasion during Toxoplasma gondii infections. Front Immunol Feb 7:15:1356216. doi: 10.3389/fimmu.2024.1356216.

Lüder et al. 2017. Impact of the host on Toxoplasma stage differenciation. Microb Cell Jun 22;4(7):203–211. doi: 10.15698/mic2017.07.579

Lutjen et al. 2006. Organ- and disease-stage- specific regulation of Toxoplasma gondii-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. Infect Immun Oct;74(10):5790-801. doi: 10.1128/IAI.00098-06

Lyons et al. 2002. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends Parasitol May;18(5):198-201. doi: 10.1016/s1471-4922(02)02248-1.

Mahadevan et al. 2012. Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8+ T cell priming. PLoS One;7(12):e51845. doi: 10.1371/journal.pone.0051845. Epub 2012 Dec 18

Malnati et al. 1992. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. Nature Jun 25;357(6380):702-4. doi: 10.1038/357702a0.

Matsumoto et al. 2004. Toll-like receptor 3 : a link between toll-like receptor, interferon and viruses. Microbiol Immunol 48(3):147-54. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03500.x

Matsumoto et al. 2008. TLR3 : interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). Adv Drug Deliv Rev Apr 29;60(7):805-12. doi: 10.1016/j.addr.2007.11.005

Matta et al. 2019. Toxoplasma gondii effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. Proc Natl Acad Sci U S A Aug 27;116(35):17480-17491. doi: 10.1073/pnas.1904637116.

McKee et al. 2004. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite Toxoplasma gondii. J Immunol Aug 15;173(4):2632-40. doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2632.

Medel et al. 2019. IRE1alpha Activation in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Modulates Innate Recognition of Melanoma Cells and Favors CD8+ T Cell Priming. Frontiers in Immunology 9. doi: 10.3389/fimmu.
2018.03050.

Mehta et al. 2018. TNF activity and T cells. Cytokine Jan:101:14-18. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.003.

Mellman et al. 2001. Dendritic cells : specialized and regulates antigen processing machines. Cell Aug 10;106(3):255-8. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00449-4

Menard et al. 2007. B Cells Amplify IFNgamma Production By T Cells via a TNF-alpha-Mediated Mechanism. The Journal of Immunology 179.7, pp. 4857–4866. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4857.

Mennechet et al. 2002. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. J Immunol Mar 15;168(6):2988-96. doi: 10.4049/jimmunol.168.6.2988

Mennechet et al. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. European Journal of Immunology 34.4, pp. 1059–1067. doi:10.1002/eji.200324416.

Mercer et al. 2020. Toxoplasma gondii dense granule protein GRA24 drives MyD88-independent p38 MAPK activation, IL-12 production and induction of protective immunity. PLoS Pathog May 15;16(5):e1008572. doi: 10.1371/journal.ppat.1008572

Mescher et al. 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. Immunol Rev Jun:211:81-92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x

Miller et al. 2009. The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii. Int J Parasitol Jan;39(1):23-39. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.002

Minns et al. 2006. TLR9 Is Required for the Gut-Associated Lymphoid Tissue Response following Oral Infection of Toxoplasma gondii. The Journal of Immunology 176.12, pp. 7589–7597. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7589.

Mogilenko et al. 2019. Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR. Cell 177.5, 1201–1216.e19. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.018.

Momburg et al. 1994. Peptide selection by MHCencoded TAP transporters. Current Opinion in Immunology 6.1, pp. 32–37. doi: 10.1016/0952-7915(94)90030-2.

Monson et al. 2021. Host regulation of lipid droplets drives antiviral responses. Cell Stress Aug 25;5(9):143-145. doi: 10.15698/cst2021.09.256.

Montazeri et al. 2017. A systemic review of in vitro and in vivo activities of anti-Toxoplasma drugs and compounds. Front Microbiol Jan 20:8:25. doi: 10.3389/fmicb.2017.00025. eCollection 2017.

Morada et al. 2013. Cryptosporidium parvumInduces an Endoplasmic Stress Response in the Intestinal Adenocarcinoma HCT-8 Cell Line. Journal of Biological Chemistry 288.42, pp. 30356–30364. doi: 10.1074/jbc.m113.459735.

Mordue et al. 1999. Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion wtih host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. Exp Parasitol Jun;92(2):87-99. doi: 10.1006/expr.1999.4412.

