

Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue par Olivier Papapietro
Le 25 novembre 2009

Titre : *Dissection génétique et études fonctionnelles du locus de contrôle de l'atopie Aiid3
et du locus de contrôle de la toxoplasmose Toxo1 dans le modèle des rats BN et LEW*

JURY

Pr Roland Liblau Président du jury
Pr François Denis Rapporteur
Pr Shozo Izui Rapporteur
Pr Jean François subra Rapporteur
Dr Gilbert Fournié Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie*
Unité de recherche : *Inserm U563*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Gilbert Fournié*
Rapporteurs : *Pr F. Denis, Pr S. Izui, Pr J.F Subra*



Remerciements

J'adresse ici mes plus sincères remerciements au Docteur Gilbert Fournié pour sa confiance toujours renouvelée au cours de ces cinq dernières années. Depuis l'année de Master jusqu'aux derniers jours de mon doctorat, vos conseils et votre enthousiasme ont toujours été une aide précieuse. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté sur le plan scientifique comme sur le plan humain.

Je remercie Monsieur le Professeur Roland Liblau de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

J'adresse ma profonde reconnaissance aux rapporteurs de ce travail qui ont accepté avec enthousiasme d'évaluer ce manuscrit, Monsieur le Professeur François Denis, Monsieur le Professeur Jean-François Subra et Monsieur le Professeur Shozo Izui. A tous, merci pour votre intérêt.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Abdelhadi Saoudi qui, depuis un entretien pour une candidature en Master au cours de l'été 2005 jusqu'à aujourd'hui, m'a toujours apporté ces conseils amicaux. Merci pour ton énergie, ta bonne humeur et tes encouragements.

Je remercie profondément tous les membres de l'équipe. Dominique, sans qui rien de ce qui a été fait n'aurait été possible, Audrey, pour qui bien plus de quelques lignes seraient nécessaires pour que je t'exprime toute ma gratitude. Stanislas, merci pour les leçons de néphrologie, de squash et les cafés. Lucille enfin, merci pour ta joie de vivre. Merci de m'avoir supporté dans les bons jours comme dans les mauvais. Je vous souhaite à tous bonheur et réussite.

Cette page serait incomplète sans une pensée amicale pour les membres de l'équipe d'Abdel, Isabelle, Christophe, Marianne et Laure, merci pour votre disponibilité et votre efficacité.

Un grand merci à tous les anciens étudiants de l'unité, futurs ou déjà nouveaux chefs. Mathias, merci pour tes talents de médium qui m'ont évité de perdre l'intégralité de ce manuscrit après un plantage total de mon ordinateur, merci aussi pour toutes les discussions toujours agréables et pour l'approvisionnement en café. Céline, l'année de DEA passée avec toi restera une source riche en souvenirs agréables. Anne, ton retour parmi nous a été la meilleure chose au CPTP cette année. Pierre enfin, travailler avec toi a été un immense plaisir, recevoir ton amitié un honneur.

Merci à tous les amis que j'ai pu rencontrer au cours de cette étape, certains ont déjà été cités, j'espère ne pas en oublier. En premier lieu les membres de la promotion de DEA 2005, Laurence, Hicham, Adeline et bien sur Marilena. Ceux rencontrés en route, Audrey, Lucille et Christine, Léon et Anaïs, Yovan et Nico. Vous resterez tous comme ce qui m'est arrivé de meilleur ces dernières années. J'adresse ma sympathie la plus sincère à toutes les personnes qui permettent la vie de ce centre, Fatima au cytomètre, Florence en Histo, bien sur, tout le personnel du service de zootechnie qui s'occupe au quotidien et avec grand soin de nos animaux : Pierre, Patrick, Audrey et tous les autres.

En arrivant en bas de page, je me rends compte qu'il est impossible de remercier toutes les personnes auxquelles je tiens. J'adresse donc un immense merci général à toutes les personnes que j'ai rencontré au cours de ces cinq dernières années !

Résumé

Chez l'homme, le développement des maladies multifactorielles résulte d'interactions complexes entre des gènes de prédisposition et l'environnement. L'hétérogénéité génétique des populations humaines et la variabilité des facteurs d'environnement rend difficile l'identification des gènes et des mécanismes physiopathologiques impliqués. L'utilisation de modèles animaux permet de contourner ces difficultés.

Les souches de rats BN et LEW s'opposent quant à l'orientation des réponses immunes et quant à leur sensibilité vis-à-vis des maladies immunes. Nous avons utilisé ce modèle pour étudier le déterminisme génétique des susceptibilités à l'infection toxoplasmique et aux désordres immunologiques induits par les sels de métaux lourds.

Alors que l'infection orale par le parasite *T. gondii* conduit au développement de kystes cérébraux chez le rat BN, le rat LEW présente la capacité d'éliminer le parasite et de bloquer sa dissémination chez l'hôte. Notre travail a permis l'identification d'un locus majeur baptisé *Toxo1* sur le chromosome 10 (c10) déterminant l'issue de l'infection chez le rat de façon indépendante du fond génétique. Une approche combinée d'analyse de liaison dans une population F2 (LEWxBN) puis de dissection génétique à l'aide de lignées et de sous-lignées congéniques réciproques BN.LEWc10 et LEW.BNc10 a conduit à localiser le(s) gène(s) de contrôle dans un intervalle de 1.09Mb. Nos études fonctionnelles ont permis d'associer la résistance à l'infection parasitaire *in vivo* à l'incapacité du parasite à proliférer et à survivre dans les macrophages et les monocytes *in vitro*. Cette restriction dépend de la mort de la cellule hôte. Deux gènes candidats majeurs ont pu être identifiés. Leur implication dans la maladie chez le rat et dans la toxoplasmose congénitale est en cours d'étude.

La même stratégie génétique a été mise en œuvre pour l'étude de la susceptibilité aux désordres immunopathologiques induits par les sels de métaux lourds. Chez le rat BN, le traitement par du bichlorure de mercure induit une production massive d'immunoglobulines de type E (IgE), le développement d'un syndrome néphrotique associé à la production d'auto-anticorps anti-laminine et des lésions tissulaires associées à la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes cytoplasmiques des polynucléaires (ANCA). Le rat LEW est résistant à l'ensemble de ces symptômes. Le travail présenté ici montre que le locus *Aiid3* sur le c9, précédemment identifié par notre équipe, contrôle l'intégralité de ces manifestations. Par dissection génétique du locus, le ou les gène(s) de contrôle ont été localisés dans une région de 117Kb comprenant 4 gènes dont 2 sont polymorphes et impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire. Nous avons mis en évidence un rôle critique du compartiment lymphocytaire T CD8 dans le contrôle de la réponse IgE induites par le mercure. D'autre part, nous avons montré une association génétique entre la susceptibilité à la maladie mercurielle et le rapport entre les sous-populations lymphocytaires T CD45R^{high} et CD45R^{low}, un paramètre associé à la susceptibilité à développer des vascularites à ANCA chez l'homme.

Ce travail fournit des informations précieuses pour des études génétiques ciblées dans des cohortes de patients et pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Abstract

Most human immune diseases are multifactorial, resulting from interactions between genetic and environmental factors. Their studies are hampered by the genetic heterogeneity of human populations and by the variability of environment. In experimental conditions, using rodent models, environmental and genetic factors are under control. The couple of BN and LEW rats represents a powerful model to study immune-mediated diseases since these two strains show strong differences in normal and pathological immune response. We have used this model to study the genetic control of toxoplasmosis and of the immune disease induced by mercury injections.

Oral *T.gondii* administration to BN rats lead to parasite dissemination within the host. In this strain the infection is characterized by specific antibody response and brain cyst formation. By contrast in the LEW rats, parasites are quickly eliminated by an innate immune mechanism; antibodies against *T.gondii* are barely detectable and there is no cyst in the brain. Linkage analyses in F2 (LEWxBN) rats followed by genetic dissection using reciprocal congenic and sub-congenic lines led us to identify on chromosome 10 (c10) a major locus called *Toxo1* that directs toxoplasmosis outcome independently of the genetic background, and to localize the genes of control within a 1.09Mb region. Further functional studies indicated a strong genetic association between the resistance *in vivo* and the ability of the macrophage to restrict parasite growth and survival *in vitro*. This restriction is dependent on host cell death. Two major candidate genes have been identified and their implications in congenital toxoplasmosis outcome are under investigation in human cohorts.

The genetic control of heavy metal-mediated immune disorder has been investigated using the same strategy. In the BN rats, HgCl₂ injections induce production of high amounts of IgE in serum, auto-antibody-mediated nephropathy and ANCA-associated vasculitis. The LEW rats are resistant to this disease. In this work, we show that *Aiid3* previously identified by our group as a locus of control of the immune disease triggered by gold salt injections, also controls the set of the mercury-induced disorders. Genetic dissection of the locus led us to localize the gene(s) of control within a critical 117Kb region. Four genes are present in this region. Two of them, which are both polymorph and implicated in immune system homeostasis and function, are major candidate genes. We found a major implication of CD8 T cells in the control by *Aiid3* of the HgCl₂-triggered IgE production. We also demonstrated that *Aiid3* controls the level of CD45RC expression in CD4 and CD8 T cells which define the CD45RC^{high} and CD45RC^{low} subsets that are characterized by different cytokine profiles and functions. Importantly, this trait has been recently associated with the susceptibility to ANCA-associated vasculitis in humans.

