



HAL
open science

Regulation of IL-17A expression during *Toxoplasma gondii* infection

Faïza Bittich-Fahmi

► **To cite this version:**

Faïza Bittich-Fahmi. Regulation of IL-17A expression during *Toxoplasma gondii* infection. Parasitology. Université de Strasbourg, 2020. English. ⟨NNT : 2020STRAJ009⟩. ⟨tel-03450175⟩

HAL Id: tel-03450175

<https://theses.hal.science/tel-03450175v1>

Submitted on 25 Nov 2021

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

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



HAL Authorization

ÉCOLE DOCTORALE Vie et Santé

UR 7292

THÈSE présentée par :

Faïza BITTICH-FAHMI

Soutenue le : **06 mars 2020**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Sciences du vivant - Parasitologie**

**Régulation différentielle de la cytokine inflammatoire
IL-17A dans les cellules infectées par le parasite
*Toxoplasma gondii***

THÈSE dirigée par :

Mr Christian SCHWARTZ

MCU HDR, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Marie-Laure DARDÉ

Professeur, université de Limoges

Mme Isabelle TARDIEUX

Directeur de recherches, CNRS

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Samira FAFI-KREMER

Professeur, université de Strasbourg

INVITÉS :

Mr Alexander PFAFF

MCU-PH HDR, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Une thèse n'est pas une fin en soi, mais c'est un moment particulier dans la vie d'un chercheur : il y aura eu un avant qui ne sera plus, et il y aura un après à construire. Aussi, au moment de franchir cette limite, je ne peux pas ne pas penser à tous ceux qui, de près ou de loin, auront contribué à ce grand effort car, si l'épreuve est individuelle, ses implications sont sociales, familiales, et humaines tout simplement.

J'aimerais tout d'abord adresser un grand hommage à mon directeur de thèse et notre regretté, le Pr Ermanno CANDOLFI, qui est parti trop tôt et à qui j'aurais tant aimé faire lire cette thèse ! Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et il m'a fait confiance malgré les connaissances scientifiques très légères que j'avais quand je suis arrivée au sein de son équipe. C'était une personne extraordinaire, car au-delà de ses qualités humaines reconnues par toute l'équipe, il a su s'attirer la sympathie de tous avec un professionnalisme hors pair. Il restera longtemps pour moi un exemple. Et pour ce qu'il a fait pour nous tous, nous l'en remercions.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Monsieur le Docteur Christian SCHWARTZ pour m'avoir guidé et exigé le meilleur de moi et surtout de m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles.

J'adresse tous mes remerciements à Madame le Pr Marie-Laure DARDE et Madame le Pr Isabelle TARDIEUX de l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude

J'exprime ma gratitude à Madame le Pr Samira FAFI-KREMER, qui a bien voulu être examinateur de cette thèse et d'avoir par le passé accepté de participer à mes comités de suivi de thèse. Veuillez bien accepter mes très sincères remerciements.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment Julie pour son intérêt et son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de ce manuscrit. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris et sans sa motivation et sa « pression » je n'aurais pas encore commencé l'écriture de cette thèse. Je te remercie profondément.

Alex, je te remercie pour tes conseils, ta disponibilité et tes connaissances techniques. Merci pour ta bonne humeur et ta contribution à la rédaction de la publication. Merci également pour tout ce que tu as fait pour moi dernièrement à la place d'Ermanno. Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance.

Cécile, Lydia, Esterina, Violaine : Merci beaucoup les filles pour votre soutien, vos conseils, votre bonne humeur et pour tous les moments de convivialité passés ensemble. Sans vous ces quelques années de thèse auraient été très difficiles.

Julie DENIS : merci beaucoup pour ton écoute, tes conseils et ton soutien pendant les moments de doute. Je te remercie de m'avoir toujours proposé ton aide. Nos longues discussions du couloir m'ont toujours boosté pour aller de l'avant !

Stéphane, merci beaucoup pour tes conseils et tes remarques scientifiques qui reflètent le grand chercheur que tu es.

Je n'oublie pas l'équipe CNR toxo : Laetitia et Chloé, merci beaucoup de m'avoir hébergé les quelques mois où j'avais besoin de m'isoler pour me concentrer un peu plus....

Je remercie également tous mes autres collègues de l'Institut : Marcela, Valentin, Victor, Bruno, Eva, Anaïs, Ozlem, pour les bons moments passés ensemble. J'espère n'avoir oublié personne.

Je tiens à remercier les biologistes de l'autre côté : Denis, Ahmed, Valérie, Odile pour leur gentillesse et leur soutien.

Mes remerciements vont aussi à mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. A toi particulièrement ma petite Dounia, merci pour ton soutien quotidien, tes encouragements, ton humour et tous les bons moments passés ensemble pour me « déstresser » !

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers temps pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents, mes sœurs, mon frère, pour leur soutien moral et matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix.

Enfin, mais non des moindres, je remercie mon mari bien aimé pour son soutien quotidien indéfectible et de m'avoir répété pendant plusieurs mois « Vas rédiger ! » ou « vas travailler ! ». Je le remercie de m'avoir supporté pendant toutes ces années même s'il n'avait pas le choix ! Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, et sans son aide cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans adresser quelques mots à mon petit cœur, ma joie de vivre, mon cher fils. Même si tu ne peux pas encore lire ce que je t'ai écrit, sache que ta présence dans ma vie est une bouffée d'oxygène. Désolée de t'avoir négligé ces derniers temps et franchement tes petites questions récurrentes vont beaucoup me manquer : « maman, t'as fini de travailler ? », « tu finis à quelle heure ? », « maman, tu veux venir jouer avec moi ? ».....

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	10
A/ TOXOPLASMA GONDII.....	10
1) Le parasite.....	11
2) Stades parasitaires.....	11
3) Cycle parasitaire.....	13
4) Invasion de la cellule hôte.....	16
5) Génotypes et virulence.....	18
6) La toxoplasmose.....	23
6.1) Aspects épidémiologiques.....	23
6.2) Manifestations cliniques.....	25
6.2.1) La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent.....	25
6.2.2) La toxoplasmose du sujet immunodéprimé.....	25
6.2.3) La toxoplasmose congénitale.....	26
6.2.4) La toxoplasmose oculaire.....	28
6.3) Diagnostic biologique.....	29
6.4) Traitements et prophylaxie.....	30
6.4.1) Traitement de la toxoplasmose.....	30
6.4.2) Prophylaxie.....	31
B/ INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE.....	33
1) Vacuole parasitophore.....	33
2) Acquisition des nutriments.....	33
3) Organisation du cytosquelette et des organelles de l'hôte.....	35
4) Manipulation de la voie apoptotique.....	35
5) Manipulation des facteurs de transcription cellulaires.....	37
5.1) STATs.....	37
5.1.1) STAT 1.....	38
5.1.2) STAT 3/6.....	39
5.2) NF-KB.....	40
5.3) HIF1.....	41
5.4) EGR2.....	42

5.5) C-Myc.....	42
5.6) UHRF1.....	43
6) Les altérations épigénétiques.....	44
6.1) Généralités.....	44
6.2) Modulation des histones.....	44
6.3) UHRF1– régulateur épigénétique.....	47
6.4) CTIP2 – régulateur épigénétique.....	47
6.5) <i>T. gondii</i> et les modifications épigénétiques de la cellule-hôte.....	47
7) Manipulation du système immunitaire.....	48
7.1) Réponse immunitaire innée.....	48
7.2) Réponse immunitaire adaptative.....	50
 C/ LA FAMILLE IL-17 ET SON IMPLICATION DANS L'INFECTION TOXOPLASMIQUE.....	 52
1) La famille de l'IL-17.....	52
2) Expression de l'IL-17.....	54
3) Régulation de l'IL-17.....	54
4) IL-17A et toxoplasmose oculaire.....	57
5) IL-17A – Cible thérapeutique.....	57
 D/ LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CTIP2	 59
1) Rôle en physiologie cellulaire.....	59
2) Rôle dans la régulation épigénétique.....	59
3) Implication en pathologie humaine.....	60
4) Implications thérapeutiques.....	60
 E/ REVUE SUR LA TOXOPLASMOSE OCULAIRE.....	 62
 OBJECTIFS.....	 94
 MATERIELS ET METHODES.....	 97
A/ Culture cellulaire.....	98
B/ Culture <i>in vivo</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	98
C/ Culture <i>in vitro</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	98
D/ Préparation et amplification des plasmides.....	98
E/ Transfection.....	99

F/ Mesure de l'activité du promoteur de l'IL-17 A par le système luciférase.....	99
G/ Immunoprécipitation (IP).....	99
H/ Western Blot (WB).....	99
I/ Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	100
K/ Cytométrie en flux.....	101
L/ Analyse statistique	101
RESULTATS.....	102
A) Première partie : l'article à soumettre.....	103
Abstract.....	105
Introduction.....	106
M&M.....	109
Results	112
Discussion.....	116
References.....	121
Figure legends.....	127
Figures.....	130
B) Deuxième partie : résultats complémentaires.....	139
1) Modulation du promoteur de l' <i>IL-17A</i> par le facteur de transcription CTIP2.....	140
2) Modulation du promoteur de l' <i>IL-17A</i> par le facteur de transcription UHRF1	142
3) Synergie d'action CTIP2-UHRF1.....	144
4) CTIP2 et les enzymes de l'épigénétique.....	144
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	148
LISTE DES FIGURES.....	156
LISTE DES TABLEAUX.....	158
BIBLIOGRAPHIE.....	159

Liste des abréviations

ABP : Actin-binding protein	DO : Densité Optique
ADN : Acide désoxyribonucléique	EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	EGR : Early Growth Response
AMA1 : Apical Membrane Antigen 1	ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ARN : Acide ribonucléique	FKHR1 : Forkhead transcription factor
ARNm : Acide ribonucléique messenger	G9a : Euchromatin histone-lysine N- methyl transferase 2
ATF6β : Activating Transcription Factor 6 beta	GAP : Glideosome Associated Proteins
ATG : Autophagy protein	GM-CSF : Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	GPI : Glycosylphosphoinositol
BCL11b : B-cell lymphoma / leukemia 11b	GRP : Glucose-regulated protein
BSA : Bovine Serum Albumine	GT : Glucose Transporter
CBP : CREB binding protein	HAS : Haute autorité de santé
CCL : Chemokine (C-C motif) ligand	HAT : Histone Acetyl Transferase
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinases	HAUSP : Herpes virus-Associated Ubiquitin Specific Protease
ChIP : Chromatine immunoprecipitation	HDAC : Histones desacétylases
c-IAP : cellular inhibitors of apoptosis protein	HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor 1
CKI : CdK Inhibitor	HMT : Histone méthyltransférase
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	ICBP90 : Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa
CNR : Centre national de recherche	IFN-γ : Interféron gamma
CTIP2 : Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor- interacting protein 2	IgG : Immunoglobuline G
CTLA : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen	IKB : Inhibiteur kappa B
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand	IKK : I κ B Kinase
Da : Dalton	IL-12 : Interleukine 12
DHFR : Dihydrofolate reductase	IL-17 : Interleukine 17
DHPS : Dihydroptéroate synthétase	IRG : IFN- γ Inducible Immunity Related GTPases
DISC : Death-Inducing Signaling Complex	JAK : Janus activated kinase
DL : Dose létale	JM : Jonction Mobile
DNMT : DNA méthyltransférases	KO : Knock-out
	LB : Lysogeny Broth
	LPS : Lipopolysaccharide
	LSD1 : Lysine-specific demethylase 1

Luc : Luciferase
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MVP : Membrane de la Vacuole Parasitophore
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B : Nuclear Factor- κ B
NK : Natural Killer
NO : Monoxyde d'azote
pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PBST : PBS + Tween 20 à 0,05%
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel Hydrogène
PHD : Plant Homeo Domain
PI : Protease Inhibitor/
 Phosphatidylinositol
PI3K : Phosphoinositol 3 kinase
PI3P : Phosphatidylinositol triphosphate
PKA : Protein Kinase A
PKD1 : Phosphoinositide dependant kinase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2 A
PP2C : Proteine Phosphatase 2C
PVDF : Polyvinylidene fluoride
qsp : Quantité Suffisante Pour
RE : Réticulum Endoplasmique
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RING : Really Interesting New Gene
ROR : Orphan Retinoid nuclear Receptor
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAG : Surface Antigen
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SEM : Standard Error of the Mean
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA : Small interference RNA
SOCS : Suppressors Of Cytokine Signaling
SRA : Set and Ring Associated domain
SSRP : Structure-Specific Recognition Protein
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
TgGT1 : *T. gondii* Glucose Transporter 1 Transcription
Th1 : T helper de type 1
Th2 : T helper de type 2
Th17 : T helper de type 17
TLR : Toll-Like Receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
TO : toxoplasmose oculaire
Topo II α : Topoisomérase II alpha
Treg : cellules T régulateur
TTD : Tandem Tudor Domain
UHRF1 : Ubiquitin-like containing PHD and Ring Finger domains, 1
UBL : Ubiquitin-like
USP : Ubiquitin-Specific-processing Protease
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIR : Virulent loci
VP : Vacuole Parasitophore
WT : Wild Type
XIAP : X-linkes Inhibitor of Apoptosis Protein

INTRODUCTION

A. TOXOPLASMA GONDII

1) Le parasite

La toxoplasmose est une pathologie cosmopolite, de symptomatologie et de gravité variable due à un protozoaire *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Ce parasite a été isolé en 1908 par Nicolle et Manceaux chez un petit rongeur nommé *Ctenodactylus gundii*. Il a été décrit chez l'Homme pour la première fois en 1923 par l'ophtalmologue Josef Janku lors d'un cas de toxoplasmose congénitale chez un nouveau-né. Il s'agit d'un parasite intracellulaire obligatoire appartenant au règne des *Protista* et au phylum des *Apicomplexae*, capable d'infecter toutes les cellules nucléées des organismes homéothermes. Le genre *Toxoplasma* ne contient qu'une seule espèce : *T. gondii*.

Tableau I : Classification taxonomique du parasite responsable de la toxoplasmose (NCBI).

Phylum	Apicomplexa
Classe	Conoidasida
Sous classe	Coccidia
Ordre	Eucoccidioridia
Sous-ordre	Eimeriorina
Famille	Sarcocystidae
Genre	<i>Toxoplasma</i>
Espèce	<i>gondii</i>

2) Stades parasitaires

T. gondii se présente sous trois stades parasitaires impliqués dans la dissémination du parasite et dans la transmission de l'infection. Ces trois stades infectieux différents sont interconnectés dans le cycle de vie du parasite et présentent des différences de morphologie : les tachyzoïtes à l'intérieur des cellules hôtes, les bradyzoïtes contenus dans des kystes tissulaires et les sporozoïtes dans les oocystes excrétés par les hôtes définitifs (Figure 1).

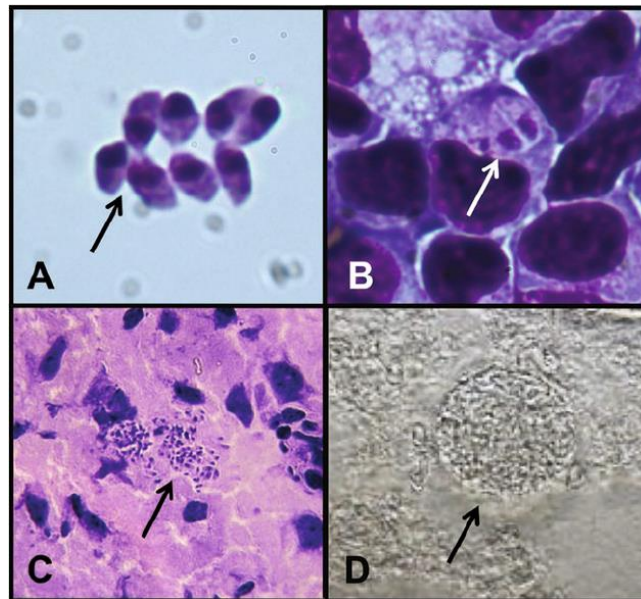


Figure 1. Stades de *T. gondii* visualisés par microscopie optique. A. Tachyzoïtes extracellulaires dans le péritoine de souris, sept jours après l'infection, colorés avec H & E. (63x) B. Réplication de parasites à l'intérieur d'un monocyte, colorés avec H & E. (63x) C. Bradyzoïtes trouvés dans le cerveau d'une souris infectée de façon chronique, colorée avec H & E. (40x) D. Kyste non homogène issu d'un homogénat de cerveau (40x) (McGovern and Wilson, 2013).

- **le tachyzoïte** : forme végétative de multiplication active, infectieuse et intracellulaire. Le tachyzoïte est la forme qui assure la dissémination du parasite dans l'organisme. Il est capable d'infecter l'ensemble des cellules nucléées, et d'entraîner une forte réponse inflammatoire et une destruction cellulaire. Il est ainsi responsable des manifestations cliniques de la pathologie. Il se présente sous la forme d'un croissant asymétrique de 6-8 μm de long pour 2-4 μm de large (Dubey *et al.*, 1998). La partie postérieure du parasite est arrondie et proche du noyau alors que la partie antérieure effilée présente une structure caractéristique des Apicomplexes et appelée complexe apical (Figure 2). Ce complexe est constitué d'organelles sécrétoires (les micronèmes, les rhoptries et les granules denses) et d'un élément participant à la mobilité du parasite et à sa pénétration dans la cellule hôte, le conoïde.

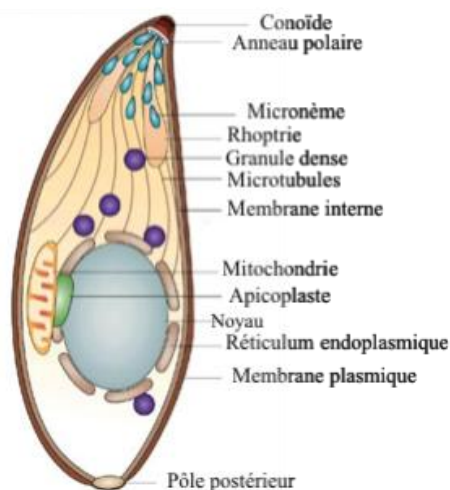


Figure 2. Structure d'un tachyzoïte de *T. gondii* (Baum *et al.*, 2006)

- **le kyste** : contient des centaines voire, plusieurs milliers de **bradyzoïtes**. Il correspond à la forme asexuée et latente du parasite et il mesure entre 5 et 100 μm de diamètre. Le bradyzoïte est proche structurellement du tachyzoïte, mais il possède un métabolisme ralenti et est plus résistant. Cette forme quiescente est localisée dans des organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau, les muscles squelettiques, les yeux et le cœur, où l'inflammation est limitée et la destruction tissulaire liée à la cytolysse est réduite afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000). Ces kystes persistent tout au long de la vie de leur hôte, et ils sont responsables d'une immunité protectrice mais aussi de la possibilité de réactivation de l'infection en contexte d'immunodépression. Ils sont inaccessibles au système immunitaire ainsi qu'aux traitements actuels.

- **l'oocyste** : mesure de 10 à 12 μm de diamètre. Il s'agit de la forme de reproduction sexuée contenant les sporozoïtes et qui est retrouvée dans les fèces des félinés (Dubey et al., 1998). Cette forme est très résistante et permet ainsi au parasite de persister pendant plusieurs semaines voire, plusieurs mois dans l'environnement. Elle joue ainsi un rôle très important dans la dissémination du parasite.

3) Cycle parasitaire

Alors que la plupart des *Apicomplexa* ont une gamme restreinte d'hôtes, *T. gondii* se singularise par sa capacité à infecter tous les mammifères à sang chaud, les oiseaux, ainsi que l'homme. Ils constituent ses hôtes intermédiaires et *T. gondii* y développe un cycle évolutif incomplet composé uniquement d'une phase asexuée. Chez l'hôte définitif, le chat et les félinés, *T. gondii* peut par contre, développer un cycle évolutif complet comprenant une phase sexuée et une phase asexuée (Figure 3).

La reproduction sexuée a lieu chez l'hôte définitif (les félinés) qui se contamine par ingestion de kystes contenus dans les tissus musculaires d'hôtes intermédiaires servant de proies (souris...) ou par l'intermédiaire d'oocystes issus d'une contamination tellurique (eau et végétaux souillés). Au contact des cellules épithéliales intestinales de l'hôte, les formes asexuées ingérées se transforment en tachyzoïtes puis se multiplient et se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui donneront, après fusion des gamètes lors de la reproduction sexuée, un oocyste. Ces oocystes, non sporulés, sont excrétés dans les fèces des félinés dans le milieu extérieur où ils deviennent matures, infectieux et très résistants en quelques jours. L'oocyste sera composé de deux sporocystes, contenant eux-mêmes quatre sporozoïtes (Dubey et al., 1998).

La reproduction asexuée peut se dérouler théoriquement dans tous les mammifères à sang chaud y compris l'Homme. L'Homme, hôte intermédiaire, se contamine donc par l'ingestion de kystes contenus dans de la viande peu ou pas cuite, provenant d'animaux infectés ou par l'ingestion d'oocystes souillant l'eau et les aliments. Ceux-ci libèrent des sporozoïtes qui passent la barrière intestinale et se transforment en tachyzoïtes. Après une parasitémie brève, les tachyzoïtes s'enkystent dans des organes dits immuno-privilégiés tels que le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur et l'œil, et ainsi, ils restent quiescents dans l'organisme pendant la vie de l'hôte en l'absence d'immunodépression (Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

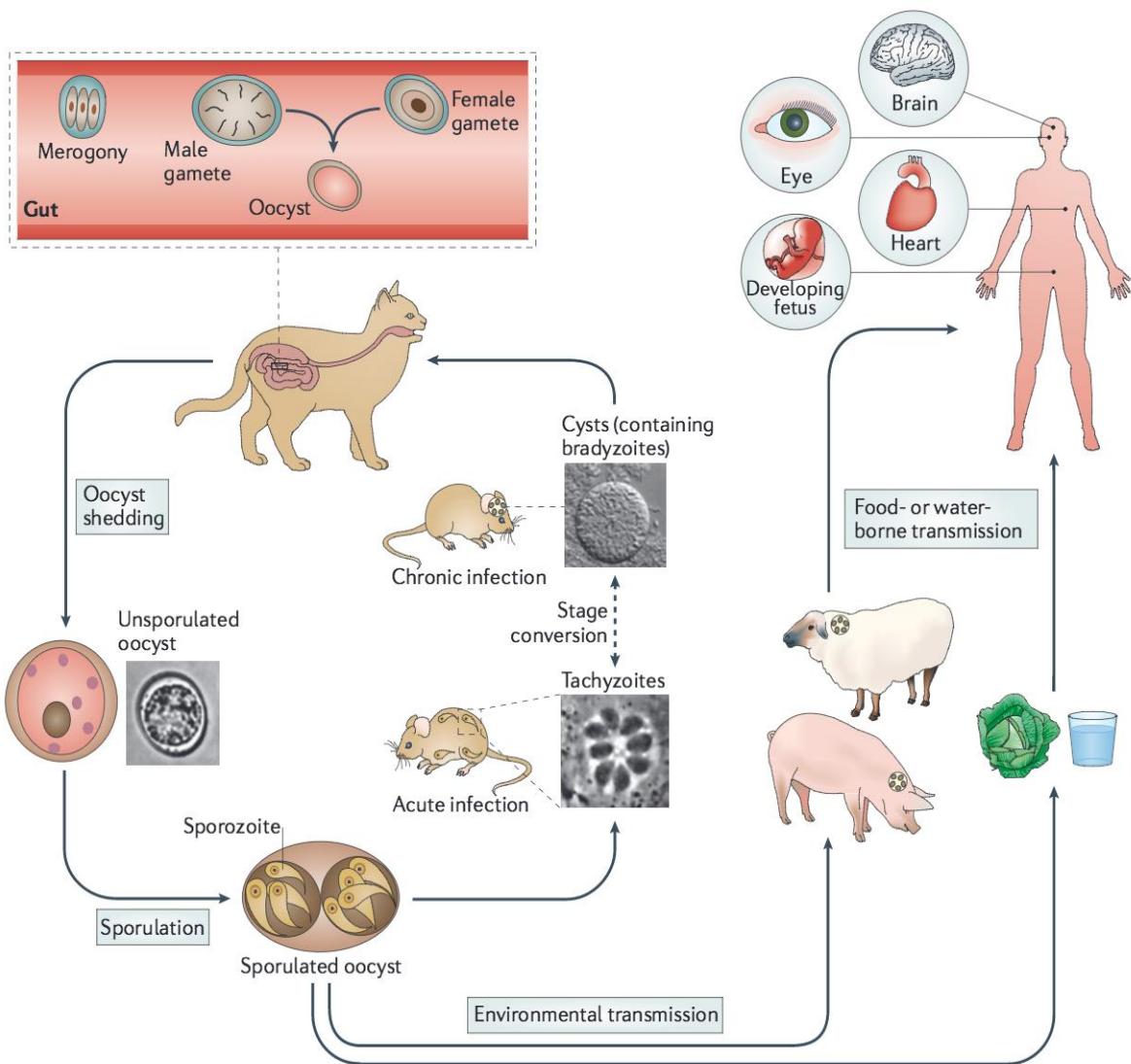


Figure 3. Cycle parasitaire de *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012)

Le chat, et les félinés en général, sont l'hôte définitif du parasite. Suite à la réplication dans les entérocytes de l'intestin (mérogonie), des gamètes mâles et femelles se forment dans la cellule hôte. La fusion de ces gamètes conduit à la formation d'oocystes immatures qui vont être libérés dans les fèces du chat et soumis à la méiose dans l'environnement pour former des oocystes matures infestants. Les oocystes sont capables de survivre dans l'environnement pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines et peuvent contaminer les aliments et l'eau, fournissant ainsi une voie d'infection pour les hôtes intermédiaires.

Les hôtes intermédiaires sont représentés par l'homme et tous les mammifères à sang chaud. Ils se contaminent *via* des oocystes sporulés présents au niveau du sol, dans la nourriture ou dans l'eau. Une fois ingérés, les oocystes vont libérer les sporozoïtes qui se transformeront en tachyzoïtes dans l'épithélium intestinal et vont le traverser pour gagner la circulation générale. L'infection aiguë est caractérisée par des tachyzoïtes à réplication rapide qui disséminent dans tout le corps. Pendant cette phase de dissémination, entre 10 et 20% des personnes contaminées peuvent présenter des symptômes liés à une toxoplasmose aiguë (Montoya and Liesenfeld, 2004). Après plusieurs jours de multiplication au sein d'une vacuole parasitophore et sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes vont se transformer en bradyzoïtes

et vont s'enkyster dans des organes comme le cerveau, l'œil, le cœur et les muscles. Ces kystes, mesurant entre 10 et 100 μm , peuvent contenir plusieurs milliers de bradyzoïtes et persistent durant toute la vie de l'hôte (Jones and Dubey, 2010). La différenciation des bradyzoïtes à croissance lente dans les kystes tissulaires conduit à une infection chronique latente.

Les humains et les vertébrés à sang chaud peuvent également contracter l'infection en mangeant de la viande crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes tissulaires. Après ingestion, les kystes libèrent les bradyzoïtes qui se transforment en tachyzoïtes dans le tube digestif, et après une phase de dissémination, ils se ré-enkystent dans les organes cités précédemment.

La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes est un phénomène rapide (à partir de 48 heures *in vitro* et à partir du 6^{ème} jour *in vivo*) sous l'influence de facteurs immuns (TNF- α , IFN- γ) et métaboliques (pH, choc thermique) (Figure 4). Les bradyzoïtes peuvent à leur tour se transformer en tachyzoïtes lors d'une diminution de la pression immunitaire (chez les sujets immunodéprimés), ce phénomène correspond à une réactivation toxoplasmique (Kim, 2018).

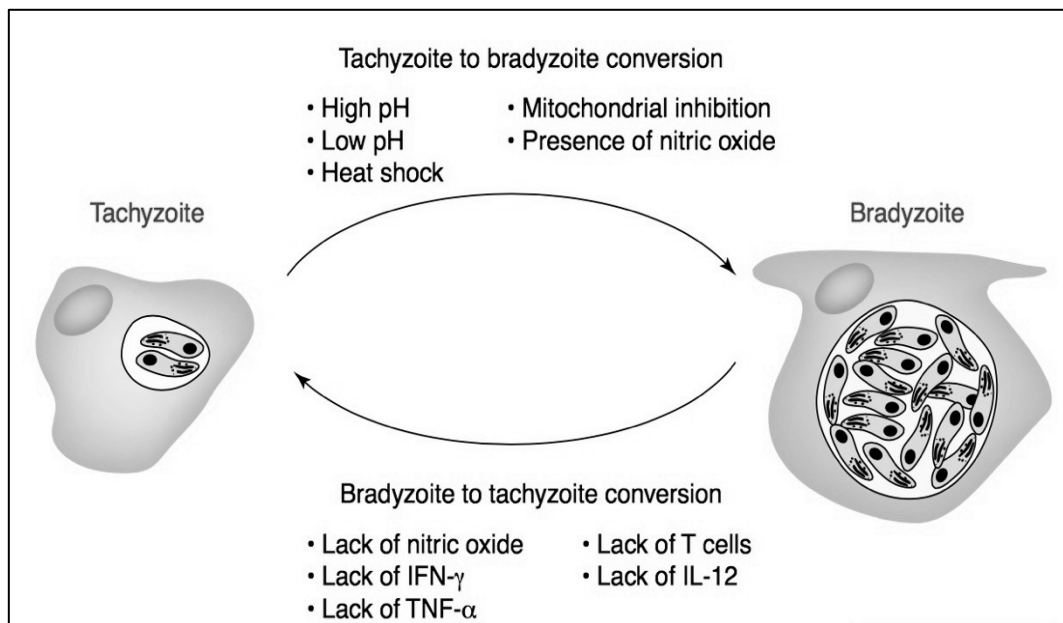


Figure 4. Processus d'interconversion (Lyons *et al.*, 2002)

La contamination de l'homme peut se faire à tous les niveaux de développement du parasite *via* (Figure 5) :

- La consommation d'eau et d'aliments contaminés par les oocystes.
- La consommation de viande crue ou insuffisamment cuite contenant des bradyzoïtes.
- Le contact avec la litière de chats contaminés (oocystes)
- La contamination du fœtus lors d'une primo-infection chez la femme enceinte par passage trans-placentaire des tachyzoïtes.

- Et plus exceptionnellement par inoculation accidentelle au laboratoire (tachyzoïtes), lors de dons de sang (tachyzoïtes) ou d'organes infectés (bradyzoïtes).

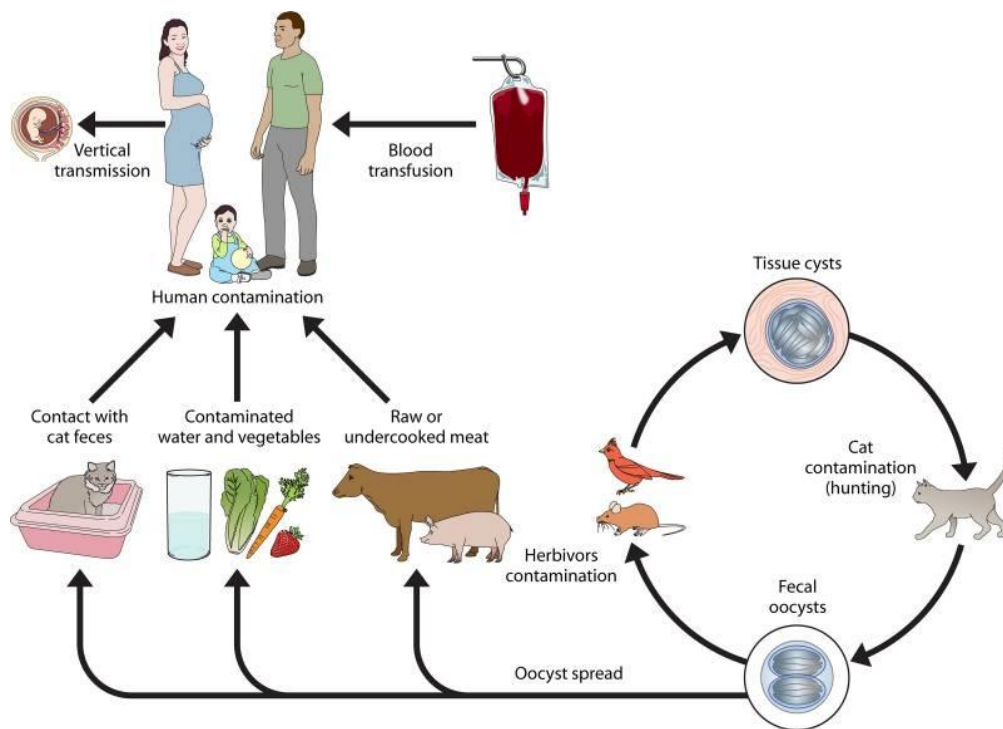


Figure 5. Contamination humaine par *Toxoplasma gondii* (Esch and Petersen, 2013)

4) Invasion de la cellule hôte

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire et l'entrée dans une cellule hôte est indispensable pour sa survie. L'invasion de la cellule hôte par *T. gondii* est un phénomène très rapide (environs 20 secondes), initié par l'attachement du parasite à la surface de la cellule qu'il infecte *via* les protéines de surface du parasite appelées SAG (Surface antigens) (Carruthers and Boothroyd, 2007). Cette invasion s'accompagne d'une sécrétion régulée de protéines provenant de trois organites parasitaires distinctes, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (Hakimi *et al.*, 2017).

La protéine SAG1 est la plus importante, elle est dotée de propriétés immunomodulatrices et est impliquée dans la reconnaissance des protéoglycannes sulfatés sur la surface de la cellule hôte (Bishop *et al.*, 2005; He *et al.*, 2002). La fixation de la protéine SAG1 sur les protéoglycannes membranaires déclenche une première vague de sécrétion à partir des micronèmes à la surface du parasite, permettant ainsi la motilité et la fixation à la cellule hôte (Carruthers, 2002).

Suite à l'attachement par le pôle apical du tachyzoïte, appelé conoïde, une augmentation de la concentration en calcium cytosolique est associée à des modifications morphologiques importantes et à la sécrétion des protéines impliquées dans l'invasion des cellules hôtes (Figures 6 et 7). Ce calcium libéré par les réservoirs intracellulaires du parasite est nécessaire et suffisant pour induire l'invasion de la cellule hôte en stimulant la sécrétion des micronèmes

à la surface du parasite (Arrizabalaga and Boothroyd, 2004; Carruthers *et al.*, 1999). Les mécanismes induisant l'augmentation du calcium cytosolique ne sont pas très bien compris, toutefois, il a été décrit que des protéines kinases calcium dépendantes (CDPK) sont impliquées dans la libération du contenu des micronèmes (Blader and Saeij, 2009).

Immédiatement après l'attachement apical du parasite et l'expulsion des protéines des micronèmes, une deuxième vague de sécrétion à partir des rhoptries est déclenchée (d'abord le cou des rhoptries puis le bulbe des rhoptries). Au niveau des rhoptries, on trouve des protéines ROP, RON et des lipides organisés en vésicules nécessaires à la formation de la vacuole parasitophore (VP). Quatre protéines de rhoptries, RON2, RON4, RON5 et RON8 se lient à la protéine de micronème AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) pour former une jonction mobile (JM) à l'interface entre le parasite et la membrane de la cellule-hôte (Alexander *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2017). Cette JM se déplace à la surface du parasite pendant l'invasion, en allant du pôle antérieur vers le pôle postérieur pour envelopper le parasite dans une VP (Carruthers and Boothroyd, 2007).

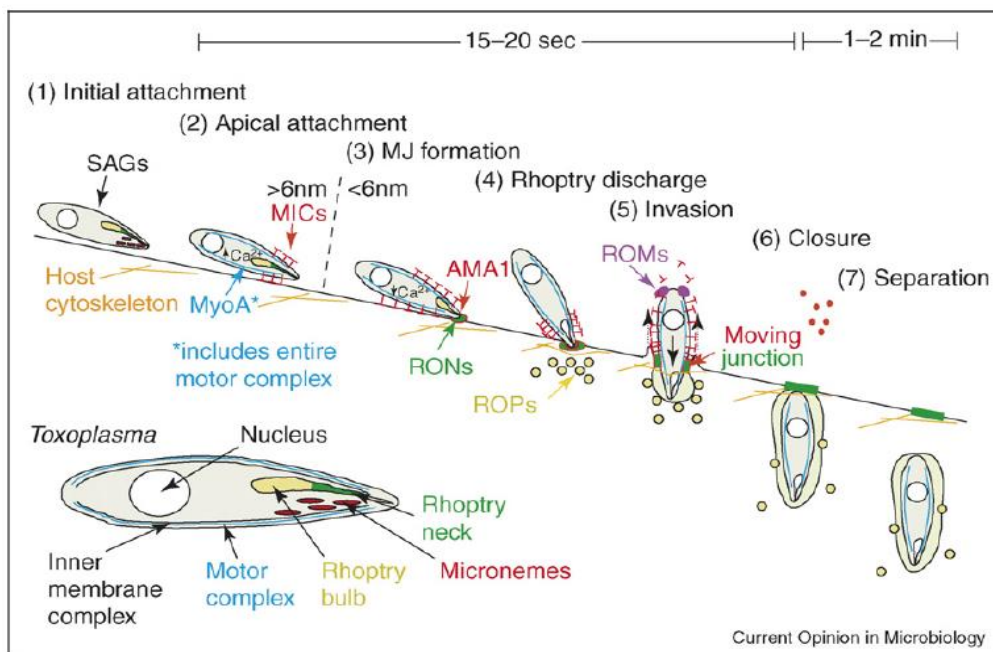


Figure 6. Invasion de la cellule hôte par *T. gondii* (Carruthers and Boothroyd, 2007)

Une autre protéine de rhoptrie a été identifiée comme acteur de la mobilité du parasite à la surface de la cellule-hôte, la toxofiline, une actin-binding protein (ABP) (Bradley *et al.*, 2005). Cette protéine joue un rôle dans l'invasion en interagissant avec le cytosquelette de l'hôte. Ce cytosquelette est important pour la mobilité du parasite appelée « Gliding motility », grâce aux filaments d'actine situés sous la membrane plasmique de la cellule-hôte (Dobrowolski and Sibley, 1996; Hakimi *et al.*, 2017; Sibley, 2004).

Ensuite, le contenu du bulbe des rhoptries est déversé à son tour dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Ces protéines ROPs relarguées vont migrer vers trois localisations principales : la lumière de la VP naissante, la membrane de la VP, ou l'intérieur de la cellule hôte et plus spécifiquement le noyau (Blader and Koshy, 2014).

En dernier, a lieu la sécrétion des protéines de granules denses (les GRAs), qui jouent un rôle majeur dans les modifications structurales de la VP. Ces GRAs sont sécrétées dans la VP

pendant et après l'invasion de la cellule hôte, elles participent au recrutement des organelles et des nutriments autour de la cellule hôte (Gold *et al.*, 2015; Mercier *et al.*, 2005; Rommereim *et al.*, 2016). Certaines de ces protéines (GRA16, GRA24) sont exportées de la VP vers le noyau de la cellule-hôte où elles jouent un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes de l'hôte (Bougdour *et al.*, 2014).

L'invasion prend fin lorsque le parasite est entièrement entouré par la VP dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Cette étape s'accompagne d'une chute de la concentration du calcium cytosolique et marque le début de la reproduction asexuée du tachyzoïte par endodyogénie au sein de la VP (Francia and Striepen, 2014; Striepen *et al.*, 2007).

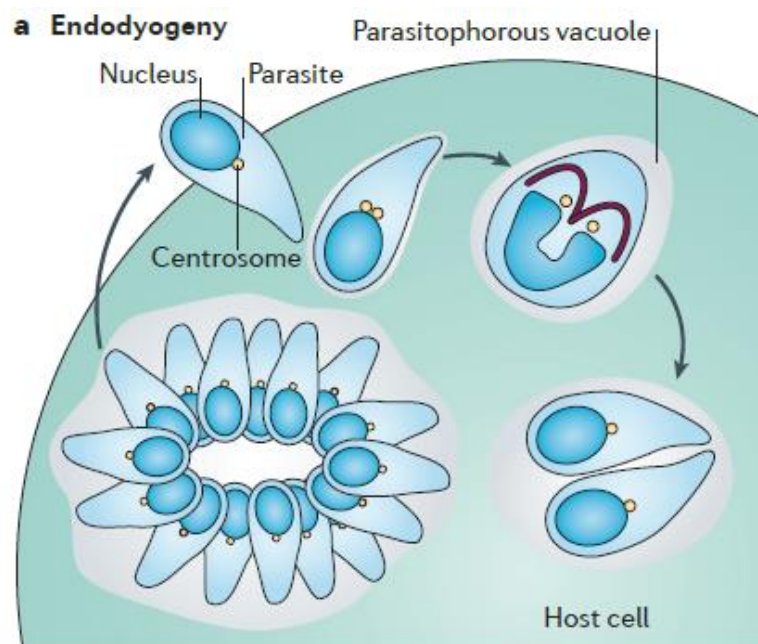


Figure 7. Reproduction de *T. gondii* par endodyogénie (Francia and Striepen, 2014)

Les parasites quittent la cellule généralement après que 64 à 128 parasites se soient accumulés dans la VP (Black and Boothroyd, 2000). La sortie de la cellule-hôte est un processus actif, qu'on appelle l'égression, et qui dépend de l'augmentation de la concentration du calcium cytosolique après libération des réserves intracellulaire (Sibley, 2010).

5) Génotypes et virulence

Dans le genre *Toxoplasma* il y a une seule espèce, *T. gondii*, au sein de laquelle, plusieurs souches ont été décrites. Bien qu'elles soient génétiquement identiques à 98%, la classification des souches de *T. gondii* a été faite en fonction de leur virulence chez la souris (détermination de la dose létale 50 (DL50) et de la dose létale 100 (DL100), doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% (DL50) ou 100% (DL100) des souris infectées). Trois lignées clonales majoritaires I, II, III, ayant des degrés de virulence variés, ont été identifiées en Europe et en Amérique du Nord (Howe and Sibley, 1995; Saeij *et al.*, 2005; Sibley and Ajioka, 2008). Cette étude a été réalisée grâce à des techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), de microsatellites et des analyses isoenzymatiques.

Tableau II : Caractéristiques des trois lignées clonales de *T.gondii* (Sibley and Boothroyd, 1992)

	Type I	Type II	Type II
Distribution humaine	0% à 40% des souches isolées	40% à 100% souches isolées	<20% souches isolées
Multiplication	Rapide en tachyzoïtes Peu de conversion en bradyzoïtes et peu de formation de kystes <i>in vivo</i>	Lente Conversion en bradyzoïtes Formation de kystes <i>in vivo</i>	Intermédiaire Formation de kystes <i>in vivo</i>
Virulence	Très virulente chez la souris toxoplasmose aigue, létale DL100= 1 parasite	Pas virulente chez la souris DL50>10 ⁵	Virulence intermédiaire Souvent létal chez la souris DL50>10 ⁵

Cependant, des souches nouvelles ont été isolées en pathologie humaine, présentant des génotypes différents des souches connues et elles sont considérées comme étant très virulentes chez l'homme, à l'origine de tableaux cliniques sévères. Ces souches dites atypiques, sont caractérisées par une grande variabilité génétique due à la présence d'allèles uniques non retrouvés dans les trois types principaux. Ce polymorphisme génétique a été principalement décrit sur le continent Sud-Américain, plus précisément au Brésil et en Guyane française (Figure 8) (Ajzenberg *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2011).

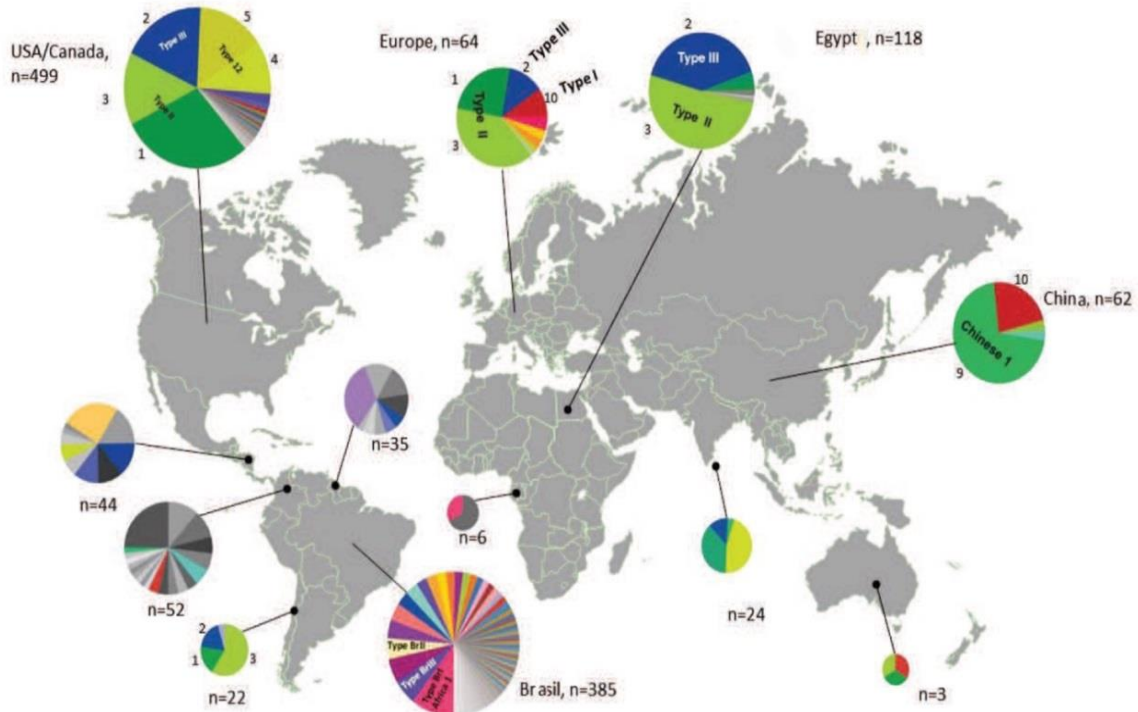


Figure 8. Distribution géographique des génotypes de *T. gondii* (Shwab *et al.*, 2014)

Les souches de type I, II, III sont largement dominantes en Europe et en Amérique du Nord alors qu'en Amérique du Sud (et plus précisément au Brésil), on note la présence d'un grand polymorphisme génétique (Figure 8).

Depuis 2012, des méthodes de regroupement ont été utilisées (RFLP, microsatellites et séquençage de marqueurs spécifiques) sur 956 isolats afin d'organiser la diversité génétique de *T. gondii*. Ainsi, une nouvelle classification a été proposée pour regrouper les différentes souches de *T. gondii*, définissant 138 génotypes répartis en 6 clades (clade A à F) et en 15 halogroupes (Figure 9) (Su *et al.*, 2012).

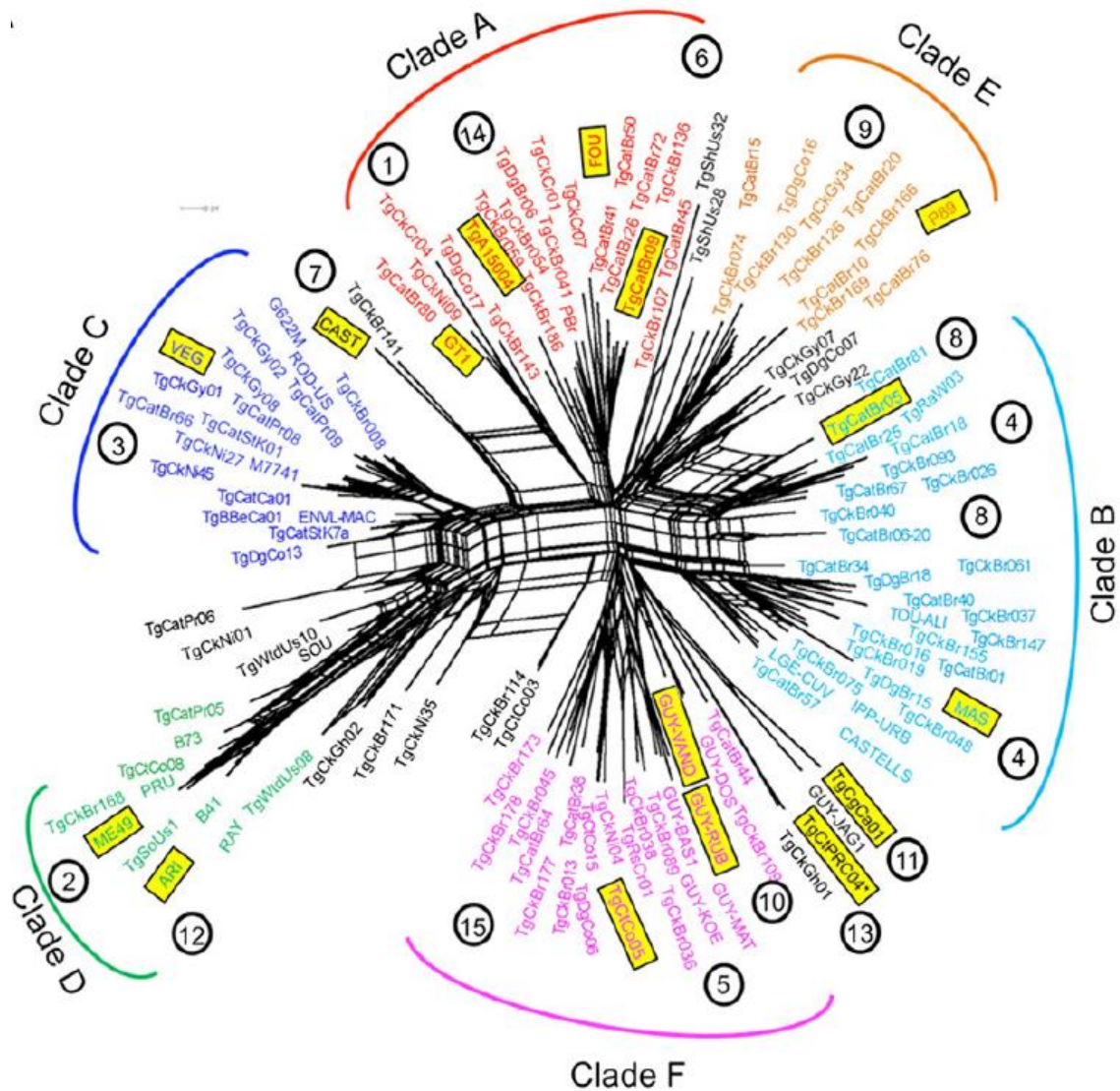


Figure 9. Structure génétique de la population de *T. gondii* (Su *et al.*, 2012)

Cette étude a pu confirmer le modèle biphasique de regroupement des souches, avec une partie comprenant des régions de l'hémisphère Nord (Amérique du Nord et Europe) où prédominent les lignées clonales (clades C et D dits types I/II/III) et le reste du globe, plus spécifiquement l'Amérique du Sud, caractérisée par la présence d'un grand nombre de génotypes, la preuve d'une forte recombinaison (clades A, B et F dits atypiques). Ces génotypes atypiques semblent être en partie responsables d'atteintes oculaires sévères observées chez des patients Sud-Américains, causes possibles d'une mauvaise adaptation de l'Homme à ces souches hautement recombinantes (Carne *et al.*, 2009).

En Europe, il existe une prédominance très nette des souches de type II. Ces souches représentent en France plus de 85 % des souches isolées alors que les souches de type I, III et atypiques sont très rares (Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai utilisé les souches suivantes :

- La souche RH, clade A, halogroupe 1, ancienne souche de type I. Elle a été isolée par Sabin en 1941 à partir d'une encéphalite toxoplasmique aiguë.
- La souche Prugnaud (PRU), clade D, halogroupe 2, ancienne souche de type II. Elle a été isolée en 1964 à partir d'une toxoplasmose congénitale sévère.
- La souche LEF, clade B, halogroupe 8, ancienne souche atypique. Elle a été isolée en 1994 à partir d'une toxoplasmose congénitale chorioretinogène.

Bien que des différences soient observées dans les pathologies induites par les différentes souches chez la souris, la virulence des souches observée chez la souris peut être différente chez l'Homme, suggérant que les facteurs de l'hôte peuvent également être impliqués dans la virulence du parasite (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). La virulence de *T.gondii* semble dépendre de la souche elle-même, des facteurs parasitaires, ainsi que des facteurs de la cellule hôte.

Afin de faciliter l'identification des gènes parasitaires impliqués dans la différence de virulence observée entre les diverses souches, des croisements expérimentaux ont été réalisés entre des souches présentant différents profils de virulence. Les souches hybrides obtenues ont été introduites chez la souris. Cinq VIR (Virulent loci) ont été identifiés ainsi que trois protéines sécrétées de rhoptries incriminées (ROP5, ROP16, ROP18). En effet, le locus VIR1 code pour la pseudokinase ROP5, le locus VIR3 pour la kinase ROP18, le locus VIR4 pour la kinase ROP16, alors que le rôle des loci VIR2 et VIR5 n'a pas encore été élucidé (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006).

Tableau III : Les protéines ROP impliquées dans la virulence de *T. gondii* (Kemp *et al.*, 2013)

	Type I	Type II	Type III
ROP5	++	+	+
ROP16	++	-	++
ROP18	++	+	-

Presence of ROP5, ROP16 and ROP18 forms in the three *Toxoplasma gondii* lineages: -, inactive; +, minimally active; ++, highly active.

Ces facteurs clés de virulence sont des protéines sécrétées déchargées des organites apicaux, les rhoptries. Ils sont injectés directement dans la cellule hôte et jouent un rôle important dans le processus d'invasion parasitaire et dans l'induction de la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12) par les macrophages de souris (Robben *et al.*, 2004).