Mordue et al. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethat overproduction of Th1 cytokines. J Immunol Oct 15;167(8):4574-84. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4574.

Mordue et al. 2003. A novel population of Gr1(+) -activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. Journal of Leukocyte Biology 74.6, pp. 1015– 1025. doi: 10.1189/jlb.0403164.

Nagamune et al. 2008. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in Toxoplasma gondii. Nature. January 10; 451(7175): 207–210. doi:10.1038/nature06478.

Napolitano et al. 2018. Cysteine-reactive free ISG15 generates IL-1β-producing CD8a+ dendritic cells at the site of infection. J Immunol Jul 15;201(2):604-614. doi: 10.4049/jimmunol.1701322

Nathan et al. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A Aug 1;97(16):8841-8. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

Neefjes et al. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature Reviews Immunology 11.12, pp. 823–836. doi: 10.1038/nri3084.

Nimmerjahn et al. 2003. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. Eur J Immunol May;33(5):1250-9. doi: 10.1002/eji.200323730

Novoa et al. 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. EMBO J Mar 3;22(5):1180-7. doi: 10.1093/emboj/cdg112.

Nuchtern et al. 1990. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. Nature Jan 4;343(6253):74-6. doi: 10.1038/343074a0

Ogolla et al. The protein kinase double-stranded RNA-dependent (PKR) enhances protection against disease cause by a non-viral pathogen. PLoS Pathog;9(8):e1003557. doi: 10.1371/journal.ppat.1003557.

Ohnmacht et al. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. J Exp Med Mar 16;206(3):549-59. doi: 10.1084/jem.20082394.

Olafsson 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 Mar;20(3). doi: 10.1111/cmi.12808.

O'Neill et al. The family of five : TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol May;7(5):353-64. doi: 10.1038/nri2079

Ong et al. 2010. Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) suverts host functions by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. J Biol Chem Sep 10;285(37):28731-40. doi: 10.1074/jbc.M110.112359.

Osorio et al. 2014. The unfolded-protein-response sensor IRE-1alpha regulates the function of CD8alpha + dendritic cells. Nature Immunology 15.3, pp. 248–257. doi: 10.1038/ni.2808.

Osorio et al. 2018. Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. Current Opinion in Immunology 52, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.020.

Oz 2014. Novel Synergistic protective efficacy of Atovaquone and Diclazuril on Fetal-Maternal Toxoplasmosis. Int J Clin Med. 2014 Aug;5(15):921–932. doi: 10.4236/ijcm.2014.515124

Paludan et al. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. Science Jan 28;307(5709):593-6. doi: 10.1126/science.1104904

Pan et al. 2007 MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. J Leukoc Biol Jul;82(1):177-83. doi: 10.1189/jlb.1006627. Epub 2007 Apr 2

Pang et al. 2013. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern recognition receptors to promote CD8+ T cell response to influenza A virus. Nat Immunol. 2013 March ; 14(3): 246–253. doi:10.1038/ni.2514

Pepper et al. 2008. Plasmacytoid dendritic cells are activated by Toxoplasma gondii to present antigen and produce cytokines. J Immunol May 1;180(9):6229-36. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6229

Persat et al. 2012. A synthetic peptide derived from the parasite Toxoplasma gondii triggers human dendritic cells' migration. J Leukoc Biol Dec;92(6):1241-50. doi: 10.1189/jlb.1211600.

Pfefferkorn, E. 1984. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proceedings ofthe National Academy of Sciences 81.3, pp. 908–912. doi: 10.1073/pnas.81.3.908

Pifer et al. 2010. UNC93B1 Is Essential for TLR11 Activation and IL-12-dependent Host Resistance to Toxoplasma gondii". Journal of Biological Chemistry 286.5, pp. 3307–3314. doi: 10.1074/jbc.m110.171025.

Pisitkun et al. 2006. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. Science Jun 16;312(5780):1669-72. doi: 10.1126/science.1124978

Plattner et al. 2008. Toxoplasma Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11- Dependent Induction of an Interleukin-12 Response". Cell Host & Microbe 3.2, pp. 77–87. doi: 10.1016/j.chom.2008.01.001.