In conclusion, our work identified candidate genes in two locus which direct toxoplasmosis outcome and heavy metal-triggered immunopathological disorder in the rat. The identification of the gene(s) and of the mechanisms at work could open new insights into the pathogenesis of the corresponding human diseases.

PREAMBULE7

1. Déterminisme génétique des maladies multifactorielles.....9

 1.1. Concept de génétique quantitative -notion de QTL9

 1.2. Stratégies de recherche de gènes impliqués dans le contrôle d'un caractère quantitatif 10

 1.2.1. Stratégie du gène candidat- Principe général..... 10

 1.2.2. Stratégie du clonage positionnel- Principe général 11

 1.3. Marqueurs moléculaires 11

 1.3.1. Introduction 11

 1.3.2. Concept de marqueurs moléculaires 12

 1.3.3. Les marqueurs microsatellites 12

 1.3.4. Les marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 13

 1.4. De la mise en évidence du QTL à l'identification du gène causal 14

 1.5. Intérêt des modèles animaux 15

 1.5.1 Identification de QTL dans les modèles animaux 16

 1.5.2 Localisation fine des QTL : du locus au gène 18

Le système immunitaire dans les maladies multifactorielles..... 25

2. Le système immunitaire, architecture et fonction 25

 2.1. Le système immunitaire inné : mécanismes de reconnaissance et réponses effectrices 26

 2.1.1. Les TLR (Toll Like Receptor)..... 26

 2.1.2. Les NLR (Nucleotide-binding domain, Leucin Rich containing protein) 32

 2.2. Le système adaptatif..... 39

 2.2.1. Introduction..... 39

 2.2.2. Ontogénie des lymphocytes T, sélection positive et négative des thymocytes 40

 2.2.3. Les lymphocytes T CD4 42

 2.2.4. Les lymphocytes T CD8 52

 2.2.5. Conclusions..... 53

3. Le système immunitaire face au parasite *Toxoplasma gondii*..... 55

 3.1. *Toxoplasma gondii*, cycle biologique..... 55

 3.1.1. Cycle sexué 55

 3.1.2. Cycle asexué 56

 3.2. La Toxoplasmose 58

 3.2.1. La toxoplasmose congénitale..... 58

 3.2.2. La toxoplasmose du sujet immunodéprimé 58

 3.3. Subversion de la réponse immunitaire innée par le parasite 59

 3.3.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le contrôle de l'infection par *T.gondii*60

 3.3.2. Modulation de la réponse innée par le toxoplasme 64

 3.4. Facteurs d'hôte contrôlant la susceptibilité à la toxoplasmose 70

4.	Le système immunitaire dans l'atopie et les maladies allergiques.....	73
4.1.	<i>Généralités</i>	73
4.2.	<i>Développement de l'atopie : production des IgE</i>	74
4.2.1.	Commutation isotypique des IgM vers les IgE	74
4.3.	<i>Les lymphocytes TH2 au cœur de l'atopie et des maladies allergiques</i>	75
4.3.1.	LT _{H2} et IgE.....	75
4.3.2.	Lymphocytes T _{H2} et phase tardive des réactions allergiques.....	76
4.3.3.	Rôle des cellules dendritiques dans la différenciation T _{H2}	76
4.4.	<i>Le développement des maladies allergique, un échec des mécanismes immunorégulateurs?</i>	78
4.5.	<i>Les facteurs génétiques dans l'atopie et les maladies allergiques</i>	79
4.6.	<i>Conclusion</i>	82
5.	Les modèles expérimentaux chez le rat BN et LEW	84
5.1.	<i>Introduction</i>	84
5.2.	<i>Les caractéristiques immunologiques chez les rats LEW et BN</i>	85
5.3.	La maladie induite par les sels de métaux lourds	87
5.3.1.	Le rat BN: un modèle pour l'étude de l'atopie et des désordres immunopathologiques associés aux IgE	88
5.3.2.	La résistance du rat LEW aux traitements par les sels de métaux lourds: une base pour les études génétiques.....	89
5.4.	<i>La toxoplasmose</i>	90
5.4.1.	Le rat LEW: un modèle unique de résistance à la toxoplasmose	90
5.4.2.	Identification du locus <i>Toxo1</i> qui contrôle la susceptibilité du rat à la toxoplasmose.....	91
	OBJECTIFS	93
	RESULTATS	94
	ARTICLE 1 : Contrôle génétique de la susceptibilité aux maladies induites par les sels de métaux lourds par le locus <i>Aiid3</i>	94
	Colocalisation du locus <i>Aiid3</i> qui contrôle la susceptibilité aux maladies induites par les sels de métaux lourds et du locus <i>Cec1</i> qui détermine l'équilibre des sous populations lymphocytaires T CD45RC ^{high} et CD45RC ^{low}	95
	ARTICLES 2 et 3 : Contrôle génétique de la susceptibilité du rat à l'infection par le parasite <i>T.gondii</i>	97
	DISCUSSION	98
	<i>Les désordres immunologiques induits par les métaux lourds</i>	98
	<i>Contrôle génétique de la susceptibilité à la toxoplasmose</i>	104

ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
<i>Aiid3</i>	Atps Induced Immunological Disorders QTL3
Atps	Aurothiopropanol sulfonate de sodium
ANCA	Antineutrophil cytoplasm antibodies
BC	Back-cross
BN	Brown Norway
<i>Cec1</i>	CD45Rc expression in CD4/CD8 T cells locus 1
CIA	Colagen-induced arthritis
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DC	Dentritic cell
DN	Double négatif
DA	Dermatite atopique
DP	Double positif
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
F1	Hybride de première génération
F2	Hybride de seconde génération
IC	Inter-cross
iNOS	Inductible NO synthase
IRF	Interferon regulatory factor
ISCS	Interval-specific congenic strain
LB	Lymphocyte B
LEW	Lewis
LF	Anthrax Lethal factor
LO	Lipoxygenase
LPS	lipopolysaccharide
LRR	Leucin Rich repeat
LT	Lymphocyte T
LXA4	Lyxoxin A4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mb	Megabase
MDP	Muramyl Di-Peptide
meso-DAP	Acide gamma-D glutamyl-meso-diaminopimelique
NBD	Nucleotide binding domain
NK	cellule natural killer
NLR	Nucleotide-binding domain, Leucin Rich containing protein (alternativement NOD-like receptor)
NLS	Nuclear localisation sequence
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PRR	Pattern recognition receptor
QTL	Quantitative trait loci
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Simple positif
TH	Cellule T auxiliaire
TLR	Toll like receptor
Treg	Cellule T régulatrice
VP	Vacuole parasitophore

PREAMBULE

Les maladies complexes ou multifactorielles constituent une large part des pathologies humaines, leurs éthologies et leurs sévérités résultent d'interactions complexes entre des facteurs environnementaux et génétiques. L'identification des facteurs génétiques représente un enjeu majeur dans l'identification des facteurs de risque et des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies mais se heurte en pratique à l'hétérogénéité des populations humaines. L'utilisation de modèles animaux expérimentaux permet de contourner en partie ces difficultés. Les rats Lewis (LEW) et Brown-Norway (BN) qui diffèrent grandement dans leurs réponses immunes normales et pathologiques représentent un modèle de choix dans l'étude des traits complexes impliquant le système immunitaire. Ainsi, à l'inverse du rat BN qui est susceptible à l'infection par le parasite *Toxoplasma gondii*, le rat LEW présente un mécanisme unique de résistance innée face à ce pathogène. La même dichotomie est observée dans un modèle de désordre immuno-pathologique induit par des injections de sels de métaux lourds. Chez le rat BN, le traitement par du bichlorure de mercure induit une forte production d'immunoglobuline de type E, un syndrome néphrotique avec protéinurie ainsi qu'une vascularite touchant plusieurs organes. Le rat LEW est lui résistant au développement de cette maladie complexe. L'utilisation de ces souches de rats consanguins dans des conditions expérimentales où l'environnement est contrôlé et identique pour tous les individus facilite grandement l'identification des régions génétiques associées à ces différences de susceptibilité.

Mon travail de thèse s'est fondé sur les résultats préliminaires de l'équipe qui avaient montré que : (1) la susceptibilité/résistance du rat à la maladie induite par les sels d'or (un modèle de dérèglement immuno-pathologique proche de celui induit par les sels de mercure) était contrôlée par un locus de 1.2 cM appelé *Aiid3* sur le chromosome 9; (2) la résistance innée du rat LEW à l'infection toxoplasmique était dépendante d'une région de 6.7 Mb appelée *Toxo1* et localisée sur le chromosome 10. Mes objectifs étaient de réaliser la dissection génétique de ces locus à l'aide de sous-lignées congéniques pour affiner leurs localisations, d'étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans les différences de phénotypes et d'identifier des gènes impliqués. J'ai ainsi pu montrer qu'une région de 117 Kb comprise dans le locus *Aiid3* contrôlait l'ensemble des paramètres induits par les sels de mercures. Cet intervalle qui comprend quatre gènes joue un rôle important dans l'homéostasie et les fonctions du compartiment lymphocytaire T. D'autre part, j'ai pu affiner la localisation

du locus *Toxo1* dans une région de 1.09 Mb. Cette région qui comprend trente six gènes identifiés contrôle la capacité des macrophages à permettre la réplication parasitaire. Nos études fonctionnelles pointent clairement deux de ces gènes comme candidats majeurs.