La protéine parasitaire **ROP16** appartient à la famille des protéines kinases ROP2. Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase, libérée lors de la phase d'invasion et accumulée dans le noyau de la cellule hôte. ROP16 phosphoryle la famille des protéines STAT (STAT1, STAT3, STAT5 et STAT6) (Signal Transducers and Activators of Transcription) de l'hôte (Ong *et al.*, 2010). Ces protéines STAT sont impliquées dans la régulation de différents processus

cellulaires telles la croissance, la différenciation, la survie ou l'apoptose et dans la régulation de la réponse immunitaire.

La protéine **ROP18** est également une sérine-thréonine kinase, active et polymorphique, elle appartient à la famille ROP2 (Taylor *et al.*, 2006). Elle possède un domaine kinase, essentiel pour assurer une croissance parasitaire rapide et pour l'induction de la virulence chez la souris (El Hajj *et al.*, 2007). ROP18 est exprimée à la surface de la membrane de la VP et est directement exposée au cytoplasme de la cellule hôte, ce qui en fait un excellent candidat impliqué dans les modifications des voies de signalisation de la cellule hôte. ROP18 est impliquée dans la phosphorylation et l'inactivation des IRGs (Immunity Related GTPase) de l'hôte (Fentress *et al.*, 2010; Steinfeldt *et al.*, 2010), qui jouent un rôle dans la lutte antimicrobienne, permettant ainsi la survie du parasite dans la cellule infectée.

Un troisième locus a été identifié, comme ayant le plus grand impact sur la virulence d'une souche de type I chez la souris et représenté par la protéine **ROP5**, qui code pour un cluster de pseudokinases (kinases inactives à cause d'une absence d'un motif dans leur domaine catalytique responsable de l'activité phosphotransférase) secrétées et hautement polymorphiques (Reese *et al.*, 2011; Saeij *et al.*, 2006). ROP5 appartient à la famille des sérine-thréonine kinases de ROP2 et se localise à la face cytosolique de la vacuole parasitophore tout comme ROP18 (Khan *et al.*, 2009). Elle est impliquée dans l'inhibition des IRGs en coopération avec ROP18, contrôlant ainsi la virulence des souches et la survie du parasite (Niedelman *et al.*, 2012).

6) La toxoplasmose

La toxoplasmose est une anthrozoonose cosmopolite de symptomatologie et de gravité variables. Elle est le plus souvent cliniquement inapparente chez les sujets immunocompétents (environ 80% des cas) et se traduit biologiquement par une séroconversion. Lorsqu'elle est symptomatique, la forme clinique la plus souvent observée est ganglionnaire (15 à 20% des cas), avec la présence d'adénopathies cervicales ou occipitales indolores et souples. Une fièvre et une asthénie sont très fréquemment associées ; l'asthénie peut perdurer plusieurs mois. Les symptômes régressent spontanément sans traitement.

6.1) Aspects épidémiologiques

On estime qu'environ 25 à 30% de la population humaine mondiale est infectée par *T. gondii* (Montoya and Liesenfeld, 2004). La séroprévalence de la toxoplasmose augmente avec l'âge et varie selon le niveau socio-économique, les habitudes alimentaires et la localisation géographique (Argumentaire de l'Haute Autorité de Santé, 2017). En réalité, les prévalences varient considérablement d'un pays à l'autre (de 10 à 80%) et souvent dans un même pays ou entre différentes communautés d'une même région (Figure 10) (Pappas et al., 2009).

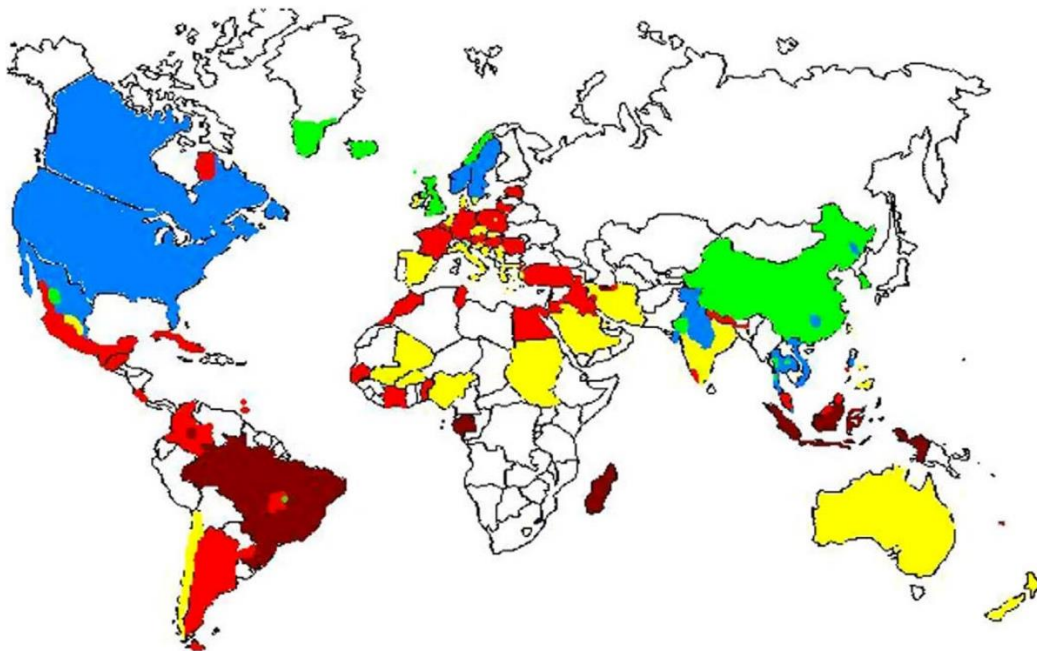


Figure 10. La séroprévalence de *T. gondii* (Pappas et al., 2009).

Le rouge foncé correspond à une prévalence supérieure à 60%, le rouge clair à 40–60%, le jaune à 20–40%, le bleu à 10–20% et le vert à une prévalence <10%. Le blanc équivaut à l'absence de données.

La prévalence de la toxoplasmose varie considérablement, avec des taux élevés (supérieurs à 60%) en Amérique latine, dans certaines parties de l'Europe centrale et orientale, au Moyen-Orient et dans certaines régions de l'Asie du Sud-Est et en Afrique. Des taux faibles sont observés dans certains pays de l'Europe du Nord, certains pays de l'Asie du Sud-Est ainsi qu'en Amérique du Nord.

Cette diversité de séroprévalence pourrait être expliquée par différents facteurs qui jouent un rôle majeur dans la propagation de *T. gondii*.

Les facteurs climatiques influent sur la survie des oocystes dans l'environnement et, par la suite, sur les taux d'infection chez les animaux de rente. En effet, les prévalences les plus faibles sont observées dans les pays arides et dans les pays les plus froids, alors que les prévalences les plus élevées on les retrouve dans les pays tropicaux à climat chauds et humides favorisant la survie des oocystes.

Des facteurs anthropiques pourraient expliquer en grande partie les variations de la séroprévalence humaine, car certaines habitudes culturelles et alimentaires, telles que la consommation de viande crue ou non cuite, le lavage des mains, les types de viande ou de légumes consommés et les habitudes de nettoyage des légumes favorisent la propagation du parasite.

D'autres facteurs responsables de la répartition inégale de la toxoplasmose dans le monde sont la situation socio-économique (sources d'eau, salubrité), les habitudes de vie (présence de chats, jardinage sans gants), ou la présence ou absence des différents programmes de surveillance ou de dépistage.

Bien que la séroprévalence augmente avec l'âge, le taux d'infection par rapport à l'âge varie en fonction du pays et du niveau socioéconomique. Une séroprévalence élevée pourrait être observée chez l'enfant dans les populations vivant dans des conditions d'hygiène médiocres, probablement liées à une contamination terrestre et d'origine hydrique par l'ingestion d'oocystes. Il a été démontré qu'avec l'augmentation du niveau socio-économique et l'amélioration des conditions générales d'hygiène, notamment la modification des systèmes de production et la consommation de viande congelée, ont entraîné une diminution constante de la séroprévalence dans plusieurs pays occidentaux comme aux États-Unis (Jones *et al.*, 2009).

En France, la séroprévalence de la toxoplasmose chez l'adulte a longtemps été élevée (82% en 1960, 66% en 1982, 43,8% en 2003, 37,8% en 2010), avec des variations régionales qui pourraient être expliquées par la différence de climat et des habitudes alimentaires d'une région à l'autre. Une projection de la prévalence de la toxoplasmose en 2020 a été estimée à 29.6% en cas de baisse continue (Figure 11) (Tourdjman *et al.*, 2015).

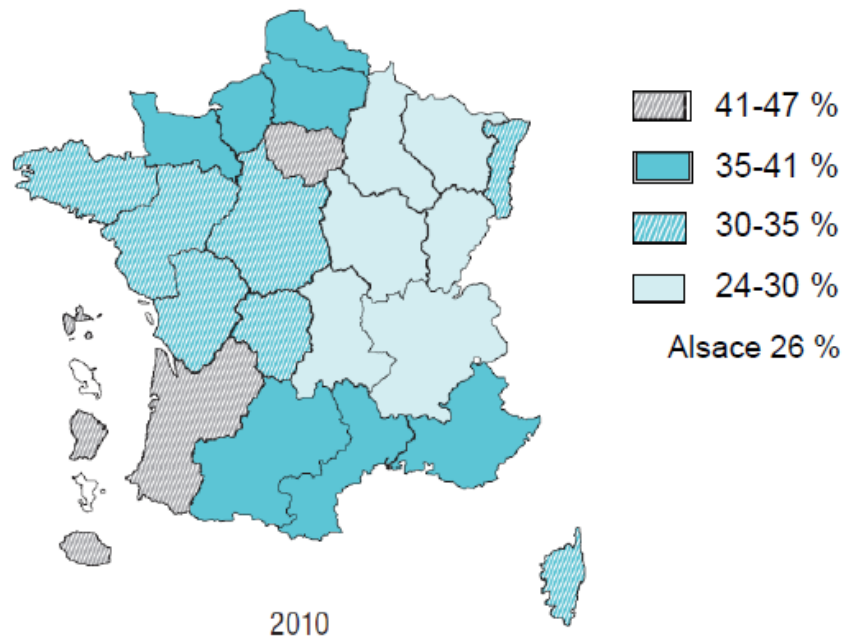


Figure 11. Prévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon le département d'habitation (Tourdjman *et al.*, 2015).

6.2) Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la toxoplasmose varient en fonction de la souche infectante, ainsi que du statut immunitaire du sujet infecté.

6.2.1) La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

Chez le sujet immunocompétent, la toxoplasmose est habituellement bénigne, elle est asymptomatique dans 90% des cas et peut se manifester parfois par un syndrome pseudo-grippal (fatigue, fièvre, courbatures...) ou par une adénopathie cervicale isolée (Montoya and Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux and Dardé, 2012).

Lors de la phase aiguë, la dissémination parasitaire est contrôlée par la réponse immunitaire de l'hôte. La primo-infection évolue ensuite vers une phase chronique asymptomatique caractérisée par l'enkystement des parasites dans des organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau, le cœur, les muscles et l'œil, où l'inflammation est limitée et la destruction tissulaire liée à la cytolysse est réduite afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000). Ainsi, les kystes peuvent persister toute la vie de l'hôte sans manifestations cliniques.

Bien que dans la majorité des cas, la toxoplasmose est une infection bénigne, elle peut provoquer des symptômes graves dans le cerveau et d'autres organes chez les patients immunodéprimés, ainsi que chez le fœtus suite à une infection congénitale.

6.2.2) La toxoplasmose du sujet immunodéprimé

La toxoplasmose de l'immunodéprimé peut résulter d'une primo-infection ou de la réactivation d'une infection ancienne (réactivation de kystes parasitaires). L'atteinte cérébrale est la plus fréquente chez les patients atteints de SIDA (Syndrome d'immunodéficience

acquise), une localisation oculaire est associée dans 10 à 20% des cas. Des formes pulmonaires ou disséminées sont rencontrées chez des patients avec un déficit profond de l'immunité cellulaire.

Dans le contexte de l'infection par le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), la manifestation clinique la plus fréquente est l'encéphalite toxoplasmique (Figure 11), avec des symptômes allant de céphalées à hémiparésie et troubles de l'élocution voire démence, pertes de mémoire et crises épileptiques (Machala *et al.*, 2015; Montoya and Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux and Dardé, 2012). Elle est le plus souvent due à la réactivation d'une infection latente (kystes cérébraux) et qui survient lorsque le nombre de cellules CD4 + est inférieur à 200 cellules / μL (Luft and Remington, 1992). Aujourd'hui, grâce à la reconstruction immunitaire due à la thérapie antirétrovirale active, l'incidence de la toxoplasmose a considérablement diminué chez les patients infectés par le VIH.

Cependant, il existe toujours des formes sévères de rétinohoréïdite toxoplasmique, survenant en général chez des sujets immunodéprimés (transplantés, patients atteints d'hémopathie maligne ou présentant une immunodépression iatrogène). Il est fondamental de reconnaître et par conséquent, de traiter efficacement ces rétinohoréïdites parasitaires dont le pronostic fonctionnel demeure souvent réservé.

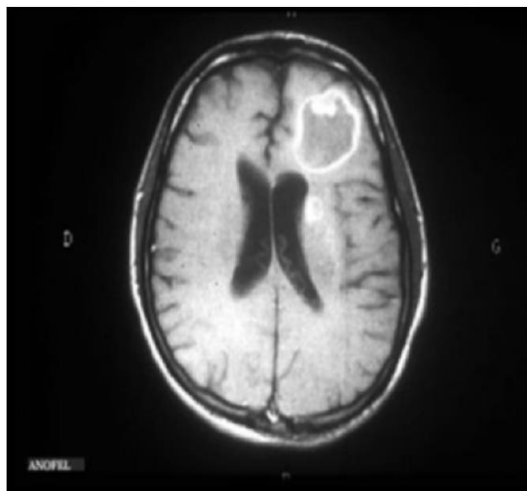


Figure 12. Encéphalite toxoplasmique.
(CD-ROM Anofel 3 ; Derouin & Pelloux, 2008)

En France, la toxoplasmose cérébrale représente 12% des personnes qui découvrent leur séropositivité au VIH après le déclenchement d'une affection opportuniste (INVS 2008).

6.2.3) La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale (TC) est dans la majorité des cas, secondaire au passage trans-placentaire du parasite lorsqu'une femme enceinte non immunisée contracte l'infection au cours de la grossesse. De rares cas de réactivation de l'infection en cas d'immunodépression pendant la grossesse, ou de nouvelle infection avec une nouvelle souche ont été décrits (Andrade *et al.*, 2009). Le passage trans-placentaire du parasite n'est cependant pas systématique, et le risque de transmission materno-fœtale lors de la phase aiguë de l'infection augmente avec l'âge de la grossesse ; le taux global de transmission est évalué à 15% à 16 semaines de grossesse, 40% à 26 semaines et 71% à 36 semaines. La sévérité de la maladie

évolue de façon inverse (formes graves en cas de transmission en début de grossesse, formes infra-cliniques en fin de grossesse) (Figure 13).

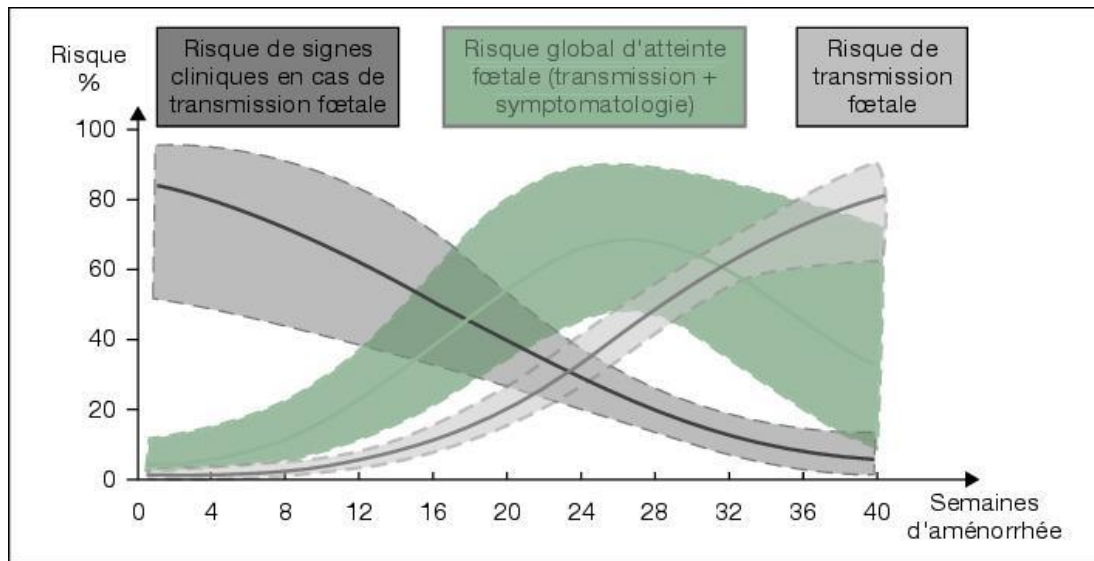


Figure 13. Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte en fonction de l'âge de la grossesse (Davenel *et al.*, 2010)

L'infection peut donc déterminer une transmission verticale du parasite, ce qui entraîne de graves conséquences pour le fœtus, notamment une altération de l'acuité visuelle, un retard mental, des calcifications intracrâniennes, une hydrocéphalie, des malformations fœtales et voire la mort *in utero* (Fallahi *et al.*, 2018).

Au cours du premier trimestre de grossesse, le risque de transmission est faible, en revanche les conséquences sont très sévères avec un risque de chorioretinite, d'hydrocéphalie, de calcifications intra-crâniennes voire mort *in utero* du fœtus (Montoya and Liesenfeld, 2004).

Pendant le 2^{ème} trimestre de grossesse, on observe des symptômes comme l'hépatosplénomégalie, la rétinocoroïdite ou des calcifications intracérébrales.

En ce qui concerne le 3^{ème} trimestre de grossesse, malgré une transmission verticale supérieure à 70%, la majorité des nouveaux-nés sont asymptomatiques à la naissance.

Le potentiel évolutif de la maladie est imprévisible, il est surtout lié à la survenue de chorioretinites tardives associées ou non à des symptômes neurologiques et des troubles de développement. Elle peut devenir cliniquement apparente des années après la naissance ; environ 10% des rétinocoroïdites sont diagnostiquées dès la naissance et 90% au cours du suivi ultérieur variant de quelques mois à plusieurs dizaines d'années selon les études (Dunn *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2001).

En 2015, la prévalence de la TC a été évaluée à 3,1 cas pour 10 000 naissances, soit 246 cas de TC diagnostiqués et les formes néonatales sévères représentaient 2% des cas (CNR toxoplasmose 2017).

La France a instauré un programme de prévention de la toxoplasmose régi par le décret du 14 février 1992, relatif au dépistage obligatoire et à la surveillance des femmes enceintes avant la fin du premier trimestre et jusqu'à la fin de la grossesse. Une circulaire du 27 septembre 1983 adjoint la prescription de règles hygiéno-diététiques pour les femmes enceintes non

immunisés vis-à-vis de la toxoplasmose. Ce programme a pour but de dépister précocement une éventuelle séroconversion, diagnostiquer et prendre en charge une éventuelle infection fœtale. En France, la séroconversion des femmes enceintes a régulièrement baissé ces cinquante dernières années, ce qui peut être expliqué par les modifications d'exposition au parasite (diminution de la consommation de viande crue, augmentation de celle de viande congelée, respect des mesures hygiéno-diététiques pendant la grossesse) (Tourdjman *et al.*, 2015).

6.2.4) Toxoplasmose oculaire

La toxoplasmose oculaire (TO) est une maladie redoutable car potentiellement cécitante. Elle résulte d'une infection congénitale ou acquise, qui touche aussi bien les sujets immunodéprimés qu'immunocompétents (Delair *et al.*, 2008; Gilbert and Stanford, 2000). La TO est la principale cause d'uvéïte postérieure dans le monde (Pfaff *et al.*, 2014). Des prévalences élevées ont été en particulier rapportées en Amérique du Sud ainsi qu'en Afrique et une partie de l'Asie (Maenz *et al.*, 2014). Plusieurs études ont montré des incidences et des sévérités plus élevées de la chorioretinite au Brésil et en Colombie (Gilbert *et al.*, 2008). Ainsi, au sud du Brésil, la TO est estimée à 17,7% (Gilbert *et al.*, 1999; Pappas *et al.*, 2009; Vallochi *et al.*, 2005) et à 6% en Colombie, alors qu'en Europe et en Amérique du Nord, elle est évaluée entre 2 et 3% (Jones *et al.*, 2006a; Robert-Gangneux and Dardé, 2012; de-la-Torre *et al.*, 2009).

Il est maintenant reconnu que la sévérité de l'infection dépend du génotype de la souche (Roberts and McLeod, 1999). En effet, la gravité de l'infection est faible dans les pays d'Europe occidentale et en Amérique du Nord où les souches de type II prédominent (Howe and Sibley, 1995; Petersen *et al.*, 2012), mais les lésions sont plus fréquentes et plus sévères en Amérique du Sud où les souches parasitaires sont beaucoup plus hétérogènes et atypiques (Furtado *et al.*, 2013; Xiao and Yolken, 2015).

Que la TO se produise chez un sujet immunocompétent ou immunodéprimé, et qu'elle soit d'origine congénitale ou acquise, l'aspect clinique de la rétinopathie toxoplasmique (inflammation de la rétine et de la choroïde) est le plus souvent typique : rétinite nécrosante localisée (Park and Nam, 2013; Subauste *et al.*, 2011). On retrouve des zones de nécroses entourées d'une réaction inflammatoire intense (Figures 14 et 15).



Figure 14. Image de fond d'œil illustrant une rétine normale (the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus website <https://aapos.org/terms/conditions/106>)



Figure 15. Choriorétinite consécutive à une toxoplasmose congénitale (*American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus website <https://aapos.org/terms/conditions/106>*)

Les récurrences sont fréquentes, quelles que soient la souche ou la région : en Europe certains auteurs les estiment à environ 80% des cas (Pleyer *et al.*, 2014). Par ailleurs, un état d'immunodépression augmente le risque de faire des récurrences, le système immunitaire n'étant plus en mesure de maintenir le parasite à l'état latent. L'importance du système immunitaire dans l'étendue des lésions rétiniennes a été abordée dans plusieurs études (Figure 16) (Garweg *et al.*, 2005; de-la-Torre *et al.*, 2013).

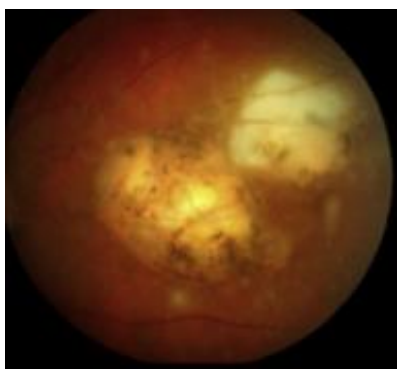


Figure 16. Toxoplasmose oculaire récurrente (Pleyer *et al.*, 2014)

À l'heure actuelle, le problème majeur réside dans l'absence de traitements réellement efficaces, agissant sur la forme latente du parasite, les bradyzoïtes enkystés, ce qui limiterait les risques de récurrence.

6.3) Diagnostic biologique

Le diagnostic de la toxoplasmose repose sur la réalisation d'examen sérologiques pour rechercher les anticorps anti-*Toxoplasma gondii* et / ou d'examen de biologie moléculaire pour la détection directe du parasite ou de son ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). La réalisation de ces examens dépend du contexte clinique, ainsi que du statut immunitaire du patient.

Tableau IV : Stratégies de diagnostic de la toxoplasmose (Robert-Gangneux and Dardé, 2012)

Patient	Disease setting	Diagnostic approach	Technique(s)	Sample(s)
Immunocompetent patient, transplant recipient, or pregnant woman	Primary infection or determination of immune status	Serology	Routine, IgG/IgM detection ^a ; complementary, IgG avidity, ^c IgA detection, dye test, ^d Western blotting, ^d and ISAGA ^e	Serum
Fetus	Maternal primary infection	Prenatal diagnosis ^f based on parasite detection	PCR, mouse assay ^b	Amniotic fluid
Newborn	Maternal primary infection	Parasite detection Serology	PCR, mouse assay ^b IgG/IgM ^g /IgA detection ^b Comparative Western blotting ^b	Placenta, cord blood Cord blood serum and/or newborn serum Neonate and mother sera in parallel
Immunocompromised patient	Cerebral or disseminated toxoplasmosis	Parasite detection ^b	PCR PCR, cell culture, mouse assay, and histology	Blood CSF, BAL, tissue specimens
Immunocompetent or immunocompromised patient	Retinochoroiditis	Serology	Comparative Western blotting, ^b Goldman-Witmer coefficient ^b	Aqueous humor and serum in parallel
		Parasite detection	PCR	Aqueous humor

6.4) Traitements et prophylaxie

6.4.1) Traitement de la toxoplasmose

Peu de médicaments sont disponibles pour le traitement de la toxoplasmose, et ces derniers sont actifs sur la forme tachyzoïte et non sur la forme kystique latente. Un traitement curatif n'est indiqué qu'en cas de TC ou toxoplasmose grave survenant chez un sujet immunodéprimé ou à la suite d'une infection par une souche atypique très virulente.

Les médicaments utilisés pour le traitement de la toxoplasmose sont regroupés en deux grandes familles : les macrolides et les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (Derouin, 2001).

Les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique regroupent deux classes thérapeutiques : les sulfamides, inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase (DHPS) (Sulfadiazine, sulfadoxine), et les inhibiteurs de la déhydrofolate réductase (DHFR) (Pyriméthamine) (Figure 17). Ces deux classes thérapeutiques ont une action parasiticide synergique sur le tachyzoïte de *T. gondii*, puisqu'elles agissent en cascade sur la voie de synthèse des folates, permettant ainsi de potentialiser l'effet anti-parasitaire. En effet, l'inhibition de la DHPS par les sulfamides diminue la quantité de dihydroptéroate et donc de dihydrofolate disponible pour l'activité de la DHFR. La diminution concomitante du substrat et de l'activité de la DHFR permet à la combinaison de ces deux drogues d'être redoutablement efficace.

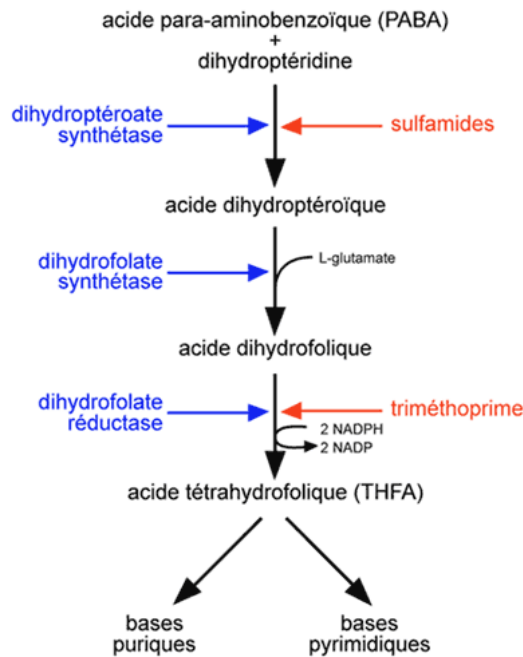


Figure 17. Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (123bio.net)

Les principaux effets indésirables observés sont cutanés (Syndrome de Lyell), mais aussi hématologiques (neutropénie, thrombopénie) nécessitant l'administration d'acide folinique chez les patients. Ces effets indésirables sont liés à l'inhibition de la synthèse de l'acide folique chez l'hôte (Rapport AFSSA 2005).

Ces deux médicaments ne doivent en aucun cas être prescrits seuls car ils seraient responsables de destructions tissulaires sévères et de larges lésions (Garweg and Stanford, 2013).

Les macrolides représentent la deuxième famille thérapeutique utilisée dans le traitement de la toxoplasmose, dont l'action est uniquement parasitostatique. La spiramycine est le seul macrolide utilisé dans le cadre de la toxoplasmose, elle est indiquée chez la femme lors d'une séroconversion pendant la grossesse afin d'éviter le passage transplacentaire du parasite et donc la contamination du fœtus (Julliac *et al.*, 2010).

Les traitements doivent être conseillés et adaptés au pays d'origine de l'infection. En effet, les souches parasitaires et les lésions étant plus sévères en Amérique du Sud, les traitements ne seront pas les mêmes que ceux donnés en Europe (Commodaro *et al.*, 2009).

Actuellement, le problème majeur réside dans l'absence de traitements réellement efficaces, agissant sur la forme latente du parasite. C'est pourquoi la prévention de l'infection joue un rôle majeur et passe par le respect des mesures hygiéno-diététiques, ainsi que la mise en place d'un traitement prophylactique chez les sujets à risque en cas d'immunodépression ou de séroconversion pendant la grossesse.

6.4.2) Prophylaxie

Actuellement, il n'existe aucun traitement prophylactique par vaccination chez l'homme (HAS 2017).

En cas d'immunodépression ou de grossesse, il est indispensable de mettre en place un traitement préventif afin de diminuer le risque d'infection, de réactivation à partie des kystes ou de transmission materno-fœtale selon le contexte.

Dans un premier temps, le respect des mesures hygiéno-diététiques pour les sujets non immunisés, notamment les femmes enceintes, est important afin d'éviter la contamination parasitaire (tableau 5).

Tableau V : Recommandations hygiéno-diététiques de prévention chez la femme enceinte (AFSSA 2005)

Synthèse actualisée des recommandations de prévention de la toxoplasmose chez la femme enceinte

Recommandations indispensables		Précisions
Hygiène personnelle	Se laver les mains : - surtout après avoir manipulé de la viande crue, des crudités souillées par de la terre ou avoir jardiné, - avant chaque repas.	Brossage des ongles recommandé.
Hygiène domestique	Porter des gants pour jardiner ou pour tout contact avec de la terre.	
	Faire laver chaque jour, par une autre personne, le bac à litière du chat avec de l'eau bouillante, ou porter des gants.	Faire particulièrement attention aux jeunes chats, surtout s'ils chassent, et aux chats errants.
Hygiène alimentaire	Bien cuire tout type de viande (y compris la volaille et le gibier). En pratique, une viande bien cuite a un aspect extérieur doré, voire marron, avec un centre rose très clair, presque beige et ne laisse échapper aucun jus rosé.	Une viande bien cuite correspond à une température à cœur comprise entre 68 et 72°C. Éviter la cuisson des viandes au four à micro-ondes.
	Lors de la préparation des repas, laver à grande eau les légumes et les plantes aromatiques, surtout s'ils sont terreux et consommés crus.	Précautions particulièrement renforcées pour les végétaux constamment souillés par de la terre et consommés crus; radis, salade, fraises, champignons.
	Laver à grande eau les ustensiles de cuisine ainsi que les plans de travail.	
Recommandations complémentaires		Précisions
Congélation	La congélation des denrées d'origine animale à des températures inférieures à -18°C (surgélation) permet la destruction des kystes, et peut être proposée comme recommandation complémentaire de prévention	
Repas en dehors du domicile	Ne consommer de viande que bien cuite. Éviter les crudités. Préférer les légumes cuits.	
Autres recommandations (relevant de la précaution)		Précisions
Aliments déconseillés	Lait de chèvre cru.	Risque exceptionnel mais avéré.
	Viande marinée, saumurée ou fumée.	Risque potentiel.
	Huîtres, moules et autres mollusques consommés crus.	Risque hypothétique à confirmer.

Document référent : Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation Afssa 2005

Dans un deuxième temps, une chimioprophylaxie secondaire est indispensable chez les sujets immunodéprimés visant à prévenir la réactivation toxoplasmique et donc la survenue d'une toxoplasmose cérébrale. Cette chimioprophylaxie secondaire est à instaurer en fonction du degré d'immunodépression, elle repose sur l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole®) et elle doit être maintenue tant que le risque d'infection opportuniste persiste (HAS 2017).

B. INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE

Les microorganismes intracellulaires tels que les champignons, les bactéries, les virus ou les parasites sont capables de perturber les grandes fonctions cellulaires de leurs hôtes. Les fonctions cellulaires touchées sont : le trafic membranaire, la synthèse protéique, le cycle cellulaire, l'apoptose, la présentation antigénique, la modulation de l'expression des gènes et de la réponse immunitaire.

Lors de la phase d'invasion, *T. gondii* établit une niche au sein de la cellule-hôte infectée pour sa réplication ; il s'agit de la vacuole parasitophore (VP), délimitée par la membrane de la VP. Cette membrane de la VP est une interface entre le parasite et le cytoplasme de la cellule hôte, elle agit comme une plate-forme pour la modulation de nombreuses voies de signalisation de la cellule-hôte, l'acquisition de nutriments et le remodelage de l'architecture de la cellule infectée, créant ainsi un environnement propice à la réplication du parasite (Martin *et al.*, 2007).

1) La vacuole parasitophore

La VP est formée lors de la phase d'invasion, par invagination de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte, entourant ainsi le parasite dans le cytoplasme cellulaire. Elle est délimitée par la membrane de la VP, qui joue un rôle majeur dans les interactions hôte-parasite observées. La membrane de la VP est poreuse pour les petites molécules (moins de 1 300 Da) mais sert autrement de frontière entre l'hôte et le parasite intracellulaire (Schwab *et al.*, 1994).

A l'intérieur de la VP, *T.gondii* secrète plusieurs protéines et lipides pour modifier la structure biochimique de la membrane de la VP, contournant ainsi la voie phagocytaire et empêchant la fusion de la VP avec le système endolysosomal (Clough and Frickel, 2017).

La membrane de la VP forme de longues structures membranaires, appelées projections de la membrane de la VP, qui s'étendent dans le cytoplasme de la cellule-hôte et permettent la communication entre plusieurs VP dans une même cellule et parfois entre VP de deux cellules voisines (Coppens and Romano, 2018; Romano *et al.*, 2013; Rome *et al.*, 2008).

Autour de la VP, le parasite recrute les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, probablement, *via* les protéines de granules denses et les protéines de la famille RON2 qui sont localisées au niveau de la membrane de la VP. Le rôle principale de cette association de haute affinité, membrane de la VP-organites cellulaire, est l'acquisition des nutriments indispensables pour la survie du parasite (Sinai *et al.*, 1997).

2) Acquisition des nutriments

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, incapable de survivre et de proliférer en l'absence d'une cellule-hôte. Dès la phase d'invasion, le parasite s'isole dans la VP qui le protège des agressions cellulaires. Afin de survivre et d'assurer sa prolifération, il doit puiser dans les ressources de la cellule infectée.

Quelques minutes après l'invasion, le parasite secrète des protéines dans la cellule infectée afin de détourner les voies de signalisation de l'hôte à son avantage. Ainsi, le parasite met en place un réseau intra-vacuolaire de tubules membranaires (Coppens and Romano, 2018). De

plus, il recrute le réticulum endoplasmique et les mitochondries de l'hôte autour de la VP, source potentielle de phospholipides et de stérols pour le parasite (Sinai *et al.*, 1997).

A travers la membrane de la VP, le parasite extrait plusieurs molécules de petite taille, dont le glucose, source d'énergie importante pour le parasite. Ce glucose transite de la cellule-hôte vers le parasite à travers la membrane de la VP grâce au transporteur membranaire *T. gondii* Glucose Transporter 1 (TgGT1) (Blader and Koshy, 2014). Le glucose est considéré comme la principale source de carbone indispensable pour la réplication et la motilité parasitaire. En effet, d'autres substrats peuvent être utilisés par le parasite comme source d'énergie, par exemple, la glutamine, une autre source de carbone, soulignant ainsi la capacité de *T. gondii* à s'adapter à plusieurs cellules-hôtes (Blume *et al.*, 2009) (Figure 18).

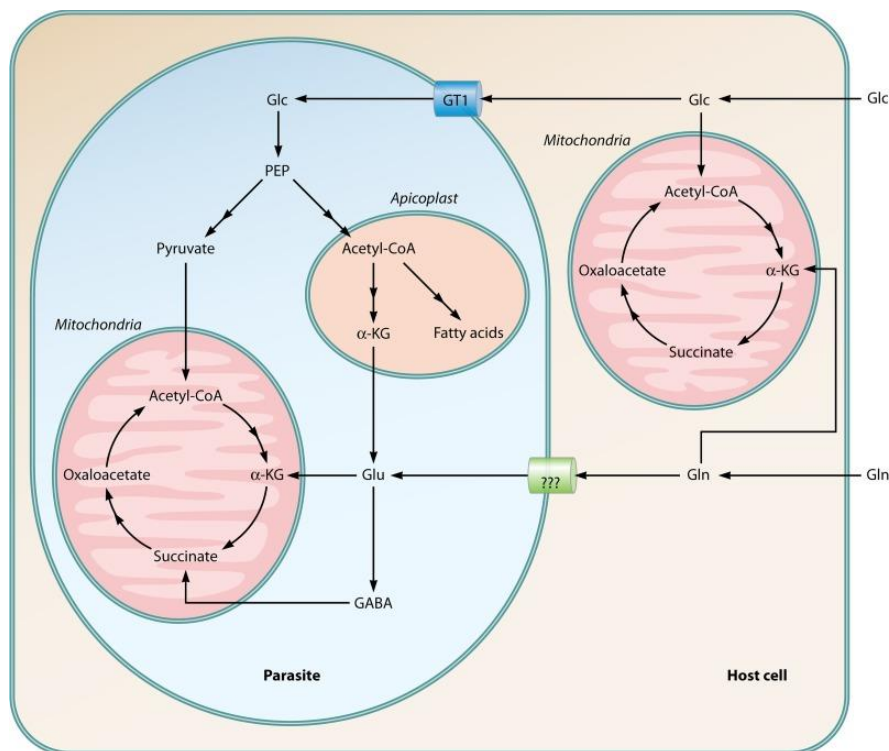


Figure 18. Utilisation du glucose (Glc) et de la glutamine (Gln) par *T. gondii* (Blader and Koshy, 2014)

Plusieurs équipes ont montré que *T. gondii* est auxotrophe pour un certain nombre de nutriments ; c'est le cas pour le cholestérol, l'arginine, le tryptophane, le fer, les polyamines, et les purines (Chaudhary *et al.*, 2004; Coppens *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2004; Gail *et al.*, 2004; Pfefferkorn, 1984; Seabra *et al.*, 2004).

L'arginine est un acide aminé essentiel acquis par le parasite à partir de la cellule-hôte. Il joue un rôle important dans la croissance et la virulence de *T. gondii*. Ainsi, une diminution de sa disponibilité favorise la transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Fox *et al.*, 2004).

Les acides gras et les folates sont synthétisés *de novo* par *T. gondii* mais peuvent également être acquis à partir de la cellule-hôte grâce à des transporteurs membranaires spécifiques (Charron and Sibley, 2002; Massimine *et al.*, 2005). De même, les sphingolipides, lipides susceptibles de contribuer à la régulation du trafic membranaire et à la structuration de la cellule, sont synthétisés *de novo* par *T. gondii* (20 espèces de sphingolipides différentes) mais aussi capturés par le parasite à partir de l'appareil de Golgi présent à proximité de la VP (Bisanz *et al.*, 2006).

Ces exemples de coexistence à la fois d'une synthèse *de novo* et d'une capture à partir de la cellule-hôte, montrent que la présence chez le parasite d'enzymes de biosynthèse de nutriments essentiels, ne peut pas exclure le fait que *T. gondii* est prototrophe pour ces métabolites (Laliberté and Carruthers, 2008).

3) Organisation du cytosquelette et des organelles de l'hôte

La membrane de la VP forme des associations étroites (probablement des interactions protéine-protéine) avec le réticulum endoplasmique et les mitochondries de la cellule-hôte et ces associations couvrent 75 % de la surface de la membrane de la VP 4 heures post-infection (Sinai *et al.*, 1997). L'association avec le réticulum endoplasmique est source de nutriments pour le parasite comme vu précédemment, alors que l'association avec les mitochondries serait impliquée dans l'acquisition de certains phospholipides, la sérine et la choline, nécessaires à la réplication parasitaire (Gupta *et al.*, 2005). Ce processus de recrutement des mitochondries semble dépendre de la protéine GRA7 (Coppens *et al.*, 2006). En utilisant d'autres GRAs comme GRA17 et GRA23, *Toxoplasma* augmente la perméabilité de la VP en créant des pores pour faciliter le passage des petites molécules (Gold *et al.*, 2015).

L'infection par *T. gondii* entraîne une réorganisation des microtubules de l'hôte autour de la VP (Coppens *et al.*, 2006; Halonen and Weidner, 1994). Ainsi, on note un réarrangement des filaments intermédiaires de vimentine autour de la VP afin de la maintenir à proximité du noyau de l'hôte (Halonen and Weidner, 1994)

Contrairement aux microtubules, les filaments d'actine de l'hôte ne sont pas réorganisés pendant la réplication parasitaire. En effet, lors de la phase d'invasion, le parasite doit traverser le cytosquelette d'actine de la cellule-hôte, probablement en formant une brèche dans le réseau ou en le démantelant localement. Des études récentes ont mis en évidence une protéine de rhoptries, la toxofiline, une actin-binding protein (ABP), qui permet au parasite d'utiliser le cytosquelette actinique de l'hôte lors de l'invasion (Delorme-Walker *et al.*, 2012; Hakimi *et al.*, 2017).

4) Manipulation des voies de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée, non inflammatoire, observé en réponse à une infection par un pathogène. Il s'agit d'un mécanisme de défense inné pour éliminer les agents pathogènes intracellulaires et diminuer la propagation de l'infection (Sridharan and Upton, 2014). Il n'est donc pas surprenant que certains pathogènes intracellulaires incluant *T. gondii*, ont développé des stratégies afin d'échapper à l'élimination par apoptose (Nash *et al.*, 1998).

Le processus apoptotique implique une cascade d'activation de cystéines protéases appelées caspases. Ces caspases sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives et sont activées par clivage, souvent par d'autres caspases (Boatright and Salvesen, 2003). Il y a des caspases initiateuses et effectrices. Les caspases initiateuses agissent en amont de la voie apoptotique et sont responsables de l'amplification initiale du signal alors que les caspases effectrices agissent en aval pour cliver les protéines-cibles spécifiques.

L'apoptose est gouvernée par deux voies d'activation principales : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque est souvent déclenchée par un stress ou des dommages causés à l'ADN, ce qui induit la libération du cytochrome C depuis la mitochondrie dans le

cytosol. Celui-ci, se lie et active le complexe de l'apoptosome incluant la procaspase 9. Une fois ce complexe formé, la procaspase 9 est clivée, et la caspase 9 active est alors libérée dans le cytosole.

La voie extrinsèque implique des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs du TNF ou des récepteurs Fas, dont l'activation par un ligand externe entraîne l'assemblage des composants du complexe DISC (Death-inducing Signaling complex), qui induit le recrutement et l'activation de la caspase 8 (Boatright and Salvesen, 2003).

Les caspases 8 et 9 activées vont à leur tour cliver la caspase 3 qui joue un rôle dans le déclenchement de l'apoptose (Figure 18) (Carmen *et al.*, 2006; Lemasters *et al.*, 1999).

L'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose est inhibée par *T. gondii* via la dégradation de la caspase 8 (Vutova *et al.*, 2007). De plus, les cellules infectées par *Toxoplasma* présentent un faible relargage de cytochrome C (Keller *et al.*, 2006). Ainsi, on a une inhibition de l'apoptose par diminution des caspases 8/9 actives et donc de la caspase 3 (Goebel *et al.*, 2001).

D'autres voies sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose par *T. gondii*. La voie impliquant NF- κ B, un facteur de transcription cellulaire activé par le parasite. L'induction de NF- κ B est associée à une réponse de survie cellulaire. En effet, NF- κ B est activé par le parasite et transloqué dans le noyau cellulaire où il active les gènes qui codent pour les protéines anti-apoptotiques. Il régule les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl2 (B-cell lymphoma 2) et des c-IAP (cellular inhibitors of apoptosis protein), contribuant ainsi au maintien d'un environnement anti-apoptotique dans les cellules infectées par *T. gondii* (Blader *et al.*, 2001; Molestina *et al.*, 2003).

Le maintien d'un état anti-apoptotique dans les cellules repose également sur l'activation de la voie de signalisation de la phosphoinositol 3 kinase (PI3K) (Kim and Denkers, 2006). Cette dernière phosphoryle le phosphatidylinositol (PI) en phosphatidylinositol biphosphate (PI2P) puis en phosphatidylinositol triphosphate (PI3P) au niveau de la membrane plasmique, conduisant au recrutement de la PKD1 (Phosphoinositide dependant kinase 1) par PI3P. La PKD1 active par phosphorylation PKB/Akt, une autre kinase qui agit à plusieurs niveaux. PKB/Akt inactive par phosphorylation le facteur pro-apoptotique Bad, elle active la voie NF- κ B et inhibe la transcription du facteur FKHR1 (Forkhead transcription factor) (Figure 19) (Datta *et al.*, 1999).

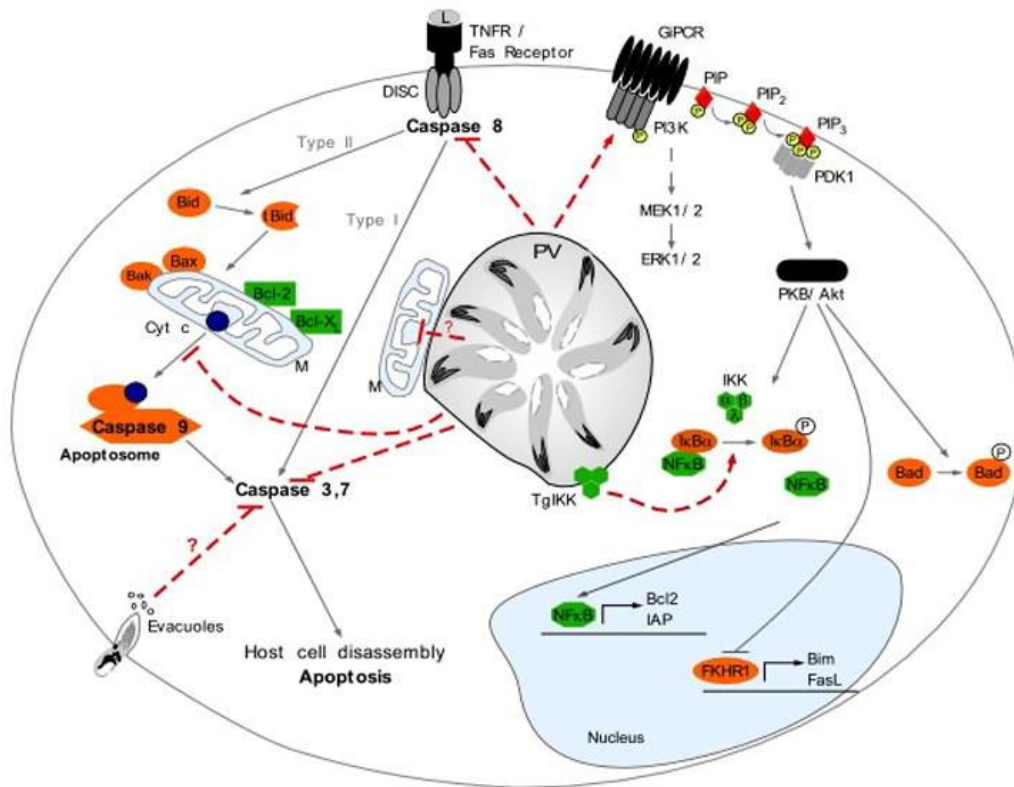


Figure 19. Inhibition des voies apoptotiques par *T. gondii* (Laliberté and Carruthers, 2008)

5) Manipulation des facteurs de transcription cellulaires

Afin de se multiplier et de persister dans la cellule infectée, le parasite est capable de moduler un certain nombre de voies de signalisation de la cellule-hôte. L'infection par *T. gondii*, induit des changements d'expression des gènes de l'hôte. Des expériences de microarray ont montré que plus de 1000 gènes de la cellule-hôte sont modulés par le parasite. Ces gènes sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires, notamment l'apoptose, le métabolisme, l'inflammation, la différenciation et la prolifération cellulaire (Blader *et al.*, 2001; Gail *et al.*, 2001). En effet, *T. gondii* est capable de détourner les mécanismes cellulaires, et de moduler à son avantage un grand nombre de facteurs de transcription (STAT1, STAT3/6, HIF1, UHRF1, NF-κB, ERG2...) afin de créer un environnement favorable à son développement et d'échapper à la réponse immunitaire. De plus, la plupart de ces facteurs de transcription cellulaires sont connus pour être régulés par des protéines parasitaires comme ROP16, ROP18, GRA15, GRA16.

La modulation de l'expression de ces gènes de la cellule-hôte est un moyen important pour le parasite pour développer sa niche répliative.

5.1) STATs

Les protéines STAT (Signal Transducers And Activators of Transcription) sont impliquées dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires comme la survie, la différenciation, la croissance, la réponse immunitaire ou encore l'apoptose. Leur activation se fait par phosphorylation, ce qui induit leur dimérisation et leur translocation dans le noyau cellulaire, où elles vont se fixer sur l'ADN et jouer le rôle de facteur de transcription.

5.1.1) STAT1

L'Interféron-gamma (IFN- γ) est une cytokine très importante et indispensable à la cellule-hôte afin de contrôler la réplication de *T. gondii* *in vitro* et *in vivo* (Suzuki *et al.*, 1988). Elle possède des propriétés antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives. L'IFN- γ est une cytokine pléiotrope, sécrétée par les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer) et régulant plus de 200 gènes connus (Boehm *et al.*, 1997). Parmi ces gènes régulés par l'IFN- γ , il y a le gène qui code pour la protéine STAT1. En effet, l'IFN- γ se fixe sur son récepteur exprimé à la surface de la cellule, induisant ainsi la dimérisation et l'activation des protéines JAK (Janus Activated Kinase) 1 et 2. Les protéines JAK activées recrutent et phosphorylent STAT1 au niveau de la tyrosine 701, conduisant à la formation d'homodimères qui sont transloqués dans le noyau pour initier la transcription des gènes qu'ils régulent et qui sont impliqués dans la résistance à l'infection par *T. gondii*. Une activité optimale de STAT1 nécessite une phosphorylation supplémentaire sur la sérine 727 et qui est dépendante de la PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et de la protéine kinase B/Akt (Figure 20) (Platanias, 2005; Varinou *et al.*, 2003).

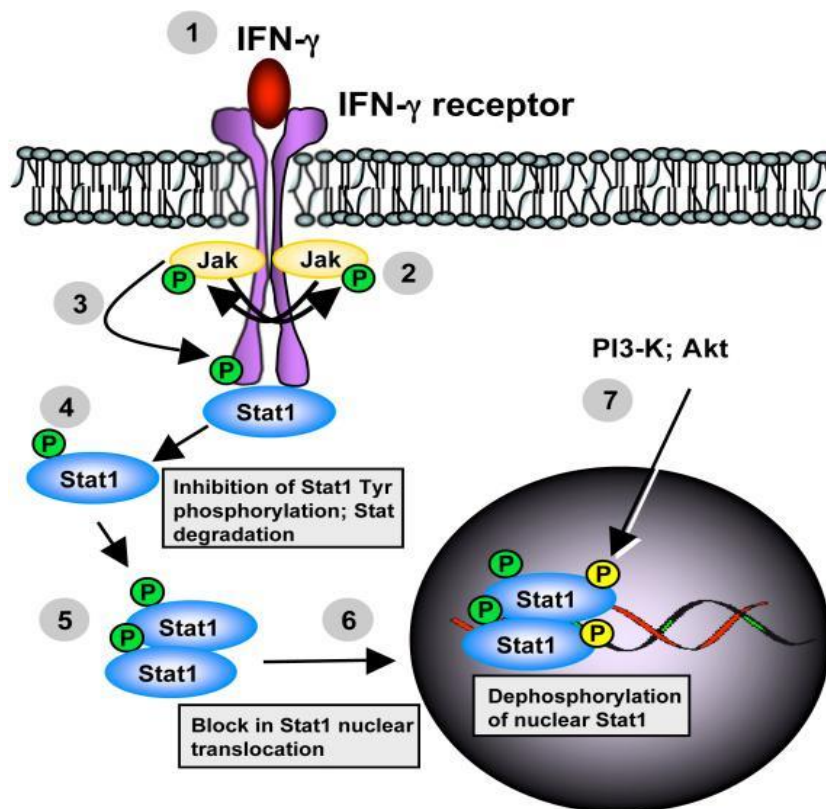


Figure 20. La voie de signalisation STAT1 et sa modulation par *T. gondii* (LENG *et al.*, 2009)

Plusieurs études suggèrent que *T. gondii* interfère avec la voie de signalisation de STAT1, mais le mécanisme de cette interaction reste peu développé.

Une diminution de la phosphorylation et une augmentation de la dégradation de STAT1 ont été observées dans les cellules infectées par une souche de type I (Zimmermann *et al.*, 2006). Contrairement à ces résultats, une autre équipe a montré qu'aucune dégradation de STAT1 n'a été observée après l'infection par une souche de type I ou II malgré l'absence de régulation de ces gènes-cibles (Kim *et al.*, 2007).

D'autres études suggèrent que *T. gondii* bloque la translocation nucléaire de STAT1 dans les macrophages, qui ne peuvent donc plus produire du TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) et de l'IL-12 (l'interleukine 12) (Denkers, 2003). De plus, il a été observé que les protéines STAT1 retrouvées dans le noyau de la cellule infectée ne sont pas toutes phosphorylées sur la tyrosine 701, ce qui suggère que l'infection par *T. gondii* induit une déphosphorylation de STAT1 après sa translocation dans le noyau. Ainsi, le parasite pourrait réguler négativement l'activité de STAT1, puisque la phosphorylation de la tyrosine 701 est nécessaire pour la fixation sur l'ADN. Une protéine parasitaire présente dans le noyau pourrait donc interférer avec l'activité de STAT1.