Poncet et al. 2021. The UPR sensor IRE1a promotes dendritic cell responses to control Toxoplasma gondii infection. EMBO Rep Feb 15;22(3):e49617. doi: 10.15252/embr.201949617

Probst et al. 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance**.** Immunity May;18(5):713-20. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00120-1

Puthalakath et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. CellJun 29;129(7):1337-49. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.027

Quinn et al. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. Int Immunol Jul;23(7):421-5. doi: 10.1093/intimm/dxr034

Raetz et al. 2013. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-Dependent IL-12 Response to Toxoplasma gondii Profilin. The Journal of Immunology 191.9, pp. 4818–4827. doi: 10.4049/jimmunol.1301301.

Rapoprt 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. NatureNov 29;450(7170):663-9. doi: 10.1038/nature06384

Rastogi et al. 2019. Translocation of effector proteins into host cells by Toxoplasma gondii. Curr Opin Microbiol Dec:52:130-138. doi: 10.1016/j.mib.2019.07.002.

Reichmann et al. 1999. The CD28/B7 interaction is not required for resistance to Toxoplasma gondii in the brain but contributes to the development of immunopathology. J Immunol Sep 15;163(6):3354-62

Reichmann et al. 2002. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of Toxoplasma gondii tachyzoites identified by T cell clone. Mol Biochem Parasitol Jan;119(1):43-54. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00397-8.

Reid et al. 2015. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol Apr;16(4):221-31. doi: 10.1038/nrm3958.

Reinhardt et al. 2009. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat Immunol Apr;10(4):385-93. doi: 10.1038/ni.1715.

Reis e Sousa 2006. Dendritic cells in mature age. Nat Rev Immunol Jun;6(6):476-83. doi: 10.1038/nri1845

Robben et al. 2005. Recruitment of Gr-1 + monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. The Journal of Experimental Medicine 201.11, pp. 1761–1769. doi: 10.1084/jem.20050054.

Roiko et al. 2014. Acidification activates Toxoplasma gondii motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. Plos Pathogen. Doi : 10.1371/journal.ppat.1004488

Rosowski et al. 2011. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein. J Exp Med Jan 17;208(1):195-212. doi: 10.1084/jem.20100717.

Ross et al. 2022. Toxoplasma effector-induced ICAM-1 expression by infected dendritic cells potentiates transmigration across polarised endothelium. Front Immunol Aug 3:13:950914. doi: 10.3389/fimmu.2022.950914

Roy et al. 2006. Pathogen-endoplasmic-reticulum interactions : in through the out door. Nat Rev Immunol Feb;6(2):136-47. doi: 10.1038/nri1775

Saeij et al. 2005. Bioluminescence imaging of Toxoplasma gondii infection in living mice reveals dramatic differences between strains. Infect Immun Feb;73(2):695-702. doi: 10.1128/IAI.73.2.695-702.2005.

Saeij et al. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. Science Dec 15;314(5806):1780-3. doi: 10.1126/science.1133690

Saeij et al. 2007. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homolgue. Nature Jan 18;445(7125):324-7. doi: 10.1038/nature05395

Salvioni et al. 2019. Robust control of a brain-persisting parasite through MHC I presentation by infected neurons. Cell Rep Jun 11;27(11):3254-3268.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.051

Sanchez et al. 2021. The pathogenicity and virulence of Toxoplasma gondii. Virulence. 2021 Dec;12(1):3095-3114. doi: 10.1080/21505594.2021.2012346

Sangaré et al. 2019. Toxoplasma GRA15 activates the NF-KappaB pathway through interactions with TNF receptor-associated factors. mBio Jul 16;10(4):e00808-19. doi: 10.1128/mBio.00808-19

Sasai et al. 2013. Pathogen recognition receptors : ligands and signaling pathways by toll-like receptors. Int Rev Immunol Apr;32(2):116-33. doi: 10.3109/08830185.2013.774391

Scalan et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United-States – major pathogens. Emerg Infect Dis Jan;17(1):7-15. doi: 10.3201/eid1701.p11101

Scanga et al. 2002. Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to Toxoplasma gondii Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells. The Journal of Immunology 168.12, pp. 5997–6001. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.5997.

Scharton-Kersten et al. 1997. Inducible Nitric Oxide Is Essential for Host Control of Persistent but Not Acute Infection with the Intracellular Pathogen Toxoplasma gondii. J Exp Med Apr 7;185(7):1261-73. doi: 10.1084/jem.185.7.1261

Schaupp et al. 2020. Microbiota-induced type I interferons instruct a poised basal state of dendritic cells. Cell May 28;181(5):1080-1096.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.022.