Avant de présenter mes résultats, j'introduirai:

I. L'étude du déterminisme génétique des maladies complexes. Quels sont les outils et les stratégies disponibles pour identifier les gènes responsables des désordres immunologiques ? Ce chapitre justifie la stratégie de clonage positionnel à l'aide de lignées et de sous-lignées congéniques pour l'identification des régions chromosomiques portant les gènes de susceptibilité (ou QTL pour Quantitative Trait Locus)

II. Les acteurs majeurs du système immunitaire : Comment l'organisme est-il capable de détecter la présence d'agents infectieux puis de mettre en place une réponse appropriée ? Ce chapitre décrit les principaux récepteurs de l'immunité innée qui initient les réponses et les sous-populations lymphocytaires T qui organisent, amplifient et régulent les différents mécanismes effecteurs. La connaissance des mécanismes impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire est indispensable dans nos études afin d'identifier les gènes candidats.

III. *Toxoplasma gondii* : Comment ce parasite est-il capable d'infecter plus de 30% de la population humaine ? Ce chapitre s'intéresse aux réponses innées dirigées contre le parasite et à la façon dont celui-ci est capable de modifier et de tirer avantage des défenses immunitaires.

IV. Les désordres immunologiques chez l'homme : Quels sont les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des maladies allergiques ? Ce chapitre illustre la complexité des maladies multifactorielles où l'environnement joue un rôle important dans la susceptibilité à développer la maladie.

V. Les modèles expérimentaux chez le rat : Quels sont les avantages du modèle des rats LEW et BN ? Ce chapitre souligne la difficulté d'identifier les gènes responsables des désordres immunologiques chez l'homme. Il détaille également les caractéristiques de chacune des deux souches de rats qui m'ont permis de mener les études génétiques dans les deux modèles d'étude : la toxoplasmose et la maladie induite par les sels de mercure.

1. Déterminisme génétique des maladies multifactorielles

Les maladies multifactorielles constituent la majorité des pathologies humaines. Par opposition aux maladies monogéniques à transmission mendélienne comme la chorée de Huntington ou le syndrome de Netherton, le déclenchement et la sévérité des maladies multifactorielles dépendent d'interactions complexes entre des facteurs liés à l'environnement (polluants, agents chimiques, alimentation, pathogènes...) et des facteurs génétiques. Mis en évidence à l'aide d'études familiales, ces derniers impliquent plusieurs gènes ayant chacun une pénétrance différente. L'ensemble de ces maladies multifactorielles comme le diabète, l'hypertension artérielle, l'asthme allergique ou les maladies auto-immunes constitue un problème majeur de santé publique. L'identification des gènes et des mécanismes physiopathologiques impliqués se heurte à la diversité de la combinatoire entre les paramètres environnementaux et génétiques. Toutefois, le développement des techniques de biologie moléculaire et de bioinformatique conjugué aux connaissances croissantes des génomes humains et animaux permettent de contourner ces difficultés. La compréhension des voies physiopathologiques et des gènes contrôlant ces maladies complexes est une étape majeure dans le développement de thérapeutiques innovantes

1.1. *Concept de génétique quantitative -notion de QTL*

Au milieu du XIX^{ème} siècle, Gregor Mendel (1822-1884) avait établi l'association entre un caractère et un gène, posant ainsi les bases de la génétique et de l'hérédité moderne. Ces travaux en leurs temps ne trouvèrent que peu d'échos, se heurtant aux observations de Francis Galton (1822-1911) qui postulait que toutes les mesures biologiques devaient se distribuer selon une loi normale. La transmission héréditaire d'un caractère quantitatif ne pouvait donc pas être régie par les lois de Mendel. En 1918, Ronald Fischer (1890-1962) proposa d'accorder les observations antérieures en mettant en évidence que des caractères quantitatifs à distribution normale pouvaient être décrits en termes mendéliens s'ils étaient multigéniques, ouvrant ainsi la voie à la génétique quantitative.

Au cours des maladies multifactorielles, l'expression d'un caractère donné est sous la dépendance de plusieurs gènes et de facteurs environnementaux. La valeur phénotypique quantifiable (P) peut se décomposer en une valeur génotypique induite par les facteurs génétiques (G) et une valeur environnementale induite par les facteurs du milieu (E) :

$$P=G+E$$

Le niveau d'expression d'un phénotype donné résulte de l'action de plusieurs gènes à effets inégaux associés à un contexte environnemental particulier. L'identification de ces gènes est problématique si la variation génétique qui détermine l'apparition de ces caractères est liée à un grand nombre de gènes chacun responsable d'un effet modeste. En pratique, dans le cadre de diverses pathologies, plusieurs groupes ont pu identifier différentes régions chromosomiques portant des gènes contrôlant les niveaux d'expression des caractères quantitatifs (QTL : Quantitative Trait Locus). La mise en évidence de ces QTL démontre que, au moins dans certains cas, la variation génétique déterminant l'apparition des caractères d'intérêt permet la localisation des gènes contrôlant la susceptibilité aux maladies multigéniques ouvrant la voie in fine à leur identification et à l'étude de leurs mécanismes d'action

1.2. Stratégies de recherche de gènes impliqués dans le contrôle d'un caractère quantitatif

L'identification des gènes responsables de la variabilité d'un caractère quantitatif repose sur deux approches complémentaires.

- 1- La stratégie du gène candidat
- 2- La stratégie du clonage positionnel

Comme le montrent les résultats obtenus jusqu'à présent, les deux stratégies «gène candidat» et «clonage positionnel» ne donnent pas accès à la même information et doivent être utilisées de façon complémentaire (Kainulainen et al., 1990), (Dietz et al., 1991), (Moffatt and Cookson, 1999). L'analyse de ces méthodes et des résultats obtenus permet de mieux percevoir leurs potentialités, leurs limites, et surtout de mettre en évidence leur complémentarité dans l'étude génétique du contrôle des caractères quantitatifs.

1.2.1. Stratégie du gène candidat- Principe général

Cette approche s'appuie sur la connaissance biologique du caractère et s'intéresse à des gènes potentiellement important dans la fonction considérée. Elle peut permettre d'identifier très rapidement un gène impliqué, mais nécessite que ce gène soit déjà connu et sa fonction identifiée. Deux exemples récents soulignent l'intérêt de cette approche: (1) plusieurs gènes impliqués dans le fonctionnement des cellules β pancréatiques et dans le mécanisme d'action de l'insuline ont pu être associés avec le risque de développer un diabète de type 2 (Barroso et al., 2003). (2) Dans le cas des fièvres récurrentes héréditaires, maladies auto-

inflammatoires transmises selon un mode mendélien, des variants du gène *Nalp12* qui fait parti de la famille des NLR ont été récemment associés à la maladie (Jeru et al., 2008). Cet exemple souligne l'intérêt de l'approche gène candidat. Les cas de maladies de ce type étant très rares, le faible nombre de patients (2 familles) aurait rendu impossible toute forme d'approche statistique essentielle dans l'approche de clonage positionnel.

1.2.2. Stratégie du clonage positionnel- Principe général

La stratégie de clonage positionnel est une approche exclusivement génétique et ne nécessite aucune information préalable de type physiologique, biochimique ou pathologique sur la nature, l'expression et la fonction des gènes impliqués. Cette démarche consiste à identifier un gène à partir de sa localisation chromosomique. Elle nécessite la construction d'une carte génétique dense en marqueurs, répartis sur l'ensemble du génome et de positions connues les uns par rapport aux autres. La recherche de QTL consiste en une analyse de liaison qui utilise les données génétiques d'une part et les données phénotypiques d'autre part. Ainsi chaque sujet de l'étude sera caractérisé par son profil génétique et son profil phénotypique. L'objectif du test consiste à rechercher une co-ségrégation, une association préférentielle entre certains allèles d'un marqueur donné et une variabilité de niveau d'expression du phénotype (« valeurs faibles » vs « valeurs élevées » du caractère quantitatif étudié). S'il existe une variabilité selon les allèles d'un marqueur, elle peut être expliquée par la co-ségrégation des allèles du marqueur avec le QTL. Le phénotype étudié est donc contrôlé par un gène situé à proximité du marqueur - gène et marqueur étant inclus au sein d'un même QTL. Des tests statistiques d'indépendance de liaison permettent de comparer les probabilités d'existence ou d'absence d'un ou plusieurs QTL (Morton, 1955).