5.1.2) STAT3/6

L'infection par *T. gondii* induit une activation spécifique des voies de signalisation de STAT3/6. L'activation de ces facteurs de transcription semble être souche-dépendante. En effet, l'infection par une souche de type I ou III induit une phosphorylation et une activation des facteurs de transcription STAT3 et STAT6, alors que l'infection par une souche de type II ne semble pas induire une telle cascade (Figure 20). Une approche génétique dans laquelle des croisements entre les différentes souches de *T. gondii* a permis de mettre en évidence un locus situé sur le chromosome VIIIb du parasite et le gène codant pour ROP16 a été le candidat le plus probable. En effet, la protéine polymorphique ROP16 a été identifiée comme responsable de l'activation de la voie de signalisation STAT3/6 (Saeij *et al.*, 2006, 2007). ROP16 phosphoryle le résidu tyrosine 705 de STAT3 et le résidu tyrosine 641 de STAT6, modulant ainsi l'expression des gènes de l'hôte (Denkers *et al.*, 2012). La phosphorylation de STAT3/6 active la voie de signalisation d'IL-4, limite la réponse Th1, déterminant ainsi moins d'inflammation mais une meilleure survie parasitaire (Ong *et al.*, 2010; Saeij *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2009). Il a été décrit que la protéine ROP16 est retrouvée dans le noyau de la cellule-hôte une dizaine de minutes après l'invasion et malgré cette translocation nucléaire rapide, la phosphorylation de STAT 3 et STAT6 par ROP16 a lieu dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Ceci a été démontré à l'aide d'une souche exprimant une ROP16 avec un signal de localisation nucléaire muté, pour laquelle les taux d'activation de STAT6 étaient similaires à ceux d'une souche sauvage (Hakansson, 2001; Saeij *et al.*, 2007).

La comparaison entre ROP16 de type I/III et ROP16 de type II, a abouti à l'identification d'un acide aminé situé en position 503 qui est responsable de la modulation souche-dépendante de la voie de signalisation STAT3. En effet, l'acide aminé 503 du domaine kinase de ROP16 est une sérine pour la souche de type II et est une leucine pour les souches de type I et III. Cette substitution d'acide aminé est à l'origine de la différence de modulation de la voie STAT3/6 par la protéine ROP16 (Figure 21) (Yamamoto *et al.*, 2009).

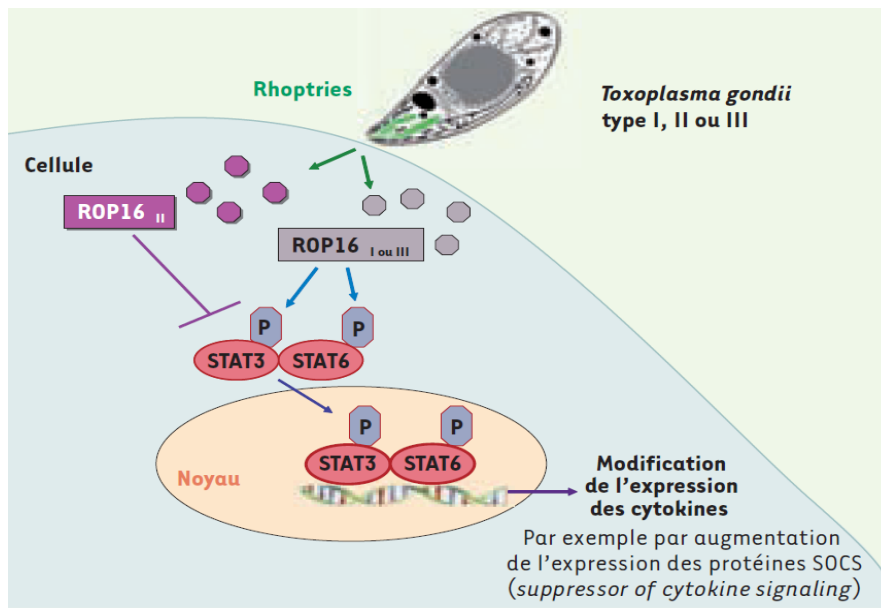


Figure 21. Schéma représentatif de l'activation de la voie de signalisation STAT3/6 (Buzoni-Gatel *et al.*, 2008)

5.2) NF- κ B

Le Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) est un facteur de transcription ayant un rôle clé dans l'immunité innée et adaptative. La voie de signalisation activant le facteur NF- κ B est indispensable à la prolifération et à la survie cellulaire. C'est pourquoi plusieurs agents infectieux ont développés des stratégies pour moduler cette voie de signalisation et promouvoir leur survie (Tato and Hunter, 2002). Certains l'activent, induisant ainsi l'inhibition de l'apoptose, un mécanisme important pour la survie des pathogènes intracellulaires. D'autres l'inhibe afin d'obtenir une meilleure survie en l'absence de l'activation des cellules immunitaires. Cette voie semble donc être un candidat à la manipulation parasitaire (Sun and Andersson, 2002; Tato and Hunter, 2002).

La famille du facteur de transcription NF- κ B est composée de cinq membres : NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), Rel A (p65), Rel B, and c-Rel (Ghosh *et al.*, 1998). Ces protéines s'associent pour former des homodimères et des hétérodimères dans le cytoplasme et qui sont séquestrés par les inhibiteurs kappa B (I κ B). De nombreux signaux sont capables d'activer le facteur de transcription NF- κ B (cytokines pro-inflammatoires, agents infectieux, stress oxydatif, etc.) (Siebenlist *et al.*, 1994). Ces signaux entraînent l'activation de la voie NF- κ B *via* la dégradation de l'I κ B par la protéine I κ B kinase (IKK). En effet, IKK phosphoryle les sérines du domaine régulateur de l'I κ B, ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, le complexe NF- κ B est libéré de son inhibiteur cytoplasmique puis transloqué dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en se fixant sur les séquences promotrices des gènes cibles pour induire leur transcription (Tato and Hunter, 2002). NF- κ B contrôle un grand nombre de gènes dont les fonctions sont variées. Il régule la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, l'inflammation et le remodelage tissulaire (Perkins, 2007). NF- κ B contrôle l'expression des gènes qui codent pour des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-12 et le TNF- α (Bauerle and Henkel, 1994). Il induit également l'expression de certains inhibiteurs de l'apoptose, notamment, des

membres de la famille Bcl2 et TRAF1/2 (TNF-receptor-associated-factor 1 and 2) (Karin and Lin, 2002).

La modulation de la voie NF- κ B par *T. gondii* fait débat. Plusieurs études ont affirmé à la fois l'activation et l'inhibition de NF- κ B par ce parasite (Rosowski *et al.*, 2011). Certaines études ont montré que les souches de type I de *Toxoplasma* inhibent la voie NF- κ B ainsi que le recrutement et l'activation de cellules immunitaires, ce qui améliore la survie des parasites (Shapira *et al.*, 2005). L'équipe de Rosowski *et al.* (2011) a montré que, contrairement aux souches de type I ou III, les souches de type II sont capables d'activer la voie NF- κ B via la protéine de granule dense GRA15 excrétée dans la cellule-hôte lors de la phase d'invasion. En effet, GRA15 initie l'activation et la translocation nucléaire des hétérodimères p50 et p65 de NF- κ B et stimule ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-12 et l'IL-1 β (Figure 22). En revanche, le mécanisme de cette régulation reste à éclaircir. De plus, c-Rel est activé après infection par *T. gondii* mais indépendamment de GRA15, ce qui suggère que d'autres effecteurs parasitaires pourraient être responsables de la modulation de certains membres spécifiques de la famille NF- κ B (Cannella *et al.*, 2014). Récemment, la protéine de rhoptrie ROP18 impliquée dans la virulence des souches, a été identifiée comme responsable de la phosphorylation de la sérine 468 de la sous-unité p65 de NF- κ B, induisant ainsi la suppression de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Du *et al.*, 2014).

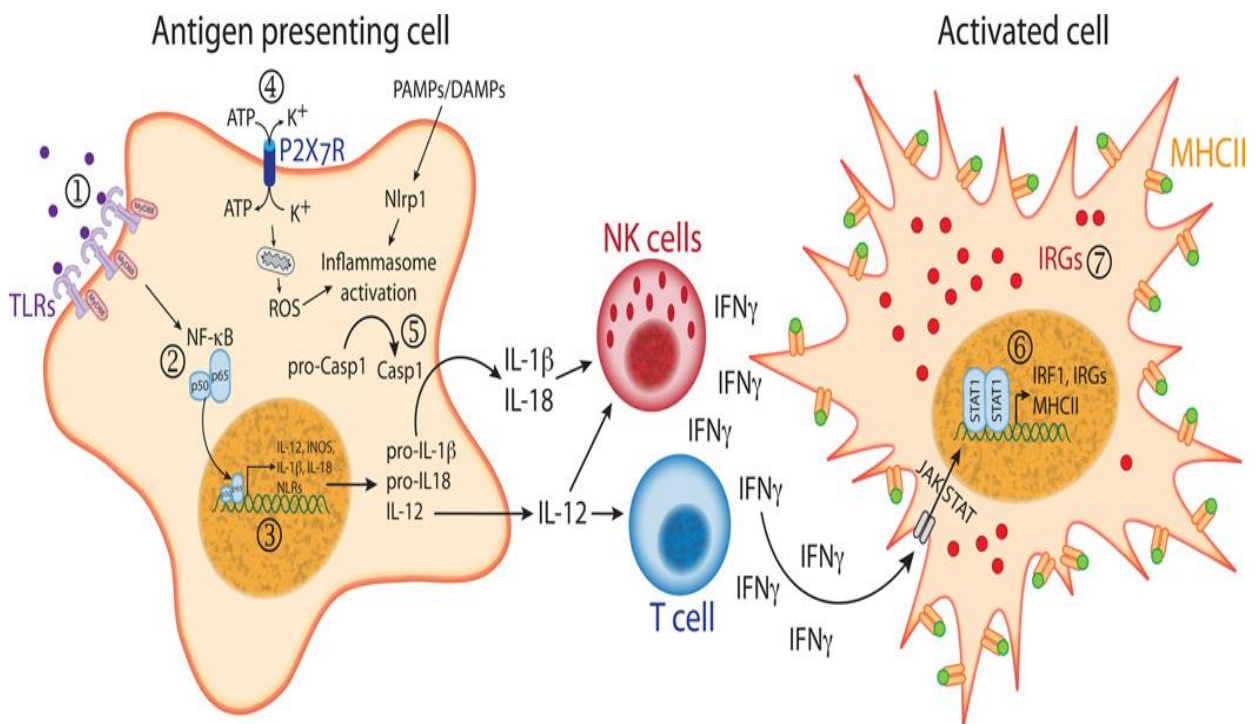


Figure 22. Modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte par *T. gondii* (Melo *et al.*, 2011)

5.3) HIF1

Il a été montré que l'infection parasitaire augmente le taux d'enzymes glycolytiques, des transporteurs de glucose ainsi que des récepteurs de la transferrine et du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Blader *et al.*, 2001). L'expression de ces protéines est dépendante du facteur de transcription HIF1 (Hypoxia Inductible Factor1).

HIF1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : la sous-unité α , sensible à la concentration d'oxygène et dont l'expression est augmentée en condition d'hypoxie, puis la sous-unité β , présente de manière constitutive dans les cellules (Huang *et al.*, 1996; Masoud *et al.*, 2015). En dehors d'une situation d'hypoxie, HIF1 α est rapidement dégradée *via* la voie du protéasome, alors qu'en situation d'hypoxie, HIF1 α forme un hétérodimère avec HIF1 β . L'hétérodimère HIF1 formé est transloqué dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription cellulaire et active la transcription des gènes cibles (Bárdos and Ashcroft, 2005)

L'infection par *T. gondii* induit une augmentation de l'expression du gène HIF1, en raison des conditions d'hypoxie locales dues à la consommation en oxygène du parasite lui-même. En effet, le facteur de transcription HIF1 module l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, le métabolisme du glucose et le métabolisme du fer, favorisant ainsi la croissance parasitaire. De plus, il a été démontré que la croissance et la survie du parasite étaient fortement réduites dans les cellules HIF1 α knock-out, cultivées sous 3% d'oxygène. HIF1 est donc nécessaire à la division cellulaire et au maintien des organelles en conditions d'hypoxie (Spear *et al.*, 2006). Néanmoins, le facteur parasitaire responsable de la régulation de HIF1 reste inconnu.

5.4) EGR2

EGR2 (Early Growth Response 2) est également un facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire, la survie et la prolifération. Il est rapidement activé dans les cellules infectées par *Toxoplasma* (Blader *et al.*, 2001). Cette activation n'est pas souche dépendante, puisque EGR2 est activé par les trois souches de *T. gondii*, suggérant ainsi que le facteur parasitaire impliqué n'est pas polymorphique. De plus, il a été montré, en utilisant la cytochalasine D (drogue inhibant la pénétration du parasite dans la cellule-hôte et non pas la sécrétion des protéines parasitaires) que l'activation d'EGR2 est corrélée avec la sécrétion des rhoptries (Phelps *et al.*, 2008).

Le rôle que joue le facteur de transcription EGR2 pendant l'infection reste à éclaircir. En revanche, les gènes régulés par EGR2 sont impliqués dans la survie cellulaire *via* l'activation des facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl2, mais aussi, des facteurs pro-apoptotiques comme p53. De ce fait, EGR2 pourrait à la fois promouvoir la prolifération parasitaire mais également protéger les cellules-hôtes de l'infection (Phelps *et al.*, 2008).

5.5) c-Myc

c-Myc est un facteur de transcription oncogénique, impliqué dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme l'apoptose, le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et le métabolisme (Dang *et al.*, 1999). Il a été montré que l'infection par *T. gondii* induit une activation du facteur de transcription c-Myc induisant ainsi l'augmentation de la transcription des gènes cibles (Franco *et al.*, 2014). Cette activation ne semble pas être souche dépendante, puisque l'infection par les trois souches de *T. gondii*, type I, II, et III induit l'augmentation de l'activité de c-Myc, ce qui exclut l'implication d'un facteur parasitaire polymorphique dans l'activation de ce facteur de transcription (notamment ROP5, ROP16, GRA15) (Franco *et al.*, 2014).

c-Myc est régulé positivement au cours de l'infection par un autre parasite de la famille des Apicomplexes, *Theileria*. Dans ce contexte, il a été rapporté que c-Myc a un effet anti-apoptotique favorisant la survie et la prolifération du parasite (Dessauge *et al.*, 2005).

Il n'a pas encore été montré si l'induction de c-Myc dans les cellules infectées par *Toxoplasma* et par *Theileria* se produit par des mécanismes apparentés. Cependant, de la même manière que l'infection à *Theileria*, *Toxoplasma* induit les gènes anti-apoptotiques de l'hôte *via* l'activation de c-Myc pour prolonger la survie de la cellule, sécurisant ainsi sa niche répliquative intracellulaire.

5.6) UHRF1

UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and Ring Fingers domain 1) est une protéine nucléaire impliquée dans la prolifération cellulaire et dans les modifications épigénétiques. Elle est également impliquée dans la régulation de la transcription du gène de la topoisomérase II α . Elle a aussi été appelée ICBP90 (Inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa) (Hopfner *et al.*, 2000). Cette protéine est constituée de 793 acides aminés et de plusieurs domaines d'intérêts (Figure 23).

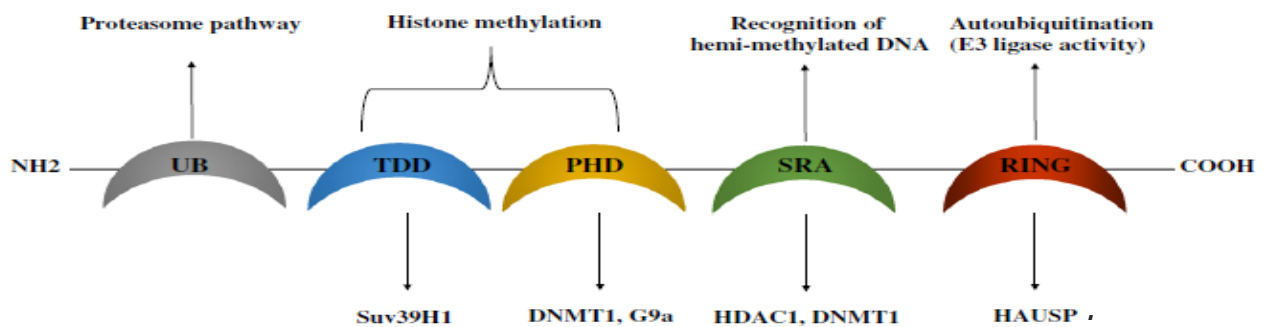


Figure 23. Représentation schématique de la protéine UHRF1 (Alhosin *et al.*, 2016)

Sur la représentation schématique d'UHRF1 ci-dessus, on observe de l'extrémité NH2 vers l'extrémité COOH, un domaine UBL (Ubiquitin-like) impliqué dans la dégradation des protéines par la voie du protéasome, un domaine TDD (Tandem Tudor Domain) impliqué dans la liaison sur des résidus lysine di ou triméthylés de l'histone 3, un domaine PHD (Plant Homeo Domain) impliqué également dans la liaison aux histones et qui recrute deux histones méthyltransférases, DNMT1 (DNA methyltransferase 1) et G9a (Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2), un domaine SRA (Set and Ring Associated domain) impliqué dans la reconnaissance des séquences d'ADN méthylées et dans le recrutement des HDAC et DNMT1, et enfin un domaine RING (Really Interesting New Gene) doté d'une activité ubiquitine ligase de type E3 et impliqué dans le recrutement de la protéase HAUSP (Herpes virus Associated Ubiquitin Specific Protease). UHRF1 possède également plusieurs sites de phosphorylation qui jouent un rôle très important dans la régulation de son activité.

UHRF1 est un facteur de transcription endogène, exclusivement nucléaire. Il voit son expression varier au cours du cycle cellulaire avec un pic en fin de phase G1 et un pic en fin de phase G2 (Figure 24). En revanche, on constate une dérégulation de ce cycle dans les cellules cancéreuses, où UHRF1 est surexprimé de manière constante (Mousli *et al.*, 2003).

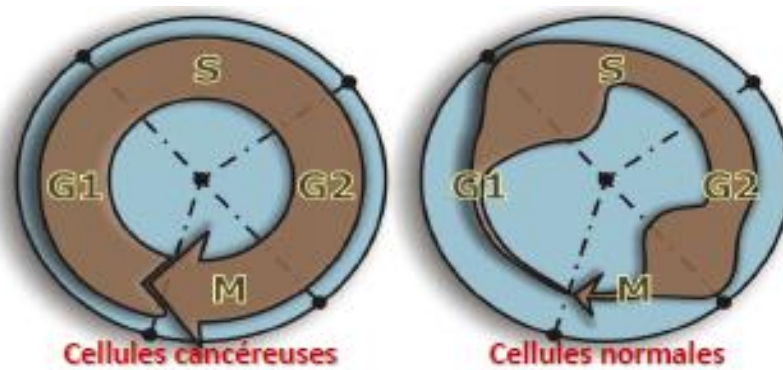


Figure 24. Expression d'UHRF1 au cours du cycle cellulaire

Des travaux réalisés précédemment au sein de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS) ont montré que lors de l'infection par *T. gondii*, l'expression d'UHRF1 est fortement augmentée et cette augmentation est indispensable à la prolifération parasitaire (Brunet *et al.*, 2008). En effet, le parasite induit une activation du promoteur UHRF1 ainsi qu'une phosphorylation de la protéine par une kinase parasitaire (Cheeseman and Weitzman, 2015).

6) Les altérations épigénétiques

6.1) Généralités

L'épigénétique correspond aux modifications réversibles et transmissibles de l'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique de l'ADN (Bronner et al., 2013). La chromatine existe sous deux formes : l'hétérochromatine et l'euchromatine. L'hétérochromatine est transcriptionnellement inactive alors que l'euchromatine est transcriptionnellement active. Les deux grandes modifications épigénétiques sont : la méthylation de l'ADN médiée par les DNMTs (DNA Méthyltransférases) qui est considérée comme répressive de la transcription, et les modifications des histones avec notamment les phénomènes d'acétylation / désacétylation médiés par les HATs (Histones acétylases) et les HDACs (Histone désacétylases) ou les phénomènes de méthylation / déméthylation médiés par des histones méthylases comme G9a. Parmi les modifications des histones, l'acétylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 14 est associée à l'activation des gènes.

6.2) Modulation des histones

Dans les cellules eucaryotes, le nucléosome constitue l'unité de base de l'organisation de la chromatine. Au niveau du nucléosome, l'ADN est enroulé autour d'un octamère protéique composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Figure 25). Les histones sont des petites molécules basiques, représentant environ 50% du poids total de la chromatine (Khorasanizadeh, 2004). Le nucléosome représente le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. En contrôlant l'accessibilité du double-brin d'ADN, il est directement impliqué dans la régulation de la transcription des gènes. Il participe aussi à la régulation épigénétique de l'expression des gènes, au travers de la modification de ses histones (Strahl and Allis, 2000).

Les queues N-terminal des histones sont le siège de modifications post-traductionnelles dont les plus étudiées sont la phosphorylation des sérines et thréonines, la méthylation des lysines

et arginines, l'acétylation des lysines, l'ubiquitinylation des lysines et la sumoylation. L'ensemble de ces modifications étant catalysées par des enzymes spécifiques.

La phosphorylation et l'acétylation des histones rendent la chromatine moins compacte et augmentent l'accessibilité au double brin d'ADN pour déclencher la machinerie de la transcription. L'acétylation s'effectue sur les résidus lysine par des enzymes appelées histone acétyl transférases (HAT). Elle est associée à une activation de la transcription et est facilement réversible grâce aux histones désacétylases (HDAC) (Kato et al., 2015). A l'échelle cellulaire, l'acétylation délimite topographiquement l'euchromatine et l'hétérochromatine au moyen d'un gradient d'acétylation / désacétylation (Suka et al., 2002). L'acétylation joue également un rôle dans la réparation de l'ADN, dans la progression du cycle cellulaire mais aussi dans l'apoptose (Carrozza et al., 2003).

La méthylation peut s'effectuer soit sur des arginines, soit sur des lysines. Cette modification post-traductionnelle est associée à une activation de la transcription si les résidus méthylés sont des arginines et à une répression de la transcription si les résidus méthylés sont des lysines. La lysine 9 de l'histone H3 est connue pour être associée à une répression de la chromatine lorsqu'elle est méthylée. Plusieurs enzymes sont responsables de cette méthylation des histones, parmi lesquelles, G9a, Suv39h1 (Kouzarides, 2007).

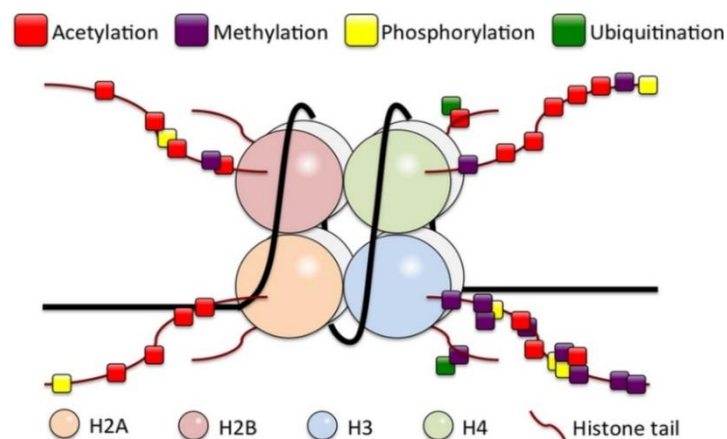


Figure 25. Les principales modifications des histones (Kato et al., 2015)

Pour survivre et établir une infection persistante, *T. gondii* est capable de moduler l'expression des gènes de l'hôte à son avantage et d'échapper aux médiateurs pro-inflammatoires. Pour cela, il cible la voie de remodelage de la chromatine, ce qui permet d'expliquer la capacité du parasite à réguler en même temps à la baisse un large panel d'effecteurs pro-inflammatoires, *via* l'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3 (Figure 26) (Leng et al., 2009).

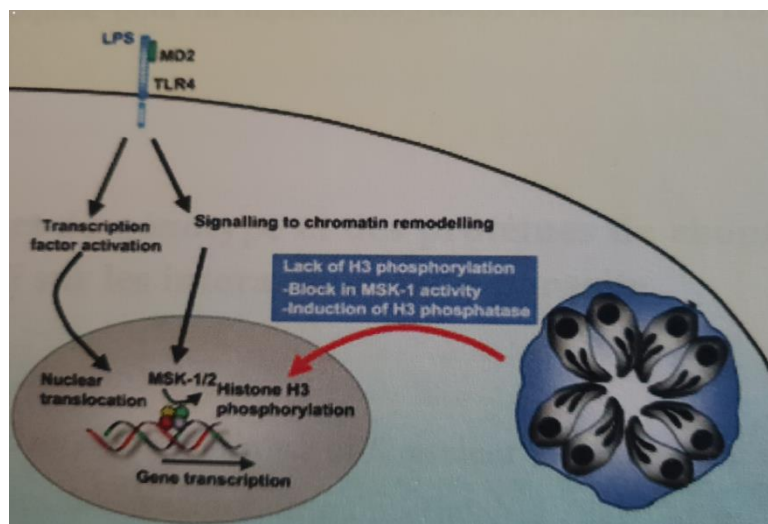


Figure 26. *T. gondii* et remodelage de la chromatine via l'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3 (Leng et al., 2009)

On ne connaît pas encore avec certitude l'influence de *T. gondii* sur la modification des histones, mais on sait qu'un certains nombres de protéines parasites ont pour cible le noyau de la cellule-hôte (ROP16, PP2C), où elles peuvent participer directement ou indirectement aux modifications des histones observées.

Différentes approches ont permis d'appuyer l'idée d'une expression différentielle des gènes en fonction du stade étudié. Une forte corrélation a été établie entre l'état d'acétylation des histones et l'expression des gènes spécifiques à chaque stade. Le passage d'une forme tachyzoïte à une forme bradyzoïte et vis-versa reposerait alors sur un équilibre stricte entre activation et répression de gènes (Behnke et al., 2008).

Chez *T. gondii*, on a identifié cinq HDAC, mais peu de données sont disponibles quant à leur localisation et leur mécanisme d'action (Bougdour et al., 2010; Dixon et al., 2010). TgHDAC3, une enzyme de *T. gondii* strictement nucléaire, a été déterminé comme responsable d'une répression très rapide des gènes spécifiques à chaque stade de différenciation (Saksouk et al., 2005). Ces données sur TgHDAC3 soulignent l'importance des HDAC de *T. gondii* et en font une cible thérapeutique potentiellement intéressante.

Les inhibiteurs des HDAC (iHDAC) ont été essentiellement développées en cancérologie, mais le caractère cosmopolite des HDAC a motivé leur utilisation sur différents microorganismes pathogènes comme *Candida albicans* et le VIH (Rotili et al., 2009). La première utilisation d'un iHDAC sur *T. gondii* a été décrite en 1996 avec l'apicidine, un tétrapeptide cyclique naturel isolé d'un champignon filamenteux *Fusarium pallidoroseum*. Chez les Apicomplexes, les données obtenues avec l'apicidine, bien qu'incomplètes, sont longtemps restées les plus probantes (Darkin-Ratray et al., 1996). Il existerait aussi une activité anti-parasitaire de ces iHDAC mais avec des concentrations beaucoup plus élevées (Strobl et al., 2007).

Dans l'état actuel des connaissances, on retiendra globalement que les iHDAC exercent dans la cellule une régulation positive des gènes pro-apoptotiques et une régulation négative des gènes anti-apoptotiques, favorisant ainsi l'élimination des cellules infectées (Bolden et al., 2006).

6.3) UHRF1 – régulateur épigénétique

En plus de l'implication d'UHRF1 dans les phénomènes physiologiques de régulation du cycle cellulaire et dans la cancérogénèse, il a été placé au centre de plusieurs mécanismes épigénétiques impliqués dans le « gene silencing » (Bronner et al., 2013). En effet, UHRF1 possède plusieurs sites de phosphorylation impliqués dans la fixation sur l'ADN et par le biais de ses différents domaines, il est capable de recruter des enzymes de l'épigénétiques telles que DNMT1, G9a, HDAC, SuV39H1.

De plus, une équipe belge a récemment identifié UHRF1 comme étant un facteur recruté au niveau du promoteur du VIH-1 et jouerait donc un rôle dans la répression de l'expression du gène du VIH-1 *via* la méthylation de l'ADN, induisant ainsi la latence du virus (Van Lint et al., 2017 ; communication at the Eighth International Workshop on HIV Persistence during Therapy).

UHRF1 pourrait donc constituer une nouvelle cible thérapeutique dans les stratégies d'éradication des réservoirs viraux pour le traitement du VIH.

6.4) CTIP2 – régulateur épigénétique

CTIP2 est un autre facteur de transcription cellulaire, recruté au niveau du promoteur du VIH-1 et connu pour être un régulateur négatif de ce dernier. Comme UHRF1, CTIP2 est connu pour être impliqué dans la régulation des phénomènes épigénétiques *via* le recrutement d'un complexe enzymatique composé des mêmes enzymes, HDAC, DNMT1, SuV39H1...

Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, CTIP2 est recruté au niveau du promoteur du gène. Il est connu pour être impliqué dans la formation d'hétérochromatine et le « gene silencing » en recrutant des histones méthyltransférases (HMT) et des histones déacétylases (HDAC) (Marban et al., 2007).

6.5) *T.gondii* et les modifications épigénétiques de la cellule-hôte

UHRF1 est un facteur de transcription cellulaire indispensable à la prolifération de *T. gondii*. La modulation de l'expression de cette protéine nucléaire est souche-dépendante, ce qui suggère que sa régulation dépend d'un facteur parasitaire polymorphique, comme la protéine de rhoptrie ROP16. De plus, ROP16 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire *via* la protéine p53, connue pour être un facteur régulant UHRF1 (Unoki et al., 2004).

Dans les cellules infectées, l'activation d'UHRF1 par *T. gondii* induit une dérégulation du cycle cellulaire, ainsi qu'une modulation du génome de l'hôte. En effet, le parasite induit l'arrêt en phase G2/M, ce qui lui confère de multiples avantages dont l'optimisation de la multiplication parasitaire et l'inhibition de l'apoptose cellulaire. Cette dérégulation est liée à la répression de la *cycline B1*, gène cible d'UHRF1 (Brunet et al., 2008).

Plusieurs microorganismes utilisent les modifications de la chromatine et des histones pour induire une modulation fine du système immunitaire de la cellule-hôte. Parmi ces microorganismes, on trouve des bactéries (*Anaplasma phagocytophylum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*) et des virus (virus de la grippe). En revanche, dans le groupe parasites, seuls *Toxoplasma* et *Theileria* sont connus pour induire des altérations épigénétiques au niveau de la cellule-hôte (Cheeseman and Weitzman, 2015; Gómez-Díaz et al., 2012).

T. gondii est ainsi capable de moduler l'expression des gènes via, entre-autre, deux modifications épigénétiques importantes : la méthylation de l'ADN et la modification des histones. D'autres gènes ont également été décrits pour être régulés par le parasite de cette façon comme TNF- α et IFN- γ (Leng et al., 2009). La *cycline B1* n'est donc probablement pas le seul gène cible d'UHRF1 dans les cellules infectées par le toxoplasme. Un Bioplex réalisé sur 27 cytokines modulées lors de l'infection parasitaire a mis en évidence 3 cytokines modulées par UHRF1 : IL-17A, GM-CSF (Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor) et PDGF (Platelet-derived growth factor).

7) Manipulation du système immunitaire

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, capable de se répliquer au sein de la cellule-hôte tout en échappant au système immunitaire, ce qui exige une modulation fine en sa faveur de la machinerie cellulaire des cellules qu'il infecte. Ainsi, *Toxoplasma* établit avec le système immunitaire de l'hôte un dialogue subtil. La réponse immunitaire de l'hôte se compose de deux phases : la réponse immunitaire innée suivie de la réponse immunitaire adaptative.

7.1) Réponse immunitaire innée

Une caractéristique de l'infection par *T. gondii* est qu'elle induit une régulation fine de la réponse immunitaire (en activant certains gènes et en inhibant d'autres), afin d'assurer la survie de la cellule-hôte et la prolifération parasitaire.

Comme pour toutes les infections, la réponse immunitaire à une primo-infection à *T. gondii* met en jeu des mécanismes de défense innée. Elle est dite non spécifique puisqu'elle fait appel aux cellules et aux mécanismes de défense de l'organisme de façon immédiate. L'élément clé de cette réponse non spécifique est la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12, connue pour son rôle primordial dans l'induction de la réponse cellulaire Th1, efficace contre *T. gondii*. Cette cytokine est produite par différentes cellules innées incluant les cellules dendritiques (CD), les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, qui ont chacune un rôle important dans la résistance de l'hôte (Sturge and Yarovinsky, 2014).

Dès sa pénétration par voie digestive dans la cellule-hôte, le parasite déclenche une réponse du système immunitaire inné *via* la production de cytokines et de chimiokines par les entérocytes, qui attirent les cellules dendritiques et les monocytes sur le lieu de l'infection (Diana *et al.*, 2005). Cette activation de la réponse immune, déclenche la sécrétion de monoxyde d'azote (NO), d'interféron-gamma (IFN- γ), de tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) et d'interleukine-12 (IL-12), conduisant à l'inhibition de la réplication du parasite et à son élimination partielle (Melo *et al.*, 2011).

En effet, les protéines parasitaires profiline et glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont capables de se fixer sur les Tolls-like receptors (TLR), TLR11 sur les CD et TLR2, TLR4 sur les monocytes-macrophages respectivement. L'activation de ces récepteurs déclenche la synthèse et la sécrétion d'IL-12, *via* les cascades de signalisation intracellulaires, impliquant les facteurs MyD88, TRAF6, MAP kinase et la voie NF- κ B (Butcher *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2004).

En plus de la production d'IL-12, les monocytes-macrophages stimulés secrètent également le TNF- α , un cofacteur antimicrobien. Cette réponse immunitaire aboutit à la production *in fine* d'IFN- γ par les cellules NK (Natural Killer) et les cellules T. L'IFN- γ produit est responsable de l'activation des cellules *via* les récepteurs à l'IFN- γ (IFN- γ R), ce qui aboutit à l'activation de la voie de signalisation STAT1. En réponse à l'activation de STAT1, l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont régulés positivement dans les monocytes-macrophages, deux facteurs qui contribuent au contrôle des parasites intracellulaires. Les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques régulent également positivement deux familles de protéines de défense appelées : IRGs (immunity related GTPases) et GBPs (guanylate binding proteins). Ces agents antimicrobiens sont recrutés dans les vacuoles parasitophores et sont impliqués dans la clairance des parasites (Figure 27) (Hunter and Sibley, 2012).

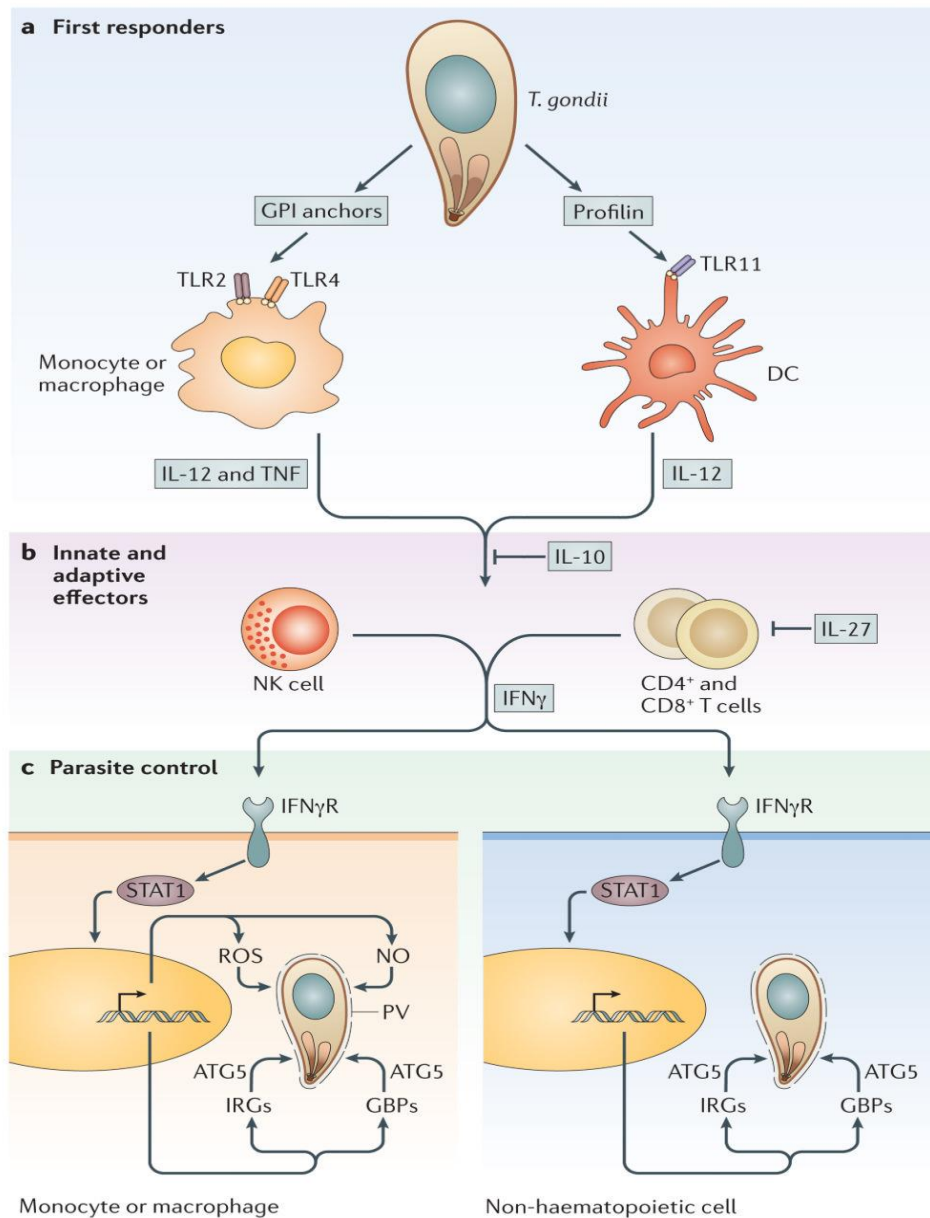


Figure 27. Réponse immunitaire innée à l'infection par *T. gondii* (Hunter and Sibley, 2012)

Les rôles clés de cette première réponse consistent à limiter la réplication parasitaire avant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

7.2) Réponse immunitaire adaptative

La persistance du parasite à long terme dépend de l'immunité adaptative ou immunité cellulaire qui correspond à la réponse immune principale de l'hôte face au parasite. Elle fait intervenir principalement les cellules lymphocytaires T de type Th1, Th2, Th17 et Treg.

Bien que la réponse immunitaire innée à *T. gondii* ait été examinée en détail, on comprend moins bien comment cette réponse entraîne la stimulation de l'immunité adaptative, notamment la capacité des cellules dendritiques à accéder aux antigènes parasitaires pour la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Blanchard and Shastri, 2010).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire fait intervenir les lymphocytes T CD4+ et CD8+, dont la différenciation est induite par les diverses cytokines produites lors de la réponse immunitaire innée comme l'IFN- γ ou l'IL-12. Cette réponse innée induit une grande production d'IL-12 afin d'orienter la réponse immunitaire adaptative vers une réponse de type Th1. Cette dernière sécrète divers effecteurs pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ , le NO, l'IL-12 ou le TNF- α pour limiter la prolifération parasitaire et augmenter la résistance de l'hôte à l'infection toxoplasmique (Gigley *et al.*, 2009).

La réponse immunitaire adaptative met également en jeu une réponse humorale de type Th2, en faveur d'une production d'immunoglobulines M et G (IgM, IgG) par les lymphocytes B, aboutissant ainsi à l'opsonisation des parasites extracellulaires et à leur phagocytose par les macrophages. En effet, cette réponse immunitaire de type Th2 est induite par la sécrétion précoce d'IL-10 par les macrophages pendant la réponse innée (Hunter and Sibley, 2012). Cette voie contrecarre l'action pro-inflammatoire Th1 en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que : l'IL-13, l'IL-4 et l'IL-5. L'IL-4 favorise la réponse immunitaire Th2, elle induit la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et inhibe la production des cellules Th1 (Swain *et al.*, 1990). L'IL-5 stimule la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B, ainsi que la sécrétion d'IL-4 par les polynucléaires éosinophiles. L'IL-13 est impliquée dans les phénomènes d'allergie et d'inflammation, elle induit la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B activés.

La voie Th17 est impliquée dans le développement de la réponse inflammatoire. La stimulation de cette voie induit la production d'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire, *via* l'action d'IL-6, d'IL-23 et de TGF- β . Cette cytokine a été retrouvée dans 70% des cas de toxoplasmose oculaire et serait impliquée dans le processus inflammatoire à l'origine de l'aggravation de l'infection (Lahmar *et al.*, 2009; Sauer *et al.*, 2012). L'IL-17 n'est pas nécessaire au développement de l'immunité acquise, cependant, elle permet le recrutement précoce des polynucléaires neutrophiles afin de contrôler la réplique parasitaire en début d'infection (Ivanov *et al.*, 2006).

Les lymphocytes Treg (T régulateurs) interviennent dans l'inhibition de la réponse immunitaire adaptative en agissant sur les trois populations Th1, Th2 et Th17. Ils sont activés par le facteur FOXP3 (Forkhead box P3) et sécrètent les cytokines anti-inflammatoires IL-10, l'IL-27 et le TGF- β , contribuant ainsi à la diminution des phénomènes immunopathologiques néfastes pour l'hôte (Awasthi *et al.*, 2007; Stumhofer *et al.*, 2007).

L'importance du système immunitaire dans l'étendue des lésions a été incriminée à plusieurs reprises (Garweg *et al.*, 2005; Holland, 2003; de-la-Torre *et al.*, 2013). Certaines cytokines sont retrouvées de manière récurrente comparées à d'autres. Ainsi, l'IL-12 et l'IL-5, respectivement pro et anti-inflammatoire, sont surexprimées dans la majorité des cas. Une autre cytokine a été retrouvée dans 70% des cas de toxoplasmose oculaire et serait impliquée dans le processus inflammatoire à l'origine de l'aggravation de l'infection, il s'agit de l'IL-17 A (Lahmar *et al.*, 2009; Sauer *et al.*, 2012).

C. IL-17 ET SON IMPLICATION DANS L'INFECTION TOXOPLASMIQUE

Classiquement, les cellules T auxiliaires étaient divisées en 2 classes : Th1 et Th2. En 2005, une nouvelle classe de cellules T auxiliaires a été découverte : les cellules Th17 (Gaffen *et al.*, 2011). De nombreuses études se sont intéressées à cette nouvelle sous-population de lymphocytes Th17, afin d'analyser leur rôle en physiologie et en pathologie (Chen and O'Shea, 2008). Plusieurs études suggèrent un rôle contre les pathogènes que les lymphocytes Th1 et Th2 ne peuvent pas éliminer.

Il a été démontré que les cellules Th17 avaient un rôle dans la protection contre les agents microbiens extracellulaires et intracellulaires tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter rodentium* et *Candida albicans* (Curtis and Way, 2009). Les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans le maintien de la barrière homéostatique épithéliale contre les attaques extérieures et ont un rôle dans les syndromes inflammatoires chroniques et les maladies auto-immunes (Ouyang *et al.*, 2008). En effet, les lymphocytes Th17 exercent un effet pro-inflammatoire, par l'intermédiaire des cytokines qu'il sécrète (IL-17, IL-21, IL-22) et intervient dans les maladies auto-immunes, les inflammations chroniques, la lutte contre les bactéries extracellulaires et les mycoses (Bettelli *et al.*, 2007). Mais à l'heure actuelle, les fonctions des lymphocytes Th17 ne sont pas totalement élucidées. Les facteurs TGF- β , IL-1, IL-6 stimulent la différenciation des lymphocytes T CD4 + naïfs en Th17 et induisant l'expression de l'IL-17A (Figure 28) (Girolomoni *et al.*, 2012). L'IL-17A est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille des IL-17.

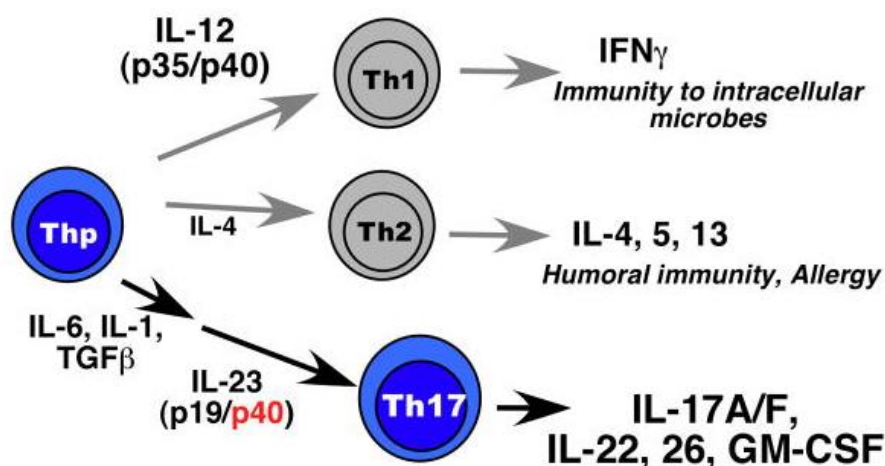


Figure 28. Différenciation des lymphocytes Th17 (Gaffen, 2011)

1) La famille de l'IL-17

L'IL-17 est la cytokine majeure de la sous-population de lymphocytes Th17. C'est une famille constituée de 6 membres, allant de l'IL-17A à l'IL-17F (Gaffen *et al.*, 2006). Ces cytokines ont en commun des résidus cystéines particuliers. On a identifié une forte homologie en acides aminés entre l'IL-17A et l'IL-17F (50%) alors que l'IL-17E présente l'homologie la plus faible avec l'IL-17A (16%) (Iwakura *et al.*, 2011). L'IL-17A, aussi

appelée IL17 ou CTLA8, est le premier membre de la famille à avoir été identifié à partir d'un hybridome de lymphocytes T de rongeur en 1993 par l'équipe de Rouvier. Cet hybridome était issu de la fusion de lymphocytes T cytotoxiques de souris et de lymphocytes d'un lymphome de rat (Rouvier *et al.*, 1993). Le gène *IL-17* humain est localisé sur le chromosome 6p12. Le produit du gène est une protéine de 150 acides aminés et d'un poids moléculaire de 15kDa (Awasthi and Kuchroo, 2009).

Il existe cinq récepteurs à l'IL-17 identifiés, nommés IL-17RA à IL-17RE (Gaffen, 2011). L'IL-17A et l'IL-17F se lient au même récepteur, mais l'influence de l'IL-17A sur la régulation du gène est 10 à 30 fois plus forte. La fonction de l'IL-17B, IL-17C et IL-17D est mal définie. L'IL-17E limite le développement de Th17 et favorise les cytokines Th2 (Gaffen *et al.*, 2006). Les ligands IL-17A, IL-17F, IL-17C et IL-17E présentent des complexes de récepteurs hétéromères, qui comprennent dans tous les cas la sous-unité A du récepteur IL-17. L'IL-17A et l'IL-17F peuvent exister sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, elles sont produites essentiellement par les cellules Th17 (Harrington *et al.*, 2005). Un état dimère des autres ligands est illustré par analogie, mais n'a pas été démontré (Figure 29). Les interactions ligand-récepteur sont moins bien définies pour l'IL-17B, et l'IL-17D et le besoin d'une sous-unité du récepteur A de l'IL-17 est inconnu (Martin *et al.*, 2013).

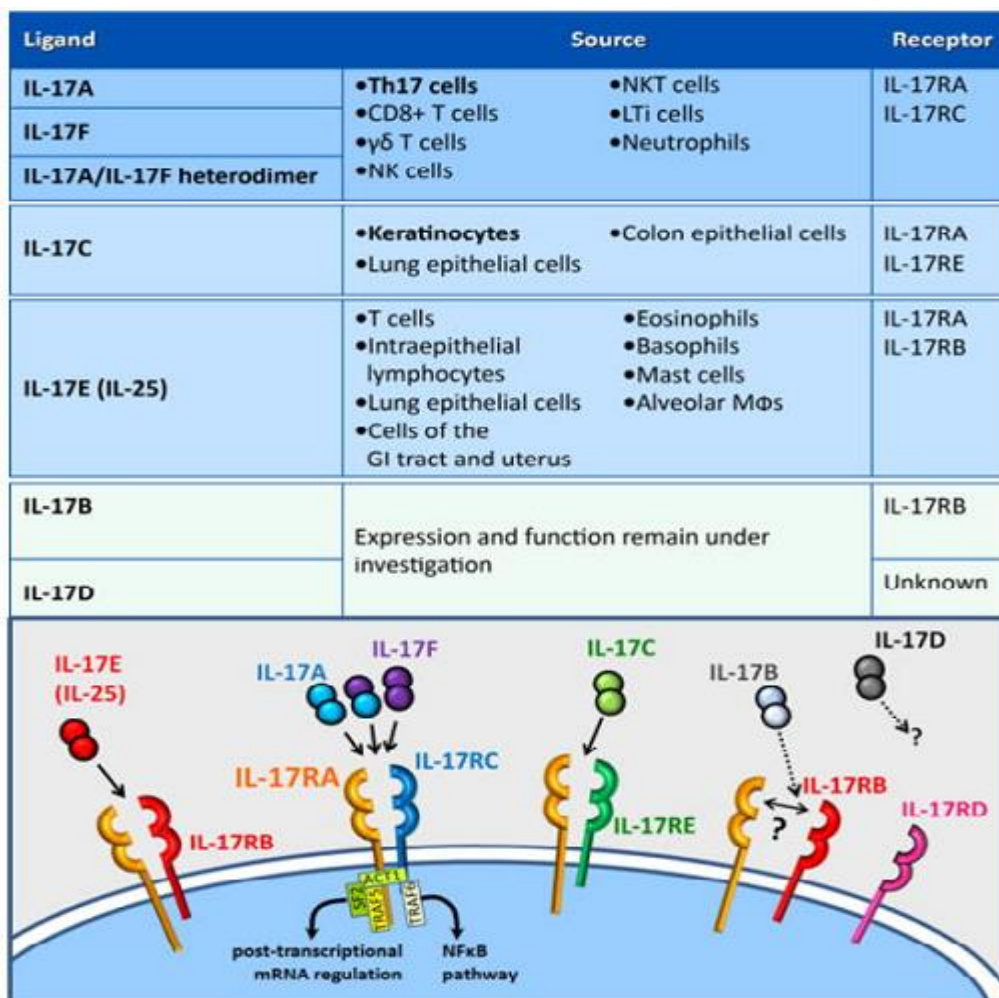


Figure 29. Les ligands de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs (Martin *et al.*, 2013)

Les récepteurs de l'IL-17 sont présents sur de nombreux types cellulaires notamment immunitaires. Leur stimulation induit l'expression de nombreuses cytokines et chimiokines permettant le recrutement et la maturation des polynucléaires neutrophiles. L'IL-17 agit également sur des cellules n'appartenant pas à l'immunité comme les fibroblastes et les cellules épithéliales et induit la production de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et de prostaglandine E2, augmentant ainsi la maturation des granulocytes et le phénomène inflammatoire (Chen and O'Shea, 2008).

La cytokine la plus largement étudiée de cette famille, l'IL-17A, est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle très important dans la défense de l'hôte contre les infections microbiennes, et est impliquée dans diverses affections inflammatoires, telles que les troubles métaboliques, les maladies auto-immunes et le cancer (Ishigame *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2008).

2) Expression de l'IL-17

L'IL-17A joue un rôle dans de nombreux troubles à médiation immunitaire, tels que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune et le psoriasis. Les ligands IL-17A, IL-17-F et IL-17C ont une expression particulièrement élevée dans la peau psoriasique (Chiricozzi and Krueger, 2013; Kirkham *et al.*, 2014; Shabgah *et al.*, 2014).

L'IL-17A est produite essentiellement par les cellules T, à savoir, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, les cellules NK et les cellules gamma-delta T ($\gamma\delta$ T) (Cua and Tato, 2010). Il a été montré que des cellules non T telles que les neutrophiles et les mastocytes, produisent également de l'IL-17A dans certaines conditions (Lin *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2014). Les lymphocytes Th17, source principale d'IL-17A, se différencient à partir des cellules CD4+ naïves sous l'action de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-1 β , alors que leur survie et leur activation sont contrôlées principalement par l'IL-23 (Figure 28) (Yang *et al.*, 2008).

Le récepteur de l'IL-17A est exprimé par plusieurs types de cellules cibles telles que : les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules de la moelle osseuses, les myéломonocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. La fixation de l'IL-17A sur son récepteur cellulaire déclenche des voies de signalisation intracellulaires qui font intervenir le NF- κ B et le MAPK p38 (Liu *et al.*, 2004). Cette activation des cellules cibles déclenche la sécrétion des cytokines, et expriment des chémokines et des molécules d'adhésion. Cette activation induit le recrutement des progéniteurs des neutrophiles, leur migration, leur infiltration tissulaire et donc l'amplification de l'inflammation locale.

Une production pathologique d'IL-17A conduit donc à une inflammation excessive et à des lésions tissulaires grave d'où l'importance de la régulation de cette cytokine pro-inflammatoire.