Schlee et al. 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. Nature Reviews Immunology 16.9, pp. 566–580. doi: 10.1038/nri.2016.78.

Schneider et al. 2013. Toxoplasma gondii triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFNγ-induced STAT1 transcriptional activity. PLoS One ;8(3):e60215. doi: 10.1371/journal.pone.0060215.

Schneider et al. 2014. Interferon-stimulated genes : a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol :32:513-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

Schulthess et al. 2012. Interleukin- 15-Dependent NKp46+ Innate Lymphoid Cells Control Intestinal Inflammation by Recruiting Inflammatory Monocytes. Immunity 37.1, pp. 108–121. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.013.

Schlüter et al. 1999. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Exacerbates Chronic Cerebral Toxoplasmosis in Toxoplasma gondii-Susceptible C57BL/6 Mice But Does Not Reactivate the Latent Disease in T. gondii-Resistant BALB/c Mice J Immunol Mar 15;162(6):3512-8

Shoulders et al. 2013. Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. Cell Reports 3.4, pp. 1279–1292. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.024.

Schröder 2006. The unfolded protein response. Mol Biotechnol Oct;34(2):279-90. doi: 10.1385/MB:34:2:279

Schulz et al. 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.

Scorza et al. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute Toxoplasma gondii infection. Infect Immun Jan;71(1):309-16. doi: 10.1128/IAI.71.1.309-316.2003

Selleck et al. 2013. Guanylate-binding Protein 1 (Gbp1) Contributes
to Cell-autonomous Immunity against Toxoplasma gondii. PLoS Pathogens 9.4. Ed. by G. S. Yap. doi: 10.1371/journal.ppat.1003320.

Sharpe 2006. Mechanisms of costimulation. Immunological Reviews Volume 229, Issue 1 pp. 5-11. Doi : 10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x

Shaw et al. 2009. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to Toxoplasma gondi. Nat Immunol Dec;10(12):1267-74. doi: 10.1038/ni.1816

Sibley et al. 1991. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. J Immunol Oct 1;147(7):2340-5.

Sibley et al. 2009. Development of forwards genetics in Toxoplasma gondii. Int J Parasitol. 2009 July ; 39(8): 915–924. Doi : 10.1016/j.ijpara.2009.02.011

Singh et al. 2002. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differenciation mutants in Toxoplasma gondii reveals a hierarchy of gene induction. Mol Microbiol May;44(3):721-33. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02903.x

Singh et al. 2014. Serologic prevalence of Toxoplasma gondii in Indian women of child bearing age and effects of social environmental factors. PLOS. Doi : 10.1371/journal.pntd.0002737

Smith, J. A. 2018. Regulation of Cytokine Production by the Unfolded Protein Response; Implications for Infection and Autoimmunity. Frontiers in Immunology 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00422.

So 2018. Roles of endoplasmic reticulum stress in immune reponses. Mol Cells Aug 31;41(8):705-716. doi: 10.14348/molcells.2018.0241

Song et al. 2024. Mutual regulations between Toxoplasma gondii and type I interferon. Front Immunol Jul 8:15:1428232. doi: 10.3389/fimmu.2024.1428232

Speer et al. 2005. Ultrastructure differenciation of Toxoplasma gondii schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. International Journal for Parasitology. Vol 35, issue 2, 193-206. Doi : 10.1016/j.ijpara.2004.11.005

Spörri et al. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. Nat Immunol Feb;6(2):163-70. doi: 10.1038/ni1162

Sprooten et al. 2019. Type I interferons and endoplasmic reticulum stress in health and disease. Int Rev Cell Mol Biol 2019 Nov 19;350:63–118. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.10.004

Steinman 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415

Studencka-Turski et al. 2019. Molecular insight into the IRE1a-mediated type I interferon response induced by proteasome impairment in myeloid cells of the brain. Front Immunol Dec 18:10:2900. doi: 10.3389/fimmu.2019.02900.

Sturge et al. (2013). “TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens”. Proceedings of the National Academy of Sciences 110.26, pp. 10711–10716. doi: 10.1073/pnas.1307868110.