Cette démarche qui cherche à cartographier le plus précisément possible le (ou les) gène(s) recherché(s), réduit l'intervalle de confiance du QTL jusqu'à n'avoir plus que quelques gènes, voir un seul gène dans le cas théorique idéal, dans la région identifiée. En pratique, la recherche de gènes devient possible lorsque la taille du QTL ne dépasse pas quelques mégabases (Mb).

1.3. Marqueurs moléculaires

1.3.1. Introduction

Les progrès de la génétique moléculaire et la mise à disposition d'outils et de techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui de mettre en évidence la variabilité

génétique au niveau de l'ADN. L'utilisation de marqueurs génétiques s'est développée au cours des dernières années, en particulier grâce aux marqueurs microsatellites et à leur caractérisation par réaction de PCR. Ces marqueurs ont permis la construction de cartes génétiques denses chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales.

1.3.2. Concept de marqueurs moléculaires

Un marqueur génétique permet de distinguer plusieurs génotypes en un locus donné et est transmis selon les lois Mendéliennes. Il correspond à une séquence d'ADN polymorphe, c'est-à-dire existant sous différentes formes ou allèles.

De nombreux marqueurs génétiques sont maintenant disponibles et organisés en carte génétique dans la plupart des espèces animales. Les principales propriétés des marqueurs génétiques (polymorphisme et liaison génétique) permettent d'identifier, de suivre des fragments chromosomiques et de détecter les principaux QTL impliqués dans le déterminisme génétique des caractères d'intérêts.

- Le polymorphisme permet d'établir l'origine parentale de l'allèle à un locus donné. Ainsi, on peut distinguer les locus provenant de la mère et ceux provenant du père.

- La liaison génétique permet de généraliser les observations sur un locus particulier à tout un segment d'ADN entourant ce locus. La taille de ce segment correspond à une région chromosomique dans laquelle aucune recombinaison n'a été observée entre le locus et le segment qui l'entoure. Ce locus devient un marqueur de ce segment et de tous les gènes qu'il contient. Le marquage est d'autant plus efficace que le segment considéré est court, ce qui limite le taux de recombinaison entre le gène et le marqueur.

Les techniques de détection de polymorphismes ont fait leurs apparitions dans les années 1980 avec la mise au point de la détection des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein et al., 1980). Les RFLP ont été largement utilisés, mais se sont révélés assez limités et difficiles à réaliser sur une grande échelle en pratique. Ce n'est qu'avec la découverte des microsatellites que des projets de cartographie des génomes à grande échelle ont pu être mis en œuvre.

1.3.3. Les marqueurs microsatellites

En 1989, la description des microsatellites (Weber and May, 1989) a permis l'essor des projets de cartographie. Les microsatellites sont généralement des séquences de 2 à 4 nucléotides, répétées en tandem (10 à 20 fois en moyenne). Ils se localisent principalement au

niveau des introns et des séquences non codantes. Très nombreux et très bien répartis sur le génome (tous les 50 à 100 kilobases (Kb) en moyenne), ils se caractérisent par un polymorphisme important dû à la variation du nombre de répétitions des séquences nucléotidiques selon les allèles. La spécificité du marqueur est définie par les séquences situées de part et d'autre du microsatellite, ce qui implique une phase de séquençage lors de la caractérisation du marqueur. Ces régions flanquant le marqueur microsatellite sont uniques dans le génome et identiques au sein d'une même espèce. Elles serviront pour le choix des amorces pour une amplification génique par PCR (Dietrich et al., 1992). Le polymorphisme du marqueur pourra alors être visualisé après migration électrophorétique (gel d'agarose, de polyacrylamide, ou électrophorèse capillaire). Historiquement utilisés comme marqueurs, les fonctions biologiques des microsatellites commencent à être élucidées. Alors que les répétitions dans les séquences codantes peuvent générer des protéines anormales, les répétitions introniques peuvent influencer sur les niveaux de transcription et de translation des gènes dans lesquels ils sont situés (Usdin, 2008).

En résumé les microsatellites ont l'avantage d'être très nombreux, très polymorphes, spécifiques d'un seul locus, régulièrement répartis sur le génome et faciles à analyser sur une grande échelle.

1.3.4. Les marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Au début des années 90, un nouveau type de marqueur a été mis en évidence : les SNP (single nucleotide polymorphism ; polymorphisme d'un simple nucléotide). Il s'agit d'une variation de la séquence d'ADN apparaissant quand un seul nucléotide diffère d'un individu à l'autre. (Wang et al., 1998). Les SNP peuvent être présents dans les régions codantes ou non codantes. Des études de séquençage systématique de grande région du génome humain ont conduit à estimer qu'il existe un SNP toutes les 1000 paires de bases (pb) environ (2000 pb au niveau des séquences codantes et 800 pb au niveau des séquences non codantes). Les SNP sont des marqueurs génétiques stables et régulièrement répartis sur tout le génome. Ils sont plus fréquents que les marqueurs microsatellites mais moins informatifs car moins polymorphes. Du fait qu'ils existent également au niveau des exons, ils peuvent affecter la séquence protéique en modifiant un codon et donc l'acide aminé correspondant. Ainsi, un allèle caractérisé par un SNP particulier peut être associé à la susceptibilité ou à la résistance au développement d'une maladie donnée. (Halushka et al., 1999).

Différents programmes de recherche visant à identifier un maximum de ces marqueurs dans le génome humain mais également dans celui de plusieurs espèces modèles ont été développés ces dernières années. Chez l'homme, un consortium international piloté par Etats-Unis s'est mis en place en Avril 1999 dans le but de réaliser une identification à grande échelle de SNP. Ainsi le projet HapMap vise à cartographier les variations courantes du génome humain. HapMap décrit la nature des SNP, leur emplacement dans la séquence d'ADN et leur distribution au sein d'une population et entre les populations dans différentes parties du monde. Ce projet a pour objectif de fournir aux chercheurs les informations permettant de réaliser de manière optimale les études chez l'homme visant à établir des associations entre certains allèles SNP et diverses maladies.

Aujourd'hui des banques de SNP identifiés chez l'homme et dans des espèces modèles sont disponibles à l'ensemble de la communauté scientifique (NCBI, SNP : <http://www.ncbi.nih.gov> ; Ensembl : <http://ensembl.org>). L'étude de ces marqueurs sur des régions de quelques centaines de Kb a montré que les allèles des SNP rapprochés recombinent très peu et tendent à rester groupés lors de la transmission héréditaire : ils forment des blocs haplotypiques de tailles variables (entre 10 et 100 Kb) dont la diversité est relativement limitée dans la population. En revanche, les recombinaisons se produisent principalement entre ces blocs. Un des objectifs du projet HapMap fut d'identifier et de définir ces blocs haplotypiques au sein des différentes populations déjà étudiées. Bien qu'un bloc haplotypique puisse contenir de nombreux SNPs, les SNPs d'un bloc étant fortement corrélés, le génotypage de quelques SNPs (Tag-SNP) au sein d'un bloc haplotypique suffit pour connaître la nature de la variation génétique de cette région. Ces blocs sont très utiles en cartographie fine.

La connaissance des SNP devrait accélérer la localisation des gènes associés à diverses pathologies chez l'homme grâce à une cartographie extrêmement fine. Le développement de nouvelles technologies permet aujourd'hui d'étudier simultanément un très grand nombre de SNP sur un même échantillon. L'utilisation de ces marqueurs est en pleine expansion dans l'étude de maladies complexes comme le diabète, le cancer, l'hypertension artérielle, l'asthme allergique et la dermatite atopique. Toutefois, le coût toujours élevé de ces techniques de criblage à grande échelle limite encore pour l'heure les études fondées sur un balayage complet du génome à l'aide de ces marqueurs.

1.4. De la mise en évidence du QTL à l'identification du gène causal

Malgré l'essor technologique dans le domaine de la génétique moléculaire, la détection de QTL se heurte encore chez l'homme au caractère multigénique des maladies complexes dans lesquelles les symptômes sont sous la dépendance de gènes modificateurs. L'hétérogénéité génétique de la population implique l'utilisation de larges cohortes pour l'identification, avec une forte fiabilité statistique, d'allèles à effets modestes. Les effets épigénétiques de l'environnement difficilement mesurables contribuent à compliquer les études génétiques chez l'homme.

Enfin, l'étape qui peut être la plus délicate est celle de l'identification de la mutation et du polymorphisme responsable de la différence de phénotype. Toute la difficulté consiste à pouvoir différencier un simple polymorphisme (n'ayant pas de conséquence fonctionnelle) de la mutation causale. Cette dernière peut affecter la séquence codante ou des séquences non codantes portant des éléments de régulation de la traduction. La mutation peut entraîner un gain ou une perte de fonction de la protéine. Des systèmes cellulaires *in vitro* ont pu permettre la compréhension des modes d'action de protéines mutantes associées au développement de pathologies (Feldmann et al., 2003). Toutefois cette approche peut s'avérer insuffisante pour comprendre le mode d'action d'un gène impliqué dans un processus biologique complexe.

Le recours à l'utilisation de modèles animaux peut représenter une solution à l'ensemble de ces problèmes.