3) Régulation de l'IL-17

La différenciation des cellules T auxiliaires CD4+ en cellules Th17 se fait sous l'action de TGF- β , IL-6, IL-23 et elle est inhibée par les deux voies Th1, Th2 *via* leurs cytokines, IFN- γ et IL-4 respectivement (Murphy and Reiner, 2002). Cependant, l'inhibition des réponses Th1,

Th2 par les cellules Th17 n'a pas été démontrée à ce jour. La différenciation et l'activation des cellules Th17 induisent la sécrétion d'IL-17A/F, d'IL-6, d'IL-21 et d'IL-22. Cette sécrétion est régulée négativement par l'IL-27, un produit de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ainsi que par l'IL-10. L'IL-10, décrite pour la première fois comme un produit des cellules Th2 inhibant la sécrétion d'INF- γ par les cellules Th1, a été ensuite identifiée comme un produit de nombreux types cellulaires, inhibant à la fois la réponse Th1 et Th2 (Grünig *et al.*, 1997). L'IL-10 exerce un feedback régulateur qui agit sur les cellules qui l'ont produite. De plus, l'absence d'IL10 ou de son récepteur se manifeste par une augmentation de l'IL-23, l'IL-1 β et l'IL-6, désormais reconnues comme étant importantes pour le développement de la lignée Th17 (Stumhofer *et al.*, 2007). Des produits supplémentaires de cellules T tels que IL-2 et IL-25 (IL-17E) peuvent avoir des effets directs et indirects sur l'engagement des cellules Th17 (Figure 30).

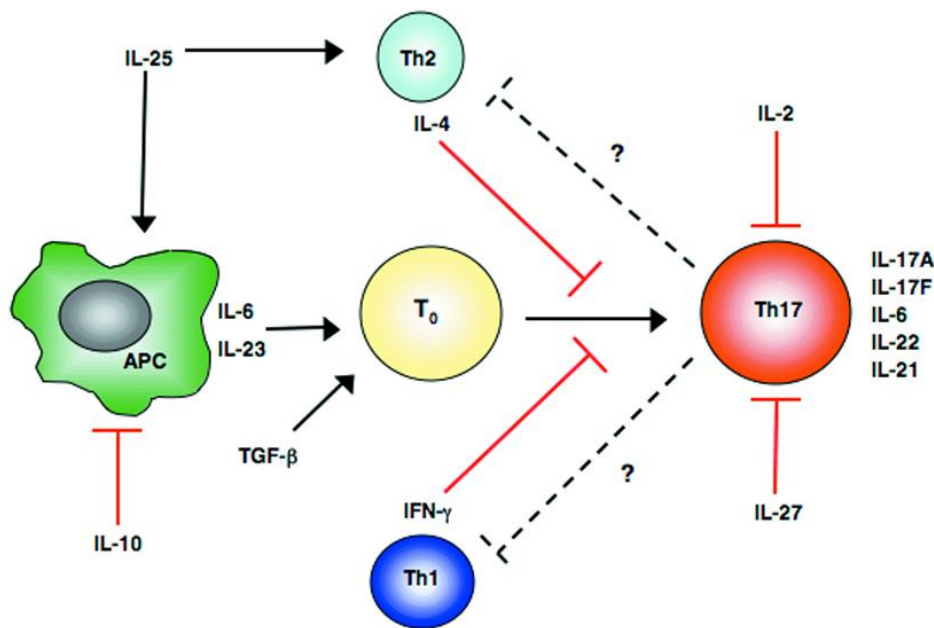


Figure 30. Régulation de la lignée Th17 (Stumhofer *et al.*, 2007)

Les études menées sur la compréhension de la voie de signalisation Th17, ont souligné l'importance des protéines de la famille STAT dans la promotion du développement des cellules de cette lignée, ainsi que leur capacité à réguler négativement ces cellules.

STAT3 est connue pour être activée par l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 favorisant ainsi la différenciation des cellules Th17. STAT3 est impliquée dans l'activation de la protéine inhibitrice SOCS3, dont il a été démontré qu'elle inhibait la synthèse d'IL-17 induite par l'IL-23 et l'IL-6 en atténuant la phosphorylation de STAT3, fournissant ainsi une boucle de rétro-inhibition de la production d'IL-17 (Chen *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2007).

Il a été montré que l'inhibition de l'IL-17 par l'INF- γ et l'IL-27 se fait *via* l'activation de la voie STAT1 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Stumhofer *et al.*, 2006). De même, la capacité de l'IL-2 à inhiber la synthèse de l'IL-17 est liée à l'activation de la voie STAT5 et à son recrutement ultérieur sur le promoteur de l'*IL-17* (Figure 31). Il a été suggéré que le facteur de transcription STAT5 pouvait inhiber directement la transcription du gène de l'*IL-17*, soit par compétition directe avec la protéine STAT3 (Chen *et al.*, 2006), connue pour être

un trans-activateur de la transcription de l'*IL17*, soit en recrutant un complexe enzymatique répresseur de la transcription de l'*IL-17*.

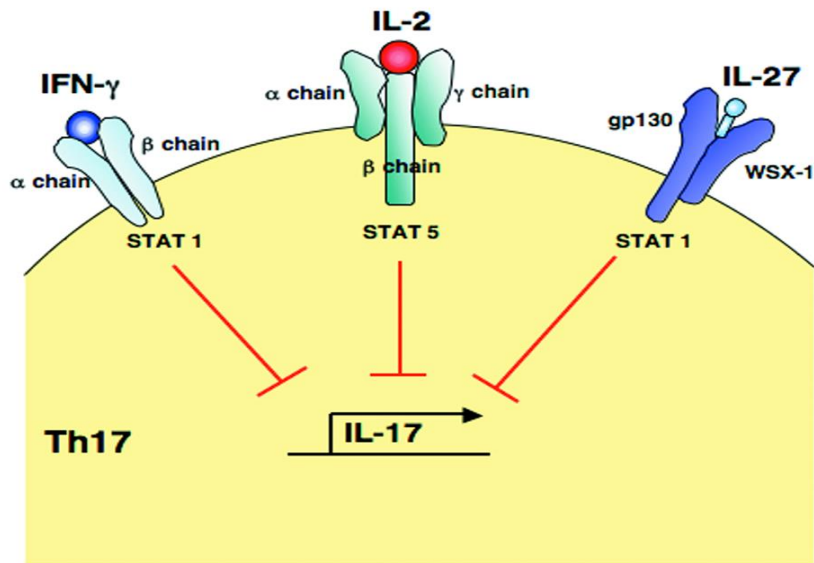


Figure 31. Inhibition de la production d'IL-17 induite par les STATs (Stumhofer *et al.*, 2007)

L'étude des mécanismes de régulation de l'IL-17A suscite un grand intérêt. De nombreux facteurs de transcription sont capables de se fixer sur le promoteur du gène de l'*IL-17A*. Certaines études ont montré que le facteur de transcription ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma) était impliqué à la fois dans la synthèse de l'IL-17A, mais aussi dans la différenciation des lymphocytes Th17. D'autres régulateurs, qu'ils soient positifs comme STAT3, IKK α ou négatifs comme STAT5, Foxp3, ont été caractérisés comme étant capables de se lier sur la séquence promotrice de gène *IL-17A* (Figure 32) (Gaffen, 2011). Cependant, dans des cellules autres que des cellules T, par exemple les cellules rétinienne et les cellules trophoblastiques, l'expression et la régulation de l'IL-17A restent méconnues et constituent donc un axe de recherche intéressant.

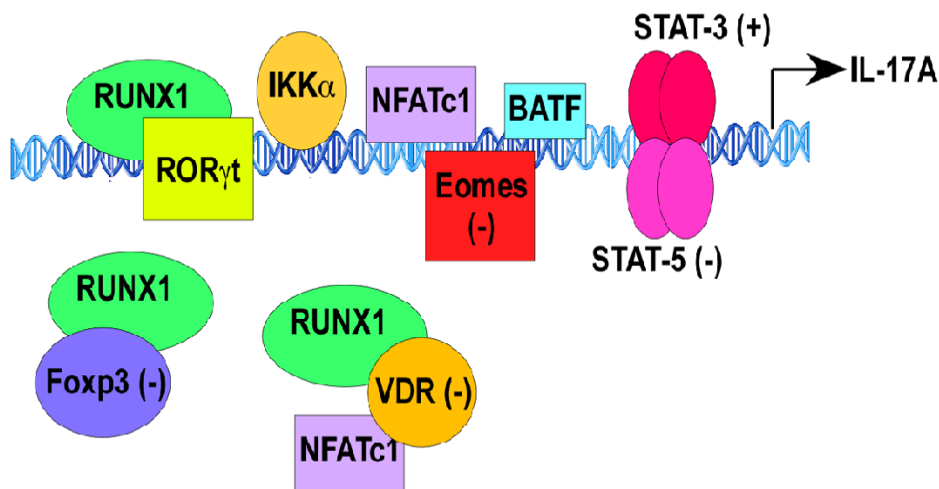


Figure 32. Régulation du gène de l'*IL-17A* (Gaffen, 2011)

4) IL-17A et toxoplasmose oculaire

Les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une TO sont relativement mal connus. En effet, les mécanismes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire oculaire ainsi que dans la physiopathologie sont peu connus, à cause de l'accès très limité aux tissus oculaires humains. Récemment, une étude spécifique de la réponse immunitaire locale a été conduite sur des patients souffrant de toxoplasmose oculaire et des quantifications de médiateurs immunitaires dans l'humeur aqueuse de ces patients ont été réalisées (Sauer *et al.*, 2013).

La régulation de l'infection oculaire par *T. gondii* fait appel à des molécules impliquées dans l'inflammation. Ainsi, afin de faciliter l'élimination du parasite, de nombreux médiateurs sont produits dont l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-6 ou le NO. Cependant, ces médiateurs sont également impliqués dans la formation de lésions oculaires du fait de la localisation intracellulaire du parasite. De ce fait, la prolifération parasitaire et la réaction inflammatoire destinée à éliminer le parasite pourraient être toutes deux destructrices pour l'œil (Gaddi and Yap, 2007; Jones *et al.*, 2006b; Wallace and Stanford, 2008).

Bien que les séquelles puissent être dramatiques, il existe une régulation dans l'œil qui limite l'extension des lésions, mais aboutit à la persistance du parasite sous forme de kystes (Jones *et al.*, 2006a; Wallace and Stanford, 2008). En effet, l'œil bénéficie d'un statut immunitaire privilégié où l'inflammation est réduite et la destruction tissulaire liée à la cytolyse est limitée afin de préserver l'intégrité de l'organe infecté (Hori *et al.*, 2010).

Parallèlement à l'activation des cellules Th1 productrices d'IFN- γ , la réaction immunitaire à l'infection par *T. gondii* implique également une prolifération et une activation des cellules Th 17 productrices d'IL-17 sous l'influence de ROR- γ t (Damsker *et al.*, 2010; Lahmar *et al.*, 2009). Il a été montré que l'activation de la voie Th17 est particulièrement délétère pour l'œil et est responsable de la formation des lésions rétinienne (Amadi-Obi *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2006b).

Dans le cas d'une TO, l'IL-17A retrouvée dans l'humeur aqueuse semble être surexprimée comparativement à d'autres pathologies oculaires (Lahmar *et al.*, 2009). Cette forte présence d'IL-17A signe l'existence d'un processus auto-immun qui résulte d'atteintes tissulaires. Dans des modèles murins, il a été montré que lors d'une primo-infection, la réponse de type Th-17 apparaît prédominante, puis rapidement contrebalancée par une réponse de type Th1/Th2/Treg qui devient prépondérante dans le cas d'une réactivation, aboutissant ainsi à un effet antiparasitaire plus performant (Sauer *et al.*, 2013).

La compréhension des réponses de l'axe Th17 / IL-17 ainsi que de son interaction et de sa régulation avec les autres axes immunitaire fournit des informations cruciales sur la défense immunitaire de l'hôte dans les maladies infectieuses. Cela faciliterait la mise au point de nouvelles stratégies immunomodulatrices efficaces pour le traitement et la prophylaxie des maladies infectieuses (bactériennes et parasitaires) et auto-immunes.

5) IL-17A – cible thérapeutique

Le lymphocyte Th17, producteur principal de l'IL-17A, initie l'inflammation et l'infiltration des tissus cible par les cellules de l'inflammation. De ce fait, il se voit attribuer une place cruciale dans les défenses de l'hôte contre les agents pathogènes (*Klebsiella* au niveau

pulmonaire, *Citrobacter* au niveau intestinal, *Toxoplasma* au niveau oculaire...) (Bäckdahl *et al.*, 2009; Korn *et al.*, 2007).

Bien que le rôle de la cytokine IL-17A ne soit pas totalement élucidé, la compréhension de ses mécanismes d'activation et de transduction des signaux a permis la réflexion et la mise en place de nombreuses études afin de démontrer son intervention dans plusieurs pathologies : les infections, les allergies, les rejets d'allogreffe et les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, psoriasis...).

Plusieurs agents qui ciblent la voie IL-17 – Th17 sont actuellement à l'étude. Les études cliniques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquants cette cytokine, soit directement (comme le ixekizumab) soit par l'intermédiaire de son récepteur (comme le brodalumab), ont été réalisées ou sont actuellement en cours (van den Berg and Miossec, 2009). Le secukinumab est un autre anticorps monoclonal humain ciblant l'IL-17A. Des traitements expérimentaux ont montré une certaine efficacité à court terme sur le psoriasis et semblent être très prometteurs (Chiricozzi and Krueger, 2013).

L'IL-17A semble donc avoir un avenir prometteur dans le traitement et peut-être même dans la prévention de certaines pathologies.

D. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION CTIP2

1) Rôle en physiologie cellulaire

La protéine CTIP2 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2), connue également sous l'appellation de BCL11b (B-cell lymphoma / leukemia 11b), a été isolée à partir d'hémopathie maligne (Lymphome T), mais a été décrite par la suite dans d'autres lignées cellulaires. CTIP2 est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines en doigt de zinc (Avram et al., 2000). CTIP2 possède six domaines en doigt de zinc responsables de la fixation sur l'ADN ainsi que d'autres domaines impliqués dans les interactions protéines-protéines (Kominami, 2012).

Il a été montré que CTIP2 était essentiel pour le développement des cellules lymphocytaires T qui sont indispensables à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Li et al., 2010). Cette protéine semble être un acteur majeur dans l'expression des gènes qui contrôlent la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes T (Ikawa et al., 2010).

Certaines données expérimentales dans les cellules microgliales (macrophages résidents du système nerveux central) et les lymphocytes T (Jurkat) ont suggéré que CTIP2 possède des propriétés anti-apoptotiques (Cherrier et al., 2009). Par ailleurs, CTIP2 est impliquée dans le métabolisme des lipides *via* la régulation de la voie de biosynthèse des sphingolipides, indispensables pour le développement du cerveau, des dents et de la peau (Kominami, 2012; Wang et al., 2013).

Bien que l'importance de CTIP2 dans la physiologie cellulaire soit soulignée par les données de la littérature, ce n'est qu'assez récemment que son mécanisme d'action a commencé à être bien compris. Ainsi il apparaît que la protéine CTIP2 est impliquée dans la modulation de l'expression des gènes en induisant des remaniements de la structure de la chromatine (Arlotta et al., 2008; Topark-Ngarm et al., 2006).

2) Rôle dans la régulation épigénétique

Le facteur de transcription CTIP2 est connu pour être recruté sur le promoteur du gène régulé, soit directement via les domaines en doigts de zinc, soit indirectement via des interactions protéine-protéine (Avram et al., 2000, 2002). Une fois amarré sur le promoteur du gène cible, CTIP2 sert alors de plateforme d'ancrage pour d'autres facteurs de transcription. Ainsi, les facteurs répresseurs qui favorisent la formation de l'hétérochromatine et empêchent l'accessibilité au promoteur de l'ARN polymérase II sont différents en fonction du type cellulaire. Alors que CTIP2 favorise le recrutement du complexe co-répresseur NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation) dans les lymphocytes T CD4⁺ pour induire la formation de l'hétérochromatine, dans les cellules microgliales, la formation de cette dernière résulte d'une synergie d'action entre la protéine CTIP2 et la protéine déméthylase LSD1 (lysine-specific demethylase 1), induisant des modifications post-traductionnelles des histones (Le Douce et al., 2012). Ainsi, CTIP2 est impliqué dans le recrutement d'un complexe multi-enzymatique composé des protéines HDAC1, HDAC2, SuV39H1, qui constituent une cible potentielle dans le cadre d'une stratégie de régulation épigénétique de la cellule-hôte (Marban et al., 2007).

Dans le cas d'une infection par le VIH-1, il apparaît que CTIP2 intervient dans l'établissement et le maintien de la latence virale *via* le remodelage de la chromatine et en prévenant la réactivation des gènes cibles. Ainsi, le complexe enzymatique recruté par CTIP2 au niveau de la chromatine, constitue une cible intéressante pour la réactivation du virus dans le cadre d'une stratégie épigénétique de réduction des réservoirs viraux.

3) Implication en pathologie humaine

A travers une meilleure compréhension des mécanismes d'action de CTIP2, plusieurs études ont souligné son implication dans plusieurs pathologies humaines.

Tout d'abord, CTIP2 a été associé à l'établissement et au maintien des réservoirs du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ et dans les cellules microgliales (Cherrier et al., 2010). Le maintien de cette latence virale a été associé à une augmentation de l'expression de CTIP2 dans le cerveau (Desplats et al., 2013).

Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin du type maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique, l'équipe de Vanvalkenburgh a montré une diminution de la protéine CTIP2 dans les lymphocytes T et plus particulièrement dans les lymphocytes Treg (Vanvalkenburgh et al., 2011). D'autres études menées sur CTIP2 ont montré son implication dans les phénomènes inflammatoires cutanés (Wang et al., 2012).

CTIP2 a été également impliquée dans la genèse de certains phénomènes néoplasiques comme les hémopathies malignes (Huang et al., 2012). Cette protéine jouerait un rôle clé dans la régulation de l'expression du gène P21 dont la dérégulation a été corrélée à l'apparition de cancers (Qian et al., 2013).

Enfin, l'expression de certains variants génétiques de CTIP2 a été associée à l'apparition d'une pathologie du cœur et notamment l'hypertrophie cardiaque (Mitchell Gary F. et al., 2012). En effet, les profils d'expression obtenus en dérégulant CTIP2 suggèrent que les voies de signalisation cellulaires qui sont connues pour être impliquées dans le processus de développement de l'hypertrophie cardiaque sont contrôlées par cette protéine et notamment la voie NF- κ B. De ce fait, le contrôle de l'expression de CTIP2 semble être une cible intéressante pour la prévention de l'hypertrophie cardiaque (Le Douce et al., 2012).

4) Implications thérapeutiques

Il est maintenant bien établi que de nombreuses pathologies humaines découlent d'une dérégulation de CTIP2, qui constitue ainsi une cible thérapeutique potentielle pour corriger les effets délétères causés par cette protéine.

La compréhension fine du mécanisme d'action de CTIP2 dans la latence virale a eu de profondes implications thérapeutiques dans le cadre de la stratégie de purge des réservoirs viraux. Ainsi l'utilisation des inhibiteurs des HDAC et de SuV39H1 a donné des résultats très prometteurs.

Des traitements basés sur l'interférence d'ARN (SiRNA) dirigés contre CTIP2 ont été proposés dans le traitement des leucémies. En effet, il a été montré que l'absence d'expression de CTIP2 induit la mort des cellules cancéreuses par apoptose (Huang et al., 2011). Une alternative à l'inhibition directe de CTIP2 serait de viser les protéines recrutées par CTIP2.

Ainsi, l'utilisation de la chaetocine, un inhibiteur de SuV39H1, est très prometteuse dans le traitement de certaines hémopathies malignes (Chaib et al., 2012).

E. REVUE SUR LA TOXOPLASMOSE OCULAIRE

Parasitized vision: pathophysiology of eye infection by *Toxoplasma gondii*

V. Greigert*, F. Fahmi-Bittich*, V. Gerber, M. Sabou, O. Villard, A. Sauer, D. Filisetti, J. Brunet, A. W. Pfaff

* These authors contributed equally

Introduction

Toxoplasma gondii is classically described as one of the most successful parasite in the world, since it is estimated that more than one-third of the global population harbors *T. gondii*, albeit with great regional disparities, prevalence ranging from 10% to 80% (1). The ocular presentation of this infection, ocular toxoplasmosis (OT), has long been exclusively attributed to congenital infection and neglected as a common health problem. Recent studies show that most of OT cases are indeed due to infection after birth (9,10) and that it can be considered as the first infectious cause of posterior uveitis worldwide, being responsible for 30 to 50% of all posterior uveitis in immunocompetent subjects (2). Interestingly, while in Europe and North America, about 2% of all infected subjects exhibit OT, in South-America the prevalence of this infection seems to be much higher, reaching 6% in Colombia and 17.7% in North-Eastern Brazil (3-8). This is due to the prevalence of highly virulent *Toxoplasma* strains in South America.

OT typically is responsible for retinochoroiditis, sometimes associated with anterior uveitis or vasculitis (9). It is often asymptomatic, especially when lesions are located at the outer edge of the retina, but it can be responsible for blurred vision and floaters (10). In case of repetitive recurrences, extensive lesion or particular location, such as macular or papillary involvement, the visual prognosis of the infected eye can be severe.

Despite this tremendous epidemiological and clinical importance, the pathophysiology of this infection remains poorly studied. Indeed, the complexity of experimental models allowing to mimic the peculiarities of this infection makes

experimental studies specific to OT difficult. However, a few research groups are involved in exploring the pathophysiology of this infection. The present review aims at reviewing current knowledge regarding eye physiology and OT pathophysiology in order for the reader to better apprehend the specific complexity of this infection and the challenges faced by researchers to understand its underlying mechanisms.

The eye: A particular organ for a particular infection

Anatomy and blood-retinal barriers. The eye is a complex organ whose main role is vision. It is therefore capable of capture light and transforms it in a neurological signal which will be used by the brain to construct an image. From this purpose comes the particular anatomy of the eye. It is composed of three layers, the outer one being known as the *fibrous tunic*, composed of the cornea and sclera. It consists mainly of collagen and contains few cells. The purpose of this layer is mainly to protect the eye from mechanic aggressions as well as giving its shape to the organ. The middle layer is the *uvea*, which is mainly composed of vascular structures, such as the choroid and the ciliary body, but also the iris. Finally, the innermost layer is classically described as the nervous layer which is, in fact, formed of the *retina*, the sensory tissue of the eye. Finally, these three layers are “filled”, with transparent tissues and liquids, allowing the light to be properly focused onto the retina in order to form a clear image. These are the lens, which is responsible for focusing light through the mechanism of accommodation, aqueous humor, located between the cornea and the lens, and the vitreous body filling the globe behind the lens.

The retina is, by itself, a complex tissue. It is a highly stratified and organized tissue formed by many different cell types fulfilling various roles. Roughly, there are five types of neuronal cells in the retina, working together for transforming light into a neurological signal for the brain to transform it into an accurate image. These are the *photoreceptor cells*, which transform the light in electrical signals, *horizontal cells* which are involved in the contrast and the luminosity of the image formed, *bipolar cells* which are interneurons allowing to pass electrical signals from several photoreceptor cells to one ganglion cell, *amacrine cells* which are responsible for the luminosity of the image and the detection of movement, and *ganglion cells* which are neurons collecting the final information from the retina and passing it to the central nervous system (CNS). Axons of these latter cells form the optical nerve. Furthermore, two types of glial cells are present within the retina. *Müller cells* are the main glial cells of this tissue, spread across all the layers, acting as the components of a framework, supporting the architecture of the retina. Additionally, these cells are also important in maintaining retinal homeostasis, and are a component of the internal blood-retinal barrier (iBRB) by sending extensions of their body around intraretinal blood vessels (11). *Astrocytes* are also a component of this barrier and fulfill a variety of functions ranging from homeostasis control to immune responses. In particular, astrocytes are responsible for controlling extracellular glutamate level, NO production and cytokines expression (12). Finally, *retinal microglial cells* are not glial cells but immune cells, deriving from the yolk sac, like cerebral microglial cells (13–15). It has been established that retinal microglia cells derive from two different types of cells, the first ones expressing specific markers of macrophages (CD45⁺, Mac-

1⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, CD68⁺), the second ones with a CD11b^{low}/CD45^{low} phenotype (16). Microglial cells can be found in all the layers of the retina and seem to be homogeneously distributed among the tissue (11). They play an important role in the immune response against infections, immuno-regulation and repairs of damaged tissues. Their functions seems to be close to those of classical macrophages, however, they appear not to be able of expressing the major histocompatibility complex of class II and to have limited abilities for antigen presentation (15).

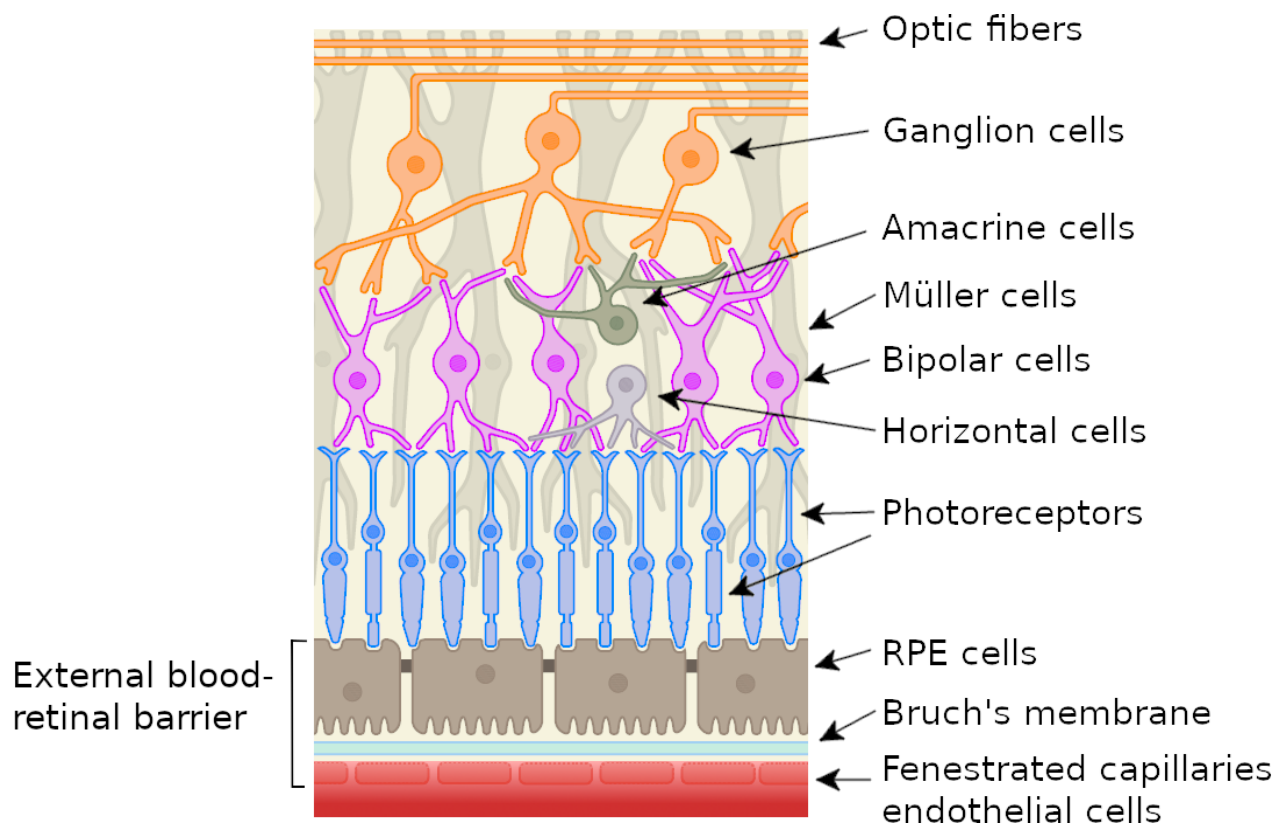


Figure 1. The ultrastructure of the human retina

Intraocular tissues are irrigated through two vascular systems. The *retinal vascular system* directly irrigates the inner layers of the retina. It is made of small blood vessels deriving from the internal carotid artery. The blood stream is isolated

from ocular tissues via tightly sealed endothelial cells, surrounded by pericytes and Müller cells and astrocytes extensions, forming the internal BRB (iBRB) (17). It seems that, in primates, this barrier is only fully competent about 10 days after birth (18,19). On the other hand, the choroidal system is in charge of irrigating the external layers of the retina, notably photoreceptor cells. This plexus is composed of fenestrated capillaries, deriving from the ophthalmic artery. These capillaries are separated from photoreceptor cells by the retinal pigment epithelium made of tightly connected cells which adhere with their vascular pole to the basal Bruch membrane, forming the external BRB (eBRB). These cells fulfill several functions, such as vitamin A metabolism, intraretinal homeostasis control and immunoregulation. These are also responsible for transporting nutrients and metabolites across the eBRB (20). Therefore, while this barrier also isolates the retina from the peripheral blood circulation, it is more permissive than the iBRB (17).

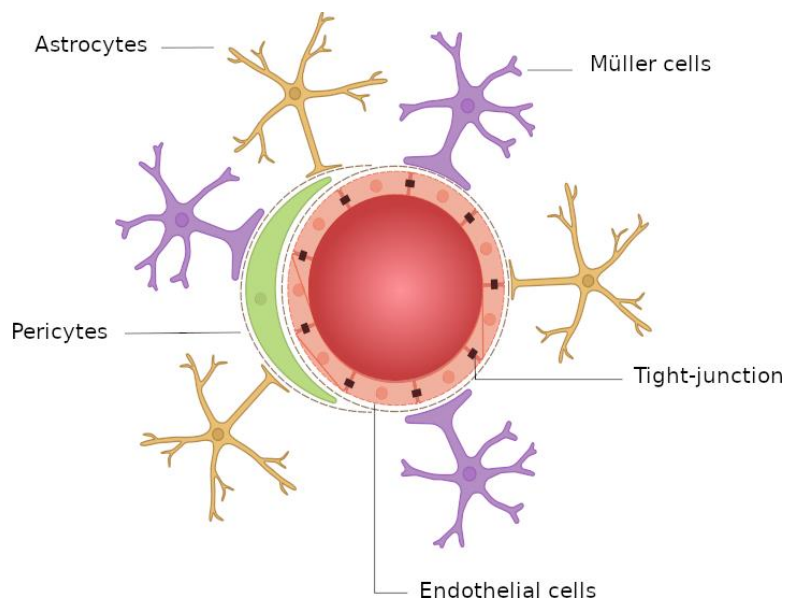


Figure 2. The internal blood-retinal barrier

The immune privilege of the posterior eye pole

Like other sensitive, non-regenerative organs, such as brain and placenta, the eye is classically described as an *immune privileged organ*. This condition is defined by limitation of local inflammation and immune cell activation, preventing irreversible tissue damage. Several underlying mechanisms are responsible for this phenomenon.

First, as described earlier, the retina is well isolated from blood circulation *via* BRBs. These BRBs mechanically forbid circulatory immune cells, antibodies and antigens to pass from one compartment to the other. Furthermore, there is no lymphatic drainage of the eye, liquids being directly drained into the venous circulation through the trabecular meshwork (21,22).

Secondly, liquids present in the eye posterior pole contain many immunosuppressive molecules, creating an immunosuppressive microenvironment. A prominent example for such molecules is the Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2), which regulates the differentiation, proliferation and survival of lymphocytes (23,24). It has been suspected that this molecule is activated and stabilized by thrombospondin-1 (TSP-1) which is constitutionally expressed in RPE cells (25). The α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) is also found in these liquids and possess immunoregulatory functions by inducing the expression of TGF- β 2, but also by inhibiting the expression of interferon gamma (IFN- γ) and the expression of the toll-like receptor 4 (TLR4) in macrophages. Altogether, these mechanisms allow the α -MSH to induce the differentiation of T cells into regulatory T cells (26–28). The vasoactive intestinal peptide (VIP) acts as a potent immunosuppressive molecule by inducing several transcription factors, such as

nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), interferon regulatory factor-1 (IRF-1), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cAMP response element (CRE). By these activations, VIP down-regulates the expression of several inflammatory molecules such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-12 and IFN- γ , while up-regulating the expression of immunomodulatory molecules such as IL-10, IL-1R and TGF- β (29–32). Retinoic acid (vitamin A), detected in RPE cells but also in all retina layers between neurons and the RPE, has been shown to have immunomodulatory functions, similar to those of TGF- β (33). Finally, the calcitonin gene-related peptide (CGRP) which is expressed by retinal neuronal cells, has an inhibitory effect on macrophages, limiting the NO production by these cells (34).

Cellular immune mechanisms are also involved in this immunosuppressive microenvironment. Thus, microglial cells, which are ocular myeloid cells, express both ligands and receptors of the CD200/CD200R and PD-1/PD-L1 systems, preventing activation of blood-borne myeloid cells (35–38). Macrophages present in the eye are able to present antigens from ocular origin and to present it to T cells in the spleen marginal zone, inducing the differentiation of these cells into regulatory T cells (39,40). RPE cells are equally able to induce the differentiation of T cells into regulatory T cells (41–44). Furthermore, they express ligands for programmed cell death pathways, such as FAS ligand (FasL) or PD-L1, inducing the death of activated immune cells originating from blood circulation (41). PD-L1 has shown to be expressed by retinal neurons from naive mice, suggesting a role of these cells and the PD-1/PD-L1 pathway in maintaining the retinal immunosuppressive

microenvironment (45). Furthermore, the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which is also expressed into the retina, particularly at the eBRB, is able to induce cell death too. RPE cells are also able to express prostaglandin E2 and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 2 (CTLA-2) which are responsible for the activation of regulatory T cells and the expression of TGF- β (41,44,46).

Thus, these multiple systems ensuring the particular immunosuppressive microenvironment in the eye posterior pole might provide a suitable niche for *T. gondii* persistence and development..

Pathophysiology of OT

The journey of a parasite

OT is one of the consequences of the systemic infection by *T. gondii*. The infection can happen *in- utero*, but most cases are actually acquired after birth (10,47,48).

When the infection is acquired through contaminated food or water ingestion, sporozoites are freed from the oocytes in which they are contained following the combined action of bile acids, trypsins, pH and other components present in mammals digestive tract (49). Once freed, mature sporozoites invade enterothelial cells, forming a parasitophorous vacuole via the mobile junction mechanism (50,51). Parasites then transform into rapidly proliferating tachyzoites, lysing their host cells and reaching the blood stream. This phenomenon is responsible for an inflammatory response and the recruitment of polymorphonuclear cells, monocytes and dendritic cells (52–54). It has also been shown that the parasites are able to cross the intestinal

barrier via a paracellular path (55,56). When the infection occur *in-utero*, subsequently to a primo-infection of the mother, the parasite will infect the fetus through fetus-derived tissues infection, such as the syncytiotrophoblast (57,58). However, there are few studies about this particular route of infection in humans.

The most commonly accepted theory regarding parasite dissemination in its host body in the one of the “Trojan horse”. It states that parasites take advantage of immune cells mobility, particularly DCs, by invading them. Indeed, it has been shown that infected cells exhibit a modified phenotype, being more mobile under the influence of parasite-derived proteins, such as GRA5 (56,59,60). This mechanism would allow parasites to be disseminated along lymphatic vessels. However, it has also been shown that parasites can disseminate along the blood stream, most of those being detected inside cells and, primarily, monocytes (61–64). As with DCs, *T. gondii* seems to have the capacity of modifying the phenotype of infected monocytes and macrophages, enhancing their mobility, marginalization and extravasation (65–69).

Following dissemination, *T. gondii* has the capacity of invading tissues, among which the brain, the heart, eyes and muscles are the privileged ones (70). Mechanisms involved in the invasion of eye tissues remain largely ignored. However, it has been shown that the parasite has the capacity of invading the retina under its free form, crossing the RPE by employing intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mediated adherence (71). Similarly, *T. gondii*-infected DCs have shown the capacity of crossing the RPE using ICAM-1, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) (72). Once in the retina, the parasite invade resident cells, but studies to identify a privileged

cell type for the parasite gave divergent results (73,74). Indeed, while, in an *in vitro* model, *T. gondii* seems capable of crossing several layers of the retina before preferentially invade a glial cell, murine models have shown that the parasite would infect both glial and neuronal cells, without preference (73,74). In one of these studies, authors showed that parasites were more present in the inner layers of the retina, suggesting that the iBRB might be the preferred route for invasion, as opposed to the eBRB (74).

Persistence and recurrences

T. gondii has the ability to persist in the invaded tissues in the form of the slow proliferating form called bradyzoite, which are organized in tissue cysts. It is believed that the transformation of tachyzoites into bradyzoites is triggered by the pressure exerted on the parasite by the host immune system. Some parasite-derived proteins have been identified as playing a role in this transformation, such as ROP17, ROP35 and ROP38 (75). No study has yet shown the specificity of invasion and cyst formation in the eye, as compared to other tissue. It is probable that the mechanisms leading to the formation of a tissue cyst are similar in the eye as in other tissues. This phenomenon consists in the transformation of a parasitophorous vacuole into a cyst by an extensive modification of the vacuole membrane, involving the addition of several parasite proteins and glycosylation (76–80). Furthermore, it has been shown that cyst containing cells exhibit a strongly modified microtubules and intermediate filaments networks (81).

Recurrences are an important feature of OT. This term refers to the fact that new foci of active retinochoroiditis consecutive to toxoplasmic infection may develop, usually at the immediate vicinity of scars of anterior episodes. Thus, with every recurrence, the probability of visual impairment consecutive to toxoplasmosis increases (2). This phenomenon, which may also occur in immunocompetent subjects, is poorly understood. It has been suggested that it may be the consequence of the active liberation of tachyzoites, issued from resident cysts (10). However, recurrences might be the consequence of the presence of parasites or parasitic antigens subsequently to the rupture of senescent cysts, traumas, hormonal fluctuations, decrease in humoral or cellular immunity, pregnancy or even eye surgery (82-84). Clinical features of these recurrences might give us clues about the mechanisms underlying their development. Indeed, it has been noted that severe, highly progressive and extended lesions occurred in patients who were older, pregnant or immunodeficient (4,84-90). It has also been showed that higher intraocular anti-*T. gondii* titers are correlated with limited risk for developing recurrences. Together, these elements seem to show that the quality of the immune response against *T. gondii* is critical in the development and the progression of OT recurrences (91). However, mechanisms triggering the recurrence remain unknown and the difficulties in developing a model for studying such a sporadic phenomenon restrict the possibility for improving our understanding on the matter.

The immune response to OT

Innate and adaptive responses to the infection

The mechanisms of the immune response to the eye infection with *T. gondii* are not well known, because of a lack in studies focused on this specific matter, and the immunosuppressive micro-environment in the eye forbids to generalize results of studies on other models.

It has been shown, using *in vitro* models, that Müller cells are able to express a large panel of inflammatory molecules, such as IL-4, IL-6, CCL2, CXCL2 and CXCL-8 (92). However, classical inflammatory cytokines, such as IL-12 or IFN- γ , which are known for being critical in controlling parasite proliferation, were not expressed by these cells (92).

Murine models partially confirmed these results, showing the expression of IL-6, but also TGF- β and β 2-microglobulin, in the eye of experimentally infected animals (93). In the same study, authors showed that IL6 knock-out mice exhibited a highly susceptible phenotype, with severe retinal inflammation and high parasite burden, suggesting an important role for this particular cytokine in protecting the retina against toxoplasmic infection (93). Another study showed the expression of IFN- γ and TNF- α by retinal lymphocytes recruited in this tissue, as well as macrophages, during toxoplasmic uveitis (94). Other cytokines and chemokines seem to have important roles in protecting the eye against the toxoplasmic infection, such as CXCL10, IFN- γ and TNF- α , as demonstrated by higher parasites burdens in the corresponding knock-out or neutralization models (95–98). Whereas these studies were interested in studying the response to an acute primo-infection, few authors specifically studied the immune response in case of recurrences. In a work using a specific murine model mimicking OT recurrences conducted in our laboratory, we

discovered that susceptible C57BL/6 mice, which exhibited important retinal inflammation and high parasite burden, strongly expressed inflammatory and T_h1 cytokines, such as IL-6 and IFN- γ , whereas the more resistant Swiss-Webster mice, primarily expressed T_h2 cytokines, such as IL-31 and a rapid, strong antibody production. Neutralizing cytokines directly in the eye allowed us to dissect specifically the ocular immune response. While intraocular neutralization of IFN- γ resulted without surprise in higher local parasite loads, locally administered anti IL-6 antibodies reversed the sensitive phenotype of C57BL/6 mice, both in terms of pathology and parasite control (99). This is in contrast to the above mentioned result of a protective effect of IL-6 (93) and could therefore reflect the special immunologic environment within the immune privileged eye, which cannot be addressed using knock-out mice.

Finally, numerous data from human samples provide clues about the immune response during OT in humans. Retrospective surveys analyzed aqueous humors of OT patients and retrieved high levels of T_h1 and inflammatory cytokines such as IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-17 and MCP-1, as well as of the T_h1 negative control cytokine IL-10 (2,100,101). Congruently, T_h2 cytokines, such as IL-13, were poorly expressed in these patients.

The case of T_h17 immunity

Lately, the attention of researchers has been focused on the role of T_h17 lymphocytes in the pathophysiology of OT. T_h17 lymphocytes, whose differentiation is stimulated by TGF- β , IL-1 and IL-6, exert a pro-inflammatory effect, *via* the cytokines that it

secrete and intervene in autoimmune diseases (like psoriasis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis), chronic inflammations and protective immunity against extracellular bacteria and fungi. However, the functions of T_h17 lymphocytes are not fully understood (102,103). IL-17 is the major cytokine of the T_h17 lymphocyte subpopulation. IL-17 family contains 6 members, named consecutively IL-17A to IL-17F (104). There are five identified IL-17 receptors, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD and IL-17RE (105). IL-17A and IL-17F bind to the same receptor, but the influence of IL-17A on gene regulation is 10 to 30 times stronger. The function of IL-17B, IL-17C and IL-17D is poorly defined. IL-17E is quite apart by its weak homology with the other family members and its T_h2-like action, and is now termed IL-25 (104). IL-17 receptors are present on many cell types including immune cells. Their stimulation induces the expression of many cytokines and chemokines allowing the recruitment and maturation of neutrophils. IL-17 also acts on non-immune cells such as fibroblasts and epithelial cells and induces the production of GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) and prostaglandin E₂, thereby increasing the maturation of granulocytes and the inflammatory phenomenon (106).

Our studies on human patients showed strong ocular IL-17A expression during OT, which was not observed in viral and other uveitis cases (100). This might suggest the existence of autoimmune processes, resulting from tissue damage. Immunofluorescence staining localized this IL-17A expression mainly to Müller cells, which is rather surprising, IL-17A being commonly associated with T-cells or NK-cells. However, it was noticed that patients from South-America exhibited a lesser expression of IL-17 than European patients, associated with IL-6 and IL-13 up-

regulation (107). Using *in vitro* models, researchers were able to show that IL-17A and IL-17R are responsible for the activation of RPE cells, compromising their barrier function (108). Furthermore, murine models have allowed the identification of IL-17 as a highly expressed cytokines in case of OT, whether during acute primo-infection through intra-vitreous injection or using a protocol experimentally mimicking OT recurrences (99,109,110). In several studies on murine models, in the setting of OT, a high expression of IL-17 was correlated with the development of severe retinal lesions, and the expression of IL-17 was higher in naive mice than in subjects which had been previously challenged with the parasite (99,101,110).

These results suggest that, during ocular *T. gondii* infection, IL-17 might compromise the barrier function of RPE cells, allowing activated immune cells, antigens and antibodies to cross the BRB, resulting in enhanced inflammation and subsequent tissue damage. Indeed, IL-17 is known for being responsible for the recruitment and activation of neutrophils, monocytes and NK cells to infection site through the production of IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) and G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), as well as to stimulate IL-6 and nitric oxide productions, amplifying the local inflammatory response in synergy with other mediators, such as IFN- γ , TNF- α and IL-1 (111-116). Furthermore, since IL-17 expression has been linked to decrease IFN- γ expression, it is possible that these damages are also the consequence of an enhanced parasite proliferation (101).

These results allow to get a rough picture of the immune response to OT. The IL-12 - IFN- γ axis seems to play a central protective role in the eye, controlling both pathology and parasite multiplication, similarly to its pivotal and long-known role in

systemic toxoplasmosis (103). There are still numerous gaps in our understanding of the intraocular immune network following *T. gondii* infection, such as the role of IL-6 and the regulatory roles of T_h2 cytokines.

Enhanced virulence: *Toxoplasma* infection in South America

It is important to note that the previous chapters detailed our knowledge on *Toxoplasma* infections in Europe and a great part of North American infections. However, it has become evident that such infections in South American patients are not only more frequent, as described in the first lines of this review, but also more severe, including the ocular involvement (3). Infections on other continents are yet less studied, but could also reveal striking differences. A study including direct comparison between French and Colombian cases showed more macular involvement, larger lesions, more inflammation and a greatly enhanced ocular parasite load in the Colombian patients (102).

These clinical differences between South-American and European patients are the consequence of the existence of atypical *Toxoplasma* strains in South-America, which have notably more virulent variants of certain crucial genes, which greatly affect the resulting immune response (117-119,71,120). The above mentioned study (102) also compared the expression of cytokines in the aqueous humor of OT patients coming from France or Colombia, and found that South American patients expressed pivotal protective factors, such as IFN- γ , but also IL-17A, in a much weaker fashion, whereas T_h2 cytokines, like IL-13 and, paradoxically, IL-6 were up-regulated. This is thought to permit considerably stronger parasite proliferation and consequently higher parasite burden, leading to severe retinal damage, in contrast to the

'European-type' milder and probably inflammation-mediated pathology (2). As there are only very few animal studies using these atypical strains (121), the pathophysiology of these infection is still largely unknown.

Perspectives and opportunities for research

As knowledge regarding OT pathophysiology grows, many questions remain unanswered. Various fundamental aspects of the infectious process leading from *T. gondii* oral infection to OT are still unknown. For example, it is not known which is the preferred route for the parasite to invade the retina. Evidences show that *T. gondii* might cross the BRB either as a free tachyzoite, or inside a 'Trojan horse' cell. Furthermore, eBRB and iBRB are very different structures, and it has not been determined which one is preferentially crossed by the parasite, even if some indirect evidences show that the iBRB might be the major route (74). Once in the retina, the parasite invade cells, but which ones are preferentially invaded, if any, remains to be established. Finally, events triggering and mechanisms underlying recurrences remain hypothetical, and further research is critically needed in order to better comprehend this major aspect of OT pathophysiology.

The immune response to OT seems to be widely dependent on IFN- γ which has a pivotal role in the defense of organisms against *T. gondii*. However, the peculiarities of the eye, its BRBs and immune environment suggest that other mechanisms might be at stake, such as the activation of type I (α and β) or III ($\lambda 1-4$) IFNs pathways. Indeed, few data exist regarding the role of these IFNs during OT,

but it has been shown that IFN- β might potentiate the protective effect of IFN- γ in a murine model of systemic infection (122). Nagineni *et al.* also showed that IFNs- α and - β had the ability to inhibit parasite replication in the setting of in vitro RPE cells infections with a RH strain (123). A similar effect was described in murine macrophages and embryonic human fibroblasts, the immunity-related GTPase M1 protein (IRGM1), which is recruited at the surface of the parasitophorous vacuole, being described as a key effector in this phenomenon (124). Another study showed that the infection of murine macrophages with atypical virulent strains triggered the expression of IFN- β by these cells, and that this production was correlated to parasite death (125). However, it was suggested that this phenomenon might be the consequence of cell stimulation with parasitic debris rather than with live parasites, since exposure of macrophages to heat-inactivated canonical strains caused the same response. Finally, a very recent study showed that type I IFNs were important for the control of parasite proliferation during experimental infection of murine models, in particular by promoting the expression of IFN- γ by NK cells, and that the toxoplasmic effector TgIST allowed the parasite to limit the reactivity of cells to type I IFNs by inhibiting the signaling pathway dependent on the STAT1/STAT2 heterodimer (126).

Regarding type III IFNs, there are currently no data available about their role during toxoplasmosis, ocular or otherwise. However, this particular family has been described as of particular importance at natural barriers, such as gastrointestinal epithelium, respiratory epithelium, placenta or blood-brain barrier (BBB) (127). Type III IFNs have mainly been studied in the setting of viral infections, but a recent study

explored the role IFN- λ 3 during the infection of the gastrointestinal epithelium with *Cryptosporidium parvum* (128). It showed that these cytokines would limit parasite crossing of the epithelium by tightening junctions between cells involved in the barrier as it had already been shown in the BBB in a West-Nile virus infection model (129). A similar phenomenon might be involved in OT pathophysiology, as a study showed that *in vitro* RPE cell infection with a RH *T. gondii* strains rapidly increased permeability of the cell layer (130).

Finally, the identification of IL-17 as a potent inflammatory effector during OT, responsible for a strong inflammation and, subsequently, to tissue damage, makes it a potential target for new treatments of OT. Indeed, several compounds, mainly monoclonal antibodies, are already available to inhibit the IL-17 pathway. These are ixekizumab, brodalumab or secukinumab, which are currently under evaluation or in use for treating auto-inflammatory diseases such as psoriasis or ankylosing spondyloarthritis (131-133). The use of such molecules to limit the impact of inflammation on tissue damage during OT might be interesting, particularly when visual function is at risk, either because of the localization of the inflammatory spot or because of its intensity. However, the role of IL-17 in OT pathophysiology is not fully understood and it would be essential to address the risk of infection facilitation via IL-17 inhibition before administrating such treatment to OT patients. Furthermore, the discrepancies between European and South-American infections could mean that such molecules might have variable effects, depending on the infective *T. gondii* strain. Other therapeutic options reside in molecules targeting IL-6 or IL-23 which are also involved in this inflammatory process. In any case, it has to

be kept in mind that all such treatments would still be more symptomatic than anti-parasitic.

Conclusions

In summary, despite numerous discoveries in the past decade, OT remains a poorly understood disease, which contrasts with its tremendous epidemiological importance. Very basic mechanisms underlying this infection remain unknown, therefore limiting the approaches to develop innovative therapeutics. Indeed, most treatments used nowadays were already used 50 years ago. However, new insights regarding the immune response to OT might provide clues to develop treatment targeting the cytokines responsible for tissue damage subsequently to high inflammation. Such treatment would remain symptomatic and further research, regarding retina invasion, intracystic bradyzoite persistence, recurrences triggering and poorly studied inflammatory mechanisms are critically needed in order to develop new therapeutics to limit or prevent recurrences or even cure people from chronic infections.

References

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet Lond Engl.* 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
2. Pfaff AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, et al. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2014 Feb;44(2):99-107.
3. de-la-Torre A, López-Castillo CA, Gómez-Marín JE. Incidence and clinical characteristics in a Colombian cohort of ocular toxoplasmosis. *Eye Lond Engl.* 2009 May;23(5):1090-3.
4. Jones JL, Muccioli C, Belfort R, Holland GN, Roberts JM, Silveira C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2006 Apr;12(4):582-7.
5. Arevalo JF, Belfort R, Muccioli C, Espinoza JV. Ocular toxoplasmosis in the developing world. *Int Ophthalmol Clin.* 2010;50(2):57-69.
6. Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today Pers Ed.* 1999 Feb;15(2):51-7.
7. Jones JL, Holland GN. Annual burden of ocular toxoplasmosis in the US. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Mar;82(3):464-5.
8. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol.* 2003 Dec;136(6):973-88.
9. Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Mar;104(2):345-50.
10. Pleyer U, Schlüter D, Mänz M. Ocular Toxoplasmosis: Recent Aspects of Pathophysiology and Clinical Implications. *Ophthalmic Res.* 2014;52(3):116-23.
11. Santallier M, Péchereau J, Péchereau A. *Anatomie de l'Œil.* Alain Péchereau; 197 p.
12. de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, et al. Retinal Macrogial Responses in Health and Disease [Internet]. *BioMed Research International.* 2016 [cited 2019 May 13]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2954721/>
13. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):841-5.

14. Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016 Mar 15;44(3):439–49.
15. McMenamin PG, Saban DR, Dando SJ. Immune cells in the retina and choroid: Two different tissue environments that require different defenses and surveillance. *Prog Retin Eye Res*. 2018 Dec 12;
16. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res*. 2015 Jul;136:116–30.
17. Spadoni I, Fornasa G, Rescigno M. Organ-specific protection mediated by cooperation between vascular and epithelial barriers. *Nat Rev Immunol*. 2017 Dec;17(12):761–73.
18. Chow BW, Gu C. Gradual Suppression of Transcytosis Governs Functional Blood-Retinal Barrier Formation. *Neuron*. 2017 Mar 22;93(6):1325-1333.e3.
19. Ogura S, Kurata K, Hattori Y, Takase H, Ishiguro-Oonuma T, Hwang Y, et al. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight*. 2017 09;2(3):e90905.
20. Strauss O. [The role of retinal pigment epithelium in visual functions]. *Ophthalmol Z Dtsch Ophthalmol Ges*. 2009 Apr;106(4):299–304.
21. Streilein JW, Stein-Streilein J. Does innate immune privilege exist? *J Leukoc Biol*. 2000 Apr;67(4):479–87.
22. Koevary null. Ocular immune privilege: a review. *Clin Eye Vis Care*. 2000 Dec;12(3–4):97–106.
23. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99–146.
24. Kriegel MA, Li MO, Sanjabi S, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Curr Rheumatol Rep*. 2006 Apr;8(2):138–44.
25. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):179–85.
26. Taylor AW. Ocular immune privilege. *Eye Lond Engl*. 2009 Oct;23(10):1885–9.
27. Taylor AW, Lee DJ. The alpha-melanocyte stimulating hormone induces conversion of effector T cells into treg cells. *J Transplant*. 2011;2011:246856.
28. Luttrull JK, Dorin G. Subthreshold diode micropulse laser photocoagulation (SDM) as invisible retinal phototherapy for diabetic macular edema: a review. *Curr Diabetes Rev*. 2012 Jul 1;8(4):274–84.

29. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, et al. VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Neuroimmunol*. 1998 May 15;85(2):155-67.
30. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Feb 1;162(3):1707-16.
31. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun;56(2):249-90.
32. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Apr 15;162(8):4685-96.
33. Mucida D, Cheroutre H. TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. *Cell Adhes Migr*. 2007 Sep;1(3):142-4.
34. Dartt DA, Bex P, D'Amore P, Dana R, Mcloon L, Niederkorn J. *Ocular Periphery and Disorders*. Academic Press; 2011. 569 p.
35. Broderick C, Hoek RM, Forrester JV, Liversidge J, Sedgwick JD, Dick AD. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1669-77.
36. Dick AD, Carter D, Robertson M, Broderick C, Hughes E, Forrester JV, et al. Control of myeloid activity during retinal inflammation. *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):161-6.
37. Chen L, Sham CW, Chan AM, Francisco LM, Wu Y, Mareninov S, et al. Role of the immune modulator programmed cell death-1 during development and apoptosis of mouse retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Oct;50(10):4941-8.
38. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:219-42.
39. Wenkel H, Streilein JW. Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Sep;39(10):1823-34.
40. Wenkel H, Streilein JW. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Oct;41(11):3467-73.

41. Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, et al. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2008 Jan;86(1):52-9.
42. Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Aburatani H, Okazaki T, et al. T-cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jun;50(6):2862-70.
43. Sugita S. Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009 Aug;57(4):263-8.
44. Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, et al. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Dec 1;181(11):7525-36.
45. Chen L, Pai V, Levinson R, Sharpe AH, Freeman GJ, Braun J, et al. Constitutive neuronal expression of the immune regulator, programmed death 1 (PD-1), identified during experimental autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2009 Feb;17(1):47-55.
46. Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H, Mochizuki M. Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res.* 2006 Dec;83(6):1459-71.
47. Bosch-Driessen EH, Rothova A. Recurrent ocular disease in postnatally acquired toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 1999 Oct;128(4):421-5.
48. Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 2008 Dec;146(6):851-5.
49. Freyre A, Falcón J. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp Parasitol.* 2004 May 1;107(1):72-7.
50. Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2011 Oct 1;27(10):459-66.
51. Besteiro S, Dubremetz J-F, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol.* 2011 Jun;13(6):797-805.
52. McLeod R, Skamene E, Brown CR, Eisenhauer PB, Mack DG. Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of A x B/B x A recombinant inbred and B10 congenic mice. *J Immunol.* 1989 Nov 1;143(9):3031-4.
53. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with

- genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):597-607.
54. Cohen SB, Denkers EY. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. *Mucosal Immunol*. 2014 Jul;7(4):744-52.
 55. Barragan A, Brossier F, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):561-8.
 56. Harker KS, Ueno N, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol*. 2015 Mar;37(3):141-9.
 57. Ferro EAV, Mineo JR, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Silva DAO, et al. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):50-8.
 58. Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):418-28.
 59. Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Loré K, Barragan A. The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1679-88.
 60. Persat F, Mercier C, Ficheux D, Colomb E, Trouillet S, Bendridi N, et al. A synthetic peptide derived from the parasite *Toxoplasma gondii* triggers human dendritic cells' migration. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec;92(6):1241-50.
 61. Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int*. 2008 Dec 1;57(4):515-8.
 62. Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):309-16.
 63. Silveira C, Vallochi AL, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*. 2011 Mar;95(3):396-400.
 64. Channon JY, Seguin RM, Kasper LH. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun*. 2000 Aug;68(8):4822-6.
 65. Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U, Arnholdt ACV. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion

- molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2004 Nov;6(14):1287–96.
66. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678–89.
 67. Harker KS, Ueno N, Wang T, Bonhomme C, Liu W, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. *J Leukoc Biol.* 2013 May;93(5):789–800.
 68. Weidner JM, Kanatani S, Hernández-Castañeda MA, Fuks JM, Rethi B, Wallin RPA, et al. Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. *Cell Microbiol.* 2013 Oct;15(10):1735–52.
 69. Ueno N, Harker KS, Clarke EV, McWhorter FY, Liu WF, Tenner AJ, et al. Real-time imaging of *Toxoplasma*-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. *Cell Microbiol.* 2014 Apr;16(4):580–95.
 70. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr;11(2):267.
 71. Furtado JM, Bharadwaj AS, Chipps TJ, Pan Y, Ashander LM, Smith JR. *Toxoplasma gondii* tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *Immunol Cell Biol.* 2012 Oct;90(9):912–5.
 72. Furtado JM, Bharadwaj AS, Ashander LM, Olivás A, Smith JR. Migration of *toxoplasma gondii*-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Oct 3;53(11):6856–62.
 73. Furtado JM, Ashander LM, Mohs K, Chipps TJ, Appukuttan B, Smith JR. *Toxoplasma gondii* migration within and infection of human retina. *PloS One.* 2013;8(2):e54358.
 74. Song HB, Jung B-K, Kim JH, Lee Y-H, Choi M-H, Kim JH. Investigation of tissue cysts in the retina in a mouse model of ocular toxoplasmosis: distribution and interaction with glial cells. *Parasitol Res.* 2018 Aug;117(8):2597–605.
 75. Zhu W, Li J, Pappoe F, Shen J, Yu L. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. *Front Microbiol.* 2019;10:899.
 76. Luo Q, Upadhya R, Zhang H, Madrid-Aliste C, Nieves E, Kim K, et al. Analysis of the glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Microbes Infect.* 2011 Dec;13(14–15):1199–210.

77. Buchholz KR, Bowyer PW, Boothroyd JC. Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst. *Eukaryot Cell*. 2013 Mar;12(3):399–410.
78. Caffaro CE, Koshy AA, Liu L, Zeiner GM, Hirschberg CB, Boothroyd JC. A nucleotide sugar transporter involved in glycosylation of the *Toxoplasma* tissue cyst wall is required for efficient persistence of bradyzoites. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003331.
79. Tomita T, Sugi T, Yakubu R, Tu V, Ma Y, Weiss LM. Making Home Sweet and Sturdy: *Toxoplasma gondii* ppGalNAc-Ts Glycosylate in Hierarchical Order and Confer Cyst Wall Rigidity. *mBio*. 2017 10;8(1).
80. Di Cristina M, Dou Z, Lunghi M, Kannan G, Huynh M-H, McGovern OL, et al. *Toxoplasma* depends on lysosomal consumption of autophagosomes for persistent infection. *Nat Microbiol*. 2017 Jun 19;2:17096.
81. Paredes-Santos TC, Martins-Duarte ES, de Souza W, Attias M, Vommaro RC. *Toxoplasma gondii* reorganizes the host cell architecture during spontaneous cyst formation in vitro. *Parasitology*. 2018;145(8):1027–38.
82. O'Connor GR. Factors related to the initiation and recurrence of uveitis. XL Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol*. 1983 Nov;96(5):577–99.
83. Bosch-Driessen LH, Plaisier MB, Stilma JS, Van der Lelij A, Rothova A. Reactivations of ocular toxoplasmosis after cataract extraction. *Ophthalmology*. 2002 Jan;109(1):41–5.
84. Garweg JG, Scherrer J, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F. Reactivation of ocular toxoplasmosis during pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2005 Feb;112(2):241–2.
85. Holland GN, Engstrom RE, Glasgow BJ, Berger BB, Daniels SA, Sidikaro Y, et al. Ocular toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol*. 1988 Dec 15;106(6):653–67.
86. Holland GN, O'Connor GR, Diaz RF, Minasi P, Wara WM. Ocular toxoplasmosis in immunosuppressed nonhuman primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988 Jun;29(6):835–42.
87. Morhun PJ, Weisz JM, Elias SJ, Holland GN. Recurrent ocular toxoplasmosis in patients treated with systemic corticosteroids. *Retina Phila Pa*. 1996;16(5):383–7.
88. Johnson MW, Greven CM, Jaffe GJ, Sudhalkar H, Vine AK. Atypical, Severe Toxoplasmic Retinochoroiditis in Elderly Patients. *Ophthalmology*. 1997 Jan 1;104(1):48–57.
89. Labalette P, Delhaes L, Margaron F, Fortier B, Rouland J-F. Ocular toxoplasmosis after the fifth decade. *Am J Ophthalmol*. 2002 Apr;133(4):506–15.

90. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol.* 2004 Jan;137(1):1-17.
91. Matet A, Paris L, Fardeau C, Terrada C, Champion E, Fekkar A, et al. Clinical and Biological Factors Associated With Recurrences of Severe Toxoplasmic Retinochoroiditis Confirmed by Aqueous Humor Analysis. *Am J Ophthalmol.* 2019 Mar;199:82-93.
92. Knight BC, Kissane S, Falciani F, Salmon M, Stanford MR, Wallace GR. Expression analysis of immune response genes of Müller cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J Neuroimmunol.* 2006 Oct 1;179(1):126-31.
93. Lyons RE, Anthony JP, Ferguson DJP, Byrne N, Alexander J, Roberts F, et al. Immunological Studies of Chronic Ocular Toxoplasmosis: Up-Regulation of Major Histocompatibility Complex Class I and Transforming Growth Factor β and a Protective Role for Interleukin-6. *Infect Immun.* 2001 Apr 1;69(4):2589-95.
94. Jones LA, Alexander J, Roberts CW. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunol.* 2006 Dec;28(12):635-42.
95. Gazzinelli RT, Brezin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC. *Toxoplasma gondii*: Acquired Ocular Toxoplasmosis in the Murine Model, Protective Role of TNF- α and IFN- γ . *Exp Parasitol.* 1994 Mar 1;78(2):217-29.
96. Pavesio CE, Chiappino ML, Gormley P, Setzer PY, Nichols BA. Acquired retinochoroiditis in hamsters inoculated with ME 49 strain *Toxoplasma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Oct;36(11):2166-75.
97. Gormley PD, Pavesio CE, Luthert P, Lightman S. Retinochoroiditis is Induced by Oral Administration of *Toxoplasma Gondii* Cysts in the Hamster Model. *Exp Eye Res.* 1999 Jun 1;68(6):657-61.
98. Sauer A, Lahmar I, Scholler M, Villard O, Speeg-Schatz C, Brunet J, et al. [Development of murine models of ocular toxoplasmosis and preliminary results of ocular inflammatory transcriptome]. *J Fr Ophtalmol.* 2009 Dec;32(10):742-9.
99. Rochet É, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, Bourcier T, Candolfi E, et al. Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect Immun.* 2015 May;83(5):2109-17.
100. Lahmar I, Abou-Bacar A, Abdelrahman T, Guinard M, Babba H, Ben Yahia S, et al. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J Infect Dis.* 2009 Apr 15;199(8):1239-49.
101. Sauer A, Pfaff AW, Villard O, Creuzot-Garcher C, Dalle F, Chiquet C, et al. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis.* 2012 Oct;206(8):1319-29.

102. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec 1;19(6):652-7.
103. Girolomoni G, Mrowietz U, Paul C. Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *Br J Dermatol*. 2012;167(4):717-24.
104. Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 Cytokine Family. In: *Vitamins & Hormones* [Internet]. Academic Press; 2006 [cited 2019 Sep 10]. p. 255-82. (Interleukins; vol. 74). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672906740109>
105. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*. 2011 Oct 1;23(5):613-9.
106. Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine*. 2008 Feb 1;41(2):71-8.
107. de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Nov;7(11):e2541.
108. Chen Y, Yang P, Li F, Kijlstra A. The Effects of Th17 Cytokines on the Inflammatory Mediator Production and Barrier Function of ARPE-19 Cells. *PLOS ONE*. 2011 Mar 30;6(3):e18139.
109. Kikumura A, Ishikawa T, Norose K. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*. 2012 Sep 1;96(9):1259-67.
110. Sauer A, Rochet E, Lahmar I, Brunet J, Sabou M, Bourcier T, et al. The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: Less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int J Parasitol*. 2013 Aug 1;43(9):721-8.
111. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):519-27.
112. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Dec 1;171(11):6052-8.
113. Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):617-21.

114. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr;148(1):32–46.
115. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):479–89.
116. Schulthess J, Meresse B, Ramiro-Puig E, Montcuquet N, Darche S, Bègue B, et al. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 2012 Jul 27;37(1):108–21.
117. Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res*. 1997;83(7):637–41.
118. Knight BC, Brunton CL, Modi NC, Wallace GR, Stanford MR. The effect of *Toxoplasma gondii* infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*. 2005 Mar;160(1–2):41–7.
119. de Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):326–9.
120. Rochet E, Argy N, Greigert V, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, et al. Type I ROP16 regulates retinal inflammatory responses during ocular toxoplasmosis. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214310.
121. Hassan MA, Olijnik A-A, Frickel E-M, Saeij JP. Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int J Parasitol*. 2019 Jan;49(1):63–70.
122. Orellana MA, Suzuki Y, Araujo F, Remington JS. Role of beta interferon in resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 1991 Sep;59(9):3287–90.
123. Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*. 1996 Oct;64(10):4188–96.
124. Mahmoud ME, Ui F, Salman D, Nishimura M, Nishikawa Y. Mechanisms of interferon-beta-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in murine macrophages and embryonic fibroblasts: role of immunity-related GTPase M1. *Cell Microbiol*. 2015 Jul;17(7):1069–83.
125. Melo MB, Nguyen QP, Cordeiro C, Hassan MA, Yang N, McKell R, et al. Transcriptional analysis of murine macrophages infected with different *Toxoplasma* strains identifies novel regulation of host signaling pathways. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003779.

126. Matta SK, Olias P, Huang Z, Wang Q, Park E, Yokoyama WM, et al. Toxoplasma gondii effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Aug 27;116(35):17480-91.
127. Wells AI, Coyne CB. Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. Trends Immunol. 2018;39(10):848-58.
128. Ferguson SH, Foster DM, Sherry B, Magness ST, Nielsen DM, Gookin JL. Interferon- λ 3 Promotes Epithelial Defense and Barrier Function Against Cryptosporidium parvum Infection. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2019;8(1):1-20.
129. Lazear HM, Daniels BP, Pinto AK, Huang AC, Vick SC, Doyle SE, et al. Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. Sci Transl Med. 2015 Apr 22;7(284):284ra59-284ra59.
130. Nogueira AR, Leve F, Morgado-Diaz J, Tedesco RC, Pereira MCS. Effect of Toxoplasma gondii infection on the junctional complex of retinal pigment epithelial cells. Parasitology. 2016 Apr;143(5):568-75.
131. Mease PJ, van der Heijde D, Ritchlin CT, Okada M, Cuchacovich RS, Shuler CL, et al. Ixekizumab, an interleukin-17A specific monoclonal antibody, for the treatment of biologic-naive patients with active psoriatic arthritis: results from the 24-week randomised, double-blind, placebo-controlled and active (adalimumab)-controlled period of the phase III trial SPIRIT-P1. Ann Rheum Dis. 2017 Jan;76(1):79-87.
132. Lebwohl M, Strober B, Menter A, Gordon K, Weglowska J, Puig L, et al. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. N Engl J Med. 2015 Oct;373(14):1318-28.
133. Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, et al. Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. N Engl J Med. 2015 Dec 24;373(26):2534-48.

OBJECTIFS

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui persiste dans des organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau ou l'œil, où l'inflammation est réduite et la destruction tissulaire liée à la cytolyse est limitée afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000). Depuis sa vacuole parasitophore, ce parasite est capable de moduler plusieurs facteurs de transcription et de manipuler plusieurs voies de signalisation de l'hôte à son avantage, ce qui lui permet d'échapper au système immunitaire et de persister à long terme.

La capacité de *T. gondii* à établir une infection chronique est très fortement liée à son spectre d'action sur de nombreux aspects de la physiologie de la cellule hôte. Le contrôle de la réponse immunitaire est primordial pour le parasite. Chez l'homme des différences effectives de cette réponse ont pu être observées en fonction de la souche parasitaire infectante. En effet, il existe une dichotomie avec d'un côté l'Europe et l'Amérique du Nord et de l'autre côté l'Amérique du Sud. En Europe prédominent des souches de type II, qui engendrent lors de l'infection des réponses immunes Th1 et Th17, cette dernière étant très délétère pour l'œil. En revanche, en Amérique du Sud existe une grande hétérogénéité de souches très virulentes, avec un tropisme oculaire et neuronal et qui sont donc responsables de lésions oculaires sévères. Chez ces patients une réponse immunitaire de type Th2 est observée.

Une étude comparative évaluant les concentrations cytokiniques dans l'humeur aqueuse de patients colombiens et français atteints de TO, a souligné la présence d'une différence souche-dépendant de l'expression d'IL-17A. En effet, chez les patients français, une augmentation de la synthèse de l'IL-17A est observée alors que les patients colombiens présentent des taux d'IL-17A plus faibles dans l'humeur aqueuse avec des lésions rétinienne plus sévères (de-la-Torre et al., 2013).

Lors de l'infection par *T. gondii*, l'IL-17A est associée aux événements inflammatoires néfastes pour l'hôte, elle induit un afflux massif des cellules inflammatoires, notamment, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. *In vivo*, l'IL-17A joue un rôle dans les lésions induites par l'infection au niveau de la rétine et ce, de façon variable selon la virulence de la souche en cause. Cependant, les voies de régulation et de modulation de l'IL-17A par *T. gondii* restent peu connues.

Au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes fondamentaux de l'interaction hôte-pathogène en se focalisant sur la modulation de l'expression de la cytokine inflammatoire IL-17A et sa régulation lors de l'infection toxoplasmique.

Les objectifs de ce travail sont de trois ordres :

- 1) Etude de l'influence du type cellulaire et de la souche parasitaire sur l'expression de l'IL-17A.
- 2) Etude du rôle de la protéine parasitaire ROP16, facteur clé dans la virulence des souches et la modulation de nombreux facteurs de transcription de l'hôte, dans la régulation de l'IL-17A.

- 3) Etude de la nature des interactions entre le facteur de transcription cellulaire UHRF1 et le promoteur de l'*IL-17A* et son rôle dans cette régulation. En effet, UHRF1 est connu pour être un régulateur épigénétique capable de recruter plusieurs enzymes responsables de modifications de la chromatine et de faire la liaison entre la méthylation d'ADN et les modifications des histones. UHRF1 coordonne l'inactivation épigénétique de certains gènes en recrutant un complexe multienzymatique. L'objectif de ce travail est donc d'explorer la nature du complexe enzymatique interagissant avec UHRF1 sur le promoteur du gène de l'*IL-17A*.
- 4) Etude de l'implication d'un autre facteur de transcription cellulaire, CTIP2, dans la régulation du gène de l'*IL-17A*.

Ces objectifs seront mis en œuvre *in vitro* dans le modèle cellulaire trophoblastique BeWo dans un premier temps. Ce modèle cellulaire à potentiel syncytial est très utilisé au sein de notre laboratoire, notamment dans l'étude du passage transplacentaire du parasite (Pfaff et al., 2005). Dans un deuxième temps, nous utiliseront les cellules microgliales qui sont des macrophages résidents du système nerveux central, pour l'étude de la régulation de l'*IL-17A* par le facteur de transcription CTIP2.

Ce travail a été réalisé avec une souche de type I (RH), mais également complété par l'utilisation d'autres souches de *T. gondii* présentant des virulences variées comme la souche de type II (Pru) et la souche atypique (LEF).

Les investigations futures devront porter sur les mécanismes de récurrences liés à la persistance des parasites, vraisemblablement, des régulations épigénétiques.

L'ensemble de cette étude a pour objectif final de développer de nouveaux outils thérapeutiques basés sur l'identification de cibles potentielles plus spécifiques.

MATERIELS & METHODES

A) Culture cellulaire

Les travaux de thèse ont été menés sur un modèle de cellules trophoblastiques de placenta humain (cellules Bewo) obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC® CCL-98™). Il s'agit de cellules adhérentes cultivées dans un milieu riche Gibco FK-12 (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), et de 500 µl d'une solution d'antibiotique contenant 10 UI/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine (Hyclone). Les cellules en culture croissent dans une atmosphère à 37 °C, 5 % de CO₂ et une saturation d'humidité à 98 %. Elles sont repiquées tous les 2 jours et le comptage des cellules est fait sur cellule de numération Fast-Read (Dutscher, Brumath, France) après coloration au bleu Trypan (Corning, Corning NY).

B) Culture *in vivo* de *Toxoplasma gondii*

Les tachyzoïtes de la souche RH (type I) sont obtenus par passages successifs de 10⁶ tachyzoïtes injectés par voie intrapéritonéale à des souris Swiss-Webster. Les souris sont euthanasiées 4 jours plus tard par inhalation d'isoflurane. Le liquide d'ascite est récupéré par ponction et lavage de la cavité péritonéale avec du PBS stérile. Les tachyzoïtes sont comptés au microscope optique sur l'hématimètre de Neubauer (Fast-Read, Dutcher) en présence du bleu de trypan.

C) Culture *in vitro* de *Toxoplasma gondii*

La culture des tachyzoïtes des souches PRU (type II), LEF (atypique) (provenant du CRB *Toxoplasma*; Laboratoire de Parasitologie, CHU Reims, France) et les souches RH ROP16 KO et PRU ROP16I (obtenues du laboratoire du Dr Mohamed-Ali Hakimi) est réalisée *in vitro* sur les cellules MRC5 (cellules pulmonaires de fœtus humain) dans des flasques de 75 cm² dans du milieu RPMI-1640 + 10 % de sérum de veau fœtal inactivé + 500 µl d'antibiotiques (10 UI/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine). Les MRC5 préalablement amplifiées sont infectées avec un ratio d'infection 1 : 1 et les cultures cellulaires sont maintenues à 37 °C, sous 5 % de CO₂.

D) Préparation et amplification des plasmides

La préparation de plasmides est faite par transformation bactérienne dans une souche DH5α chimio-compétente par choc thermique. 1 µl de plasmide (1 ng/µl) est mis en présence de 50 µl de bactéries (Subcloning Efficiency DH5α, Chemically Competent Cells, Invitrogen) et incubé 5 min sur la glace puis 5 min dans un bain-marie à 37°C et enfin 2 min sur la glace. 250 µl de milieu de préculture chaud (37°C) est ajouté et incubé à 37°C pendant 60 min. Les bactéries sont ensuite étalées stérilement sur un milieu gélosé LB broth supplémenté par l'antibiotique dont le plasmide à amplifier porte la résistance (par exemple ampicilline à 100 µg/ml) et incubées toute la nuit à l'étuve à 37°C. Un starter est réalisé par ensemencement d'une colonie sélectionnée dans un volume de 5 ml de milieu liquide LB broth + 5 µl d'ampicilline (100 mg/ml), durant la journée à 37°C sous agitation (225rpm). Ce starter va permettre de savoir si les bactéries de la colonie piquée ont acquis le plasmide. En fin de journée, quand le starter est trouble, 1 à 2 ml sont placés dans un Erlenmeyer avec 250 ml de milieu liquide LB broth et 250 µl d'ampicilline (100µg/ml) en agitation toute la nuit (225 rpm) à 37°C. Pour finir, l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique amplifié est

effectuée par un kit de midi-préparation (Qiagen, Valencia) selon les recommandations du fournisseur.

E) Transfection

Lorsque les cellules sont à environ 60 % de confluence, elles sont transfectées à l'aide de XtremeGENE® (Roche), qui est un agent de transfection de formulation non liposomale. Le mélange de transfection pour un puits (d'une plaque 6 puits) est le suivant : 100 µl de milieu sans sérum, 18 µl de XtremeGENE® et 10 µg de plasmide d'intérêt. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante avant d'être ajouté au puits contenant la culture cellulaire. Les cellules sont récoltées 24 h ou 48 h (en cas d'infection avec *T. gondii*) post-transfection à l'aide de 500 µl de tampon de lyse Bright-Glo luciférase assay buffer (Promega).

Pour les cellules cultivées en boîte de Pétri, le mélange de transfection est le suivant : 600 µl de milieu sans sérum, 18 µl de XtremeGENE® et 10 µg de plasmide d'intérêt. Les cellules sont récupérées après 24h post-transfection à l'aide de trypsine (Gibco by Life Technologies) et les extraits sont analysés par Western blot.

F) Mesure de l'activité du promoteur de l'*IL-17A* par le système luciférase

La technique de luciférase permet d'analyser l'expression du promoteur d'un gène, en le couplant au gène codant pour la luciférase. Le gène de la luciférase est utilisé en biologie moléculaire en tant que gène rapporteur. Placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'*IL-17 A (IL-17A- luc)*, ce gène rapporteur codant pour la luciférase est transcrit et traduit en fonction de l'activité promotrice. La quantification de l'activité enzymatique luciférase permet donc d'évaluer l'activité du promoteur. En milieu contenant de la luciférine et de l'ATP, la luciférase synthétisée est responsable d'une émission lumineuse quantifiable par luminométrie à l'obscurité. Les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines, dosées par la méthode de Bradford.

G) Immunoprécipitation (IP)

Cette technique permet d'isoler et de concentrer la protéine d'intérêt (UHRF1) dans un échantillon contenant plusieurs protéines. L'immunoprécipitation d'UHRF1 est réalisée sur des extraits de cellules Bewo infectées par *T. gondii* avec une cinétique d'infection : 0, 1, 3, 6, 12 et 24 heures. Les extraits protéiques de ces cellules sont incubés avec des billes de protéines G (Sigma-Aldrich) et du PBS+PIC (cocktail inhibiteur de protéases) pendant 2 h à 4°C. Après centrifugation, le surnageant clarifié est incubé pendant 4 – 5 heures à 4 °C sous agitation avec l'anticorps cible (anti-UHRF1) ou l'isotype contrôle IgG. Les billes de protéine G sont ensuite ajoutées et les échantillons incubés toute la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, 4 lavages des billes sont réalisés avec une solution de PBS+PIC. Les billes sont ensuite reprises dans 300 µl de tampon de charge 8X et conservées à -20°C. Les extraits seront ensuite analysés par Western Blot.

H) Western Blot (WB)

Le WB est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter. Le WB permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe en utilisant l'électrophorèse sur gel d'acrylamide

(gels à 10 ou 15 %). Les extraits protéiques sont analysés dans des conditions dénaturantes (0.1 % de SDS). Trente microgrammes de protéines totales sont mélangés à du tampon de dissociation et incubées 5 min à 100°C. Les extraits protéiques sont déposés dans les puits du gel en parallèle de 8 µl de marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Standards, BioRad). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF préalablement activée dans l'éthanol 100 %, pendant 1h à 250 mA. Après le transfert, la membrane est incubée dans une solution de blocage (PBS contenant 5 % de lait en poudre) pendant 30 min à température ambiante puis une deuxième incubation est faite avec les anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêts toute la nuit à 4 °C, sous agitation.

La détection des protéines d'intérêts se fait à l'aide d'un anticorps secondaire (anti-IgG de souris couplé à une peroxydase) dirigé contre l'anticorps primaire, pendant 1h à température ambiante sous agitation. La révélation se fait à l'aide d'un substrat chimioluminescent de l'enzyme. Une solution composée d'un mélange volume à volume de peroxydase et luminol (kit Clarity Western ECL Substrat, BioRad) est déposé sur la membrane pendant une minute. La lecture se fait au ChemiDoc (BioRad) et les images sont acquises par le logiciel ImageLab (version 5.1, BioRad).

I) Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

L'immunoprécipitation de la chromatine est une méthode qui permet de déterminer les sites de liaison de l'ADN sur le génome pour une protéine particulière et donne accès à une représentation des interactions protéine-ADN qui ont lieu dans le noyau de la cellule vivante. Le principe à la base de ce procédé est que les protéines qui se lient à l'ADN peuvent être réticulées avec l'ADN auquel elles sont liées. En employant un anticorps spécifique d'une protéine présumée liée à l'ADN, on peut faire une immunoprécipitation du complexe protéine-ADN du lysat cellulaire. La réticulation s'obtient souvent par l'action du formaldéhyde sur les cellules pendant 10 min, puis la réaction est stoppée par addition de glycine pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées avec du PBS froid entre chaque étape, et la récolte se fait par raclage cellulaire dans du PBS supplémenté de PMSF et de PIC. Après centrifugation à 2 500 rpm pendant 10 min à 4°C, les culots cellulaires sont conservés à -80°C. Ces culots cellulaires sont ensuite lysés pendant 30 min avec du Lysis Buffer à 4°C, puis transférés dans un homogénéiseur et lentement broyés à froid. Chaque broyat est ensuite récupéré et centrifugé à 5 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le culot contenant les noyaux cellulaires est ensuite remis en suspension dans du Digestion Buffer puis incubé 5 min à 37°C. La digestion enzymatique est alors réalisée par un cocktail enzymatique, lors d'une incubation à 37°C pendant 1 heure. La réaction est stoppée par addition d'EDTA suivie par une incubation de 10 min à 4°C. Après centrifugation à 15 000 rpm pendant 10 min à 4°C, les surnageants contenant la chromatine fragmentée peuvent être conservés à -80°C.

Un dosage des protéines contenues dans les surnageants est effectué par la méthode de Bradford avec une gamme étalon de BSA de 8 points allant de 0 à 1 mg/mL (à partir d'une solution stock d'Albumin Standard 2mg/mL, Thermo Scientific). Dans une plaque de 96 puits, 250µL de Réactif de Bradford ainsi que 10µL d'échantillons (dilués ou non) ou de gamme étalon sont déposés par puits. La densité optique est lue à 590 nm au spectrophotomètre. Une droite de régression est réalisée à partir de la gamme et les concentrations protéiques des échantillons sont calculées en fonction de la gamme (en tenant compte de la dilution de l'échantillon). Les surnageants sont alors divisés en 3 : une partie est

conservée comme Input (ADN avant ChIP), et les 2 autres sont incubés sous agitation à 4°C durant une nuit avec les billes magnétiques fournies par le kit et soit les anticorps d'intérêt (liste des anticorps en annexe) soit des IgG isotypiques (contrôle négatif).

Les billes sont ensuite lavées et incubées 15 min avec 100 µL de tampon d'éluion avant d'être centrifugées pour récupérer le surnageant. Les surnageants des ChIP ainsi que les Inputs sont incubés 2,5 heures à 65°C. L'ADN est ensuite extrait par une protéinase K pendant 1 heure à 37°C, la réaction est alors stoppée et les échantillons conservés à -20°C avant d'être amplifiés par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Les résultats sont exprimés en pourcentage du rapport de l'ADN immunoprécipité (normalisé par le contrôle isotypique) sur l'ADN Input non immunoprécipité.

J) Cytométrie en flux

Les cellules BeWo sont cultivées en boîtes de Pétri et infectées par *T. gondii* lorsqu'elles sont à environ 70 – 80 % de confluence avec un rapport d'infection de 1 : 1. Après les temps d'infection, les cellules sont récoltées à l'aide de la trypsine (Invitrogen) et lavées 3 fois au PBS. Elles sont ensuite fixées pendant 20 min sur glace avec du formaldéhyde, puis lavées au PBS et reprise dans 1 ml d'éthanol pur. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires anti-IL17A souris et le sérum polyclonal anti-*T. gondii* de lapin pendant 45 min et ensuite les cellules sont lavées et réincubées pendant 45 min avec les anticorps secondaires marqués Alexa 488 anti-Ig de lapin et Alexa 647 anti-Ig de souris. Les cellules sont ensuite lavées et la fluorescence est analysée par cytométrie en flux (FACScan flow cytometer) sur 20 000 cellules et les données sont analysées avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

K) Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test t de Student sur le logiciel GraphPad PRISM 6. Les données qui sont présentées correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes effectuées en triplicats. Une valeur p inférieures à 0.05 est considérée comme significative.

RESULTATS

A) Première partie : ARTICLE à soumettre

« Régulation de l'expression de la cytokine IL-17A dans le cas d'une infection par *Toxoplasma gondii* »

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire obligatoire, capable de moduler différentes voies de signalisation de la cellule hôte afin de se multiplier et d'échapper à la réponse immunitaire. Cependant, des formes sévères de toxoplasmose, notamment, la toxoplasmose oculaire, sont expliquées par une réponse inflammatoire trop importante médiée entre autre par la cytokine IL-17A et aboutissant à la destruction du tissu rétinien. Il a été montré que l'IL-17A peut être considérée comme un facteur prédictif de sévérité et que la diversité des formes cliniques observée semble liée à la variabilité des souches de *T. gondii*. En effet, des différences effectives de cette réponse ont pu être observées chez l'homme en fonction de la souche de *T. gondii* infectante. Une étude comparative évaluant les concentrations cytokiniques dans l'humeur aqueuse de patients colombiens et français atteints de toxoplasmose oculaire, confirme aussi cette différence d'expression d'IL-17A souche dépendante (de-la-Torre et al., 2013).

Par ailleurs, l'invasion parasitaire est associée à l'activation d'UHRF1 entraînant des modifications dans les cellules infectées de façon souche-dépendante. UHRF1 a un rôle prédominant dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la cancérogénèse et les modifications épigénétiques. Aussi, de nombreuses protéines parasitaires polymorphiques sont désormais connues pour moduler différentes voies de signalisation de la cellule hôte. Une étude récente a montré que *T. gondii* pouvait moduler directement le facteur de transcription UHRF1 par l'intermédiaire d'un facteur parasitaire sécrété lors de la phase d'invasion de la cellule hôte, ROP16, une protéine de rhoptrie. ROP16 est une protéine-kinase connue pour moduler les facteurs de transcription STAT 3/5/6 et est responsable de l'activation et de la phosphorylation d'UHRF1 induisant ainsi sa surexpression dans les cellules infectées.

Une étude préliminaire effectuée au laboratoire par Bio-Plex avait permis de mettre en évidence l'implication du facteur de transcription UHRF1 dans la régulation de l'expression de l'IL-17A. En l'absence d'expression d'UHRF1, nous avons observé une augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* et de son expression protéique.

Par analyse ChIP, nous avons montré qu'UHRF1 était capable de se fixer sur le promoteur de l'*IL-17A*. Plusieurs facteurs de transcription agissent en association et pour cela notre travail s'est élargi à l'étude de l'interaction d'UHRF1 avec des facteurs de transcription comme STAT3, STAT5 et NF-KB. D'une part, ces facteurs sont connus pour se fixer sur le promoteur de l'*IL-17A* et d'autre part, pour être activé par le parasite (Gaffen, 2011; Ong et al., 2010; Rosowski et al., 2011; Yamamoto et al., 2009).

L'objectif de cet article est d'étudier la modulation de l'expression de la cytokine IL-17A et de déterminer son mécanisme de régulation par le facteur de transcription UHRF1 dans un contexte d'infection par *T. gondii*, en évaluant l'impact des autres facteurs de transcription cellulaires sur cette régulation.

Dans cette étude, menée *in vitro* sur le modèle cellulaire BeWo, nous avons montré que :

- La régulation du promoteur de l'*IL-17A* dépend de la cellule hôte. Elle est souche-dépendante et pourrait être gouvernée par la protéine parasitaire ROP16.
- UHRF1 se fixe sur le promoteur du gène de l'*IL-17A* et que cette fixation était indépendante de STAT 3/5 et NF-KB.
- L'expression de l'*IL-17A* semble augmenter en l'absence d'UHRF1.
- L'activation du gène de l'*IL-17A* est régulée de façon épigénétique et fait intervenir la méthylation et l'acétylation de l'Histone H3. Ces phénomènes pourraient être dus au recrutement des enzymes de l'épigénétique comme les HDACs, les DNMTs et G9a *via* UHRF1.

La méthylation de l'ADN est un phénomène connu pour être responsable de la répression des gènes. Ainsi, UHRF1 est recruté sur le promoteur du gène de l'*IL-17A* pendant l'infection, où il induit des modifications épigénétiques qui conduisent à la formation de l'hétérochromatine. Dans les cellules infectées par *Toxoplasma*, UHRF1 interagit avec HDAC1, HDAC2 et DNMT1 pour former un complexe répressif. Cette interaction conduit à la désacétylation de l'histone H3 et à la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) situées sur le promoteur du gène de l'*IL-17A* et ainsi, à l'inactivation du gène.

Ce genre d'expérience permet de comprendre les mécanismes physiopathologiques déployés par les souches et pourrait servir de base au développement de thérapies personnalisées.

Regulation of IL-17A expression during *Toxoplasma gondii* infection

Faïza Fahmi-Bittich, Alexander W Pfaff, Christian Schwartz, Cécile Doderer-Lang, Julie Denis, Marcela Sabou, Julie Brunet

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, EA 7292 «Dynamics of host-pathogen interactions», Université de Strasbourg; 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, IL-17A, ROP16, UHRF1, epigenetic regulation

ABSTRACT

Toxoplasmosis is caused by an obligate intracellular protozoan, *Toxoplasma gondii*, which is capable of modulating various signaling pathways of the host cell in order to multiply and to evade the immune response. However, severe clinical forms like ocular toxoplasmosis (OT) are explained by an excessive inflammatory response. The inflammatory cytokine IL-17A has been identified as a marker of disease severity. South American patients have more severe forms of ocular toxoplasmosis than European patients, due to the existence of more virulent *T. gondii* strains in South America. This difference in the virulence of the strains leads to markedly different cytokine profiles. However, the mechanisms of IL-17A regulation *in vitro* are still unknown. During this work, we show that the regulation of the *IL-17A* promoter in infected cells varies according to cell type and parasite strain. This strain-dependent regulation is modulated by the polymorphic protein ROP16. Furthermore, the transcription factor UHRF1 is overexpressed in cells infected with *T. gondii* via the action of ROP16 and other parasite proteins, but the mechanisms of action are still unknown. In addition, our preliminary results show that the activation of the *IL-17A* promoter is controlled by epigenetic modulation that may involve histone modifications, by acetylation or methylation. These epigenetic phenomena could be due to the recruitment of enzymes such as HDACs, DNMTs and G9a via UHRF1.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a ubiquitous protozoan parasite which infects humans and all warm-blooded vertebrates. It infects up to 50% of the human population worldwide (Dubey, 2007). Toxoplasmosis is generally asymptomatic, but it can be severe during pregnancy and in immunocompromised patients (Montoya and Liesenfeld, 2004). Because *Toxoplasma* infection is most often asymptomatic, it is evident that this parasite has developed sophisticated ways to manipulate host immunity in order to establish a lifelong chronic infection that target neuronal tissues such as the retina and the brain.

The genus *Toxoplasma* consists of a single species, *T. gondii*, but several strains have been described. Although they are genetically identical to 98%, three major clonal lineages, with varying degrees of virulence, have been identified in Europe and North America. Type I strains are highly virulent in mice, whereas strain types II and III are less virulent and can establish latent infection (Saeij et al., 2005; Sibley and Ajioka, 2008). In France, there is a clear predominance of type II strains, which represent more than 85% of (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). In contrast, in South America, a great variety of heterogeneous atypical genotypes has been described, often associated with severe infections (Su et al., 2012).

It is well established that *Toxoplasma* actively interferes with host cell signaling during intracellular infection in order to achieve intracellular persistence (LENG et al., 2009). *T. gondii* modulates and hijacks host cell pathways involved in various processes such as apoptosis, growth, inflammation and metabolism (Hakimi and Bougdour, 2015). *T. gondii* is capable of blocking pathways leading to apoptosis and interfering with proinflammatory responses. However, how these suppressive effects occur is less well known (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2005; Zimmermann et al., 2006).

Previous studies showed that the parasite manipulates the host cell signaling pathways by secreting different proteins, among which rhoptry proteins. ROP16 was identified as a key polymorphic virulence factor which determines the difference between strains (Saeij et al., 2006). This rhoptry protein is a kinase that is injected into the cytoplasm during parasite invasion, and can also enter the nucleus where it binds to target genes to enhance their transcription. Recently, the signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway has been identified as a major target of interference. Among these target genes there are STAT3, STAT5 and STAT6 (Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009). *Toxoplasma* strain type is an important determinant of activation of STAT signaling pathways during intracellular infection (Saeij et al., 2007). Type I strains express a ROP16 allele associated with prolonged activation of STAT3 and STAT6 signaling, whereas type II strains activate this pathway only transiently (Denkers et al., 2012). These STAT proteins are involved in the regulation of various cellular processes like growth, differentiation, survival or apoptosis and in the regulation of the immune response.

Other transcription factors are known to be modulated by *T. gondii* such as, NF- κ B and UHRF1. In fact, to achieve intracellular persistence, *T. gondii* modulates and hijacks a large number of transcription factors to its advantage in order to create an environment favorable to its development, and to escape the immune response (Hakimi and Bougdour, 2015). Microarray experiments have shown that more than 1000 genes in the host cell are modulated by the parasite (Blader et al., 2001). UHRF1 (Ubiquitin-like containing PHD and Ring Fingers domain 1) is one of these genes modulated by the parasite. It is a nuclear protein, composed of 5 structural domains which is involved in cell proliferation, carcinogenesis and DNA repair (Bronner et al., 2013). Also, UHRF1 appears to be a central element in epigenetic phenomenon. Epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone modification, involve reversible and transmissible modifications of gene expression without modification of DNA sequence (Munshi et al., 2009). In fact, UHRF1 has several phosphorylation sites involved in DNA binding and through its different domains it is able to recruit epigenetic enzymes such as DNMT1, G9a, HDAC1/2 and SuV39H1. Thus, UHRF1 is involved in "gene silencing" by recruiting a repressive multienzymatic complex, promoting heterochromatin environment formation in the target genes (Bronner et al., 2013).

Moreover, previous studies of our laboratory have shown that infection-induced upregulation of UHRF1 expression is responsible for the host-cell arrest at the G2 phase and is essential for parasite proliferation. In fact, the increase in post-infection UHRF1 expression was correlated with a decrease in expression of cyclin B1. Cyclin B1 is known to be the target gene of UHRF1 (Brunet et al., 2008). In addition, we have identified a new parasite strategy involving ROP16 in UHRF1 activation, which induces *cyclin B1* inhibition, through recruitment of phosphorylated UHRF1 associated to a repressive multienzymatic complex (Sabou et al., 2019).

T. gondii is thus able to modulate the expression of genes via, among others, two important epigenetic modifications: the methylation of DNA and the modification of histones. Other genes have also been described to be regulated by the parasite in this way, such as TNF- α and IFN- γ (Leng et al., 2009). *Cyclin B1* is therefore probably not the only UHRF1 target gene in toxoplasma-infected cells. A multiplex assay revealed 3 cytokines modulated by UHRF1 during infection: IL-17A, GM-CSF (Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor) and PDGF (Platelet-derived growth factor).

Severe clinical forms like ocular toxoplasmosis (OT) are explained by an excessive inflammatory response. The mechanisms that regulate this inflammatory process in OT are poorly understood. Our previous studies have identified interleukin-17A (IL-17A) as a marker for disease severity. IL-17A has been shown as being strongly up-regulated during OT in human patients, and specific of the toxoplasmic etiology patients with uveitis (Lahmar *et al.*, 2009).

In ocular toxoplasmosis, the cytokine profiles are relatively homogeneous and some cytokines are often found to be overexpressed. Diverse studies realized in mice

infected with type II strains of *T. gondii* have demonstrated that after a first infection, the Th17 response is predominant and it is rapidly counterbalanced by Th1/Th2/Treg response. A Th17 response is important in reactivation and permits an optimal anti-parasitic effect. In fact, 70% of cases of patients with ocular toxoplasmosis present an overexpression of IL-17A, in addition to a strong IFN- γ expression. In contrast, non-*Toxoplasma* uveitis cases do not present IL-17A overexpression, which could be at the origin of the detrimental inflammatory process (Sauer *et al.*, 2015).

IL-17A is involved in the host defense against diverse pathogens, among which fungi and bacteria, through recruitment of neutrophils and antimicrobial peptides (Saijo *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2001). On the other hand, IL-17A is a well-known inducer of proinflammatory responses and autoimmune diseases. The exact role of IL-17A during toxoplasmosis is still ambiguous, varying between antipathogenic activity and tissue destruction (Kelly *et al.*, 2005).

The results of a recent study have shown that IL-17A was upregulated in French patients with a type II strain, while Colombian patients with a virulent strain had lower levels of this cytokine (De la Torre *et al.*, 2013). These discrepancies, regarding European and South American patients, might result from the genetic differences existing between European strains and South-American atypical strains, responsible for widely variable pathophysiology.

Moreover, murine models have improved our knowledge of the adaptive immune response to infection, but the inflammatory Th17 response during toxoplasmosis still remains to be explored. Furthermore, the fundamental mechanisms describing the parasitic effectors involved in the modulation of interleukin-17 production, linked to the severity of immune-pathological phenomena, are largely unknown.

Here we report the IL-17A regulation through UHRF1 during *T. gondii* infection. We show that the regulation of the *IL-17A* promoter can be controlled by epigenetic methylation and acetylation of histone H3, involving recruitment of enzymes such as HDACs, DNMT and G9a by UHRF1. Furthermore, we show that this regulation is strain-dependent and ruled by the parasitic protein ROP16.

MATERIALS AND METHODS

Cells and parasites

The human trophoblast cell line BeWo was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured in FK12 medium (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), supplemented with 10% heat inactivated FCS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin (Invitrogen). The human astrocytic, Müller and microglia cells lines was cultured in DMEM medium (Fisher Scientific), supplemented as above plus 2mM glutamine. Cell cultures were kept at 37°C, 5% CO₂ and cell numbers were determined with a Neubauer cell counting chamber using a Trypan blue (Corning, Corning NY) exclusion test.

The virulent RH *T. gondii* strain was obtained from the French Biological Resource Center *Toxoplasma* (CRB *Toxoplasma*; Laboratoire de Parasitologie, CHU Reims, France). Tachyzoites were maintained in Swiss-Webster mice. Before use, they were washed twice in PBS and counted using the Trypan blue exclusion test before use.

PRU and LEF strains of *T. gondii* were also obtained from the French Biological Resource Center. Tachyzoites were grown *in vitro*, into THP1 cells. Cell cultures were maintained at 37 °C and 5% of CO₂. Four to five days later, the PRU and LEF tachyzoites were recovered by centrifugation of the cell supernatant for 5 minutes at 3000 rpm. The parasites were washed twice in PBS and counted using the trypan blue.

RH ROP16 KO and PRU ROP16 I strains were generously donated by Doctor Mohamed-Ali Hakimi, University of Grenoble, France.

Transfection of host cells and luciferase assays

BeWo, astrocytes, müller and microglia cells were transfected with pGL3-IL17A-Luc plasmid (Addgene) (2µg/well) for 24 hours with X-tremeGENE™ (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) transfection reagent and infected with *T. gondii* for the indicated times and harvested for luciferase activity measurements with 500 µL of Bright-Glo luciferase assay Buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Results are expressed as a ratio of the protein quantification.

Chemicals and antibodies

Polyclonal anti-*T. gondii* antibody was raised in New Zealand rabbits by several injections of 50 µg of soluble *T. gondii* antigen suspended in Freund's incomplete adjuvant. The IgG fraction of this serum was purified by chromatography on DEAE Trisacryl (1 M) and tested by ELISA. The mouse monoclonal antibody against IL-17A was obtained from Abcam. The anti-HDAC1/2 mouse monoclonal and anti-actin mouse monoclonal antibodies or anti-G9a rabbit polyclonal antibody or anti-DNMT1 rabbit polyclonal antibody were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG-peroxidase, donkey F(ab')₂ fragment anti-rabbit IgG-peroxidase, Tween-20 and the protease inhibitor cocktail were purchased from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). G 418 was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO).

The ECL detection system was obtained from Amersham Biosciences (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France). TriReagent was purchased from Molecular Research Center (Cincinnati, OH).

Flow cytometry

BeWo cells were grown in six-well plates (Dutscher, Brumath, France) and infected at sub-confluent conditions with *T. gondii* for the indicated times at 37°C. The cells were harvested by trypsination (Fisher Scientific) and gently washed three times with 1 ml of PBS. Cell suspensions were fixed by incubation for 15 minutes on ice in 0.4 ml of 5% formaldehyde in PBS (v/v), washed with PBS; then resuspended in 1 ml of absolute ethanol and stored at -20°C until use. Infected cells were identified by flow cytometry. Briefly, cells were washed and stained for 45 minutes with rabbit anti-*T. gondii* IgG antibody and with mouse anti-IL-17A antibody. Then, samples were washed and incubated with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit for 45 min and washed again. Fluorescence was measured in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and analyzed with the CellQuest software package.

Western blotting and co-immunoprecipitation

Blots were probed with the indicated antibodies at 1 µg/ml. For co-immunoprecipitation of UHRF1, infected or uninfected cell extracts were incubated with protein G beads coupled to anti-UHRF1 monoclonal antibody (5 µg) in 1 ml PBS supplemented with protease inhibitors for 2 h at 4°C. Beads were washed five times with PBS and bound proteins were removed from the beads, denatured using loading buffer and separated on 10% SDS-PAGE gels, blotted and finally probed with 1 µg/ml of antibodies. Secondary peroxidase conjugated antibodies were used at 0.16 µg/ml. Signals were visualized by chemiluminescence using the ECL detection system.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis

Cells were cultured in 10 cm dishes and then infected with *T. gondii* for the indicated times. ChIP was performed according to manufacturer's recommendations (ChIP-IT Express enzymatic kit, Active Motif, CA, USA). The supernatant containing the sheared chromatin was incubated with anti-HDAC1/2, or anti-DNMT1, or anti-G9a, or anti-Actin (as negative control) antibodies and magnetic beads overnight at 4°C on a roller shaker. The beads were washed and incubated with 100 µl of elution buffer at

65°C for 2.5 hours. Cross-linking was reversed by 1.5 hours incubation with 2 µl of proteinase K at 37°C. DNA was extracted using the QiaMini Kit (Qiagen). DNA samples from the ChIP experiments were subjected to PCR using *IL-17A* primers (sense 5'-GCA GCA CTG CTC AGC TTC TAA CA-3', antisense 5'-TGG CGT GTC GCA GTG GGT TC-3') and TaqDNA polymerase (Invitrogen). The reaction contents were heated to 94°C for 15 min for polymerase activation followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final step at 72°C for 7 min.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t* test. Data are shown as means ± SEM. A *p* value below 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Modulation of the *IL-17A* promoter in *T. gondii* infected cells depends on cell type

First, we wanted to study the kinetics of *IL-17A* promoter activation upon *T. gondii* infection. First, BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase (*IL-17A-luc*) reporter plasmid, followed by infection with the virulent RH strain of *T. gondii*. Infection significantly induced *IL17-A* promoter activity with a peak of activation at 6 h post infection (Figure 1 A).

We also examined the effect of *T. gondii* infection on *IL17-A* promoter activity in astrocytes, Microglial cells and Müller cells, potential targets of *T. gondii* in the eye. In contrast to BeWo cells, we observed a slower, continuous increase of *IL-17A* promoter activity in astrocytes and Müller cells (Figures 1B and 1D). *IL-17A* promoter activity was only slightly enhanced at 12 h post infection in microglial cells (Figures 1 C).

We then looked at *IL-17A* expression on the protein level following *T. gondii* infection in BeWo cells, by flow cytometry. Six hours post-infection, *IL-17A* protein expression was increased (Figure 1 E). These results confirmed the functional activation of *IL-17A* promoter in infected cells and illustrated that the immune response is apparently regulated by *T. gondii* infection, with different kinetics between cell types.

Strain-dependent modulation of *IL-17A* promoter

Next, we wanted to evaluate the effect of different *T. gondii* strains in *IL-17A* modulation. First, BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase (*IL-17A-luc*) reporter plasmid, followed by infection with different *T. gondii* strains: RH (Type I), PRU (Type II) and LEF (Atypical) strains at a moi of 1:1. *IL-17A* promoter luciferase activity was measured by luminometry. The analysis showed a notable difference in *IL-17A* modulation between parasite strains (Figure 2). As before, we observed a rapid activation of the *IL-17A* gene promoter with an activation peak at 6 h post-infection with the type I RH strain. The type II PRU strain induced a similar, but delayed profile, with maximal activation at 24 h post-infection. As for the atypical LEF strain, the infected cells showed a singular profile with intense activation as early as 3 hours post-infection which is then maintained until 24 hours post-infection.

ROP16-dependent activation of *IL-17A* promoter

ROP16 is one of the best characterized virulence factors determining strain differences in toxoplasmic infection. We therefore investigated the role of this

secreted protein using a genetically engineered *Toxoplasma* mutant: RH ROP16 KO, a RH parasite deficient for the *rop16* gene.

BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase reporter plasmid, followed by infection with the RH ROP16 KO strain or with the wild type RH strain. The analysis showed a significant difference for the ROP16 deficient strain, compared with the wild type RH strain (Figure 3A). The *IL-17A* promoter was not activated in cells infected with RH ROP16 KO parasites, in contrast to those infected with RH wild type parasites.

We then looked for IL-17A expression on the protein level. Bewo cells were infected with the wild type RH strain or with the RH parasite deficient for the *rop16* gene at a moi 1:1 and then IL-17A expression was measured by flow cytometry (Figure 3B). A significant increase in IL-17A level was observed at 6 and 12 h post-infection in RH wild type infected cells, but again not in cells infected with RH ROP16 KO strain.

Together, these results suggest that the activation of the *IL-17A* promoter and the expression of IL-17A protein are ROP16-dependent.

To further investigate the role of ROP16, BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase (*IL-17A-luc*) reporter plasmid, followed by infection with different *T. gondii* strains: RH (Type I), PRU (Type II) and PRU ROP16 I strains at a moi of 1:1. PRU ROP16 I strain is a type II strain carrying the gene encoding the protein ROP16 of a type I strain. The effects of this mutation on IL-17A were compared to those obtained with wild type I (RH) and type II (PRU) strains. We observed an overactivation of the *IL-17A* promoter with the PRU ROP16 I strain (Figure 3C). This experiment shows that ROP16 alone does not explain the differences in *IL-17A* promoter activation.

UHRF1 is recruited to the *IL-17A* gene promoter and suppresses its expression in *Toxoplasma*-infected cells

A preliminary proteomic study showed UHRF1 involvement in the regulation of several cytokines including IL-17A (our own observation). To establish if UHRF1 is directly involved in IL-17A regulation, we examined the recruitment of UHRF1 to the *IL-17A* gene promoter during infection by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, followed by IL-17A specific PCR (Figure 4 A). We observed enhanced UHRF1 binding to the *IL-17A* gene promoter at the early phase (1-3 h) post infection.