Sutterland et al. 2015. Beyond the association. Toxoplasma gondii in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction : systemic review and meta-analysis. Acta Psychiatr Scand Sep;132(3):161-79. doi: 10.1111/acps.12423

Suzuki et al. 2010. Removal of Toxoplasma gondii cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells. Am J Pathol Apr;176(4):1607-13. doi: 10.2353/ajpath.2010.090825

Suzuki et al. 2023. IFN-γ production by brain-resident cells activates cerebral mRNA expression of a wide spectrum of molecules critical for both innate and T cell-mediated protective immunity to control reactivation of chronic infection with Toxoplasma gondii. Front. Cell. Infect. Microbiol. Doi : 10.3389/fcimb.2023.1110508

Suzuki et al. 2020. The immune system utilizes two distinct effector mechanisms of T cells depending on two different life cycle stages of a single pathogen, Toxoplasma gondii, to control its cerebral infection. Parasitol Int Jun:76:102030. doi: 10.1016/j.parint.2019.102030

Sweeney et al. 2010. Host cell invasion by Toxoplasma gondii is temporally regulated by the hist microtubule cystoskeleton. Eukaryot Cell Nov;9(11):1680-9. doi: 10.1128/EC.00079-10.

Swierzy et al. 2015. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differenciation of Toxoplasma gondii towards the bradyzoite stage. Cell Microbiol Jan;17(1):2-17. doi: 10.1111/cmi.12342.

Swierzy et al. 2017. Divergent co-transcriptomes of different host cells infectedwith Toxoplasma gondii reveal cell type-specific host-parasite interactions. Sci Rep Aug 3;7(1):7229. doi: 10.1038/s41598-017-07838-w.

Takeuchi et al. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

Tavernier et al. 2017. Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. Nature Cell Biology 19.6, pp. 698–710. doi: 10.1038/ncb3518.

Tenter et al. 2000. Toxoplasma gondii : from animals to humans. Int J Parasitol Nov;30(12-13):1217-58. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7.

Thompson et al. 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune reponse to viral infection. Viruses Jun;3(6):920-40. doi: 10.3390/v3060920

Tian et al. 2012. Genetic Targeting of the Active Transcription Factor XBP1s to Dendritic Cells Potentiates Vaccine-induced Prophylacticand Therapeutic Antitumor Immunity. Molecular Therapy 20.2, pp. 432– 442. doi: 10.1038/mt.2011.183.

Torres et al. 2018. Toxoplasma gondii alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. J Neuroinflammation Feb 23;15(1):57. doi: 10.1186/s12974-018-1086-8

Travier et al. 2008. Functionnal domains of the Toxoplasma GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. Int J Parasitol Jun;38(7):757-73. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.10.010.

Trinchieri et al. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines : new players in the regulation of T cell responses. Immunity Nov;19(5):641-4. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00296-6.

Trombetta et al. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu Rev Immunol :23:975-1028. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538

Tu et al. 2018. Observations on bradyzoite biology. Microbes and Infection, 20(9), 466-476. Doi : 10.1016/j.micinf.2017.12.003

Urra et al. 2012. When ER stress reaches a dead end. Biochim Biophys Acta Dec;1833(12):3507-3517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024

Van de Laar et al. 2012. Regulation of dendritic cell developement by GM-CSF : molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. Blood Apr 12;119(15):3383-93. doi: 10.1182/blood-2011-11-370130

Villegas et al. 2002. Susceptibility of Interleukin-2-Deficient Mice to Toxoplasma gondii Is Associated with a Defect in the Production of Gamma Interferon. Infection and Immunity 70.9, pp. 4757–4761. doi: 10.1128/iai.70.9.4757-4761.2002.

Volmer et al. 2015. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. Curr Opin Cell Biol Apr:33:67-73. doi: 10.1016/j.ceb.2014.12.002

Walter et al. 2011. The unfolded protein response : from stress pathway to homeostatic regulation. Science Nov 25;334(6059):1081-6. doi: 10.1126/science.1209038

Wan et al. 2015. T. gondii rhoptry protein ROP18 induces apoptosis of neural cells via endoplasmic reticulum stress pathway. Parasites & Vectors 8.1. doi: 10. 1186/s13071-015-1103-z.

Wang et al. 2016. Toxoplasma gondii mitogen-activated protein kinases are associated with inflammasome activation in infected mice. Microbes and Infection 18.11, pp. 696–700. doi: 10.1016/j. micinf.2016.07.004.