1.5. Intérêt des modèles animaux

Le développement de la génétique comparative et la mise en évidence des régions de synténie entre les génomes humains et ceux des organismes modèles (souris, rats, singes) permet d'envisager l'application des résultats expérimentaux à la pathologie humaine (Yamada et al., 1994), (Jacob and Kwitek, 2002); (Korstanje and Paigen, 2002). Les avantages des modèles animaux sont multiples :

- L'utilisation de souches consanguines (homozygotes) élimine les problèmes liés à l'hétérogénéité génétique ;
- Il est possible de réaliser des croisements et d'obtenir un grand nombre d'individus à chaque génération ;
- Les animaux évoluent dans un environnement contrôlé, ce qui minimise l'effet de ce facteur sur le phénotype étudié ;

- Des résultats statistiques significatifs peuvent être obtenus à partir d'un nombre d'animaux calculé à l'avance ;

- Le génie génétique permet l'identification formelle du gène et de la protéine mutante dans la pathologie ;

De nombreux groupes de recherches sont à l'heure actuelle engagés dans des recherches expérimentales visant à disséquer les facteurs génétiques qui contrôlent le développement des maladies multigéniques humaines. Les résultats obtenus chez l'animal permettent de progresser dans la recherche de gènes impliqués dans la survenue et/ou dans l'évolution de ces maladies (Griffiths et al., 1999); (Encinas and Kuchroo, 2000).

L'objectif ultime de cette approche est de caractériser ces gènes et surtout les mécanismes physiopathologiques qu'ils mettent en jeu. En effet, la caractérisation de gènes impliqués dans une voie physiopathologique chez l'animal va ensuite permettre l'étude de cette même voie en pathologie humaine. Des polymorphismes des gènes de cette voie pourront alors être recherchés. L'identification fine des mécanismes physiopathologiques à l'origine des maladies ouvre la voie à des thérapeutiques ciblées.

1.5.1 Identification de QTL dans les modèles animaux

1.5.1.1 Principes

Les croisements entre souches consanguines constituent en pratique des dispositifs de référence pour la détection de QTL dans les espèces modèles. Une souche est considérée comme consanguine quand elle est produite à partir d'un couple ancestral et qu'au moins 20 générations de croisements frère-sœur ont été réalisées. L'utilisation de ces lignées fixées évite les problèmes de l'hétérogénéité génétique. De plus, le choix des souches parentales peut être réalisé en fonction du caractère étudié. L'utilisation d'espèces modèles, telles que le rat ou la souris, permet d'avoir à disposition des cartes génétiques très denses en marqueurs et/ou en gènes. Chez la souris par exemple, en Septembre 2009 environ 23.000 gènes et 15.000.000 marqueurs SNP étaient répertoriés sur le site "Ensembl", et chez le rat environ 18.000 gènes et 2.900.000 marqueurs génétiques. Toutes ces caractéristiques, contribuent à rendre les études génétiques plus faciles à partir d'animaux consanguins que chez l'homme. Elles expliquent ainsi la mise en œuvre de nombreux modèles expérimentaux d'études de pathologies humaines à caractère complexe (Sakaguchi, 2000) (Encinas and Kuchroo, 2000).

La primo-détection de QTL passe par la mise en place de dispositifs expérimentaux. En croisant deux souches consanguines homozygotes P1 et P2 différentes pour un certain nombre de caractère (notamment le caractère d'intérêt), on obtient une population F1 dans laquelle les individus sont tous génétiquement identiques (hétérozygotes pour l'ensemble du génome). Ainsi, Lorsqu'un QTL Q ségrége avec un marqueur M tous les descendants F1 issus du croisement d'une souche P1 homozygote M1Q1/M1Q1 avec une souche P2 homozygote M2Q2/M2Q2 sont hétérozygotes M1Q1/M2Q2.

C'est en seconde génération de croisement que la co-ségrégation des allèles du marqueur M associés au QTL d'intérêt Q peut être observée. Les dispositifs expérimentaux pour un premier balayage de tout le génome, diffèrent selon l'utilisation des animaux F1. Les plus fréquemment utilisés sont les cohortes d'animaux hybrides de deuxième génération F2 issus par inter-croisement d'individus F1 (« inter-cross ») ou d'animaux issus de croisement en retour entre des animaux F1 et une des deux lignées parentales ayant permis la génération des F1 (« back-cross »).

1.5.1.2 L'inter-croisement (croisement F2)

L'étude d'une population F2 permet d'estimer le nombre de QTL en ségrégation et d'avoir une "vue d'ensemble du génome" (Darvasi, 1998) quel que soit l'effet du (ou des) QTL. Ce dispositif où les trois génotypes possibles sont présents (M1M1, M1M2 et M2M2) permet d'estimer les effets additifs ou dominants/récessifs des allèles d'un QTL et donc du (ou des) gène(s) d'intérêt présent au niveau de ce QTL. Lorsque les allèles du QTL sont codominants, l'estimation des effets additifs dans un protocole F2 requiert 30% de descendants en moins qu'un protocole « back-cross » (Darvasi, 1998) Ceci est dû au fait qu'une descendance F2 fournit deux fois plus d'événements méiotiques.

1.5.1.3 Le rétrocroisement ou back cross de première génération (BC1)

Après production d'une génération F1, les animaux sont croisés en retour sur une des populations parentales, désignée population receveuse ou "parent récurrent" afin d'obtenir une population BC1 (back-cross de première génération). En prenant pour parent récurrent, le parent récessif P1, la moitié des descendants BC1 produits sont homozygotes M1/M1 et la moitié sont hétérozygotes M1/M2. On comparera les moyennes du niveau d'expression du phénotype d'intérêt des individus M1M1 et des individus M1M2.

La population « back-cross » permet de comparer le génotype homozygote récessif (M1M1) avec le génotype hétérozygote (M1M2). L'effet estimé du QTL correspond à la différence entre la moyenne de l'hétérozygote M1M2 et celle de l'homozygote M1M1. Mais si le rétrocroisement est effectué sur le parent homozygote dominant M2M2, il n'y a plus de différence de phénotype chez les individus BC1 puisque chacun d'eux possède au moins un allèle dominant M2.

Lorsqu'il y a dominance/récessivité entre les deux allèles du QTL, le protocole back-cross, réalisé sur le parent homozygote récessif (M1M1), est plus puissant que le protocole F2 pour détecter des QTL (Darvasi, 1998). Le nombre de descendants nécessaire pour estimer la dominance dans un protocole « back-cross » est alors deux fois moins important que dans un protocole F2

Un premier balayage de tout le génome permet donc de mettre en évidence un certain nombre de QTL. En effet, quel que soit le croisement utilisé, des QTL sont presque toujours détectés. Le passage à l'étape suivante, à savoir la cartographie fine des QTL, est beaucoup plus délicat. Suite au premier balayage du génome, les intervalles de confiance des QTL détectés sont importants (de l'ordre de 20 à 40 centiMorgans en moyenne). Il existe différents dispositifs permettant d'aboutir à une réduction de la zone de localisation des QTL détectés lors d'une primo-détection. Certains d'entre eux sont décrits dans le chapitre suivant.

1.5.2 Localisation fine des QTL : du locus au gène

Les programmes dits de "primo-détection" s'avèrent en général très fructueux. Cependant la localisation d'un QTL dans un intervalle de l'ordre de 20 à 40 cM contenant plusieurs centaines de gènes ne permet pas d'aborder l'étape de l'identification du gène (Wenderfer et al., 2000).

Comme indiqué ci-dessus, la précision de la localisation des QTL est limitée par le nombre d'événements de recombinaison survenus dans la population étudiée. Augmenter la taille de la population F2 ou BC1 d'une part et la densité de marqueurs d'autre part, permet d'améliorer la précision de la localisation d'un QTL, mais cette méthode a ses limites et un coût souvent rédhibitoire. De plus, les résultats obtenus ces dernières années montrent que les effets génétiques mis en évidence dans le cadre des programmes de détection de QTL sont souvent dus à un ensemble de gènes localisés dans un même QTL. Ce type d'observation a été fait en particulier dans les modèles murins de diabète (Podolin et al., 1998), de lupus (Morel et al., 2001) ou d'épilepsie (Legare et al., 2000) (Legare and Frankel, 2000). Par ailleurs, les

effets d'un QTL peuvent varier en fonction de la forme allélique d'un autre gène situé sur un autre locus (épistasie) (Fijneman et al., 1996). Les limites des programmes de primo-détection de QTL évoquées ci-dessus soulignent l'intérêt d'une localisation plus précise des QTL. Cet objectif devient une nécessité si l'on cherche à identifier les bases moléculaires des variations observées aux QTL. Les approches utilisables que ce soit le clonage positionnel ou la recherche de candidats positionnels, ne sont en effet envisageables qu'au sein de programmes de cartographie fine de QTL où la résolution est proche d'1 Mb (soit environ 0.7 cM). Les procédures qui permettent de diminuer l'intervalle de localisation d'un QTL se basent en partie sur le principe de la dissection génétique du chromosome (GCD: Genetic Chromosome Dissection), méthode proposée à l'origine par des généticiens dont le modèle d'étude était la drosophile (Davies, 1971). Ainsi, l'information apportée par l'étude des marqueurs génétiques est utilisée pour construire des chromosomes recombinants au niveau de régions d'intérêt spécifiques. Le QTL est attribué à telle ou telle région spécifique en fonction des effets quantitatifs exprimés par les différentes lignées recombinantes. Dans la grande majorité des cas, cette méthode de cartographie fine utilise l'accumulation des événements de recombinaison au cours des générations, qui se traduit par une réduction de la taille des fragments de chromosomes en déséquilibre de liaison. Il convient par ailleurs de noter que, contrairement à la primo-détection, la cartographie fine de QTL est une approche ciblée, limitée le plus souvent à une région unique du génome (ou quelques régions en cas d'interactions de gènes). Elle implique un choix préalable, qui n'est ni trivial ni anodin, des régions du génome à étudier de façon prioritaire. Elle nécessite également de disposer de réseaux denses de marqueurs dans les régions étudiées.