To further characterize the interaction between UHRF1 protein and *IL-17A* gene promoter, we transfected BeWo cells with UHRF1-siRNA plasmids in the presence or absence of *T. gondii* and evaluated *IL-17A* promoter activity. Cells transfected with an EGFP-siRNA expression plasmid were used as control. We observed a strong activation of the *IL-17A* promoter in cells transfected with UHRF1-siRNA plasmids (Figure 4 B). We then evaluated IL-17A expression under the same conditions. A

significant increase in IL-17A levels was observed at 12 and 24 h post infection in UHRF1 knock-down cells compared with cells transfected with EGFP-siRNA (Figure 4 C).

Taken together, these experiments show that during *T. gondii* infection, UHRF1 negatively regulates IL-17A expression through its recruitment on the *IL-17A* gene promoter.

Epigenetic regulation of the *IL-17A* promoter in *T. gondii* infected cells

We have previously shown that UHRF1 downregulates IL-17A expression during *T. gondii* infection. Considering the central role of UHRF1 in epigenetic modification, we hypothesized that it may regulate IL-17A expression by interfering with the epigenetic machinery. In order to test this hypothesis, BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase reporter plasmid, then treated or not with TSA (Trichostatin A), an inhibitor of HDAC mediated epigenetic modifications, for 12 h, followed by infection with the RH strain.

We observed an increase of *IL-17A* promoter activity in cells treated with TSA during late times of infection (Figure 5 A). This result suggests the presence of epigenetic regulation on the *IL-17A* promoter.

Epigenetic phenomena may involve histone modifications by acetylation or methylation. In order to highlight this type of modifications on the *IL-17A* promoter histones, we performed a ChIP assay using antibodies against acetyl-H3 and H3K9me3, followed by the *IL-17A* gene specific PCR in BeWo infected cells.

As shown in Figure 5 B, Histone H3 is acetylated at 1 h post infection and methylated at 6 and 12 h post infection. These data suggest that promoter activation is epigenetically controlled and its regulation involves methylation and acetylation of histone H3.

UHRF1 interacts with a multienzymatic complex on the *IL-17A* gene promoter to repress its expression

We have previously shown that the activation of the *IL-17A* promoter can be controlled by epigenetic methylation and acetylation of histone H3. These phenomena could be due to the recruitment of epigenetic enzymes such as HDACs, DNMTs and G9a *via* UHRF1. To further establish whether UHRF1 recruits epigenetic enzymes and forms a multienzymatic complex in infected cells, we immunoprecipitated UHRF1 and identified time dependent binding partners by Western Blot.

Western Blot analysis shows the binding of several epigenetic enzymes on UHRF1 (Figure 6). This result indicates that UHRF1 recruits HDAC1 and HDAC2 during the early times of infection, then G9a and DNMT1 during late times of infection.

IL-17A promoter activity modulation by STAT3 and STAT5

Cellular transcription factors like STAT3 and STAT5 are known to be activated by the parasite and to bind to the IL-17A promoter (Ong et al., 2010; Rosowski et al., 2011; Yamamoto et al., 2009). To analyze the role of these factors in *IL-17A* regulation, we transfected BeWo with sh-STAT3, sh-STAT5 or the respective controls (sh-STAT3 CTRL or sh-STAT5 CTRL). We then infected the cells with RH strain parasites and measured *IL-17A* promoter activity by luciferase assay.

We did not observe any significant effect of STAT3 down-regulation on *IL-17A* promoter activation (Figure 7 A). However, the absence of STAT5 induces a significant increase in *IL-17A* promoter activity at 6 hours post-infection (Figure 7 B).

We then repeated the same experience without infection and observed that the inhibition of STAT3 induces a significant decrease of *IL-17A* promoter activity, while the inhibition of STAT5 induces a significant increase of *IL-17A* promoter activity, highlighting the positive activities of STAT3 on *IL-17A* promoter and the inhibitory role of STAT5 in this promoter (Figure 7 C).

UHRF1 promoter modulation by STAT3, STAT5 and NF-κB

Previously, we have shown that UHRF1 binds to the *IL-17A* gene promoter but the nature of this interaction remains unknown and could involve other cellular transcription factors like STAT3, STAT5 and NF-κB. It is important to know if these transcription factors interact with the UHRF1 promoter during infection.

To further establish whether these factors are involved in *UHRF1* promoter activation, BeWo cells were transfected with STAT3-siRNA, STAT5-siRNA or NF-κB-siRNA plasmids and then with *UHRF1* promoter luciferase reporter plasmid, followed by infection with the RH strain. An EGFP-siRNA plasmid was used as control. *UHRF1* promoter activity was measured by luciferase assay.

As observed in figure 8A, there was no significant difference in UHRF1 promoter activity with or without STAT3. The same result was observed with STAT5 (Figure 8 B). In contrast, siRNA mediated inhibition of NF-κB induces a significant *UHRF1* promoter activity decrease from 3 h post-infection (Figure 8 C). Taken together, these results indicate that activation of the *UHRF1* promoter does not require STAT3 and STAT5 factors, but is promoted by NF-κB binding.

UHRF1 binding to IL-17A promoter is independent of STAT3, STAT5 and NF-κB

UHRF1 is recruited to the *IL-17A* gene promoter and negatively regulates IL-17A expression. As several transcription factors act in combination, we addressed the role of STAT3, STAT5 and NF-κB in this regulation. We infected and transfected BeWo cells with STAT3-siRNA or STAT5-siRNA or NF-κB-siRNA plasmids, then

performed a ChIP assay using antibodies against UHRF1. An EGFP-SiRNA plasmid was used as control. We then evaluated the precipitation of the *IL-17A* gene by PCR.

We did not observe any significant difference in UHRF1 binding on *IL-17A* promoter with STAT3-siRNA (Figure 9 A), STAT5-siRNA (Figure 9 B) or NF- κ B-siRNA (Figure 9 C) plasmids, compared to the control. These results suggest that UHRF1 binds to the *IL-17A* promoter independently of these transcription factors.

DISCUSSION

Once infected with *Toxoplasma gondii*, a person or animal harbors the parasite in latent form for the entire life, in target organs, such as the eye or the brain. These latent forms are inaccessible to the usual treatments and can reactivate causing severe complications such as ocular toxoplasmosis (OT). The manifestations of this pathology vary widely, from asymptomatic to severe, and this clinical diversity seems to be correlated with the virulence of infectious parasite strains.

IL-17A has been implicated in a number of autoimmune diseases both in humans and in mouse models (Katz and Nadiv, 2000). Previous studies have highlighted the importance of IL-17A cytokine in OT (Kikumura et al., 2012). Increased levels of IL-17A have been found in samples from patients with OT. In humans, effective differences in this response were observed as a function of the infectious *T. gondii* strain. A comparative study evaluating cytokine concentrations in the aqueous humor of Colombian and French patients with OT also confirms this difference in the expression of IL-17A (de-la-Torre et al., 2013). Atypical, highly virulent strains, common in South America, are associated with severe cases of ocular toxoplasmosis, whereas in Europe type II strains are more often isolated (Fekkar et al., 2011). Despite this clinical importance, the pathophysiology of OT remains poorly studied. Indeed, the complexity of experimental models which could mimic the peculiarities of this infection makes experimental studies specific to OT difficult.

IL-17A is part of a relatively new cytokine family that exhibits potent inflammatory activities, both alone and in association with other cytokines. IL-17A is known to indirectly recruit neutrophils and is implicated in combating extracellular bacterial infections (Happel et al., 2005). IL-17A identification as a potent inflammatory effector during OT, responsible for a strong inflammation and, subsequently, to tissue damage, makes it a potential target for new treatments of OT. IL-17 has been associated with various autoimmune diseases. Elevated expression of IL-17A has been previously reported in many clinical cases, such as rheumatoid arthritis and lung infections (Miossec, 2003; Ruddy et al., 2004). In several studies on murine models of OT, IL-17A expression enhanced parasite proliferation and retinal lesions, and the expression of IL-17A was higher in primary than in reinfection (Rochet et al., 2015; Sauer et al., 2012, 2013). However, the mechanisms of regulation of this

cytokine are not yet well clarified. The objective of our work, therefore, was to study *in vitro* one of the fundamental mechanisms of host-pathogen interaction; the immune response, focusing on the modulation of IL-17A inflammatory cytokine expression.

We first examined the expression of IL-17A during infection with a virulent (type I) strain of *Toxoplasma gondii*. We first observed that the activity of the promoter of the *IL-17A* gene increased during infection with a peak activation at 6 hours post-infection. This promoter activation is associated with a slightly delayed increase in protein expression. We also showed that *IL-17A* promoter activation depends on cell types and *T. gondii* strains. This difference in the IL-17A expression, has previously reported by De-La-Torre *et al.*, 2013. The results of this study showed that IL-17A was upregulated in French patients with a type II strain, while Colombian patients with virulent strains had lower levels of this cytokine. Indeed, atypical strains with strong virulence are more common in the South American continent, and they are associated with severe cases of OT, whereas in Europe type II strains are more often isolated (Fekkar *et al.*, 2011). It would be interesting to compare several atypical strains for their capacity to activate the *IL17A* promoter and correlate this activity to clinical or immunological characteristics of the infected subjects.

Recently, the polymorphic rhopty protein ROP16 was identified as major modulator determining strain virulence (Yamamoto *et al.*, 2009). ROP16 is a highly polymorphic protein kinase, secreted in the host cell nucleus during the parasitic invasion and is known to be implicated in STAT3 gene activation (Yamamoto *et al.*, 2009). IL-23 and IL-6 are also known to have an activating action on STAT3, resulting in a positive regulation of the transcription of *IL-17A* gene (Cho *et al.*, 2006). Further work is required to delineate precisely how IL-6 and IL-23 regulate the transcription of *IL-17A* and how STAT3 contributes to this regulation. However, the regulation and the expression condition of these factors in non-lymphocyte cells remain widely unknown.

Recently, Sabou *et al.*, have shown that the parasitic kinase ROP16 is one of the factors responsible for the UHRF1 activation (Sabou *et al.*, 2019). We show here that the kinase ROP16 is a major factor for the *IL-17A* promoter activation, as the RH ROP16 KO strain did not induce activation of the *IL-17A* promoter, unlike the RH wild type strain. In addition, the presence of ROP16 I in the PRU strain induces overactivation of *IL-17A* promoter. Thus, the addition of the gene for a virulence protein such as ROP16 I in the genome of a strain that is not very virulent accentuates its inflammatory and deleterious response for the eye. This result suggests that ROP16 alone does not explain the differences in activation of the *IL-17A* promoter observed between these strains. Probably, other parasitic effectors could be involved in this regulation, such as the parasitic protein ROP18 by its action on immunity related GTPases (IRGs). ROP18 phosphorylates IRGs in order to allow parasite survival and to promote virulence (Fentress *et al.*, 2010).

Our previous *in vivo* study has revealed that the virulent ROP16 allele induced suppression of IL-17A expression and the absence of visible retinal pathology in RH infected-mice. In contrast, PRU infection causes moderate immune mediated pathology (Rochet et al., 2019). This recalls our results on human OT, which also highlighted an immune induced pathology in type II infections in European patients, whereas the immune ocular response mediated by the IL-17A expression in South American patients was down-regulated and the pathology would be induced by a high parasite proliferation (de-la-Torre et al., 2013).

It is important to maintain the balance between protective and pathogenic effects of IL-17A signaling pathway because dysregulation of IL-17A can lead to excess of inflammation resulting in tissue damage and autoimmune diseases (Amatya et al., 2017). In some cancers, IL-17 seems to act in a pro-cancerogenic way (Lin et al., 2019; Zhang et al., 2020). Therefore, IL-17 neutralization might turn out to be a treatment option. A recent study has been reported that in some cancers, IL17RB is overexpressed and generation of IL17RB Knockout cell lines using CRISPR/Cas9 blocks this pro-cancerogenic effect (Hu et al., 2020). In the same perspective, we can consider the use of this technique in OT to reduce inflammation and block the deleterious effect of IL-17A in the eye. Despite its harmful effects, IL-17A plays an important role in host defense against pathogens. IL-17A has been reported to be involved in preventing *Candida albicans* infections and in maintaining the integrity of the mucosal barrier (Gaffen and Moutsopoulos, 2020).

Moreover, we demonstrate that UHRF1 activated by ROP16 is recruited to the *IL-17A* gene promoter during *T. gondii* infection. We observed that the expression of IL-17A increase when UHRF1 protein expression is neutralized by siRNAs, highlighting the inhibitory effect of UHRF1 on the IL-17A promoter. UHRF1 recruitment induces epigenetic modifications, leading to heterochromatin environment formation and repression of *IL-17A* promoter activity. UHRF1 is also known to be involved in cell cycle regulation, which is disturbed during *T. gondii* infection, allowing parasite proliferation (Brunet et al., 2008). In many cancers, UHRF1 is permanently overexpressed, leading to an uncontrolled cell multiplication (Saidi et al., 2017; Zhu et al., 2015). Recently, high expression of UHRF1 was associated with tumor metastasis (Hu et al., 2019; Oh et al., 2018). Therefore, UHRF1 may be a new potential target molecule for future treatment.

IL-17A is not the only gene targeted by UHRF1 and regulated in an epigenetic manner in infected cells, especially as other cell types, particularly in the immune or neuronal system have been shown to be modulated by *T. gondii* (Leng and Denkers, 2009). In infected cells, Sabou *et al.*, have shown that the parasitic kinase ROP16 is one of the factors responsible for UHRF1 activation, which in turn causes the down-regulation of cyclin B1 and the G2 cell cycle arrest. They demonstrated that activated UHRF1 was recruited to the *cyclin B1* gene promoter during infection and induced

epigenetic modifications, resulting in the formation of a heterochromatin environment and repression of the the *cyclin B1* gene promoter activity. They have identified by mass spectrometry the enzymatic complex recruited by UHRF1 on *cyclin B1* gene promoter.

Our results in infected cells show that UHRF1 recruits HDAC1 and HDAC2 during the early time points of infection and DNMT1 and G9a during late time points. This epigenetic modulation involves methylation and acetylation of histone H3, but the precise molecular mechanisms of UHRF1 interaction with the *IL-17A* gene promoter in parasite-dependent epigenetic events still need to be clarified.

While this mechanism has not been described before in parasitic infections, the regulatory role of UHRF1 was shown for many cancers, through “silencing” of a high number of tumor suppressor genes including *RB1* and *BRCA1* through a DNA methylation-dependent mechanism (Jeanblanc et al., 2005; Jin et al., 2010).

There is a similar transcription factor, the co-repressor COUP-TF interacting protein 2 (CTIP2) that inhibits *HIV-1* gene transcription by recruiting a chromatin-modifying complex and by establishing a heterochromatic environment at the *HIV-1* promoter in microglial cells, leading to *HIV-1* silencing (Le Douce et al., 2012). It would be interesting to evaluate the role of CTIP2 in *IL-17A* promoter activity in infected cells with different *T. gondii* strains. Identification of additional factors able to induce negative regulation at the *IL-17A* promoter could provide more insight in the molecular mechanisms of establishment and maintenance of retinal inflammation.

T. gondii regulates STAT3/6 and NF- κ B by injecting into the host cell cytoplasm rhoptry- or dense granule-localized factors, respectively (Ong et al., 2010; Rosowski et al., 2011; Yamamoto et al., 2009). Among the cellular transcription factors known to be activated by the parasite and to bind to the *IL-17A* promoter are STAT3, STAT5 and NF- κ B. STAT3 and NF- κ B are positive regulators while STAT5 is described as a negative regulator of *IL-17A* gene promoter. Moreover, enhancing activities of STAT3 can be counterbalanced by competitive binding of STAT5 at the same locus (Chen et al., 2006; Laurence et al., 2007; Whitley et al., 2018). In contrast to previous reports, we did not observe an activation of the *IL-17A* gene promoter with STAT3, while we did observe its inhibition by STAT5. This could be a unique feature of the highly specialized BeWo cell line. Further experiments should thus be extended to other cell lines.

In this study, we show that UHRF1 binds to the *IL-17A* gene promoter but the nature of this interaction remains unknown and could involve others cellular transcription like STAT3, STAT5 and NF- κ B. Our results do not indicate a modifying role of these factors in the binding of UHRF1 on the *IL-17A* promoter and therefore, another, yet unknown mechanisms are involved in the modulation of binding of UHRF1 to the *IL-17A* promoter.

Taken together, our findings significantly extend our knowledge about regulation of the *IL-17A* cytokine gene. However, these results were obtained in a BeWo trophoblastic cell model. To obtain insight into these mechanisms during OT, these experiments will have to be carried out on retinal cells, or infiltrating cells such as lymphocytes known to be capable of producing IL-17A. A murine model would also add to our understanding since the modulation of a cytokine should be considered in a more representative *in vivo* environment. Finally, this study should also be extended to the highly pathogenic and variable South American strains, responsible for severe forms of OT.

These findings further advance our understanding of OT and the mechanism involved in pathophysiology of this infection, which leads to the establishment of an inflammatory environment in the eye. As this understanding is crucial for developing innovative therapeutic interventions, our results could be a first step towards such treatment for OT. IL-17A is now a major target for an array of therapeutic monoclonal antibodies such as Secukinumab, Ixekizumab and Brodalumab, involved in treatment of autoimmune diseases like psoriasis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis (Chen et al., 2020; Kurschus and Moos, 2017). Previous studies have reported that IL-17A level was associated with asthma severity (Bullens et al., 2006). In this way, a natural flavonoid Apigenin was developed in order to investigate its anti-inflammatory effects in asthmatic mice. Apigenin has been shown to decrease the IL-17A synthesis by decreasing the expression of NF- κ B in lung tissue in asthmatic mice. This molecule would be a promising candidate for the treatment of asthma (Pang et al., 2019). Finally, other transcription factors, like ROR γ t, a key player in the Th17 lymphocytes differentiation (Ivanov et al., 2006), are interesting targets of future research on new drugs interfering in the IL-17A signaling pathway, with the long-term goal of clinical intervention.

REFERENCES

- Amatya, N., Garg, A.V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 38, 310–322.
- Blader, I.J., Manger, I.D., and Boothroyd, J.C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J. Biol. Chem.* 276, 24223–24231.
- Bronner, C., Krifa, M., and Mousli, M. (2013). Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1643–1649.
- Brunet, J., Pfaff, A.W., Abidi, A., Unoki, M., Nakamura, Y., Guinard, M., Klein, J.-P., Candolfi, E., and Mousli, M. (2008). *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell. Microbiol.* 10, 908–920.
- Bullens, D.M.A., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J., and Ceuppens, J.L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* 7, 135.
- Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., and Denkers, E.Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* 167, 2193–2201.
- Chen, S., Blijdorp, I., van Mens, L., Bowcutt, R., Latuhihin, T., van de Sande, M., Shaw, S., Yeremenko, N., and Baeten, D. (2020). IL-17A and IL-17F expression and functional responses in rheumatoid arthritis and peripheral spondyloarthritis. *J. Rheumatol.*
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.-M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O’Shea, J.J. (2006). Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8137–8142.
- Cho, M.-L., Kang, J.-W., Moon, Y.-M., Nam, H.-J., Jhun, J.-Y., Heo, S.-B., Jin, H.-T., Min, S.-Y., Ju, J.-H., Park, K.-S., et al. (2006). STAT3 and NF-κB Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 176, 5652–5661.
- Denkers, E.Y., Bzik, D.J., Fox, B.A., and Butcher, B.A. (2012). An Inside Job: Hacking into Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Cascades by the Intracellular Protozoan *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 80, 476–482.

- Dubey, J.P. (2007). 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii*, L.M. Weiss, and K. Kim, eds. (London: Academic Press), pp. 1–17.
- Fekkar, A., Ajzenberg, D., Bodaghi, B., Touafek, F., Le Hoang, P., Delmas, J., Robert, P.Y., Dardé, M.L., Mazier, D., and Paris, L. (2011). Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1513–1517.
- Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., et al. (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii* secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 8, 484–495.
- Gaffen, S.L., and Moutsopoulos, N.M. (2020). Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol* 5.
- Hakimi, M.-A., and Bougdour, A. (2015). *Toxoplasma's* ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 26, 24–31.
- Happel, K.I., Dubin, P.J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L.J., Odden, A.R., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., et al. (2005). Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 202, 761–769.
- Hu, O., Provvindo, A., and Zhu, Y. (2020). Generation of IL17RB Knockout Cell Lines Using CRISPR/Cas9-Based Genome Editing. *Methods Mol. Biol.* 2108, 345–353.
- Hu, Q., Qin, Y., Ji, S., Xu, W., Liu, W., Sun, Q., Zhang, Z., Liu, M., Ni, Q., Yu, X., et al. (2019). UHRF1 promotes aerobic glycolysis and proliferation via suppression of SIRT4 in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 452, 226–236.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121–1133.
- Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., Abbady, A.-Q., Siffert, J.-C., Mathieu, E., Muller, C.D., and Bronner, C. (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* 24, 7337–7345.
- Jin, W., Chen, L., Chen, Y., Xu, S.-G., Di, G.-H., Yin, W.-J., Wu, J., and Shao, Z.-M. (2010). UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 123, 359–373.
- Katz, Y., and Nadiv, O. (2000). Interleukin-17 may have a central role in inflammatory joint diseases as a “fine-tuning” cytokine. *Isr. Med. Assoc. J.* 2 *Suppl*, 21–22.

- Kelly, M.N., Kolls, J.K., Happel, K., Schwartzman, J.D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., and Khan, I.A. (2005). Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 73, 617–621.
- Kikumura, A., Ishikawa, T., and Norose, K. (2012). Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *British Journal of Ophthalmology* 96, 1259–1267.
- Kurschus, F.C., and Moos, S. (2017). IL-17 for therapy. *J. Dermatol. Sci.* 87, 221–227.
- Lahmar, I., Abou-Bacar, A., Abdelrahman, T., Guinard, M., Babba, H., Ben Yahia, S., Kairallah, M., Speeg-Schatz, C., Bourcier, T., Sauer, A., et al. (2009). Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J. Infect. Dis.* 199, 1239–1249.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381.
- Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2012). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* 40, 1904–1915.
- Leng, J., and Denkers, E.Y. (2009). *Toxoplasma gondii* Inhibits Covalent Modification of Histone H3 at the IL-10 Promoter in Infected Macrophages. *PLOS ONE* 4, e7589.
- LENG, J., BUTCHER, B.A., and DENKERS, E.Y. (2009). Dysregulation of Macrophage Signal Transduction by *Toxoplasma gondii*: Past Progress and Recent Advances. *Parasite Immunol* 31, 717–728.
- Lin, W., Niu, Z., Zhang, H., Kong, Y., Wang, Z., Yang, X., and Yuan, F. (2019). Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 12, 3604–3612.
- Miossec, P. (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: If T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis & Rheumatism* 48, 594–601.
- Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., and Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36, 75–88.
- Oh, Y.M., Mahar, M., Ewan, E.E., Leahy, K.M., Zhao, G., and Cavalli, V. (2018). Epigenetic regulator UHRF1 inactivates REST and growth suppressor gene expression via DNA methylation to promote axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E12417–E12426.

- Ong, Y.-C., Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2010). Toxoplasma Rhoptry Protein 16 (ROP16) Subverts Host Function by Direct Tyrosine Phosphorylation of STAT6. *J Biol Chem* 285, 28731–28740.
- Pang, L., Zou, S., Shi, Y., Mao, Q., and Chen, Y. (2019). Apigenin attenuates PM2.5-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by down-regulating NF- κ B in murine model of asthma. *Int J Clin Exp Pathol* 12, 3700–3709.
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 25, 264–296.
- Rochet, É., Brunet, J., Sabou, M., Marcellin, L., Bourcier, T., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2015). Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect. Immun.* 83, 2109–2117.
- Rochet, E., Argy, N., Greigert, V., Brunet, J., Sabou, M., Marcellin, L., de-la-Torre, A., Sauer, A., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2019). Type I ROP16 regulates retinal inflammatory responses during ocular toxoplasmosis. *PLoS One* 14.
- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D.C., and Saeij, J.P.J. (2011). Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *Journal of Experimental Medicine* 208, 195–212.
- Ruddy, M.J., Wong, G.C., Liu, X.K., Yamamoto, H., Kasayama, S., Kirkwood, K.L., and Gaffen, S.L. (2004). Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J. Biol. Chem.* 279, 2559–2567.
- Sabou, M., Doderer-Lang, C., Leyer, C., Konjic, A., Kubina, S., Lennon, S., Rohr, O., Viville, S., Cianférani, S., Candolfi, E., et al. (2019). *Toxoplasma gondii* ROP16 kinase silences the cyclin B1 gene promoter by hijacking host cell UHRF1-dependent epigenetic pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., and Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology* 21, 476–481.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis. *Science* 314, 1780–1783.
- Saeij, J.P.J., Coller, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–327.
- Saidi, S., Popov, Z., Janevska, V., and Panov, S. (2017). Overexpression of UHRF1 gene correlates with the major clinicopathological parameters in urinary bladder cancer. *Int Braz J Urol* 43, 224–229.

Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S., et al. (2010). Dectin-2 Recognition of α -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681–691.

Sauer, A., Pfaff, A.W., Villard, O., Creuzot-Garcher, C., Dalle, F., Chiquet, C., Pelloux, H., Speeg-Schatz, C., Gaucher, D., Prevost, G., et al. (2012). Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J. Infect. Dis.* 206, 1319–1329.

Sauer, A., Rochet, E., Lahmar, I., Brunet, J., Sabou, M., Bourcier, T., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2013). The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int. J. Parasitol.* 43, 721–728.

Shapira, S., Harb, O.S., Margarit, J., Matrajt, M., Han, J., Hoffmann, A., Freedman, B., May, M.J., Roos, D.S., and Hunter, C.A. (2005). Initiation and termination of NF- κ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 118, 3501–3508.

Sibley, L.D., and Ajioka, J.W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 329–351.

Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., et al. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5844–5849.

de-la-Torre, A., Sauer, A., Pfaff, A.W., Bourcier, T., Brunet, J., Speeg-Schatz, C., Ballonzoli, L., Villard, O., Ajzenberg, D., Sundar, N., et al. (2013). Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- γ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Negl Trop Dis* 7.

Whitley, S.K., Balasubramani, A., Zindl, C.L., Sen, R., Shibata, Y., Crawford, G.E., Weathington, N.M., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2018). IL-1R signaling promotes STAT3 and NF- κ B factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate Il17a/f transcription. *J Biol Chem* 293, 15790–15800.

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

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating

Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *J Exp Med* 194, 519–528.

Zhang, H., Chai, W., Yang, W., Han, W., Mou, W., Xi, Y., Chen, X., Wang, H., Wang, W., Qin, H., et al. (2020). The increased IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells promote tumor cell proliferation and migration in neuroblastoma. *Clin. Immunol.* 108343.

Zhu, M., Xu, Y., Ge, M., Gui, Z., and Yan, F. (2015). Regulation of UHRF1 by microRNA-9 modulates colorectal cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Sci.* 106, 833–839.

Zimmermann, S., Murray, P.J., Heeg, K., and Dalpke, A.H. (2006). Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J. Immunol.* 176, 1840–1847.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *T. gondii* infection activates *IL-17A* promoter activity and increase *IL-17A* expression.

(A) BeWo cells were transfected with *IL-17A* promoter luciferase reporter plasmid for 24 hours, then infected for the indicated times with *T. gondii* (RH strain) at a moi of 1:1 and assessed for luciferase activity. The same experiment was repeated with Astrocytes cells (B), Microglia cells (C) and Müller cells (D). The values shown are means \pm S.E.M of three separate experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, compared to control. (E) Flow cytometry analysis of *IL-17A* expression in BeWo cells infected for the indicated times with *T. gondii* (RH strain) at a moi of 1:1. The data represent typical samples performed in triplicate in three independent experiments. * $p < 0.05$, compared to control.

Figure 2. Strain-dependent activation of *IL-17A* promoter.

BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase (*IL-17A-luc*) reporter plasmid, followed by infection with different *T. gondii* strains: RH (Type I), PRU (Type II) and LEF (Atypical) strains at a moi of 1:1 and assessed for luciferase activity (means \pm S.E.M. of three separate experiments performed in triplicate). * $p < 0.05$, compared to control.

Figure 3. ROP16-dependent activation of *IL-17A* promoter

(A) BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase reporter plasmid, followed by infection with the RH ROP16 KO strain or with the wild type RH strain of *T. gondii* at a moi 1:1 and assessed for luciferase activity. The values shown are means \pm S.E.M of three separate experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, compared to control. (B) Flow cytometry analysis of *IL-17A* expression in BeWo cells infected for the indicated times with RH strain or ROP16 KO strain at a moi of 1:1. (C) BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase (*IL-17A-luc*) reporter plasmid, followed by infection with different *T. gondii* strains: RH (Type I), PRU (Type II) and PRU ROP16 I at a moi of 1:1 and assessed for luciferase activity. The values shown are means \pm S.E.M of three separate experiments performed in triplicate.

Figure 4. UHRF1 is recruited to the *IL-17A* gene promoter and suppresses its expression in *Toxoplasma*-infected cells

(A) Binding of UHRF1 to the *IL-17A* gene promoter in infected cells. BeWo cells were infected with *T. gondii* for the indicated times at a moi of 5:1. ChIP assay was performed using antibodies against UHRF1. Immunocomplexes were then analyzed by real-time PCR specific for the promoter region of the *IL-17A* gene. Non-immunoprecipitated chromatin material was used as input control. Data are representative of at least three independent experiments. (B) BeWo cells were transfected with UHRF1-siRNA or EGFP-siRNA plasmid vectors, next with *IL-17A-Luc* and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. *IL-17A*

promoter activity was analyzed by luciferase assay. (C) BeWo cells were transfected with UHRF1-siRNA or EGFP-siRNA plasmid vectors then infected for the indicated times with RH strain at a moi of 1:1 and IL-17A expression was measured by flow cytometry. Data are representative of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared to control.

Figure 5. Epigenetic regulation of the *IL-17A* promoter in *T. gondii* infected cells

(A) BeWo cells were transfected with an *IL-17A* promoter luciferase reporter plasmid for 24 hours, then treated or not with TSA (Trichostatin A) for 12 hours, followed by infection with the RH strain at a moi 1:1 and assessed for luciferase activity. Data are representative of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared to control. (B) BeWo cells were infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 5:1. ChIP assay was performed using antibodies against acetyl-histone 3 and trimethyl-H3 (Lys9) or an isotype control antibody (IgG). The precipitated DNA was then amplified by real-time PCR for the *IL-17A* gene promoter region. The results were normalized to the input DNA and expressed as relative binding. Data are means \pm SEM of three separate experiments (* $p < 0.05$).

Figure 6. UHRF1 interacts with a multienzymatic complex

BeWo cells were infected for the indicated times with RH strain of *T. gondii* at a moi of 5:1. Then, UHRF1 was immunoprecipitated and time dependent binding partners were identified by Western Blot. Samples were analyzed by Western blot using antibodies against HDAC1, HDAC2, G9a, DNMT1 or actin as loading control. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 7. *IL-17A* promoter activity modulation by STAT3 and STAT5

A) BeWo cells were transfected with sh-STAT3 or sh-STAT3 CTRL plasmid vectors, next with *IL-17A*-Luc and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. *IL-17A* promoter activity was analyzed by luciferase assay. B) BeWo cells were transfected with sh-STAT5 or sh-STAT5 CTRL plasmid vectors, next with *IL-17A*-Luc and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. *IL-17A* promoter activity was analyzed by luciferase assay. C) BeWo cells were transfected with sh-STAT3 or sh-STAT3 CTRL or sh-STAT5 or sh-STAT5 CTRL plasmid vectors and next with *IL-17A*-Luc plasmid. *IL-17A* promoter activity was analyzed by luciferase assay. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 8. UHRF1 promoter activity modulation by STAT3, STAT5 and NF- κ B

A) BeWo cells were transfected with STAT3-siRNA or EGFP-siRNA plasmid vectors, next with UHRF1-Luc and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. *UHRF1* promoter activity was analyzed by luciferase assay. B) BeWo cells were transfected with STAT5-siRNA or EGFP-siRNA plasmid vectors, next with UHRF1-Luc and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. *UHRF1* promoter activity was analyzed by luciferase assay. C) BeWo cells were

transfected with NF- κ B -siRNA or EGFP-siRNA plasmid vectors, next with UHRF1-Luc and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 1:1. UHRF1 promoter activity was analyzed by luciferase assay. Data are representative of at least three independent experiments.

Figure 9. UHRF1 binding to IL-17A promoter is independent of STAT3, STAT5 and NF- κ B

A) BeWo cells were transfected with STAT3-siRNA or EGFP-siRNA and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 5:1. ChIP assay was performed using antibodies against UHRF1 protein or an isotype control antibody (IgG). The precipitated DNA was then amplified by real-time PCR for the *IL-17A* gene promoter region. The results were normalized to the input DNA and expressed as relative binding. B) BeWo cells were transfected with STAT5-siRNA or EGFP-siRNA and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 5:1. ChIP assay was performed using antibodies against UHRF1 protein or an isotype control antibody (IgG). The precipitated DNA was then amplified by real-time PCR for the *IL-17A* gene promoter region. The results were normalized to the input DNA and expressed as relative binding. C) BeWo cells were transfected with NF- κ B-siRNA or EGFP-siRNA and then infected for the indicated times with *T. gondii* at a moi of 5:1. ChIP assay was performed using antibodies against UHRF1 protein or an isotype control antibody (IgG). The precipitated DNA was then amplified by real-time PCR for the *IL-17A* gene promoter region. The results were normalized to the input DNA and expressed as relative binding.

Figure 1

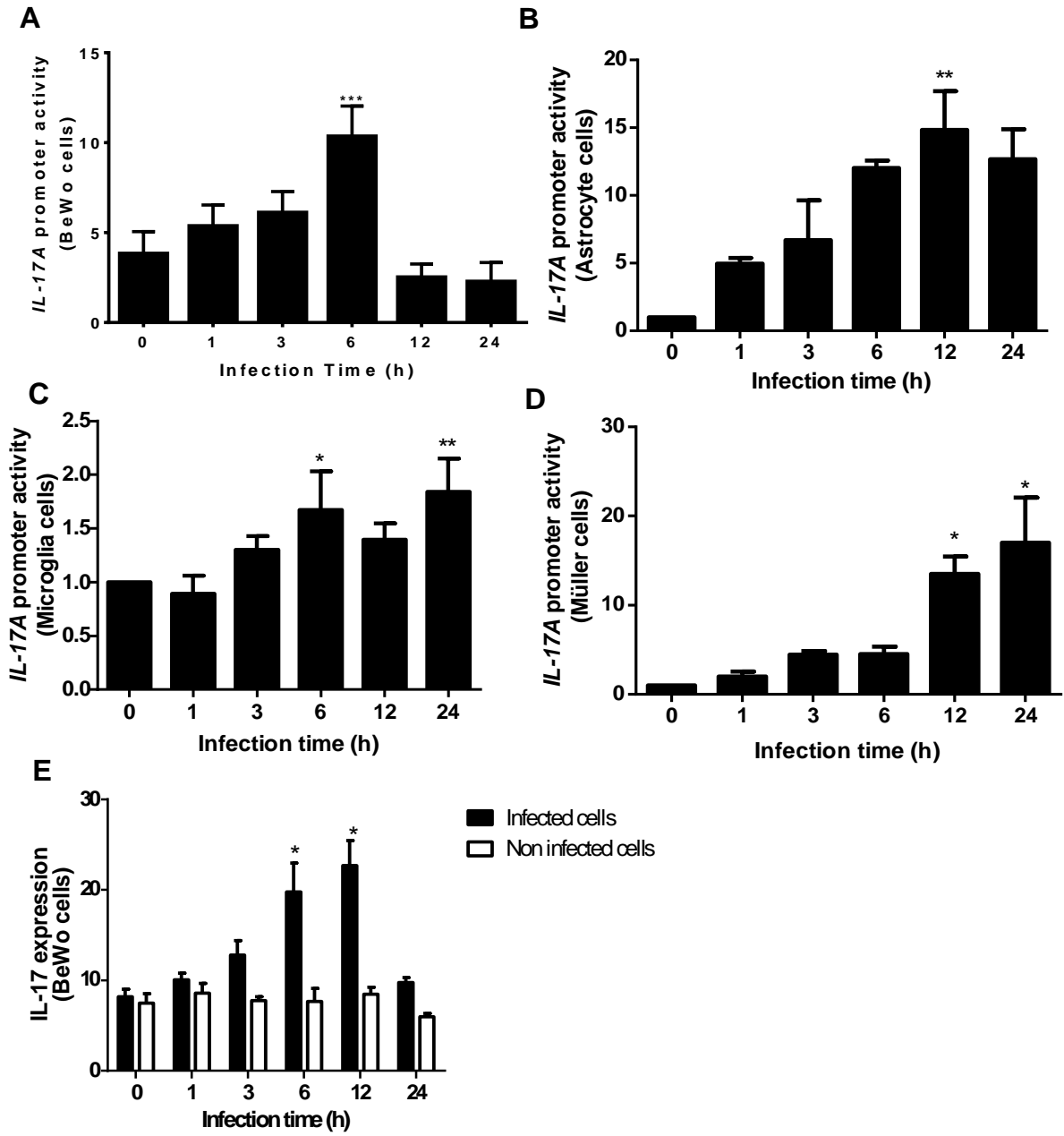


Figure 2

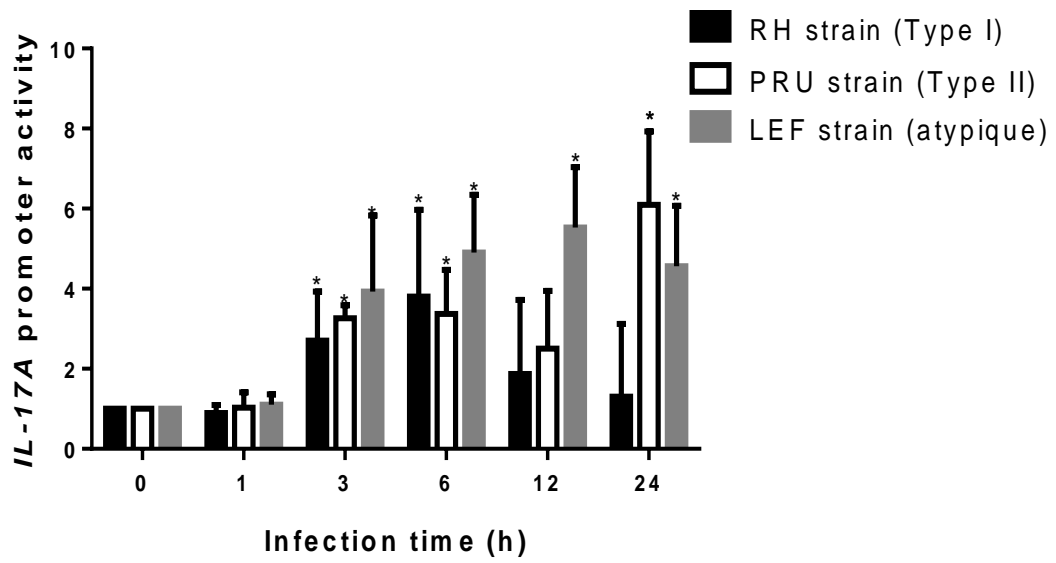


Figure 3

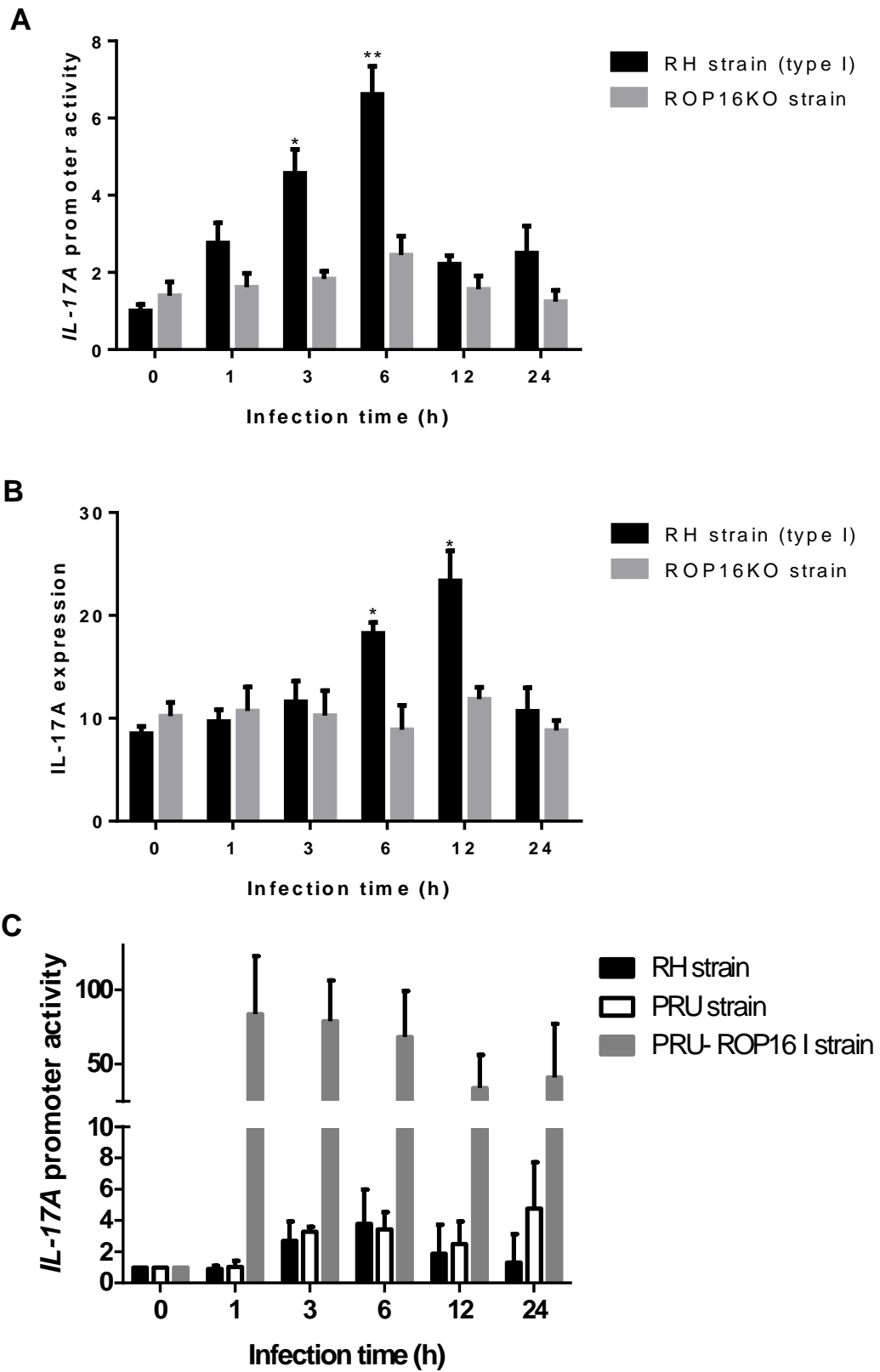
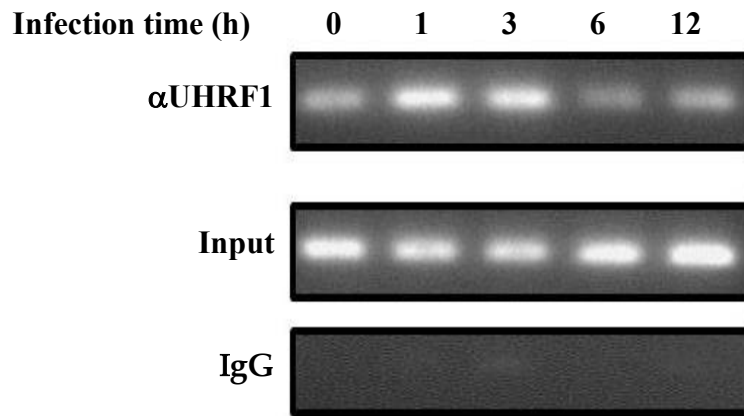
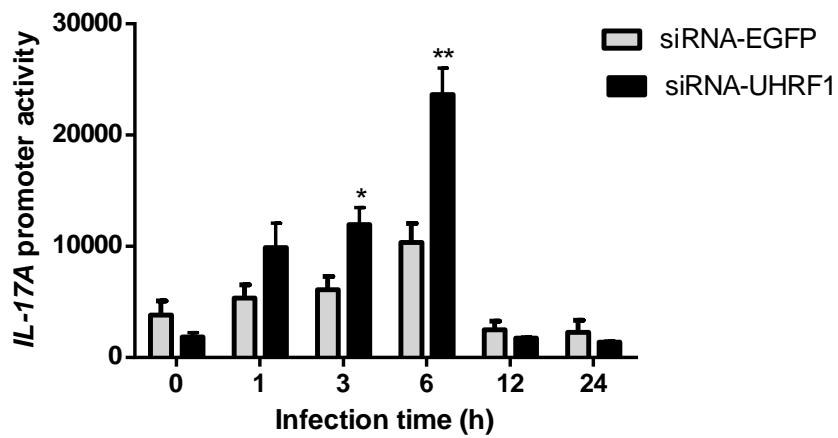


Figure 4

A



B



C

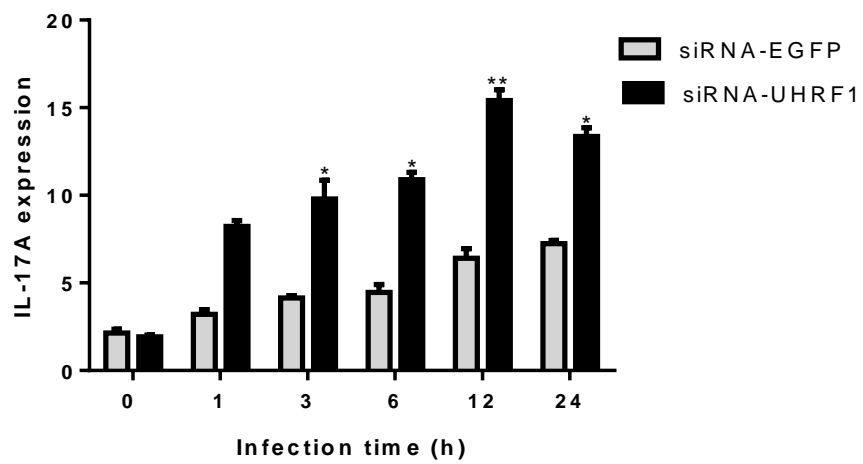
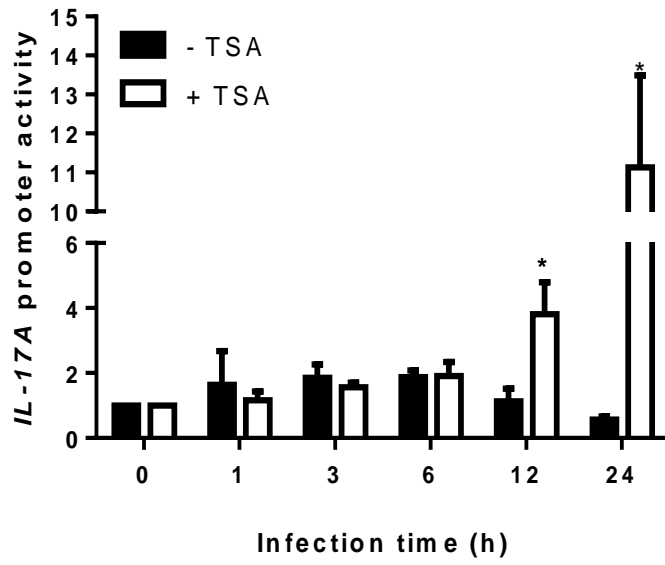


Figure 5

A



B

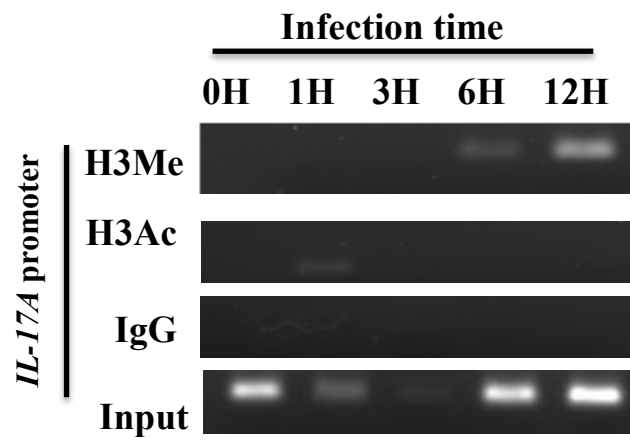


Figure 6

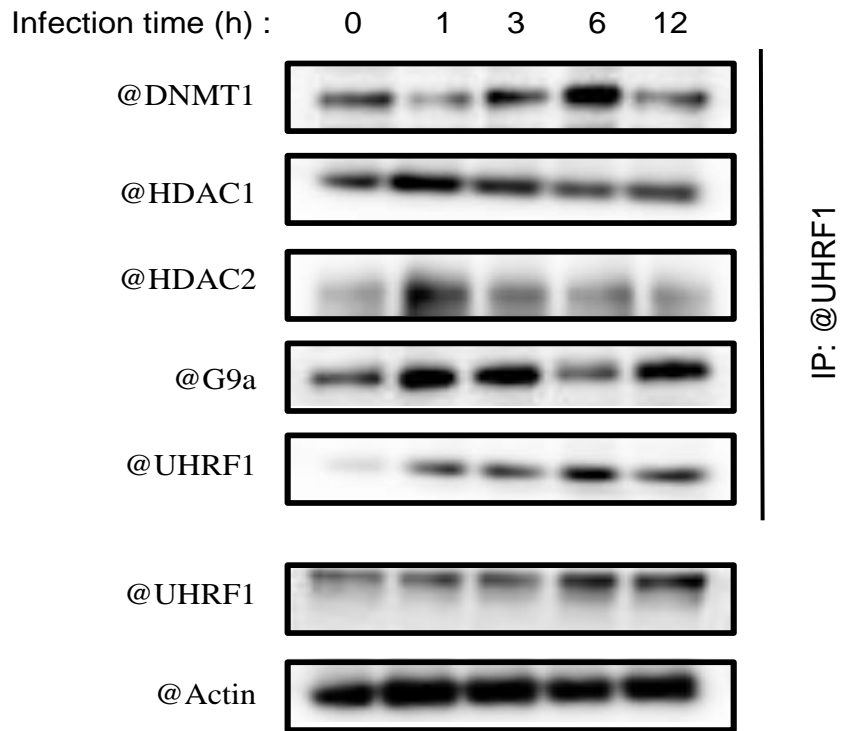


Figure 7

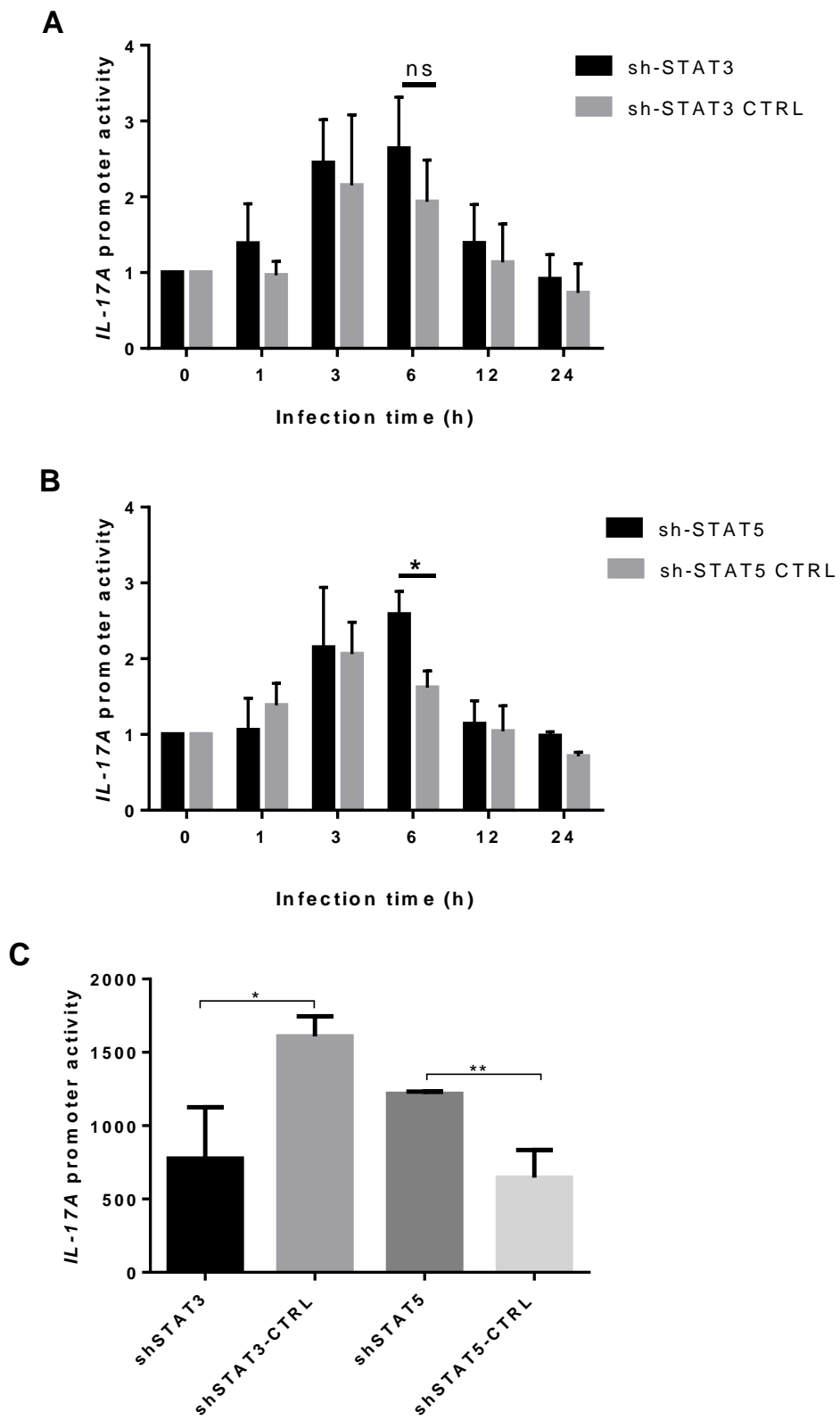
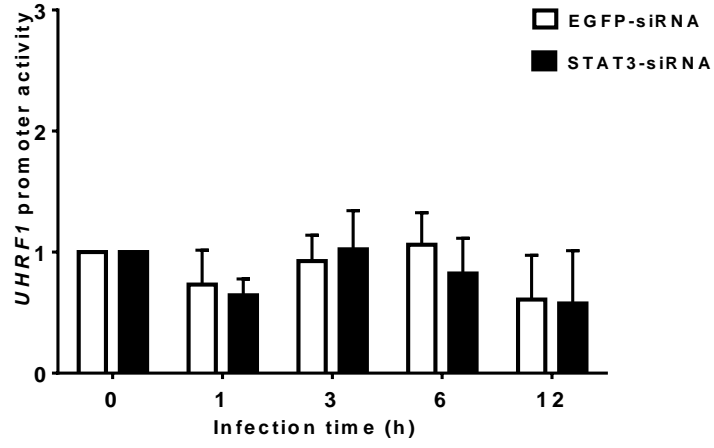
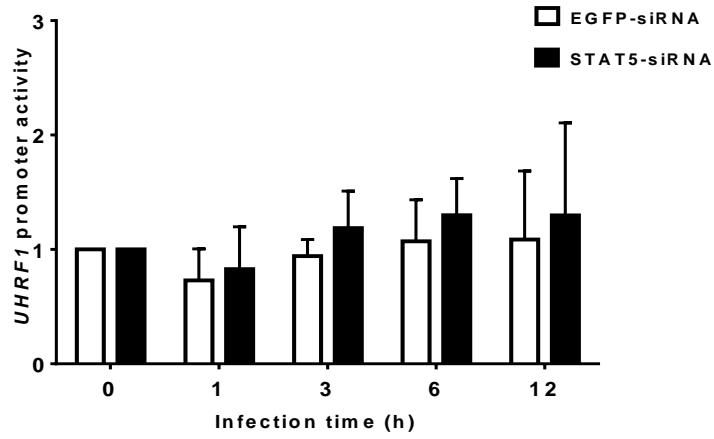