Watanabe et al. 2011. Activation of type I IFN signaling by NOD1 mediates mucosal host defense against Helicobacter pylori infection. Gut Microbes Jan-Feb;2(1):61-5. doi: 10.4161/gmic.2.1.15162

Wearsch et al. 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. Curr Opin Cell Biol Dec;20(6):624-31. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.005

Wei et al. 2018. Toxoplasma gondii dense granule protein 15 induces apoptosis in choriocarcinoma JEG-3 cells through endoplasmic reticulum stress. Parasites & Vectors 11.1. doi: 10.1186/s13071-018-2835-3.

Weidner et al. 2013. Rapid cystoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by Toxoplasma gondii coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. Cell Microbiol Oct;15(10):1735-52. doi: 10.1111/cmi.12145.

Westrate et al. 2015. Form follows function : the importance of endoplasmic reticulum shape. Annu Rev Biochem:84:791-811. doi: 10.1146/annurev-biochem-072711-163501

Wilson et al. 2005. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. Journal of Neuroimmunology 165.1-2, pp. 63–74. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.04.018.

Wilson et al. 2010. Differential Regulation of Effector- and Central-Memory Responses to Toxoplasma gondii Infection by IL-12 Revealed by Tracking of Tgd057- Specific CD8+ T Cells. PLoS Pathogens 6.3. Ed. by E. Y. Denkers, e1000815. doi: 10.1371/journal.ppat.1000815.

Witola et al. 2010. NALP1 Influences Susceptibility to Human Congenital Toxoplasmosis, Proinflammatory Cytokine Response, and Fate ofToxoplasma gondii-Infected Monocytic Cells. Infection and Immunity 79.2. Ed. by J. H. Adams, pp. 756–766. doi: 10.1128/iai.00898-10.

Yamamoto et al. 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. J BiochemSep;136(3):343-50. doi: 10.1093/jb/mvh122

Yamamoto et al. 2011. ATF6 beta is a host cellular target of the Toxoplasma gondiivirulence factor ROP18. The Journal of Experimental Medicine 208.7, pp. 1533–1546. doi: 10.1084/jem.20101660.

Yamamoto et al. 2012. A Cluster of Interferon-gamma- Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against Toxoplasma gondii. Immunity 37.2, pp. 302–313. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.009.

Yap et al. 1998. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75- deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. J Immunol Feb 1;160(3):1340-5

Yap et al. 1999. Cell-mediated Immunity to Toxoplasma gondii : initiation, regulation and effector function. Immunobiology Dec;201(2):240-7. doi: 10.1016/S0171-2985(99)80064-3

Yarovinsky 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 et al. 2006. Toll-like Receptor Recognition Regulates Immunodominance in an Antimicrobial CD4+ T Cell Response. Immunity 25.4, pp. 655–664. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.015.

Yarovinsky, F. 2014. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. Nature Reviews Immunology 14.2, pp. 109–121. doi: 10.1038/nri3598.

Ye et al. 2000. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. Molecular Cell 6.6, pp. 1355–1364. Doi : 10.1016/s1097-2765(00)00133-7.

Yogev et al. 2012. Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. ImmunityAug 24;37(2):264-75. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.025

Yoshida et al. 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. Cell 107.7, pp. 881–891. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0.

Zammit et al. 2005. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. Immunity May;22(5):561-70. doi: 10.1016/j.immuni.2005.03.005

Zehner et al. 2015. The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8+ T Cells. Immunity 42.5, pp. 850–863. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.008.

Zelenay et al. 2012. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. J Clin Invest May;122(5):1615-27. doi: 10.1172/JCI60644.

Zelenay 2013. Adaptive immunity after cell death. Trends Immunol Jul;34(7):329-35. doi: 10.1016/j.it.2013.03.005.

Zinszner et al., 1998. CHOP is implicated in programmed cel death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes DevApr 1;12(7):982-95. doi: 10.1101/gad.12.7.982

Zhan et al. 2011. GM-CSf increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8+ spleen dendritic cells. Eur J Immunol Sep;41(9):2585-95. doi: 10.1002/eji.201141540

Zhang et al. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory reponse. Nature Jul 24;454(7203):455-62. doi: 10.1038/nature07203.

Zhou et al. 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restriced subset of cells through signaling pathways involving both the JAK-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. J Virol Jul;81(14):7749-58. doi: 10.1128/JVI.02438-06

Zhou et al. 2015. Toxoplasma gondii prevalent in China induce weaker apoptosis of neural stem cells C17.2 via endoplasmic reticulum stress (ERS) signaling pathways. Parasites & Vectors 8.1, p. 73. doi: 10.1186/s13071-015-0670-3.