1.5.2.1 Les lignées congéniques

Les lignées congéniques ou lignées quasi-isogéniques (NIL=Nearly Isogenic Line) sont obtenues à partir d'une souche consanguine pour laquelle une région chromosomique a été remplacée par celle d'une autre souche consanguine (figure 1).

L'intervalle d'un QTL d'une souche donneuse est introduit dans une souche receveuse sous le contrôle de marqueurs (Marker Assisted Selection :M.A.S.) à l'aide de croisements en retour successifs effectués sur la souche receveuse. Le génotypage de marqueurs au niveau de la région d'étude permet d'identifier les animaux porteurs de la région à introduire et de les sélectionner comme parents de la génération suivante. Par cette méthode dite "classique", la sélection des animaux pour le croisement en retour suivant s'effectue uniquement au niveau

de la région d'intérêt. Il est en général nécessaire d'effectuer une douzaine de générations de croisements en retour successifs, suivi d'un croisement consanguin pour obtenir des animaux congéniques. La production de ces lignées nécessite alors 3 à 4 ans.

Pour produire plus rapidement ces lignées, Wakeland et coll. ont proposé d'utiliser un protocole de M.A.S. étendu à l'ensemble du génome. Il s'agit de la stratégie de "Speed Congenics" (Wakeland et al., 1997). Elle permet de sélectionner les descendants ayant hérité de la région d'intérêt à introduire et ayant la plus forte proportion du génome receveur pour tout le reste du génome (fond génétique). La production de lignées congéniques par cette méthode est plus rapide que par la méthode classique. Elle permet de diminuer le nombre de générations nécessaires pour l'obtention des lignées congéniques (Visscher, 1999). Une lignée congénique pure diffère de la souche parentale uniquement aux environs du QTL. Mais en pratique, il est nécessaire de disposer de marqueurs complètement discriminants et bien répartis sur l'ensemble du génome, pour permettre de déterminer avec certitude l'origine des allèles des marqueurs et d'éliminer ainsi les régions chromosomiques où il subsisterait des allèles de la souche donneuse. Cette vérification de la pureté d'une lignée congénique peut être longue et coûteuse mais elle est indispensable. Une couverture du génome par 200 marqueurs répartis de manière homogène est en pratique suffisante ; elle permet de vérifier que statistiquement, la pureté du fond génétique de la lignée obtenue est supérieure à 99.5%. La figure 1 représente les différentes étapes permettant l'établissement de lignées congéniques.

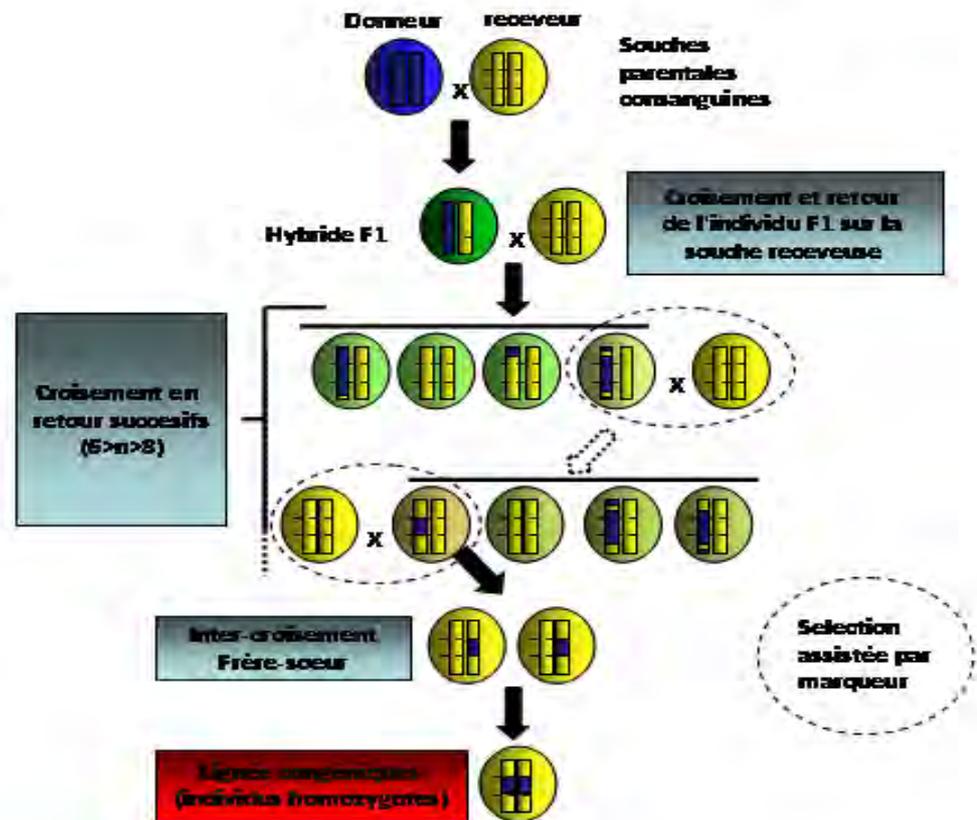


Figure 1: Génération de lignées congéniques.

Les lignées congéniques sont obtenues à partir d'une souche consanguine dans laquelle une région chromosomique est remplacée par celle provenant d'une autre souche. Ainsi, l'intervalle de localisation d'un QTL provenant d'une souche donneuse est introduit dans le génome de la souche receveuse. A partir d'une population F1, plusieurs croisements en retour (BC ou backcross) sont effectués avec la souche receveuse. A chaque génération sont sélectionnés les descendants ayant hérité de la région d'intérêt à l'état hétérozygote et ayant la plus forte proportion du génome receveur pour tout le reste du génome. Entre 6 et 8 (génome receveur = 99.99%) croisements en retour suivis d'un croisement sont nécessaires pour obtenir une lignée congénique par le protocole "speed congenics".

1.5.2.2 Les sous-lignées ou lignées congéniques spécifiques d'un intervalle

Les lignées congéniques spécifiques d'un intervalle (ISCS: Interval-Specific Congenic Strain) sont obtenues en recherchant des individus recombinants dans l'intervalle de localisation du QTL. L'objectif est d'obtenir un sous-ensemble de lignées congéniques présentant des recombinaisons régulièrement réparties dans l'intervalle de localisation du QTL. Ainsi les ISCS permettent d'obtenir des animaux recombinants à des endroits différents au sein d'un même QTL et donc de restreindre l'intervalle de localisation du QTL en éliminant les zones n'ayant aucun effet sur le phénotype.

Les sous-lignées sont produites à partir d'une lignée congénique qui sera rétro-croisée avec la souche receveuse. Les animaux recombinants sélectionnés seront inter-croisés (frère-sœur) pour obtenir des animaux homozygotes. Les ISCS peuvent également être produites à partir d'un croisement entre deux lignées congéniques. Darvasi a proposé cette stratégie expérimentale pour cartographier un QTL dans un intervalle de 1 cM (Darvasi, 1997). Mais pour atteindre cette résolution, il est nécessaire de disposer de marqueurs génétiques espacés d'1cM au maximum dans la région du QTL. Il en découle que ces lignées peuvent potentiellement différencier deux QTL étroitement liés distants de quelques cM seulement. La figure 2 décrit l'établissement de sous lignées congéniques.

Un exemple de cartographie fine de QTL nous est fourni avec l'étude du déterminisme génétique de l'apparition des crises d'épilepsie dans un modèle expérimental développé chez la souris. Chez les souris EL/Suz (EL), prédisposées à l'épilepsie, des crises spontanées apparaissent vers 90 jours. Ces crises peuvent être provoquées dès 45 jours si les souris sont soumises à des balancements rythmiques. Une primo-détection de QTL à partir d'une population back-cross a permis de localiser le QTL *E12* pour "Epilepsy QTL number 2" dans un intervalle d'environ 20 cM sur le chromosome 2. Une lignée congénique, par introduction de *E12* de la souche sensible EL dans le génome de la souche résistante ABP, a été construite. Cette lignée congénique a été obtenue après 5 générations de croisements en retour, la longueur du fragment introduit étant d'environ 50 cM. L'analyse de cette lignée congénique a permis de mettre en évidence une liaison significative (Frankel et al., 1995). Huit lignées ISCS pour différents fragments du QTL ont ensuite été construites puis étudiées. Aucune n'a pu reproduire l'intégralité des résultats obtenus avec la lignée congénique initiale (Legare et al., 2000). *E12*, qui est un QTL à effet important, est en fait un ensemble de plusieurs QTL

proches, chacun avec des effets plus faibles. La décomposition de ce locus a permis de délimiter un QTL dans une région de 1 cM seulement, ce qui traduit bien le gain obtenu sur la précision de l'intervalle de localisation du QTL.