Figure 8

A



B



C

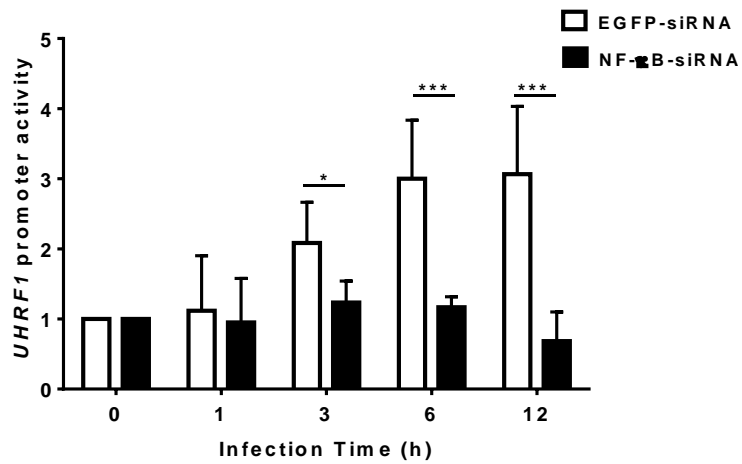
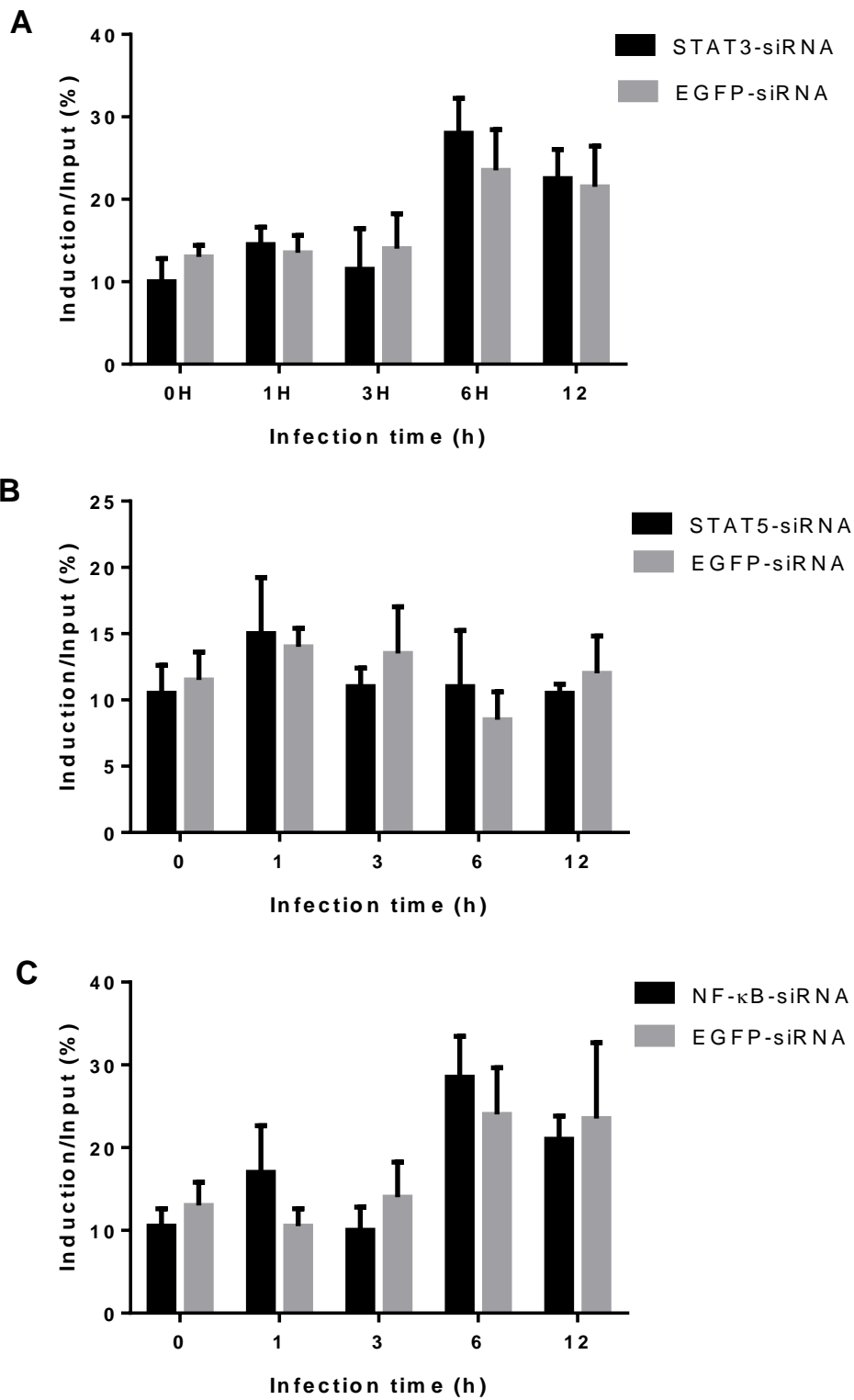


Figure 9



B) Deuxième partie : Résultats complémentaires

« CTIP2 – un nouveau régulateur de l'IL-17A »

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, cosmopolite et capable d'infecter les cellules nucléées des animaux à sang chaud. Sa capacité à établir une infection chronique est très fortement liée à son spectre d'action sur de nombreux aspects de la physiologie de la cellule hôte. *T. gondii* persiste dans certains organes immunologiquement privilégiés comme le cerveau, où l'inflammation est limitée et la destruction tissulaire liée à la cytolysse est réduite afin de préserver l'intégrité fonctionnelle de l'organe infecté (Black and Boothroyd, 2000).

Tout comme le toxoplasme, le VIH-1 est un virus capable d'établir une infection latente dans les cellules cibles, appelées « cellules réservoirs du VIH ». Ces cellules sont caractérisées par la persistance de génomes viraux intégrés dans leur génome et incapables de produire de nouvelles particules virales échappant ainsi à la vigilance du système immunitaire. Il est maintenant clairement établi que ce phénomène de latence « post-intégrative » constitue le principal obstacle à l'éradication du VIH (Van Lint et al., 2013). Les lymphocytes T CD4+ mémoire constituent le principal réservoir cellulaire du VIH-1. Cependant, d'autres cellules cibles du VIH-1 comme les cellules microgliales peuvent également être infectées de façon latente par *T. gondii* et ainsi contribuer à la persistance de l'infection virale et parasitaire (Le Douce et al., 2010; Melzer et al., 2010). Ces deux pathogènes sont capables de se répliquer au sein d'une cellule hôte, développant une infection persistante, tout en échappant aux phénomènes d'apoptose et aux réponses immunitaires, ce qui exige une modulation fine, en leur faveur, de la machinerie cellulaire des cellules qu'ils infectent. Le système nerveux central (SNC) est donc l'organe infecté par les deux pathogènes et où les cellules microgliales constituent les cibles cellulaires communes de *T. gondii* et du VIH-1 dans le cerveau (Melzer et al., 2010; Williams and Hickey, 2002).

Nous avons montré précédemment que dans des cellules infectées, UHRF1, un facteur de transcription impliqué dans la régulation chromatinienne, diminuait l'expression d'IL-17A. L'expression d'UHRF1 est modulée lors de l'infection et est indispensable à la prolifération parasitaire. UHRF1 est capable de recruter plusieurs enzymes responsables de modifications de la chromatine (Dnmt, HDAC1/2...) favorisant la formation d'hétérochromatine et la répression du gène de la *cycline B1* (Brunet et al., 2008). Nos résultats préliminaires indiquent qu'un autre répresseur transcriptionnel, CTIP2, inhibe la transcription du gène de l'IL-17A. Or,

il a été démontré que CTIP2 réprime la transcription des gènes du VIH-1 pour favoriser l'établissement de réservoirs latents (Le Douce et al., 2012; Van Lint et al., 2013). CTIP2, comme UHRF1, s'associe à des complexes de modification de la chromatine pour réprimer l'expression de ses gènes cibles (Marban et al., 2007). CTIP2 est donc un facteur cellulaire impliqué dans la régulation des phénomènes épigénétiques et dans la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales. De plus, plusieurs études ont montré une production et une sécrétion d'IL-17 par les cellules microgliales (Kawanokuchi et al., 2008; Lv et al., 2016; Su et al., 2017; Zhang et al., 2017). Dans ce cadre, nous avons voulu étudier l'implication du facteur de transcription CTIP2 dans la régulation de l'IL-17A dans les cellules microgliales.

1) Modulation du promoteur de l'*IL-17A* par le facteur de transcription CTIP2

Afin de mettre en évidence l'implication du facteur cellulaire CTIP2 dans la régulation de l'IL-17A, l'activité du promoteur du gène *IL-17A* a été analysée par le système luciférase à l'aide d'un plasmide contenant le promoteur du gène *IL-17A* couplé au gène de la luciférase. Les cellules microgliales ont été co-transfectées par le vecteur rapporteur du promoteur de l'IL-17A auquel a été ajouté le vecteur d'expression Flag-CTIP2. Le plasmide pcDNA3 a été utilisé comme contrôle (figure 1).

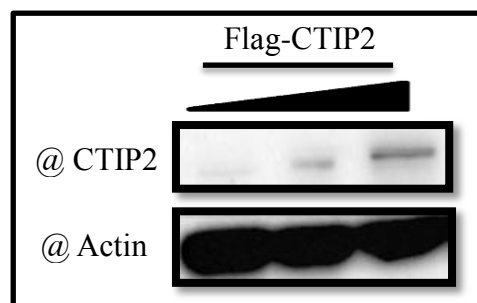
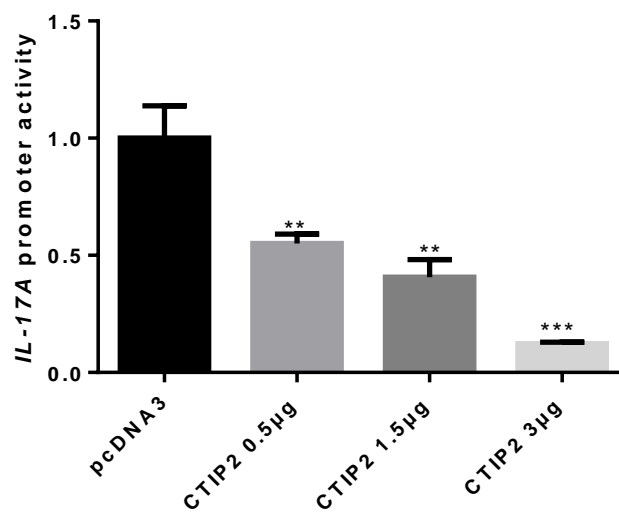


Figure 1 : Modulation du promoteur du gène *IL-17A* par le facteur de transcription CTIP2 dans les cellules microgliales. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A-luc* et une dose réponse du plasmide Flag-CTIP2 allant de 0.5µg à 3.5µg. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les expériences ont été réalisées en triplicat (contrôle : plasmide vide). L'efficacité de transcription et d'expression du vecteur Flag-CTIP2 a été contrôlée par Western Blot.

En condition de surexpression de CTIP2, nous observons une diminution de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* de manière significative et dose dépendante.

Parallèlement, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de CTIP2 sur le promoteur du gène de l'*IL-17A* en utilisant un plasmide sh-CTIP2 qui diminue l'expression de CTIP2. Les cellules microgliales ont été co-transfectées par le plasmide *IL-17A-Luc* auquel a été ajouté le plasmide sh-CTIP2 à différentes doses (figure 2).

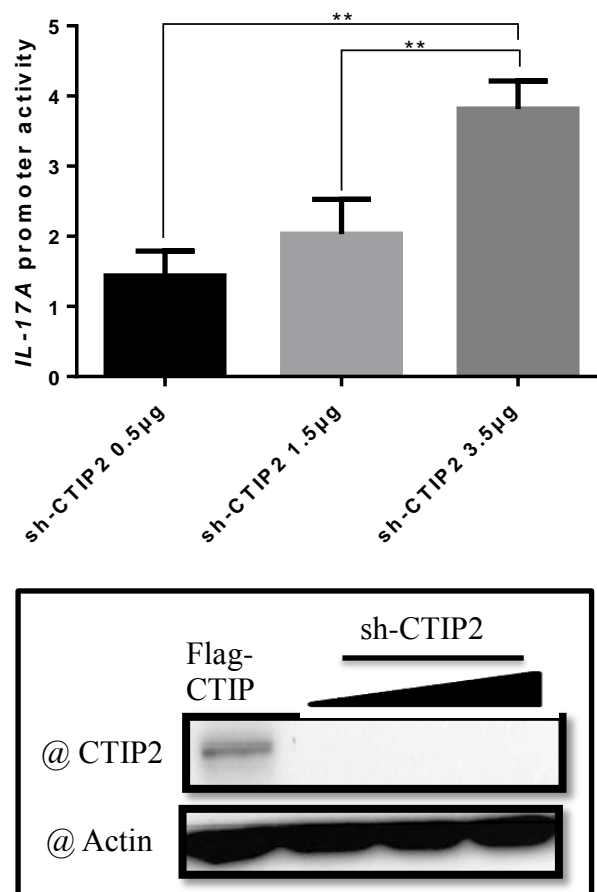


Figure 2 : Modulation du promoteur du gène *IL-17A* par le facteur de transcription CTIP2 dans les cellules microgliales. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A-luc* et une dose réponse du plasmide sh-CTIP2 ou sh-CTIP2 contrôle allant de 0.5µg à 3.5µg. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford et normalisés par rapport au contrôle correspondant. Les expériences ont été réalisées en triplicat (sh-CTIP2 contrôle : plasmide vide). L'efficacité de transcription et d'expression du vecteur sh-CTIP2 a été contrôlée par Western Blot

On constate une augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* lorsqu'on inhibe le facteur CTIP2 de façon dose-dépendante. Ces résultats suggèrent donc que CTIP2 est impliqué dans la répression de la transcription du gène de l'*IL-17A*.

2) Modulation du promoteur de l'*IL-17A* par le facteur de transcription UHRF1

Nous avons montré précédemment que le facteur UHRF1 est impliqué dans la répression du gène de l'*IL-17A* dans les cellules trophoblastiques BeWo en conditions d'infection par *T. gondii*. On s'est intéressé dans cette partie à l'étude de l'effet d'UHRF1 sur le promoteur de l'*IL-17A* dans les cellules microgliales et en dehors de l'infection.

Dans un premier temps, l'activité du promoteur du gène *IL-17A* a été analysée par le système luciférase à l'aide d'un plasmide contenant le promoteur du gène *IL-17A* couplé au gène de la luciférase. Les cellules microgliales ont été co-transfectées par le vecteur rapporteur du promoteur *IL-17A* auquel a été ajouté le vecteur d'expression Flag-UHRF1 à différentes doses. Le plasmide pcDNA3 a été utilisé comme contrôle (figure 3).

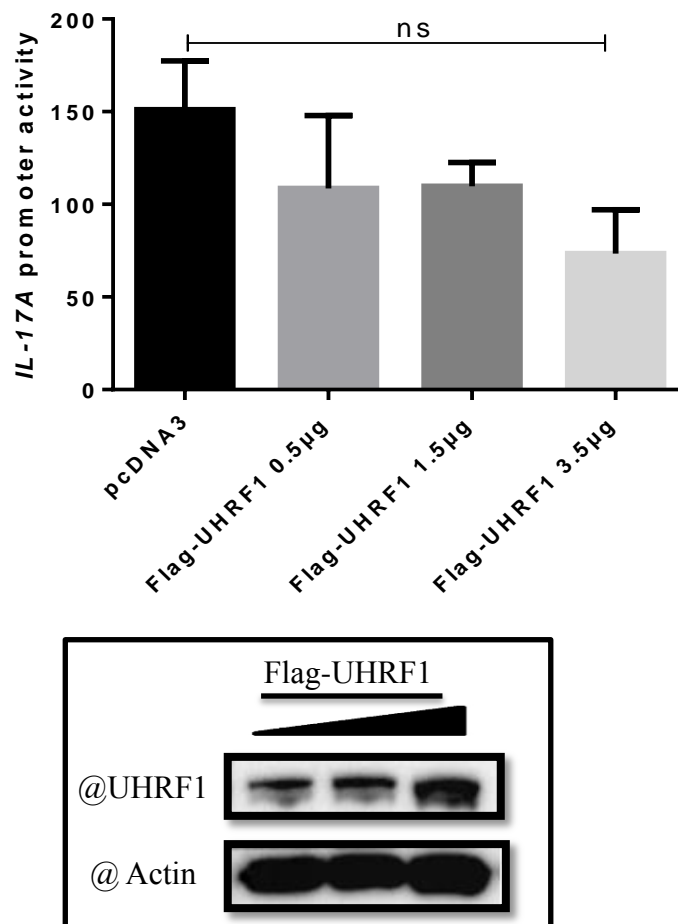


Figure 3 : Modulation du promoteur du gène *IL-17A* par le facteur de transcription UHRF1 dans les cellules microgliales. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A*-luc et une dose réponse du plasmide Flag-UHRF1 allant de 0.5µg à 3.5µg. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les expériences ont été réalisées en triplicat (pcDNA3 : plasmide vide). L'efficacité de transcription et d'expression du vecteur Flag-UHRF1 a été contrôlée par Western Blot.

En surexprimant UHRF1 dans les cellules microgliales, l'activité du promoteur de l'*IL-17A* diminue de façon proportionnelle à la dose d'UHRF1 transfectée. Cependant, ces résultats nécessitent d'être confirmées.

Dans un deuxième temps, on s'est intéressé à l'étude de l'activité du promoteur de l'*IL-17A* en absence du facteur UHRF1 en utilisant un plasmide UHRF1-siRNA. Les cellules microgliales ont été co-transfectées par le plasmide *IL-17A*-Luc auquel a été ajouté le plasmide UHRF1-siRNA ou son contrôle EGFP-siRNA à différentes doses (figure 4).

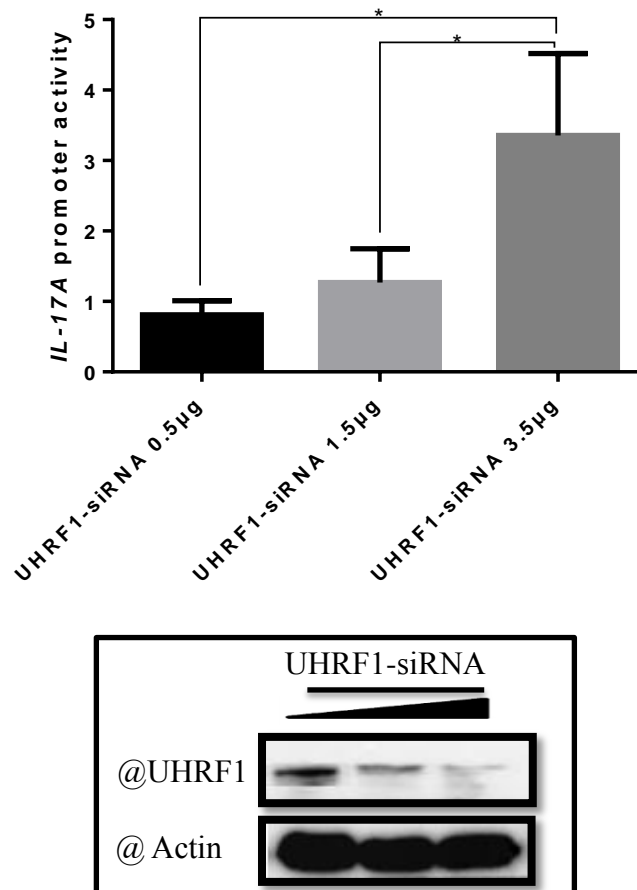


Figure 4 : Modulation du promoteur du gène *IL-17A* par le facteur de transcription UHRF1 dans les cellules microgliales. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A*-luc et une dose réponse du plasmide UHRF1-siRNA ou EGFP-siRNA allant de 0.5µg à 3.5µg. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford et normalisés par rapport au contrôle correspondant. Les expériences ont été réalisées en triplicat (EGFP-siRNA : plasmide contrôle). L'efficacité de transcription et d'expression du vecteur UHRF1-siRNA a été contrôlée par Western Blot.

L'inhibition du facteur de transcription UHRF1 induit l'augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* de façon dose dépendante. Ces résultats confirment donc l'effet inhibiteur d'UHRF1 sur le promoteur *IL-17A* déjà observé sur le modèle cellulaire BeWo.

3) Synergie d'action CTIP2-UHRF1 ?

Souvent les facteurs de transcription agissent en association. Nous avons montré qu'UHRF1 se fixe sur le promoteur de l'*IL-17A* et régule négativement son activité. Nous avons montré également que CTIP2 est impliqué dans l'inhibition du promoteur du gène de l'*IL-17A*. Nous nous sommes donc posé la question de savoir s'il existe une synergie d'action entre CTIP2 et UHRF1 pour inhiber le promoteur du gène de l'*IL-17A*. Pour cela, les cellules microgliales ont été co-transfectées avec le plasmide IL-17A-Luc et les plasmides Flag-CTIP2 et Flag-UHRF1 seuls ou en association (Figure 5).

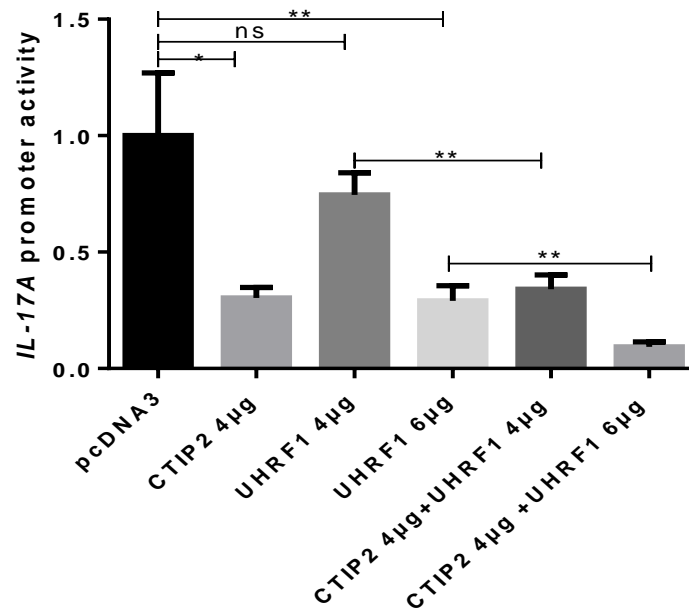


Figure 5 : Activité du promoteur IL-17A dans les cellules co-transfectées avec le plasmide IL-17A-Luc et les plasmides Flag-CTIP2 et/ou Flag-UHRF1. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide IL-17A-luc et une dose de plasmide d'intérêt. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les expériences ont été réalisées en triplicat (pcDNA3 : plasmide vide).

Les facteurs de transcription CTIP2 et UHRF1 semblent agir en synergie pour inhiber le promoteur de l'*IL-17A*. Cependant, il s'agit ici du résultat d'une seule expérience donc ça nécessite d'être confirmé prochainement.

4) CTIP2 et les enzymes de l'épigénétique

CTIP2 est un facteur de transcription cellulaire connue pour être impliqué dans la régulation des phénomènes épigénétiques. CTIP2 est connu pour être impliqué dans le recrutement d'un complexe multi-enzymatique composé des protéines HDAC1, HDAC2, SuV39H1 (Marban et al., 2007). De plus, nous avons montré précédemment qu'il existe une régulation épigénétique au niveau du promoteur de l'*IL-17A* dans les cellules infectées par *T. gondii*. Dans ce cadre, nous avons voulu tester l'effet de ces enzymes induisant des modifications épigénétiques sur l'activité du promoteur *IL-17A* et d'une éventuelle synergie avec le facteur CTIP2.

Dans un premier temps, les cellules microgliales ont été co-transfectées par le plasmide IL-17A-Luc auquel a été ajouté le plasmide Flag-CTIP2 ou Flag-HDAC1 ou Flag-HDAC2 ou sh-

CTIP2 ou sh-HDAC1 ou sh-HDAC2 à différentes doses, seuls ou en association (Figures 6 et 7).

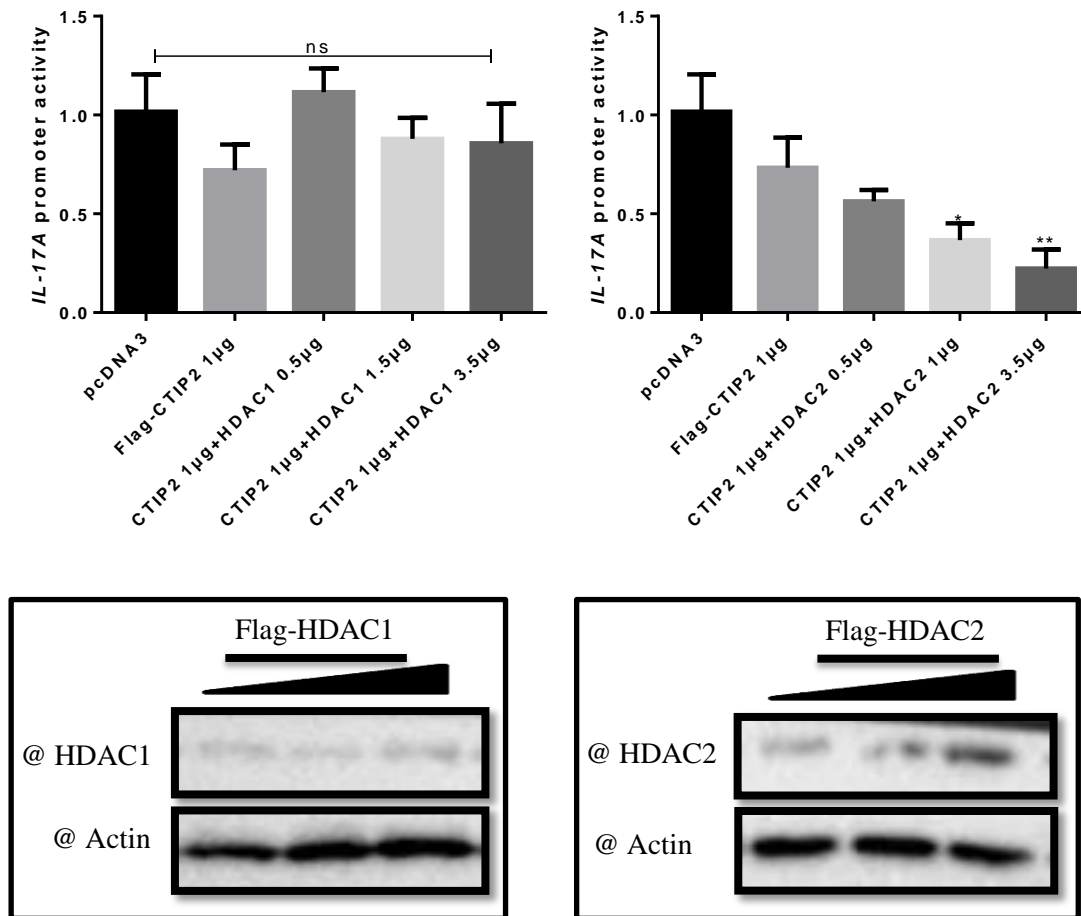


Figure 6 : Activité du promoteur *IL-17A* dans les cellules co-transfectées avec le plasmide *IL-17A-Luc* et les plasmides *Flag-CTIP2* et/ou *Flag-HDAC1/2*. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A-luc* et une dose réponse du plasmide d'intérêt. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les expériences ont été réalisées en triplicat (pcDNA3 : plasmide vide). L'efficacité de transcription et d'expression des vecteurs *Flag-HDAC1* et *Flag-HDAC2* a été contrôlée par Western Blot.

Nos résultats montrent une synergie d'action entre CTIP2 et HDAC2 qui réprime l'activité du promoteur de l'*IL-17A* de manière dose dépendante. Cependant, le facteur HDAC1 ne semble pas inhiber l'activité promotrice *IL-17A*.

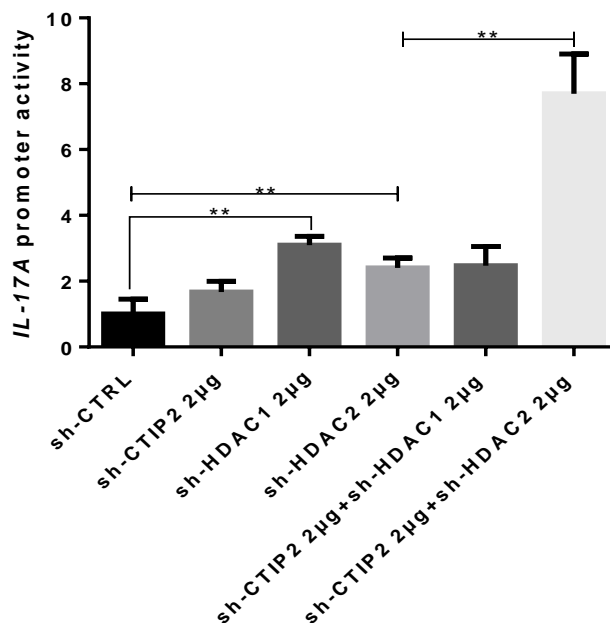


Figure 7 : Activité du promoteur *IL-17A* dans les cellules co-transfectées avec le plasmide *IL-17A-Luc* et les plasmides *sh-CTIP2* et/ou *sh-HDAC1/2*. Les cellules microgliales sont cotransfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A-luc* et 2µg du plasmide *sh-CTIP2* ou *sh-HDAC1/2*. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford et normalisés par rapport au contrôle correspondant. Les expériences ont été réalisées en triplicat (sh-contrôle : plasmide vide).

Nos résultats confirment la synergie d'action observée précédemment entre CTIP2 et HDAC2. De plus, l'inhibition de HDAC1 induit une augmentation significative de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* mais cette activité ne semble pas être synergique avec la protéine CTIP2.

Dans un deuxième temps, les cellules microgliales ont été co-transfectées par le plasmide *IL-17A-Luc* auquel a été ajouté le plasmide Flag-CTIP2 ou GFP-Suv39H1 à différentes doses (Figure 8).

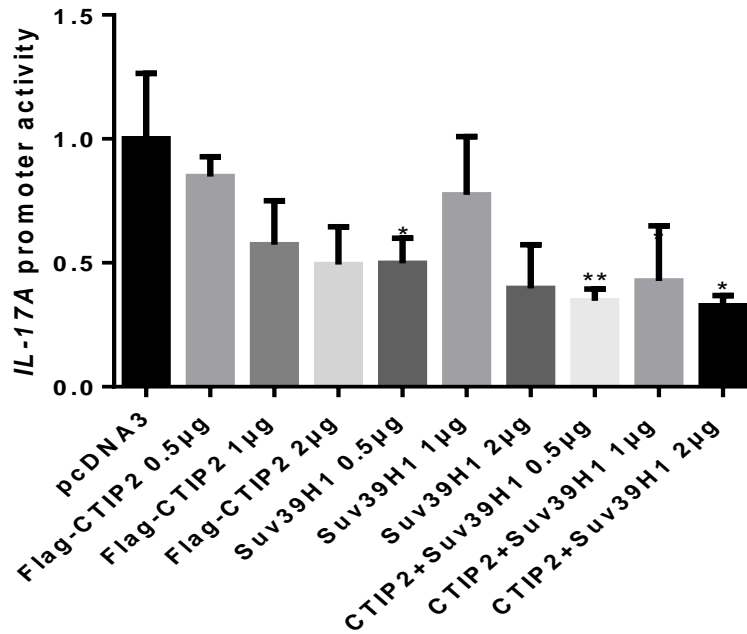


Figure 8 : Activité du promoteur *IL-17A* dans les cellules co-transfectées avec le plasmide *IL-17A-Luc* et les plasmides *Flag-CTIP2* et/ou *GFP-Suv39H1*. Les cellules microgliales sont co-transfectées avec 0.5µg de plasmide *IL-17A-luc* et une dose réponse du plasmide *Flag-CTIP2* ou *GFP-Suv39H1* seuls ou en association. Les cellules sont récoltées après 48 heures et les résultats sont exprimés par rapport à la quantité de protéines dosée par la méthode de Bradford. Les expériences ont été réalisées en triplicat (pcDNA3 : plasmide vide).

On constate une diminution de l'activité du promoteur du gène de l'*IL-17A* en présence du plasmide *Suv39H1*. De plus, il existe une synergie d'action entre *CTIP2* et *Suv39H1*.

Ces résultats suggèrent donc la présence d'une régulation épigénétique induite par les protéines *HDAC1*, *HDAC2* et *Suv39H1* qui seraient recrutées au niveau du promoteur du gène de l'*IL-17A* par le facteur de transcription *CTIP2*.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Dès lors que l'Homme est infecté par *T. gondii*, il héberge le parasite sous une forme latente toute sa vie, dans des organes cibles dont l'œil et le cerveau. Ces formes latentes, sont inaccessibles aux traitements usuels, et peuvent se réactiver provoquant des complications redoutables comme la toxoplasmose oculaire chez un hôte immunocompétent et la toxoplasmose cérébrale chez un hôte immunodéprimé comme dans le cas d'infection par le VIH. Cette capacité qu'il a à établir une infection chronique est liée à sa faculté de modifier les fonctions de la cellule-hôte, comme la réponse immunitaire, les voies de signalisation de l'apoptose ou encore l'organisation de certaines organelles intracellulaires (mitochondrie, réticulum endoplasmique). Ces modifications de la cellule-hôte lui permettent d'entretenir un environnement adéquat à sa prolifération.

Afin de moduler les voies de signalisation de la cellule hôte, *T. gondii* secrète lors de la phase d'invasion des protéines contenues dans des organelles sécrétoires spécifiques, les rhoptries. Parmi ces protéines, ROP16 est intéressante car : i) il s'agit d'une sérine-thréonine kinase capable d'activer et d'induire la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription cellulaires et dans ce cadre des travaux récents de notre laboratoire ont identifié la protéine ROP16 comme étant un activateur majeur du facteur de transcription UHRF1 (Sabou et al., 2019) ; ii) elle a également une localisation nucléaire ; iii) elle est polymorphique et est associée à la virulence du parasite (Saeij et al., 2007).

La virulence de la souche parasitaire infectante joue un rôle majeur dans le déclenchement et la vigueur de la réponse immunitaire intraoculaire de l'hôte infecté. Par exemple, en Amérique du Sud, des formes plus graves de la toxoplasmose oculaire sont observées, cette gravité accrue étant probablement liée à la présence de souches parasitaires plus virulentes qu'en Europe ainsi qu'une susceptibilité génétique plus élevée vis-à-vis de l'infection. Les lésions rétiniennes sont dues d'une part à la prolifération parasitaire qui induit la lyse des cellules infectées, d'autre part à la réponse inflammatoires de l'hôte ainsi qu'aux phénomènes d'auto-immunité (Gaddi and Yap, 2007; Garweg and Candolfi, 2009; Jones et al., 2006b).

Pour proliférer et persister au sein d'une cellule-hôte, le parasite est capable de moduler un certain nombre de voies de signalisation (apoptose, réponse immunitaire...) et de facteurs de transcription (UHRF1, NF- κ B, STAT3...). UHRF1 est un facteur de transcription cellulaire modulé par le parasite lors de l'infection toxoplasmique. Des travaux précédemment réalisés au sein de notre laboratoire ont montré qu'il est indispensable à la prolifération parasitaire et qu'il est un élément central dans la régulation de l'expression des gènes des cellules infectées (Brunet et al., 2008). En effet, dans la lignée des cellules trophoblastiques BeWo infectées par la souche RH de *T. gondii*, le parasite est capable d'activer UHRF1 et d'augmenter son expression protéique. Ce ci provoque une dérégulation du cycle cellulaire *via* l'inhibition du gène de la *cycline B1* et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Les études menées sur les micro-organismes intracellulaires altérant le cycle des cellules infectées sont nombreuses. Ce phénomène est particulièrement observé chez les virus et notamment le VIH-1. L'infection par ce virus induit un arrêt du cycle en phase G2/M ce qui induit une meilleure réplication virale (He et al., 1995). Dans le groupe protozoaire, un autre parasite, *Leishmania* spp. est connu pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Kuzmenok et al., 2005).

En dehors du gène de la *cycline B1*, les gènes cibles d'UHRF1 demeurent peu connus. Cependant, lors d'une étude par BioPlex, il a été montré qu'UHRF1 régule une cytokine pro-inflammatoire retrouvée dans la majorité des cas de toxoplasmose oculaire : l'IL-17A (résultat

interne). Au vu de l'importance de cette dernière dans la toxoplasmose oculaire, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de sa régulation.

Des travaux réalisés précédemment sur des modèles humains et murins de TO ont permis de mettre en évidence le rôle délétère de la réponse Th17, médiée par la sécrétion d'IL-17A. Le rôle de ces cellules est particulièrement notable dans la régulation de la TO. En effet, cette production d'IL-17A est en partie régulée par la production d'IL-27 (Gaddi and Yap, 2007). Des expériences menées sur des souris dépourvues du gène qui code pour le récepteur de l'IL-27 ont montré une évolution clinique très sévère avec une production d'IL-17A proéminente (Stumhofer et al., 2006). Chez les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-17A, l'infection se caractérise par une nette diminution de l'inflammation locale, une augmentation de la survie et une diminution du nombre de kystes chez les animaux infectés. Cependant, la régulation de la production d'IL-17A est source de nombreuses questions. La production d'IL-17A sous la dépendance de l'IL-23 implique les voies de signalisation médiées par STAT3 et NF- κ B (Aggarwal et al., 2003). Néanmoins, la régulation et l'expression de ces facteurs dans les cellules non lymphocytaires restent largement méconnues.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié la régulation de l'expression de l'IL-17A en fonction du type cellulaire et de la virulence de la souche parasitaire. Nous avons montré que l'infection par *T. gondii* induit une activation rapide et transitoire du promoteur du gène de l'*IL-17A*. L'intensité et le profil de cette activation est variable en fonction de la lignée cellulaire. De plus, les expériences réalisées à l'aide de trois souches de virulences variables (RH, PRU, LEF) ont montré que l'IL-17A est modulé différenciellement selon le type de souche concernée. Ayant observé une différence significative dans l'activation du promoteur de l'*IL-17A* en fonction de la virulence de la souche, on s'est posé la question à savoir si la protéine polymorphique parasitaire ROP16, qui est elle-même connue pour être impliqué dans la virulence, est à l'origine de cette différence observée. Ainsi, nous avons comparé l'effet d'une souche RH délétée pour le gène qui code pour la protéine ROP16 par rapport à la souche RH sauvage. Nos résultats montrent que l'activation du promoteur de l'*IL-17A* est inhibée en l'absence de la protéine ROP16 ce qui suggère que la kinase ROP16 est indispensable à l'activation de l'*IL-17A* et souligne l'importance des facteurs de virulence tels que ROP16 dans la physiopathologie oculaire.

Nous avons voulu ensuite approfondir l'exploration du rôle de ROP16 en utilisant une souche modifiée de *T. gondii*, la souche de type II ROP16 I et qui correspond à une souche de type II au sein de laquelle a été introduit le gène qui code pour une protéine ROP16 de type I à la place du gène de la protéine ROP16 de type II. Les effets de cette mutation sur l'*IL-17A* ont été comparés à ceux obtenus avec les souches sauvages de type I (RH) et de type II (PRU). Les résultats de cette expérience nous montrent que l'expression d'une protéine ROP16 provenant d'une souche de type I par une souche de type II induit une très forte activation du promoteur de l'*IL-17A*, ce qui suggère que ROP16 à elle seule ne permet pas d'expliquer les différences d'activation du promoteur *IL-17A* observées entre les trois souches. D'autres effecteurs parasitaires pourraient être impliqués dans cette régulation comme par exemple la protéine parasitaire ROP18 de par son action sur les IRGs (Fentress *et al.*, 2010). Ainsi, il serait intéressant d'explorer l'implication de la protéine ROP18 dans l'activation du promoteur *IL-17A* par des expériences de luciférase en utilisant une souche de type I délétée du gène qui code pour la protéine ROP18.

Des études sur l'inflammation intestinales ont montré qu'une souche de type II ROP16I est incapable de déclencher l'inflammation intestinale (Robben et al., 2004). Or, nos résultats montrent que la protéine ROP16 de type I est un réel facteur de virulence. Elle induit une augmentation de la cytokine pro-inflammatoire IL-17A quel que soit le génotype de la souche dans laquelle elle se trouve. Lorsque cette protéine ROP16 I se trouve dans un génotype II, la réponse immunitaire s'en trouve fortement accrue. Avec la souche PRU-ROP16I, l'activation du promoteur du gène de l'*IL-17A* dépasse celle d'une souche de type I. La protéine ROP16 I semble influencer considérablement la réponse inflammatoire oculaire, notamment la production de cytokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires au site de l'infection. Cependant, la présence de ROP16 I dans une souche de type II aggrave également les modifications de la structure rétinienne et donc les lésions, tandis que dans une souche de type I la structure de la rétine est faiblement modifiée (Rochet et al., 2019).

Ainsi, l'introduction d'une protéine de virulence telle que ROP16 I dans le génome d'une souche de type II peu virulente accentue ses propriétés inflammatoires et délétères pour l'œil. De plus, il est intéressant de noter que les souches atypiques sud-américaines sont issues de recombinaisons génétiques entre des parasites de génotypes différents, ce qui explique la gavité et l'importance de la TO sur ce continent par rapport à celle observée en Europe.

Les résultats quant à la recherche de l'*IL-17A* par Western Blot ne sont pas présentés ici car sont totalement négatifs. L'absence de l'expression protéique de l'*IL-17A* en Western Blot pourrait être expliquée par une très faible production d'*IL-17* par les cellules ou l'absence de stabilisation de la protéine ou par une dégradation de celle-ci par le protéasome par exemple. Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous pourrions analyser l'ubiquitinylation de l'*IL-17A* dans ce contexte et regarder l'expression de l'*IL-17A* en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132 par exemple).

Les résultats de ce travail de thèse ont été obtenus avec une souche virulente de type I de *T. gondii*. Or, la majorité des souches isolées en Europe appartiennent à la lignée clonale de type II et ces souches diffèrent entre autre par leur virulence chez la souris (Saeij et al., 2006). Ainsi, les différences d'activation du promoteur de l'*IL-17A* observées peuvent s'expliquer par la capacité variable de ces souches à moduler les voies de signalisation de la cellule-hôte. En effet, la souche RH de type I possède une protéine ROP16 capable d'activer de façon constitutive les voies de signalisation STAT3, STAT6, inhibant la production de l'*IL-12* (Ong et al., 2010; Saeij et al., 2006). Dans cette souche, la protéine de granule dense GRA15 est incapable d'activer la voie de signalisation NF- κ B et d'initier une réponse immunitaire au sein de la cellule-hôte, alors que la souche de type II induit une activation transitoire des facteurs STAT3, STAT6 ainsi qu'une activation rapide de la voie NF- κ B conduisant à une production accrue d'*IL-12* et à un meilleur contrôle de la réplication parasitaire. Ce mécanisme serait l'un des facteurs de virulence des souches de *T. gondii*. Nous pourrions donc élargir notre étude afin d'explorer l'impact de GRA15 sur l'expression d'*IL-17A* en utilisant des souches parasitaires Knock-out pour le gène codant la protéine GRA15 ou en utilisant des plasmides codant pour cette protéine.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'implication du facteur de transcription UHRF1 dans la régulation de l'*IL-17A*. En effet, une étude préliminaire effectuée au laboratoire par Bio-Plex avait permis de mettre en évidence l'implication d'UHRF1 dans la régulation de certaines cytokines dont l'*IL-17A*. UHRF1 est un facteur

cellulaire dont l'activité est modulée lors de l'infection parasitaire et varie en fonction de la virulence des souches. Dans les cellules BeWo infectées par la souche RH de type I, nous avons montré le recrutement d'UHRF1 sur le promoteur de l'*IL-17A*. Cependant, les sites de fixation d'UHRF1 sur le promoteur de l'*IL-17A* ne sont pas connus à l'heure actuelle et restent à déterminer. Des expériences impliquant des transfections par des mutants d'*IL-17A* tronqués à différentes longueurs du promoteur suivies de CHIP avec un anticorps anti-UHRF1 pourraient être envisagées. De plus, il serait intéressant d'étudier la cinétique de recrutement d'UHRF1 sur le promoteur *IL-17A* lors de l'infection par une souche de type II (PRU), plus fréquente en Europe.

Nous avons poursuivi l'étude de la modulation de l'*IL-17A* et sa régulation par le facteur UHRF1 dans le cadre de l'infection toxoplasmique en évaluant l'impact des autres facteurs de transcription cellulaires sur cette régulation afin de déterminer les mécanismes d'action impliqués. Parmi les facteurs de transcription cellulaires qui sont connus pour être activés par le parasite et pour se fixer sur le promoteur de l'*IL-17A*, nous avons sélectionné les facteurs STAT3, STAT5 et NF- κ B. Il est important de savoir si ces facteurs de transcription jouent également un rôle dans la modulation de l'activité du promoteur *UHRF1*. Notre hypothèse est que la régulation de l'*IL-17A* par UHRF1 implique l'action de ces facteurs cellulaires et pour vérifier cette hypothèse, nous avons exploré par des techniques de *gene silencing* et de système luciférase l'action de STAT3, STAT5 et NF- κ B sur le promoteur *UHRF1*. Nous avons montré que les facteurs STAT3 et STAT5 ne modifiaient pas l'activité du promoteur *UHRF1* alors que le facteur NF- κ B semble l'activer à partir de 6 heures post-infection. En effet, NF- κ B possède des sites de fixation sur le promoteur *UHRF1* et induit son activation (Thèse de sciences de Ghaidaa KANJO, 2014). Parallèlement, nous avons exploré l'action de STAT3 et STAT5 sur le promoteur de l'*IL-17A*. Dans les cellules T, il a été montré que STAT3 et STAT5 entrent en compétition au niveau de leurs sites de fixation sur la séquence promotrice de l'*IL-17A* et que STAT3 était caractérisé comme étant un régulateur positif, alors que STAT5 était caractérisé comme étant un régulateur négatif de l'*IL-17A* (Chen et al., 2006; Gaffen, 2011; Laurence et al., 2007; Whitley et al., 2018). Nos résultats confirment en partie ces observations. En effet, nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de l'activité promotrice en présence et en absence de STAT3.

En ce qui concerne le facteur STAT5, son inhibition par un shRNA induit une augmentation significative de l'activité du promoteur *IL-17A* à 6 heures post-infection. Ces résultats confirment le rôle inhibiteur de STAT5 sur le promoteur de l'*IL-17A* mais seulement à 6 heures d'infection, et contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, STAT3 ne semble pas activer le promoteur du gène de l'*IL-17A*. Cette différence observée pourrait s'expliquer par la différence de lignées cellulaires puisque nos résultats ont été obtenus dans la lignée trophoblastique BeWo alors que dans les études réalisées précédemment les résultats ont été obtenus dans les cellules T. De plus, nos expériences ont été réalisées en condition d'infection, par conséquent, la présence du parasite dans la cellule pourrait jouer un rôle dans l'action de ces facteurs de transcription sur le promoteur *IL-17A*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié par système luciférase l'action de STAT3 et STAT5 sur le promoteur du gène de l'*IL-17A* en dehors de l'infection toxoplasmique en utilisant des shRNA de ces facteurs. Nous avons obtenu les mêmes résultats que ceux observés dans la littérature. En effet, l'inhibition de STAT3 par un shRNA induit une diminution de l'activité du promoteur *IL-17A* alors que l'inhibition de STAT5 par un shRNA induit une augmentation de

l'activité promotrice. Ces résultats suggèrent que l'effet de STAT3/STAT5 est influencé par le parasite.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la modulation de la liaison d'UHRF1 au promoteur *IL-17A*. En effet, nous avons montré qu'UHRF1 se lie au promoteur de l'*IL-17A* et le régule négativement mais la nature de cette interaction reste méconnue et pourrait faire intervenir d'autres facteurs de transcription cellulaires et notamment, les facteurs STAT3, STAT5 et NF- κ B. Par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine associées à des PCR quantitatives, nous avons montré que ces facteurs ne modifiaient pas la liaison d'UHRF1 sur le promoteur *IL-17A* et par conséquent, un autre mécanisme serait impliqué dans la modulation de la liaison du facteur UHRF1 au promoteur *IL-17A*.

UHRF1 est un facteur de transcription cellulaire, connu pour être impliqué dans la régulation des phénomènes épigénétiques *via* la modification des histones et la méthylation de l'ADN (Arita et al., 2008; Bostick et al., 2007). La méthylation de l'ADN étant un mécanisme épigénétique utilisé pour inactiver certains gènes. Jusqu'à présent, UHRF1 était étudié uniquement dans le domaine oncologique où il a été montré qu'il recrute un complexe protéique impliqué dans le *gene silencing* (Alhosin et al., 2016; Saidi et al., 2017). Dans une étude récente, l'expression élevée d'UHRF1 a été associée à des métastases tumorales (Hu et al., 2019). Dans le cadre de l'infection toxoplasmique, UHRF1 a été identifié comme un régulateur négatif du promoteur du gène de la *cycline B1* en induisant des modifications épigénétiques. De plus, Sabou *et al.*, ont identifié par spectrométrie de masse les acteurs du complexe multienzymatique recrutés par UHRF1 sur le promoteur de la *cycline B1*. Ainsi, il a été montré qu'UHRF1 interagit avec les enzymes HDAC1, HDAC2, DNMT1 et G9a qui sont impliquées dans la modulation des phénomènes épigénétiques.

Afin d'explorer le mécanisme permettant à UHRF1 d'induire une régulation négative du gène de l'*IL-17A*, nous avons d'abord voulu vérifier si les enzymes d'intérêt impliquées dans les modifications épigénétiques étaient recrutées par le facteur UHRF1 au niveau du promoteur *IL-17A*. Pour ce faire, nous avons montré par immunoprécipitation de la protéine UHRF1 le recrutement des enzymes HDAC1 et HDAC2 pendant les temps précoces de l'infection et le recrutement de G9a et DNMT1 pendant les temps tardifs de l'infection.

Les modulations épigénétiques peuvent impliquer des modifications des histones entre autre par acétylation ou par méthylation. Afin de mettre en évidence ce type de modifications sur les histones du promoteur du gène de l'*IL-17A*, nous avons réalisé une immunoprécipitation de la chromatine par des anticorps anti-histone H3 méthylés anticorps anti-histone H3 acétylée (H3Ac). Nous avons alors montré la présence d'une méthylation de l'histone H3 à 6 heures et 12 heures d'infection et une acétylation de l'histone H3 après 1 heure d'infection. Ces modifications favoriseraient l'établissement d'un environnement hétérochromatinien au niveau du promoteur du gène d'intérêt, ce qui conduit à son inactivation et favoriserait la survie et la prolifération intracellulaire du parasite. Par ce mécanisme de méthylation de l'ADN, UHRF1 est impliqué dans l'inhibition d'un grand nombre de gènes suppresseur de tumeurs et notamment, les gènes RB1 et BRCA1 (Jeanblanc et al., 2005; Jin et al., 2010).