Les ISCS peuvent également être utilisées pour la mise en évidence d'effets d'épistasie. L'étude d'un modèle de souris lupique (Santiago et al., 1998) fournit un bon exemple d'interactions épistatiques où des QTL ayant des effets non détectables indépendamment, interagissent fortement avec un QTL situé sur un autre chromosome. Il en résulte que sans avoir identifié la nature des gènes impliqués, ce dispositif a permis de mettre en évidence des interactions entre QTL et d'aider à élucider une partie des mécanismes génétiques impliqués dans les maladies auto-immunes.

L'utilisation de lignées et des sous-lignées congéniques apparaît donc comme une approche puissante dans le cadre des études génétiques de maladies multigéniques dont le but ultime est l'identification, à l'aide des modèles animaux, des gènes responsables des pathologies humaines. C'est cette approche que notre équipe développe depuis plusieurs années pour étudier le contrôle génétique de maladies multifactorielles impliquant le système immunitaire: la toxoplasmose, une maladie parasitaire causée par *Toxoplasma gondii* et un modèle de maladie de maladie "allergique" provoqué par l'injection de sel de métaux lourds.

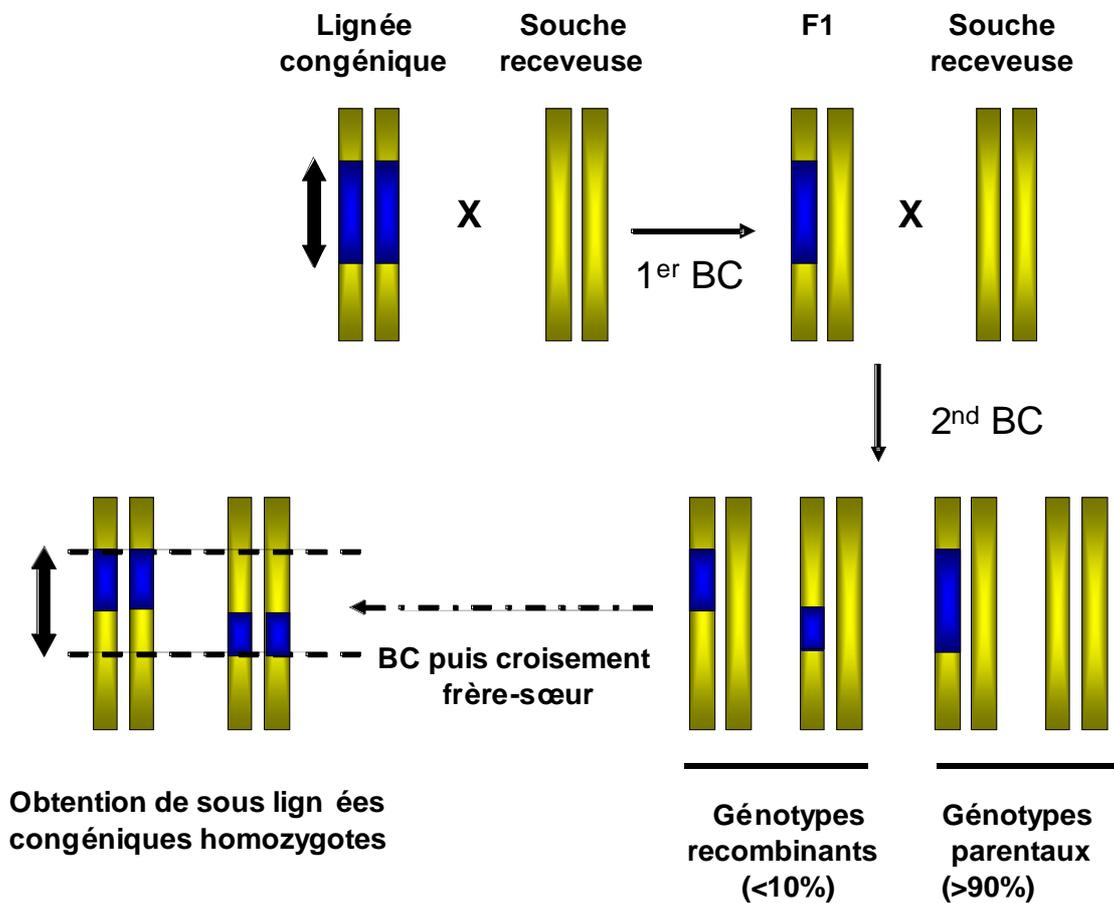


Figure 2: Génération de sous lignées congéniques ou lignées congéniques spécifiques d'un interval (ISCS)

Un croisement en retour d'un individu congénique sur la souche receveuse permet l'obtention d'une population F1 hétérozygote pour le locus d'intérêt. Un nouveau croisement en retour de l'individu F1 sur la souche receveuse peut générer des individus recombinants qui ségrégent à des endroits différents du QTL. Des croisements frère-sœur d'individus de même génotypes permettent l'établissement de sous lignées congéniques. ISCS=Interval-Specific Congenic Strain.

Le système immunitaire dans les maladies multifactorielles

Le système immunitaire assure le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Sa fonction est de lutter contre les processus infectieux et cancéreux. Caractérisé par une collaboration intensive entre de nombreux types cellulaires, son fonctionnement s'articule autour de trois processus critiques : 1- La reconnaissance du danger. 2- La mise en place d'une réponse adaptée. 3- L'autorégulation. À l'échelle individuelle, malgré l'efficacité de nos mécanismes de défenses, nous sommes susceptibles à de nombreuses infections. A l'inverse à l'échelle de la population, des résistances sont observées. Cette observation suggère l'existence de variants géniques capables de moduler les phénotypes de susceptibilité/résistance dans certaines maladies. Plusieurs gènes conférant ces capacités ont déjà été mis en évidence dans des processus infectieux chez l'homme et dans des modèles expérimentaux. Une vision quelque peu provocatrice considèrerait les maladies infectieuses comme des maladies génétiques, le système immunitaire ne disposant pas des bons gènes pour contenir et éliminer le pathogène. Le système immunitaire s'est formidablement complexifié au cours de l'évolution. La grande sophistication du système permet la mise en place d'une réponse qui est idéalement spécifique et adaptée à la situation pathologique, mais elle favorise en revanche l'apparition de dérèglements pouvant conduire à l'apparition de réponses inappropriées comme dans le cas de l'asthme allergique ou de l'auto-immunité. Là encore, la susceptibilité à développer ces désordres immunopathologiques est sous la dépendance de différents gènes encore mal identifiés.

2. Le système immunitaire, architecture et fonction

Un des aspects majeurs de l'immunologie est de comprendre comment l'organisme est capable de détecter la présence d'agents infectieux et de les éliminer sans détruire ses propres tissus. L'immense diversité moléculaire des pathogènes, leurs forts niveaux de réplication ainsi que leurs fortes capacités à muter expliquent la complexité de ces processus. La réponse du système immunitaire à ces agents infectieux peut être subdivisée chez les vertébrés en deux sous-ensembles, la réponse innée et la réponse adaptative.

La réponse adaptative est permise par la génération aléatoire d'un immense répertoire de récepteurs à l'antigène, les TCR (T Cell Receptor) et les BCR (B Cell Receptor). Elle nécessite une expansion clonale des cellules spécifiques et est responsable de la mémoire immunologique. Bien que critique dans la protection de l'organisme, le système adaptatif ne

peut fonctionner de façon autonome. En effet, les cellules T sont incapables de détecter les pathogènes dans leurs contextes biologiques, mais reconnaissent des motifs antigéniques présentés par les molécules du CMH. D'autre part, la distribution clonale des récepteurs implique un délai d'expansion des clones spécifiques et de différenciation en cellules effectrices généralement compris entre 4 et 7 jours. Le système immunitaire inné est lui capable de détecter la présence et la nature des infections et assure la première ligne de défense de l'organisme. Enfin, il contrôle l'initiation et la nature de la phase effectrice de la réponse adaptative.

2.1. Le système immunitaire inné : mécanismes de reconnaissance et réponses effectrices.

Bien que la découverte du système immunitaire inné par Elie Metchnikoff ait été récompensée par le Prix Nobel en 1908, le champ de l'immunité adaptative a, de façon prépondérante, occupé le terrain immunologique pendant près d'un siècle. La mise en évidence et la compréhension des mécanismes de reconnaissance des pathogènes par les PRR (Pattern-Recognition Receptor) ont ravivé l'intérêt de la recherche pour la composante innée du système immunitaire.