A notre connaissance, *T. gondii* est le seul parasite pour lequel une régulation épigénétique de la cellule-hôte a été démontrée. Cependant, la méthylation de l'ADN a déjà été décrite pour d'autres agents infectieux tels que *Pseudomonas syringae* et *Wolbachia pipientis* (Gómez-

Díaz et al., 2012). Certains virus sont aussi connus pour induire une méthylation de certains gènes de l'hôte afin de supprimer la réponse immunitaire de l'hôte, c'est le cas du VIH-1 (Chéné et al., 2007; Marban et al., 2007) et du virus de l'hépatite B (Zheng et al., 2009).

Nos résultats ont été obtenus dans un modèle cellulaire trophoblastique impliqué dans la transmission trans-placentaire du parasite lors d'une toxoplasmose congénitale. Dans l'organisme humain, le parasite persiste au sein d'organes immunologiquement privilégiés comme l'œil, le cerveau ou les muscles. Nos résultats doivent être confirmés sur un modèle cellulaire adapté à la latence du parasite, comme les astrocytes, les cellules de Müller ou les cellules microgliales. De plus, un modèle d'infection murin serait également intéressant pour notre compréhension puisque l'étude de la modulation de notre cytokine devrait être envisagée dans un environnement *in vivo* plus représentatif. Enfin, cette étude devrait également être étendue aux souches sud-américaines hautement pathogènes et variables, responsables de formes sévères de TO.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nos travaux se sont focalisés sur l'étude de la régulation de l'IL-17A par un autre facteur de transcription cellulaire, CTIP2. CTIP2 est connu pour son implication dans la régulation du VIH-1. En effet, CTIP2 induit la répression de la transcription des gènes du VIH-1 en recrutant un complexe multienzymatique composé des protéines HDAC1, HDAC2 et SuV39H1, qui constituent une cible potentielle dans le cadre d'une stratégie de régulation épigénétique de la cellule-hôte (Marban et al., 2007). Dans les cellules microgliales, nous avons montré que le facteur de transcription CTIP2 induit également la répression de la transcription du gène de l'*IL-17A*. Cette répression semble être dose-dépendante et fait intervenir d'autres effecteurs protéiques, HDAC1, HDAC2 et SuV39H1. Il serait intéressant d'identifier les autres effecteurs cellulaires impliqués dans cette régulation et notamment le rôle du facteur LSD1 qui est connu pour interagir avec le facteur CTIP2 afin d'induire le *gene silencing* du VIH-1 (Le Douce et al., 2012). De plus, dans une étude récente sur un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, il a été montré que l'inhibition de LSD1 induisait une augmentation de la synthèse d'IL-17 (Liu et al., 2018). Cependant, il reste à déterminer si cette inhibition se fait directement *via* le recrutement de CTIP2 sur le promoteur du gène de l'*IL-17A*.

Dans les cellules Treg, le déficit en CTIP2 induit un déficit en Foxp3 et en IL-10 et par conséquent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et l'IL-17. Cependant, il n'a pas été montré si cette augmentation des cytokines pro-inflammatoires est liée au déficit de Foxp3 ou directement à l'action répressive de CTIP2 sur l'expression de ces gènes (Vanvalkenburgh et al., 2011).

Nos résultats préliminaires suggèrent la présence d'une synergie d'action entre CTIP2 et UHRF1. De nouvelles investigations seront nécessaires afin de déterminer si ces deux facteurs de transcription coopèrent pour leur action au niveau du promoteur de l'*IL-17A*. Cependant, il est maintenant clair que CTIP2 et UHRF1 sont impliqués dans l'inactivation de la transcription du gène de l'*IL-17A*.

Par ailleurs, des données récentes obtenues dans des lymphocytes T font état du recrutement d'un complexe multienzymatique ayant des activités déacétylase et méthyltransférase au niveau du promoteur du VIH-1. Ce complexe est associé à des modifications épigénétiques considérées comme des marques répressives, avec notamment la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Chéné et al., 2007; Marban et al., 2007).

Ce contrôle épigénétique de la structure de la chromatine est ainsi très important et constitue un moyen de régulation de l'expression des gènes en général, et de la latence parasitaire en particulier. La compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'établissement et le maintien de la latence cellulaire du parasite est donc indispensable étant donné les importantes implications thérapeutiques qui en découlent.

L'IL-17A est désormais une cible majeure pour une gamme d'anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique, tels que le secukinumab, l'ixekizumab et le brodalumab qui sont impliqués dans le traitement de maladies auto-immunes comme le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante (Chen et al., 2020; Kurschus and Moos, 2017). Par ailleurs, dans un modèle expérimental murin de toxoplasmose oculaire, l'administration d'anticorps anti-IL-17A limite la prolifération parasitaire et diminue l'inflammation en antagonisant la voie Th17 et en stimulant la voie Th1. Ce résultat souligne le rôle crucial que joue l'IL-17A dans la toxoplasmose oculaire et révèle de nouvelles approches thérapeutiques *in vivo* en réprimant la voie inflammatoire Th17 (Sauer et al., 2012).

A ce stade, de nombreuses expériences sont encore à réaliser pour étoffer la compréhension de ce mécanisme de régulation de la voie IL-17. Les expériences de ChIP permettant de confirmer le recrutement de CTIP2 sur le promoteur *IL-17A* sont en cours. Il serait intéressant de poursuivre les investigations sur le mécanisme de régulation de l'IL-17A par ce facteur de transcription crucial en présence et en absence de *T. gondii*. Nos résultats suggérant une synergie d'action entre les facteurs CTIP2 et UHRF1 au niveau du promoteur *IL-17A* sont à confirmer par des expériences d'immunoprécipitation.

Une étude de l'activité du promoteur de l'*IL-17A* avec les différentes souches parasitaires sud-américaines sur des cellules rétinienne, comme les microglies, est à prévoir. Deux de ces souches dites atypiques, la RUB et la VAND, ont été étudiées par notre équipe sur un modèle murin. Cependant, cette étude n'a pas été poursuivie du fait de la variabilité de ces souches en culture cellulaire, ce qui a engendré des problèmes de reproductibilité des expériences. Ces problèmes techniques nécessitent des investigations complémentaires afin de maîtriser l'usage de ces souches sauvages. De plus, une autre cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules Th17, l'IL-17F, possède 50% d'homologie avec l'IL-17A et peut avoir les mêmes fonctions que celle-ci. Le rôle de l'IL-17F dans la TO devra donc être examiné prochainement.

Liste des figures

Figure 1 : Stades de <i>T. gondii</i> visualisés par microscopie optique.....	12
Figure 2 : Structure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	12
Figure 3 : Cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	14
Figure 4 : Processus d'interconversion.....	15
Figure 5 : Contamination humaine par <i>T. gondii</i>	16
Figure 6 : Invasion de la cellule hôte par <i>T. gondii</i>	17
Figure 7 : Reproduction de <i>T. gondii</i> par endodyogénie.....	18
Figure 8 : Distribution géographique des géotypes de <i>T. gondii</i>	19
Figure 9 : Structure génétique de la population de <i>T. gondii</i>	20
Figure 10 : La séroprévalence de <i>T. gondii</i>	23
Figure 11 : Prévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon le département d'habitation.....	25
Figure 12 : Encéphalite toxoplasmique.....	26
Figure 13 : Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte en fonction de l'âge de la grossesse.....	27
Figure 14 : Image de fond d'œil illustrant une rétine normale.....	28
Figure 15 : Chorioretinite consécutive à une toxoplasmose congénitale.....	29
Figure 16 : Toxoplasmose oculaire récurrente.....	29
Figure 17 : Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique.....	31
Figure 18 : Utilisation du glucose(Glc) et de la glutamine (Gln) par <i>T. gondii</i>	34
Figure 19 : Inhibition des voies apoptotique par <i>T. gondii</i>	37
Figure 20 : La voie de signalisation STAT1 et sa modulation par <i>T. gondii</i>	38
Figure 21 : Schéma représentatif de l'activation de la voie de signalisation STAT3/6.....	40
Figure 22 : Modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte par <i>T. gondii</i>	41
Figure 23 : Représentation schématique de la protéine UHRF1.....	43
Figure 24 : Expression d'UHRF1 au cours du cycle cellulaire.....	43
Figure 25 : Les principales modifications des histones.....	45
Figure 26 : <i>T. gondii</i> et remodelage de la chromatine via l'inhibition de la phosphorylation de l'histone H3.....	46
Figure 27 : Réponse immunitaire innée à l'infection par <i>T. gondii</i>	50

Figure 28 : Différenciation des lymphocytes Th17.....	52
Figure 29 : Les ligands de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs.....	53
Figure 30 : Régulation de la lignée Th17.....	55
Figure 31 : Inhibition de la production d'IL-17 induite par les STATs.....	56
Figure 32 : Régulation du gène de l'IL-17A.....	56

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification taxonomique du parasite responsable de la toxoplasmose.....	11
Tableau 2 : Caractéristiques des trois lignées clonales de <i>T. gondii</i>	19
Tableau 3 : Les protéines ROP impliquées dans la virulence de <i>T. gondii</i>	21
Tableau 4 : Stratégies de diagnostic de la toxoplasmose.....	30
Tableau 5 : Recommandation hygiéno-diététiques de prévention chez la femme enceinte...	32

BIBLIOGRAPHIE

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* *278*, 1910–1914.

Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carne, B., and Dardé, M.L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *34*, 1185–1196.

Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., and Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathog* *1*.

Alhosin, M., Omran, Z., Zamzami, M.A., Al-Malki, A.L., Choudhry, H., Mousli, M., and Bronner, C. (2016). Signalling pathways in UHRF1-dependent regulation of tumor suppressor genes in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *35*, 174.

Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S., and Egwuagu, C.E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* *13*, 711–718.

Amatya, N., Garg, A.V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* *38*, 310–322.

Andrade, G.M.Q., Vasconcelos-Santos, D.V., Carellos, E.V.M., Romanelli, R.M.C., Vitor, R.W.A., Carneiro, A.C.A.V., and Januario, J.N. (2009). Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy – an underestimated event? *Jornal de Pediatria* *0*.

Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., and Shirakawa, M. (2008). Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* *455*, 818–821.

Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., and Macklis, J.D. (2008). Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J. Neurosci.* *28*, 622–632.

Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J.C. (2004). Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int. J. Parasitol.* *34*, 361–368.

Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D.J., Ishmael, J.E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 10315–10322.

Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A., and Leid, M. (2002). COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem. J.* *368*, 555–563.

Awasthi, A., and Kuchroo, V.K. (2009). Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int. Immunol.* *21*, 489–498.

- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1380–1389.
- Bäckdahl, L., Bushell, A., and Beck, S. (2009). Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 176–184.
- Baeuerle, P.A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141–179.
- Bárdos, J.I., and Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim. Biophys. Acta* 1755, 107–120.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 621–628.
- Behnke, M.S., Radke, J.B., Smith, A.T., Sullivan, W.J., and White, M.W. (2008). The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol. Microbiol.* 68, 1502–1518.
- van den Berg, W.B., and Miossec, P. (2009). IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 5, 549.
- Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 652–657.
- Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Maréchal, E., and Cesbron-Delauw, M.-F. (2006). *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem. J.* 394, 197–205.
- Bishop, J.R., Crawford, B.E., and Esko, J.D. (2005). Cell Surface Heparan Sulfate Promotes Replication of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 73, 5395–5401.
- Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 607–623.
- Blader, I.J., and Koshy, A.A. (2014). *Toxoplasma gondii* Development of Its Replicative Niche: in Its Host Cell and Beyond. *Eukaryot Cell* 13, 965–976.
- BLADER, I.J., and SAEIJ, J.P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117, 458–476.
- Blader, I.J., Manger, I.D., and Boothroyd, J.C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *J. Biol. Chem.* 276, 24223–24231.
- Blanchard, N., and Shastri, N. (2010). Topological journey of parasite-derived antigens for presentation by MHC class I molecules. *Trends Immunol.* 31, 414–421.

- Blume, M., Rodriguez-Contreras, D., Landfear, S., Fleige, T., Soldati-Favre, D., Lucius, R., and Gupta, N. (2009). Host-derived glucose and its transporter in the obligate intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* are dispensable by glutaminolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 12998–13003.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 725–731.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 749–795.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* *5*, 769.
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. (2007). UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science* *317*, 1760–1764.
- Bougdour, A., Braun, L., Cannella, D., and Hakimi, M.-A. (2010). Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* *12*, 413–423.
- Bougdour, A., Tardieux, I., and Hakimi, M.-A. (2014). *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. *Cell. Microbiol.* *16*, 334–343.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., et al. (2005). Proteomic Analysis of Rhoptry Organelles Reveals Many Novel Constituents for Host-Parasite Interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *280*, 34245–34258.
- Bronner, C., Krifa, M., and Mousli, M. (2013). Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 1643–1649.
- Brunet, J., Pfaff, A.W., Abidi, A., Unoki, M., Nakamura, Y., Guinard, M., Klein, J.-P., Candolfi, E., and Mousli, M. (2008). *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell. Microbiol.* *10*, 908–920.
- Bullens, D.M.A., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P.W., Dupont, L.J., and Ceuppens, J.L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* *7*, 135.
- Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., and Denkers, E.Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* *167*, 2193–2201.
- Buzoni-Gatel, D., Dubremetz, J.-F., and Werts, C. (2008). Manipulation du système immunitaire par le parasite *Toxoplasma gondii*. *Med Sci (Paris)* *24*, 191–196.

- Cannella, D., Brenier-Pinchart, M.-P., Braun, L., van Rooyen, J.M., Bougdour, A., Bastien, O., Behnke, M.S., Curt, R.-L., Curt, A., Saeij, J.P.J., et al. (2014). miR-146a and miR-155 Delineate a MicroRNA Fingerprint Associated with Toxoplasma Persistence in the Host Brain. *Cell Reports* 6, 928–937.
- Carne, B., Demar, M., Ajzenberg, D., and Dardé, M.L. (2009). Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 15, 656–658.
- Carmen, J.C., Hardi, L., and Sinai, A.P. (2006). *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell. Microbiol.* 8, 301–315.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Côté, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19, 321–329.
- Carruthers, V.B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81, 111–122.
- Carruthers, V., and Boothroyd, J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 83–89.
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., and Sibley, L.D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* 1, 225–235.
- Chaib, H., Nebbioso, A., Prebet, T., Castellano, R., Garbit, S., Restouin, A., Vey, N., Altucci, L., and Collette, Y. (2012). Anti-leukemia activity of chaetocin via death receptor-dependent apoptosis and dual modulation of the histone methyl-transferase SUV39H1. *Leukemia* 26, 662–674.
- Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 115, 3049–3059.
- Chaudhary, K., Darling, J.A., Fohl, L.M., Sullivan, W.J., Donald, R.G.K., Pfefferkorn, E.R., Ullman, B., and Roos, D.S. (2004). Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 279, 31221–31227.
- Cheeseman, K., and Weitzman, J.B. (2015). Host-parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cell. Microbiol.* 17, 1121–1132.
- Chen, Z., and O’Shea, J.J. (2008). Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 41, 71–78.
- Chen, S., Blijdorp, I., van Mens, L., Bowcutt, R., Latuhihin, T., van de Sande, M., Shaw, S., Yeremenko, N., and Baeten, D. (2020). IL-17A and IL-17F expression and functional responses in rheumatoid arthritis and peripheral spondyloarthritis. *J. Rheumatol.*
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.-M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L., and O’Shea, J.J. (2006). Selective regulatory function of *Socs3* in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8137–8142.

- Chéné, I. du, Basyuk, E., Lin, Y.-L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., et al. (2007). Suv39H1 and HP1 γ are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J* 26, 424–435.
- Cherrier, T., Suzanne, S., Redel, L., Calao, M., Marban, C., Samah, B., Mukerjee, R., Schwartz, C., Gras, G., Sawaya, B., et al. (2009). p21WAF1 gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* 28, 3380–3389.
- Cherrier, T., Le, V.D., Redel, L., Marban, C., Aunis, D., Rohr, O., and Schwartz, C. (2010). [Molecular basis of HIV-1 latency - Part II: HIV-1 reactivation and therapeutic implications]. *Med Sci (Paris)* 26, 291–295.
- Chiricozzi, A., and Krueger, J.G. (2013). IL-17 targeted therapies for psoriasis. *Expert Opin Investig Drugs* 22, 993–1005.
- Cho, M.-L., Kang, J.-W., Moon, Y.-M., Nam, H.-J., Jhun, J.-Y., Heo, S.-B., Jin, H.-T., Min, S.-Y., Ju, J.-H., Park, K.-S., et al. (2006). STAT3 and NF- κ B Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 176, 5652–5661.
- Clough, B., and Frickel, E.-M. (2017). The Toxoplasma Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier. *Trends Parasitol.* 33, 473–488.
- Commodaro, A.G., Belfort, R.N., Rizzo, L.V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier, M.N., and Belfort, R. (2009). Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 345–350.
- Coppens, I., and Romano, J.D. (2018). Hostile intruder: Toxoplasma holds host organelles captive. *PLoS Pathog* 14.
- Coppens, I., Sinai, A.P., and Joiner, K.A. (2000). Toxoplasma gondii exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J. Cell Biol.* 149, 167–180.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., and Joiner, K.A. (2006). Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261–274.
- Cua, D.J., and Tato, C.M. (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479–489.
- Curtis, M.M., and Way, S.S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177–185.
- Damsker, J.M., Hansen, A.M., and Caspi, R.R. (2010). Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 211–221.
- Dang, C.V., Resar, L.M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J.E., Wonsey, D., and Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell Res.* 253, 63–77.

- Darkin-Rattray, S.J., Gurnett, A.M., Myers, R.W., Dulski, P.M., Crumley, T.M., Allocco, J.J., Cannova, C., Meinke, P.T., Colletti, S.L., Bednarek, M.A., et al. (1996). Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *PNAS* *93*, 13143–13147.
- Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* *13*, 2905–2927.
- Davenel, S., Galaine, J., Guelet, B., Marteil, S., and Robert-Gangneux, F. (2010). La toxoplasmose congénitale en France en 2009. *Journal de Pharmacie Clinique* *29*, 5–30.
- Delair, E., Monnet, D., Grabar, S., Dupouy-Camet, J., Yera, H., and Brézin, A.P. (2008). Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* *146*, 851–855.
- Delorme-Walker, V., Abrivard, M., Lagal, V., Anderson, K., Perazzi, A., Gonzalez, V., Page, C., Chauvet, J., Ochoa, W., Volkmann, N., et al. (2012). Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. *J. Cell. Sci.* *125*, 4333–4342.
- Denkers, E.Y. (2003). From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *39*, 193–203.
- Denkers, E.Y., Bzik, D.J., Fox, B.A., and Butcher, B.A. (2012). An Inside Job: Hacking into Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Cascades by the Intracellular Protozoan *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* *80*, 476–482.
- Derouin, F. (2001). Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs* *2*, 1368–1374.
- Desplats, P., Dumaop, W., Smith, D., Adame, A., Everall, I., Letendre, S., Ellis, R., Cherner, M., Grant, I., and Masliah, E. (2013). Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology* *80*, 1415–1423.
- Dessauge, F., Hilaly, S., Baumgartner, M., Blumen, B., Werling, D., and Langsley, G. (2005). c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene* *24*, 1075–1083.
- Diana, J., Vincent, C., Peyron, F., Picot, S., Schmitt, D., and Persat, F. (2005). *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clin Exp Immunol* *141*, 475–484.
- Dixon, S.E., Stilger, K.L., Elias, E.V., Naguleswaran, A., and Sullivan, W.J. (2010). A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *173*, 1–9.
- Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* *84*, 933–939.
- Du, J., An, R., Chen, L., Shen, Y., Chen, Y., Cheng, L., Jiang, Z., Zhang, A., Yu, L., Chu, D., et al. (2014). *Toxoplasma gondii* Virulence Factor ROP18 Inhibits the Host NF- κ B Pathway by Promoting p65 Degradation. *J Biol Chem* *289*, 12578–12592.
- Dubey, J.P. (2007). 1 - The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii*, L.M. Weiss, and K. Kim, eds. (London: Academic Press), pp. 1–17.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267–299.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., and Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353, 1829–1833.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J.F. (2007). ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 3.
- Esch, K.J., and Petersen, C.A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clin Microbiol Rev* 26, 58–85.
- Fallahi, S., Rostami, A., Nourollahpour Shiadeh, M., Behniafar, H., and Paktinat, S. (2018). An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 47, 133–140.
- Fekkar, A., Ajzenberg, D., Bodaghi, B., Touafek, F., Le Hoang, P., Delmas, J., Robert, P.Y., Dardé, M.L., Mazier, D., and Paris, L. (2011). Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1513–1517.
- Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., et al. (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii* secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 8, 484–495.
- Fox, B.A., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.* 34, 323–331.
- Francia, M.E., and Striepen, B. (2014). Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 125–136.
- Franco, M., Shastri, A.J., and Boothroyd, J.C. (2014). Infection by *Toxoplasma gondii* Specifically Induces Host c-Myc and the Genes This Pivotal Transcription Factor Regulates. *Eukaryot Cell* 13, 483–493.
- Freeman, K., Tan, H.K., Prusa, A., Petersen, E., Buffolano, W., Malm, G., Cortina-Borja, M., Gilbert, R., and European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (2008). Predictors of retinochoroiditis in children with congenital toxoplasmosis: European, prospective cohort study. *Pediatrics* 121, e1215-1222.
- Furtado, J.M., Winthrop, K.L., Butler, N.J., and Smith, J.R. (2013). Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41, 82–94.
- Gaddi, P.J., and Yap, G.S. (2007). Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 155–159.

- Gaffen, S.L. (2011). Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 23, 613–619.
- Gaffen, S.L., and Moutsopoulos, N.M. (2020). Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol* 5.
- Gaffen, S.L., Kramer, J.M., Yu, J.J., and Shen, F. (2006). The IL-17 cytokine family. *Vitam. Horm.* 74, 255–282.
- Gail, M., Gross, U., and Bohne, W. (2001). Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization. *Mol. Genet. Genomics* 265, 905–912.
- Gail, M., Gross, U., and Bohne, W. (2004). Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitol. Res.* 94, 233–239.
- Garweg, J.G., and Candolfi, E. (2009). Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 211–220.
- Garweg, J.G., and Stanford, M.R. (2013). Therapy for ocular toxoplasmosis--the future. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 21, 300–305.
- Garweg, J.G., Ventura, A.C.S., Halberstadt, M., Silveira, C., Muccioli, C., Belfort, R.J., and Jacquier, P. (2005). Specific antibody levels in the aqueous humor and serum of two distinct populations of patients with ocular toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 287–295.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260.
- Gigley, J.P., Fox, B.A., and Bzik, D.J. (2009). Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *J. Immunol.* 182, 1069–1078.
- GILBERT, R., and STANFORD, M. (2000). Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol* 84, 224–226.
- Gilbert, R.E., Dunn, D.T., Lightman, S., Murray, P.I., Pavesio, C.E., Gormley, P.D., Masters, J., Parker, S.P., and Stanford, M.R. (1999). Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol. Infect.* 123, 283–289.
- Gilbert, R.E., Freeman, K., Lago, E.G., Bahia-Oliveira, L.M.G., Tan, H.K., Wallon, M., Buffolano, W., Stanford, M.R., and Petersen, E. (2008). Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2.
- Girolomoni, G., Mrowietz, U., and Paul, C. (2012). Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *British Journal of Dermatology* 167, 717–724.
- Goebel, S., Gross, U., and Lüder, C.G. (2001). Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J. Cell. Sci.* 114, 3495–3505.

- Gold, D.A., Kaplan, A.D., Lis, A., Bett, G.C., Rosowski, E.E., Cirelli, K.M., Bougdour, A., Sidik, S.M., Beck, J.R., Lourido, S., et al. (2015). The *Toxoplasma dense granule* proteins GRA17 and GRA23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. *Cell Host Microbe* 17, 642–652.
- Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M.A., and Rivero, A. (2012). Epigenetics of Host–Pathogen Interactions: The Road Ahead and the Road Behind. *PLoS Pathog* 8.
- Grünig, G., Corry, D.B., Leach, M.W., Seymour, B.W.P., Kurup, V.P., and Rennick, D.M. (1997). Interleukin-10 Is a Natural Suppressor of Cytokine Production and Inflammation in a Murine Model of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J Exp Med* 185, 1089–1100.
- Gupta, N., Zahn, M.M., Coppens, I., Joiner, K.A., and Voelker, D.R. (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J. Biol. Chem.* 280, 16345–16353.
- Hakansson, S. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO Journal* 20, 3132–3144.
- Hakimi, M.-A., and Bougdour, A. (2015). *Toxoplasma*'s ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 26, 24–31.
- Hakimi, M.-A., Olias, P., and Sibley, L.D. (2017). *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. *Clin Microbiol Rev* 30, 615–645.
- Halonen, S.K., and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 65–71.
- Happel, K.I., Dubin, P.J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L.J., Odden, A.R., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., et al. (2005). Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 202, 761–769.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Marzio, P.D., Morgan, D.O., and Landau, N.R. (1995). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Protein R (Vpr) Arrests Cells in the G2 Phase of the Cell Cycle by Inhibiting p34cdc2 Activity. *J. VIROL.* 69, 7.
- He, X., Grigg, M.E., Boothroyd, J.C., and Garcia, K.C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nature Structural Biology* 9, 606.
- Holland, G.N. (2003). Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* 136, 973–988.
- Hopfner, R., Mousli, M., Jeltsch, J.M., Voulgaris, A., Lutz, Y., Marin, C., Bellocq, J.P., Oudet, P., and Bronner, C. (2000). ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression. *Cancer Res.* 60, 121–128.

- Hori, J., Vega, J.L., and Masli, S. (2010). Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *18*, 325–333.
- Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* *172*, 1561–1566.
- Hu, O., Provvido, A., and Zhu, Y. (2020). Generation of IL17RB Knockout Cell Lines Using CRISPR/Cas9-Based Genome Editing. *Methods Mol. Biol.* *2108*, 345–353.
- Hu, Q., Qin, Y., Ji, S., Xu, W., Liu, W., Sun, Q., Zhang, Z., Liu, M., Ni, Q., Yu, X., et al. (2019). UHRF1 promotes aerobic glycolysis and proliferation via suppression of SIRT4 in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* *452*, 226–236.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* *271*, 32253–32259.
- Huang, X., Chen, S., Shen, Q., Chen, S., Yang, L., Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Schmidt, C.A., and Li, Y. (2011). Down regulation of BCL11B expression inhibits proliferation and induces apoptosis in malignant T cells by BCL11B-935-siRNA. *Hematology* *16*, 236–242.
- Huang, X., Du, X., and Li, Y. (2012). The role of BCL11B in hematological malignancy. *Experimental Hematology & Oncology* *1*, 22.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* *10*, 766–778.
- Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2010). An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* *329*, 93–96.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., et al. (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* *30*, 108–119.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., and Nakae, S. (2011). Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* *34*, 149–162.
- Jeanblanc, M., Mousli, M., Hopfner, R., Bathami, K., Martinet, N., Abbady, A.-Q., Siffert, J.-C., Mathieu, E., Muller, C.D., and Bronner, C. (2005). The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* *24*, 7337–7345.
- Jin, W., Chen, L., Chen, Y., Xu, S.-G., Di, G.-H., Yin, W.-J., Wu, J., and Shao, Z.-M. (2010). UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *123*, 359–373.

- Jones, J.L., and Dubey, J.P. (2010). Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology* 124, 10–25.
- Jones, J.L., Muccioli, C., Belfort, R., Holland, G.N., Roberts, J.M., and Silveira, C. (2006a). Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection, Brazil. *Emerg Infect Dis* 12, 582–587.
- Jones, J.L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J.S., and Montoya, J.G. (2009). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 49, 878–884.
- Jones, L.A., Alexander, J., and Roberts, C.W. (2006b). Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunol.* 28, 635–642.
- Julliac, B., Théophile, H., Begorre, M., Richez, B., and Haramburu, F. (2010). Side effects of spiramycin masquerading as local anesthetic toxicity during labor epidural analgesia. *Int J Obstet Anesth* 19, 331–332.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–227.
- Kato, S., Ishii, T., and Kouzmenko, A. (2015). Point mutations in an epigenetic factor lead to multiple types of bone tumors: role of H3.3 histone variant in bone development and disease. *Bonekey Rep* 4.
- Katz, Y., and Nadiv, O. (2000). Interleukin-17 may have a central role in inflammatory joint diseases as a “fine-tuning” cytokine. *Isr. Med. Assoc. J.* 2 *Suppl*, 21–22.
- Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2008). Production and functions of IL-17 in microglia. *Journal of Neuroimmunology* 194, 54–61.
- Keller, P., Schaumburg, F., Fischer, S.F., Häcker, G., Gross, U., and Lüder, C.G.K. (2006). Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 312–319.
- Kelly, M.N., Kolls, J.K., Happel, K., Schwartzman, J.D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., and Khan, I.A. (2005). Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 73, 617–621.
- Kemp, L.E., Yamamoto, M., and Soldati-Favre, D. (2013). Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 607–631.
- Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol* 41, 645–655.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259–272.

- Kikumura, A., Ishikawa, T., and Norose, K. (2012). Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *British Journal of Ophthalmology* 96, 1259–1267.
- Kim, K. (2018). The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 479–499.
- Kim, L., and Denkers, E.Y. (2006). *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *J. Cell. Sci.* 119, 2119–2126.
- Kim, S.-K., Fouts, A.E., and Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J. Immunol.* 178, 5154–5165.
- Kirkham, B.W., Kavanaugh, A., and Reich, K. (2014). Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology* 141, 133–142.
- Kominami, R. (2012). Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 88, 72–87.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19, 362–371.
- Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 131, 822.
- Kurschus, F.C., and Moos, S. (2017). IL-17 for therapy. *J. Dermatol. Sci.* 87, 221–227.
- Kuzmenok, O.I., Chiang, S.-C., Lin, Y.-C., and Lee, S.T. (2005). Retardation of cell cycle progression of macrophages from G1 to S phase by ICAM-L from *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 35, 1547–1555.
- Lahmar, I., Abou-Bacar, A., Abdelrahman, T., Guinard, M., Babba, H., Ben Yahia, S., Kairallah, M., Speeg-Schatz, C., Bourcier, T., Sauer, A., et al. (2009). Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J. Infect. Dis.* 199, 1239–1249.
- Laliberté, J., and Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1900–1915.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371–381.
- Le Douce, V., Herbein, G., Rohr, O., and Schwartz, C. (2010). Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 7, 32.
- Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2012). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* 40, 1904–1915.

- Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Nishimura, Y., Nieminen, A.L., and Herman, B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.* *31*, 305–319.
- Leng, J., and Denkers, E.Y. (2009). *Toxoplasma gondii* Inhibits Covalent Modification of Histone H3 at the IL-10 Promoter in Infected Macrophages. *PLOS ONE* *4*, e7589.
- LENG, J., BUTCHER, B.A., and DENKERS, E.Y. (2009). Dysregulation of Macrophage Signal Transduction by *Toxoplasma gondii*: Past Progress and Recent Advances. *Parasite Immunol* *31*, 717–728.
- Leng, J., Butcher, B.A., Egan, C.E., Abi Abdallah, D.S., and Denkers, E.Y. (2009). *Toxoplasma gondii* Prevents Chromatin Remodeling Initiated by TLR-Triggered Macrophage Activation. *J Immunol* *182*, 489–497.
- Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.-C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., et al. (2010). Reprogramming of T Cells to Natural Killer–Like Cells upon Bcl11b Deletion. *Science* *329*, 85–89.
- Lin, A.M., Rubin, C.J., Khandpur, R., Wang, J.Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E.C., Shah, P., Kaplan, M.J., and Bruce, A.T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol* *187*, 490–500.
- Lin, W., Niu, Z., Zhang, H., Kong, Y., Wang, Z., Yang, X., and Yuan, F. (2019). Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* *12*, 3604–3612.
- Liu, Q., Li, F.-C., Zhou, C.-X., and Zhu, X.-Q. (2017). Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. *Exp. Parasitol.* *176*, 89–98.
- Liu, W., Fan, J.-B., Xu, D.-W., Zhu, X.-H., Yi, H., Cui, S.-Y., Zhang, J., and Cui, Z.-M. (2018). Knockdown of LSD1 ameliorates the severity of rheumatoid arthritis and decreases the function of CD4 T cells in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol* *11*, 333–341.
- Liu, X.K., Lin, X., and Gaffen, S.L. (2004). Crucial Role for Nuclear Factor of Activated T Cells in T Cell Receptor-mediated Regulation of Human Interleukin-17. *J. Biol. Chem.* *279*, 52762–52771.
- Luft, B.J., and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* *15*, 211–222.
- Lv, M., Zhang, D., Dai, D., Zhang, W., and Zhang, L. (2016). Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate regulates the expression of interleukin-17A in activated microglia in cerebral ischemia/reperfusion. *Inflamm. Res.* *65*, 551–562.
- Lyons, R.E., McLeod, R., and Roberts, C.W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitology* *18*, 198–201.
- Machala, L., Kodym, P., Malý, M., Geleneky, M., Beran, O., and Jilich, D. (2015). [Toxoplasmosis in immunocompromised patients]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* *64*, 59–65.

- Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., and Pleyer, U. (2014). Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* 39, 77–106.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 26, 412–423.
- Martin, A.M., Liu, T., Lynn, B.C., and Sinai, A.P. (2007). The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54, 25–28.
- Martin, D.A., Towne, J.E., Kricorian, G., Klekotka, P., Gudjonsson, J.E., Krueger, J.G., and Russell, C.B. (2013). The Emerging Role of Interleukin-17 in the Pathogenesis of Psoriasis: Preclinical and Clinical Findings. *J Invest Dermatol* 133, 17–26.
- Mason, N.J., Fiore, J., Kobayashi, T., Masek, K.S., Choi, Y., and Hunter, C.A. (2004). TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 72, 5662–5667.
- MASOUD, G.N., WANG, J., CHEN, J., MILLER, D., and LI, W. (2015). Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel HIF1 α Inhibitors. *Anticancer Res* 35, 3849–3859.
- Massimine, K.M., Doan, L.T., Atreya, C.A., Stedman, T.T., Anderson, K.S., Joiner, K.A., and Coppens, I. *Toxoplasma gondii* is capable of exogenous folate transport. *Molecular and Biochemical Parasitology* 144, 44–54.
- Mathur, A.N., Chang, H.-C., Zisoulis, D.G., Stritesky, G.L., Yu, Q., O'Malley, J.T., Kapur, R., Levy, D.E., Kansas, G.S., and Kaplan, M.H. (2007). Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J. Immunol.* 178, 4901–4907.
- McGovern, K.E., and Wilson, E.H. (2013). Dark side illuminated: imaging of *Toxoplasma gondii* through the decades. *Parasit Vectors* 6, 334.
- Melo, M.B., Jensen, K.D.C., and Saeij, J.P.J. (2011). *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* 27, 487–495.
- Melzer, T.C., Cranston, H.J., Weiss, L.M., and Halonen, S.K. (2010). Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. *J Neuroparasitology* 1.
- Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., and Delauw, M.-F.-C. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 829–849.
- Miossec, P. (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: If T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis & Rheumatism* 48, 594–601.
- Mitchell Gary F., Verwoert Germaine C., Tarasov Kirill V., Isaacs Aaron, Smith Albert V., Yasmin null, Rietzschel Ernst R., Tanaka Toshiko, Liu Yongmei, Parsa Afshin, et al. (2012). Common Genetic Variation in the 3'-BCL11B Gene Desert Is Associated With Carotid-

Femoral Pulse Wave Velocity and Excess Cardiovascular Disease Risk. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5, 81–90.

Molestina, R.E., Payne, T.M., Coppens, I., and Sinai, A.P. (2003). Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell. Sci.* 116, 4359–4371.

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

Mousli, M., Hopfner, R., Abbady, A.-Q., Monté, D., Jeanblanc, M., Oudet, P., Louis, B., and Bronner, C. (2003). ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells. *Br. J. Cancer* 89, 120–127.

Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., and Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36, 75–88.

Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 933–944.

Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., and Curiel, T.J. (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* 160, 1824–1830.

Niedelman, W., Gold, D.A., Rosowski, E.E., Sprockholt, J.K., Lim, D., Farid Arenas, A., Melo, M.B., Spooner, E., Yaffe, M.B., and Saeij, J.P.J. (2012). The Rhopty Proteins ROP18 and ROP5 Mediate *Toxoplasma gondii* Evasion of the Murine, But Not the Human, Interferon-Gamma Response. *PLoS Pathog* 8.

Oh, Y.M., Mahar, M., Ewan, E.E., Leahy, K.M., Zhao, G., and Cavalli, V. (2018). Epigenetic regulator UHRF1 inactivates REST and growth suppressor gene expression via DNA methylation to promote axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E12417–E12426.

Ong, Y.-C., Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2010). *Toxoplasma* Rhopty Protein 16 (ROP16) Subverts Host Function by Direct Tyrosine Phosphorylation of STAT6. *J Biol Chem* 285, 28731–28740.

Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467.

Pang, L., Zou, S., Shi, Y., Mao, Q., and Chen, Y. (2019). Apigenin attenuates PM2.5-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by down-regulating NF-κB in murine model of asthma. *Int J Clin Exp Pathol* 12, 3700–3709.

Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M.E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39, 1385–1394.

Park, Y.-H., and Nam, H.-W. (2013). Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *Korean J Parasitol* 51, 393–399.

- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* *6*, 1133–1141.
- Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 49–62.
- Petersen, E., Kijlstra, A., and Stanford, M. (2012). Epidemiology of ocular toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *20*, 68–75.
- Pfaff, A.W., Villard, O., Klein, J.-P., Mousli, M., and Candolfi, E. (2005). Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: cross-regulation of nitric oxide production and polyamine biosynthesis. *Int. J. Parasitol.* *35*, 1569–1576.
- Pfaff, A.W., de-la-Torre, A., Rochet, E., Brunet, J., Sabou, M., Sauer, A., Bourcier, T., Gomez-Marin, J.E., and Candolfi, E. (2014). New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* *44*, 99–107.
- Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 908–912.
- Phelps, E.D., Sweeney, K.R., and Blader, I.J. (2008). *Toxoplasma gondii* rhoptry discharge correlates with activation of the early growth response 2 host cell transcription factor. *Infect. Immun.* *76*, 4703–4712.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 375–386.
- Pleyer, U., Schlüter, D., and Mänz, M. (2014). Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. *Ophthalmic Res.* *52*, 116–123.
- Qian, X., Hulit, J., Suyama, K., Eugenin, E.A., Belbin, T.J., Loudig, O., Smirnova, T., Zhou, Z.N., Segall, J., Locker, J., et al. (2013). p21CIP1 mediates reciprocal switching between proliferation and invasion during metastasis. *Oncogene* *32*, 2292–2303.
- Reese, M.L., Zeiner, G.M., Saeij, J.P.J., Boothroyd, J.C., and Boyle, J.P. (2011). Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 9625–9630.
- Robben, P.M., Mordue, D.G., Truscott, S.M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L.D. (2004). Production of IL-12 by Macrophages Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on the Parasite Genotype. *The Journal of Immunology* *172*, 3686–3694.
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* *25*, 264–296.
- Roberts, F., and McLeod, R. (1999). Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Parasitology Today* *15*, 51–57.

- Roberts, F., Mets, M.B., Ferguson, D.J., O'Grady, R., O'Grady, C., Thulliez, P., Brézin, A.P., and McLeod, R. (2001). Histopathological features of ocular toxoplasmosis in the fetus and infant. *Arch. Ophthalmol.* *119*, 51–58.
- Rochet, É., Brunet, J., Sabou, M., Marcellin, L., Bourcier, T., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2015). Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect. Immun.* *83*, 2109–2117.
- Rochet, E., Argy, N., Greigert, V., Brunet, J., Sabou, M., Marcellin, L., de-la-Torre, A., Sauer, A., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2019). Type I ROP16 regulates retinal inflammatory responses during ocular toxoplasmosis. *PLoS One* *14*.
- Romano, J.D., Sonda, S., Bergbower, E., Smith, M.E., and Coppens, I. (2013). *Toxoplasma gondii* salvages sphingolipids from the host Golgi through the rerouting of selected Rab vesicles to the parasitophorous vacuole. *Mol Biol Cell* *24*, 1974–1995.
- Rome, M.E., Beck, J.R., Turetzky, J.M., Webster, P., and Bradley, P.J. (2008). Intervacuolar Transport and Unique Topology of GRA14, a Novel Dense Granule Protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* *76*, 4865–4875.
- Rommereim, L.M., Bellini, V., Fox, B.A., Pètre, G., Rak, C., Touquet, B., Aldebert, D., Dubremetz, J.-F., Cesbron-Delauw, M.-F., Mercier, C., et al. (2016). Phenotypes Associated with Knockouts of Eight Dense Granule Gene Loci (GRA2-9) in Virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* *11*, e0159306.
- Rosowski, E.E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R.A., Jensen, K.D.C., and Saeij, J.P.J. (2011). Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *Journal of Experimental Medicine* *208*, 195–212.
- Rotili, D., Simonetti, G., Savarino, A., Palamara, A.T., Migliaccio, A.R., and Mai, A. (2009). Non-Cancer Uses of Histone Deacetylase Inhibitors: Effects on Infectious Diseases and Hemoglobinopathies+.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattéi, M.G., Denizot, F., and Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol.* *150*, 5445–5456.
- Ruddy, M.J., Wong, G.C., Liu, X.K., Yamamoto, H., Kasayama, S., Kirkwood, K.L., and Gaffen, S.L. (2004). Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- α is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J. Biol. Chem.* *279*, 2559–2567.
- Sabou, M., Doderer-Lang, C., Leyer, C., Konjic, A., Kubina, S., Lennon, S., Rohr, O., Viville, S., Cianféroni, S., Candolfi, E., et al. (2019). *Toxoplasma gondii* ROP16 kinase silences the cyclin B1 gene promoter by hijacking host cell UHRF1-dependent epigenetic pathways. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., and Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology* *21*, 476–481.

Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis. *Science* 314, 1780–1783.

Saeij, J.P.J., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–327.

Saidi, S., Popov, Z., Janevska, V., and Panov, S. (2017). Overexpression of UHRF1 gene correlates with the major clinicopathological parameters in urinary bladder cancer. *Int Braz J Urol* 43, 224–229.

Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S., et al. (2010). Dectin-2 Recognition of α -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681–691.

Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., Sullivan, W.J., Cesbron-Delauw, M.-F., and Hakimi, M.-A. (2005). Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* 25, 10301–10314.

Sauer, A., Pfaff, A.W., Villard, O., Creuzot-Garcher, C., Dalle, F., Chiquet, C., Pelloux, H., Speeg-Schatz, C., Gaucher, D., Prevost, G., et al. (2012). Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J. Infect. Dis.* 206, 1319–1329.

Sauer, A., Rochet, E., Lahmar, I., Brunet, J., Sabou, M., Bourcier, T., Candolfi, E., and Pfaff, A.W. (2013). The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int. J. Parasitol.* 43, 721–728.

Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 509–513.

Seabra, S.H., DaMatta, R.A., de Mello, F.G., and de Souza, W. (2004). Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 90, 455–460.

Shabgah, A.G., Fattahi, E., and Shahneh, F.Z. (2014). Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol* 31, 256–261.

Shapira, S., Harb, O.S., Margarit, J., Matrajt, M., Han, J., Hoffmann, A., Freedman, B., May, M.J., Roos, D.S., and Hunter, C.A. (2005). Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 118, 3501–3508.

Shwab, E.K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., and Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461.

Sibley, L.D. (2004). Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science* 304, 248–253.

- Sibley, L.D. (2010). How Apicomplexan Parasites Move In and Out of Cells. *Curr Opin Biotechnol* 21, 592–598.
- Sibley, L.D., and Ajioka, J.W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 329–351.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, Regulation and Function of NF-kappaB. *Annual Review of Cell Biology* 10, 405–455.
- Sinai, A.P., Webster, P., and Joiner, K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 17), 2117–2128.
- Spear, W., Chan, D., Coppens, I., Johnson, R.S., Giaccia, A., and Blader, I.J. (2006). The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cell. Microbiol.* 8, 339–352.
- Sridharan, H., and Upton, J.W. (2014). Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 22, 199–207.
- Steinfeldt, T., Könen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2010). Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* 8.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41.
- Striepen, B., Jordan, C.N., Reiff, S., and van Dooren, G.G. (2007). Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa. *PLoS Pathog* 3.
- Strobl, J.S., Cassell, M., Mitchell, S.M., Reilly, C.M., and Lindsay, D.S. (2007). SCRIPTAID AND SUBEROYLANILIDE HYDROXAMIC ACID ARE HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS WITH POTENT ANTI-TOXOPLASMA GONDII ACTIVITY IN VITRO. *Para* 93, 694–700.
- Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., et al. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7, 937–945.
- Stumhofer, J.S., Silver, J., and Hunter, C.A. (2007). Negative regulation of Th17 responses. *Semin Immunol* 19, 394–399.
- Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2014). Complex Immune Cell Interplay in the Gamma Interferon Response during *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect Immun* 82, 3090–3097.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., et al. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5844–5849.

- Su, D., Cheng, Y., Li, S., Dai, D., Zhang, W., and Lv, M. (2017). Sphk1 mediates neuroinflammation and neuronal injury via TRAF2/NF- κ B pathways in activated microglia in cerebral ischemia reperfusion. *Journal of Neuroimmunology* 305, 35–41.
- Subauste, C.S., Ajzenberg, D., and Kijlstra, A. (2011). Review of the series “Disease of the year 2011: toxoplasmosis” pathophysiology of toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 19, 297–306.
- Suka, N., Luo, K., and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat. Genet.* 32, 378–383.
- Sun, Z., and Andersson, R. (2002). NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 18, 99–106.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240, 516–518.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145, 3796–3806.
- Tato, C.M., and Hunter, C.A. (2002). Host-Pathogen Interactions: Subversion and Utilization of the NF- κ B Pathway during Infection. *Infect Immun* 70, 3311–3317.
- Taylor, P.R., Roy, S., Leal, J.S., Sun, Y., Howell, S.J., Cobb, B.A., Li, X., and Pearlman, E. (2014). Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and dectin-2. *Nat Immunol* 15, 143–151.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., et al. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314, 1776–1780.
- Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V.J., Barrett, B., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T.M., and Leid, M. (2006). CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. *J. Biol. Chem.* 281, 32272–32283.
- de-la-Torre, A., Rios-Cadavid, A.C., Cardozo-García, C.M., and Gomez-Marín, J.E. (2009). Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *British Journal of Ophthalmology* 93, 1001–1004.
- de-la-Torre, A., Sauer, A., Pfaff, A.W., Bourcier, T., Brunet, J., Speeg-Schatz, C., Ballonzoli, L., Villard, O., Ajzenberg, D., Sundar, N., et al. (2013). Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- γ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Negl Trop Dis* 7.
- Tourdjman (mathieu.tourdjman@invs.sante.fr, M., Tcheandjieu, C., de Valk, H., Goulet, V., and Le Strat, Y. (2015). Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France: évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des enquêtes nationales périnatales. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 15–16, 264–272.
- Unoki, M., Nishidate, T., and Nakamura, Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23, 7601–7610.

- Vallochi, A.L., Muccioli, C., Martins, M.C., Silveira, C., Belfort, R., and Rizzo, L.V. (2005). The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* *139*, 350–351.
- Van Lint, C., Bouchat, S., and Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* *10*, 67.
- Vanvalkenburgh, J., Albu, D.I., Bapanpally, C., Casanova, S., Califano, D., Jones, D.M., Ignatowicz, L., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Jenkins, N.A., et al. (2011). Critical role of Bcl11b in suppressor function of T regulatory cells and prevention of inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *208*, 2069–2081.
- Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Müller, M., and Decker, T. (2003). Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* *19*, 793–802.
- Vutova, P., Wirth, M., Hippe, D., Gross, U., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I., and Lüder, C.G.K. (2007). *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell. Microbiol.* *9*, 1556–1570.
- Wallace, G.R., and Stanford, M.R. (2008). Immunity and *Toxoplasma* retinochoroiditis. *Clin Exp Immunol* *153*, 309–315.
- Wang, Z., Zhang, L.-J., Guha, G., Li, S., Kyrlykova, K., Kioussi, C., Leid, M., Ganguli-Indra, G., and Indra, A.K. (2012). Selective ablation of Ctip2/Bcl11b in epidermal keratinocytes triggers atopic dermatitis-like skin inflammatory responses in adult mice. *PLoS ONE* *7*, e51262.
- Wang, Z., Kirkwood, J.S., Taylor, A.W., Stevens, J.F., Leid, M., Ganguli-Indra, G., and Indra, A.K. (2013). Transcription Factor Ctip2 Controls Epidermal Lipid Metabolism and Regulates Expression of Genes Involved in Sphingolipid Biosynthesis during Skin Development. *Journal of Investigative Dermatology* *133*, 668–676.
- Whitley, S.K., Balasubramani, A., Zindl, C.L., Sen, R., Shibata, Y., Crawford, G.E., Weathington, N.M., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2018). IL-1R signaling promotes STAT3 and NF- κ B factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate *Il17a/f* transcription. *J Biol Chem* *293*, 15790–15800.
- Williams, K.C., and Hickey, W.F. (2002). Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu. Rev. Neurosci.* *25*, 537–562.
- Xiao, J., and Yolken, R.H. (2015). Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)* *213*, 828–845.
- Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., et al. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med* *206*, 2747–2760.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* *454*, 350–352.

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *J Exp Med* *194*, 519–528.

Zhang, B., Yang, N., Mo, Z.-M., Lin, S.-P., and Zhang, F. (2017). IL-17A Enhances Microglial Response to OGD by Regulating p53 and PI3K/Akt Pathways with Involvement of ROS/HMGB1. *Front Mol Neurosci* *10*.

Zhang, H., Chai, W., Yang, W., Han, W., Mou, W., Xi, Y., Chen, X., Wang, H., Wang, W., Qin, H., et al. (2020). The increased IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells promote tumor cell proliferation and migration in neuroblastoma. *Clin. Immunol.* 108343.

Zheng, D.-L., Zhang, L., Cheng, N., Xu, X., Deng, Q., Teng, X.-M., Wang, K.-S., Zhang, X., Huang, J., and Han, Z.-G. (2009). Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *Journal of Hepatology* *50*, 377–387.

Zhu, M., Xu, Y., Ge, M., Gui, Z., and Yan, F. (2015). Regulation of UHRF1 by microRNA-9 modulates colorectal cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancer Sci.* *106*, 833–839.

Zimmermann, S., Murray, P.J., Heeg, K., and Dalpke, A.H. (2006). Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J. Immunol.* *176*, 1840–1847.

Régulation différentielle de la cytokine inflammatoire IL-17A dans les cellules infectées par le parasite *T. gondii*

Résumé

La toxoplasmose est une pathologie due à un protozoaire intracellulaire obligatoire, *T. gondii*, capable de moduler diverses voies de signalisation de la cellule hôte afin de se multiplier et d'échapper au système immunitaire. Cependant, des formes cliniques sévères telles que la toxoplasmose oculaire s'expliquent par une réponse inflammatoire excessive. La cytokine inflammatoire IL-17A a été identifiée comme marqueur de sévérité de la maladie. Les patients sud-américains présentent des formes plus graves de toxoplasmose oculaire que les patients européens, en raison de l'existence de souches plus virulentes de *T. gondii* en Amérique du Sud. Cette différence de virulence des souches conduit à des profils de cytokines très différents. Par ailleurs, l'invasion parasitaire est associée à l'activation d'UHRF1, entraînant des modifications dans les cellules infectées, et de façon souches-dépendantes. UHRF1 a un rôle prédominant dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, les modifications épigénétiques et la cancérogénèse. Cependant, les mécanismes de régulation de l'*IL-17A in vitro* sont encore inconnus. Dans cette étude menée dans un modèle cellulaire *in vitro* nous avons montré que la régulation du gène de l'*IL-17A* dans les cellules infectées par *T. gondii* dépend du type cellulaire et de la souche parasitaire. Cette régulation souche-dépendante est modulée par la protéine polymorphique ROP16. Le facteur de transcription UHRF1 est surexprimé dans les cellules infectées par *T. gondii* via l'action de ROP16 et d'autres protéines parasites, mais le mécanisme d'action demeure inconnu. De plus, nos résultats montrent que l'activation du promoteur *IL-17A* est contrôlée par une modulation épigénétique pouvant impliquer des modifications des histones, par acétylation ou méthylation. Ces phénomènes épigénétiques pourraient être dus au recrutement d'enzymes telles que les HDAC, les DNMT et le G9a via UHRF1. Les connaissances acquises par cette étude pourront nous permettre de développer de nouvelles thérapies ciblant la cytokine IL-17A afin de contrecarrer ses effets inflammatoires dans la TO.

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, IL-17A, ROP16, UHRF1, régulation épigénétique

Abstract

Toxoplasmosis is caused by an obligate intracellular protozoan, *Toxoplasma gondii*, which is capable of modulating various signaling pathways of the host cell in order to multiply and to evade the immune response. However, severe clinical forms like ocular toxoplasmosis (OT) are explained by an excessive inflammatory response. The inflammatory cytokine IL-17A has been identified as a marker of disease severity. South American patients have more severe forms of ocular toxoplasmosis than European patients, due to the existence of more virulent *T. gondii* strains in South America. This difference in the virulence of the strains leads to markedly different cytokine profiles. However, the mechanisms of IL-17A regulation *in vitro* are still unknown. During this work, we show that the regulation of the *IL-17A* promoter in infected cells varies according to cell type and parasite strain. This strain-dependent regulation is modulated by the polymorphic protein ROP16. Furthermore, the transcription factor UHRF1 is overexpressed in cells infected with *T. gondii* via the action of ROP16 and other parasite proteins, but the mechanisms of action are still unknown. In addition, our preliminary results show that the activation of the *IL-17A* promoter is controlled by epigenetic modulation that may involve histone modifications, by acetylation or methylation. These epigenetic phenomena could be due to the recruitment of enzymes such as HDACs, DNMTs and G9a via UHRF1. The knowledge acquired by this study will allow us to develop new therapies targeting the IL-17A cytokine in order to counter its inflammatory effects in OT.

Keywords : *Toxoplasma gondii*, IL-17A, ROP16, UHRF1, epigenetic regulation