La stratégie de reconnaissance des pathogènes par les cellules de l'immunité innée est basée sur la détection de molécules normalement absentes des cellules hôtes, mais constitutives et conservées pour des micro-organismes d'une classe donnée. Ceci permet à un nombre limité de gènes codants pour des PRR de détecter tout type d'infection microbienne. Les motifs reconnus appelés PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) peuvent être considérés comme une signature du type d'agent infectieux. Ils sont généralement impliqués dans des fonctions cruciales de la biologie des micro-organismes, ce qui limite la capacité de mutation ou de perte de ces PAMP. Les macrophages, comme de façon plus générale les cellules de l'immunité innée disposent de différents PRR. Ces molécules peuvent être localisées dans les membranes cytoplasmiques et endosomales (TLR : Toll Like Receptor) ou dans le cytoplasme (NLR : Nucleotide-binding domain, Leucine Rich containing protein). Enfin certains PRR peuvent être sécrétés comme le LBP qui intervient dans la détection des lipopolysaccharides bactériens (LPS).

2.1.1. Les TLR (Toll Like Receptor)

L'identification du rôle de Toll, un gène responsable du développement dorso-ventral chez la drosophile mais également impliqué dans la défense contre un champignon parasite allait être le point de départ de la mise en évidence de nombreux gènes de reconnaissance des pathogènes chez les vertébrés (Lemaitre et al., 1996). En effet, en 1997, l'équipe de Charles Janeway identifia chez l'homme un homologue du gène Toll fonctionnant comme un récepteur au lipopolysaccharide bactérien (LPS) (Medzhitov et al., 1997). Plusieurs gènes homologues baptisés TLR (Toll like receptors) allaient par la suite être décrits, chacun ayant des spécificités de reconnaissance différentes. On dénombre aujourd'hui 13 TLR dont la structure s'apparente à celle du récepteur à l'IL-1.

2.1.1.1 Structure, localisation et ligands des TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type 1 qui appartiennent à la superfamille des récepteurs de type Toll/IL1-R (TIR) déterminée par la présence d'un domaine intracytoplasmique de type TIR essentiel pour les interactions avec des molécules adaptatrices (Akira et al., 2001). À la différence du récepteur à l'IL-1 dont la partie extracellulaire est constituée de domaines de types immunoglobulines, le segment extracellulaire des TLR est caractérisé par la présence de domaines riches en leucine (LRR) qui permettent la reconnaissance de ligands (Rock et al., 1998). Le domaine transmembranaire est responsable de la localisation du TLR dans la cellule (Barton et al., 2006).

Les TLR 1, 2, 5, 6, 10 et 11 sont localisés à la membrane plasmique, alors que les TLR 3, 7, 8 et 9 sont situés dans les membranes des endosomes. La localisation subcellulaire est importante car elle permet une bonne spécificité de la reconnaissance des ligands. Ainsi le TLR 9 reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN double brin, ces motifs fréquents dans les génomes viraux sont également présents bien qu'en faible quantité dans le génome humain. Il a été montré que la localisation intracellulaire était critique pour la détection de l'ADN viral, masqué par la capsid dans le milieu extracellulaire mais également pour empêcher la réactivité vis-à-vis de l'ADN du soi libéré dans le secteur extracellulaire par les cellules mortes (Barton et al., 2006).

La reconnaissance par les TLR est marquée par une forte dégénérescence, chaque récepteur pouvant détecter et répondre à différents ligands présentant des structures moléculaires distinctes. Initialement décrit comme un récepteur au LPS, le TLR4 est capable de détecter et d'induire une réponse contre le virus syncytial respiratoire (Kurt-Jones et al.,

2000), l'extra-domaine A de la fibronectine (Okamura et al., 2001), la protéine de choc thermique HSP60 (Ohashi et al., 2000) et l'acide hyaluronique (Taylor et al., 2004). La localisation subcellulaire des TLR, leurs principaux ligands identifiés ainsi que les molécules adaptatrices utilisées sont récapitulés dans le tableau 1. La mise en évidence de composés du soi comme ligands des TLR a fait évoluer la définition initiale de ces molécules, plutôt qu'uniquement dédiés à la reconnaissance d'agents infectieux, les TLR apparaissent donc de façon plus générale comme des récepteurs capables de détecter le danger.

2.1.1.2 Protéines adaptatrices, voies de signalisation et facteurs de transcription

L'activation des TLR induit l'expression d'un large panel de gènes essentiels pour la réaction immunitaire. La diversité des réponses possibles dépend des types de TLR engagés, du recrutement de molécules adaptatrices permettant la transduction du signal et de l'activation de facteurs de transcription capables de contrôler de façon complexe le niveau d'expression de nombreux gènes (Krishnan et al., 2007). Les cascades de signalisation en aval des TLR sont résumées dans la figure 3. Elles aboutissent à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, AP1 et IRF

La famille des facteurs de transcription NF- κ B contient 5 membres : p65, RelB, c-Rel, p100/p-52 et p105/p50 qui s'organisent en homo ou hétéro-dimères associés à une molécule de la famille I κ B. Les séquences NES (Nuclear Export Sequence) présentes sur les protéines I κ B assurent la localisation cytoplasmique des complexes NF- κ B/I κ B, réprimant ainsi les activités transcriptionnelles. La dégradation de I κ B conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B qui va pouvoir se fixer sur des régions promotrices ou « enhancer » afin d'induire l'expression génique. Suite à l'activation des TLR, les membres de la famille NF- κ B régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α , l'IL-12 et l'IFN- β (Hayden and Ghosh, 2004).

Le complexe AP-1 (activating protein 1) est un facteur transcriptionnel dimérique composé d'une combinaison de protéines des familles multigéniques Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, et Fra-2) et Jun (c-Jun, JunB, et JunD). Son activation dans la signalisation des TLR est sous le contrôle des voies MAPK (mitogen-activating protein kinase) JNK et p38. Parmi les protéines du complexe AP-1, c-jun joue un rôle déterminant dans les réponses inflammatoires en contrôlant notamment la production de TNF- α , d'IL-12 et du récepteur aux chimiokines CCR7.

Enfin, les facteurs de transcription de la famille IRF (interferon regulatory factor) permettent la production d'IFN de type 1 suite à l'activation des TLR. La transcription du gène codant pour l'IFN- β est contrôlée par l'action coordonnée des facteurs NF- κ B, AP-1, IRF3 et IRF7. À l'état non activé, les molécules IRF sont présentes dans le cytoplasme. Après stimulation, ces molécules sont phosphorylées par des molécules IKK non conventionnelles, TBK1 (TANK binding kinase 1) et IKKi. Cette modification induit l'import nucléaire des protéines IRF et la transcription génique. Un haut degré de complexité est atteint avec la capacité d'IRF3 à former des dimères avec les molécules de la famille NF- κ B, ainsi la production d'IP-10 et d'IFN- β est dépendante de dimères IRF3/p65 (Wietek et al., 2003).

2.1.1.3 Rôle des TLR dans les réponses immunes

Le rôle critique des TLR dans les processus de défenses immunitaires a été démontré par des approches génétiques dans des modèles expérimentaux comme chez l'homme. Chez la souris, des mutations dans le TLR4 rendent les animaux résistants aux chocs septiques et inversement, confèrent une susceptibilité accrue aux infections expérimentales par des bactéries Gram négative (Poltorak et al., 1998). L'étude des souris déficientes pour différents TLR soulignent toutefois une augmentation seulement modeste de la susceptibilité face aux pathogènes. Ces données peuvent s'expliquer par une complémentarité entre les différents TLR ou par l'action d'autres récepteurs comme les NLR (Ku et al., 2005). Le mécanisme de compensation entre les différents TLR est démontré par l'immunodépression plus sévère des animaux déficients pour MyD88 que celle observée chez des animaux déficients pour des TLR individuels. Chez l'homme des mutations dans la protéine IRAK4 confèrent une immunodépression caractérisée par des infections bactériennes récurrentes (Picard et al., 2003). Là encore, malgré le rôle central d'IRAK4 dans la signalisation des TLR, les patients sont capables de contrôler les infections virales et fongiques soulignant un phénomène de redondance dans les mécanismes de défense immunitaire.

Les TLR participent à tous les événements majeurs des réponses innées. Leur activation contrôle la nature et l'efficacité du processus de phagocytose. Ce mécanisme ancestral qui assure le « nettoyage » de l'organisme par l'élimination des cellules apoptotiques et des composants dégradés des matrices extracellulaires constitue également la première ligne de défense face aux agents infectieux. Les TLR ne sont pas responsables du processus d'ingestion des pathogènes, mais contrôlent l'efficacité des étapes conduisant à leur dégradation. Par des mécanismes encore mal connus impliquant la voie des MAP kinases, ils

favorisent l'acquisition séquentielle par le phagosome de nouveaux constituants conduisant à sa maturation et *in fine* à la formation du phagolysosome, structure où s'effectue la dégradation terminale des pathogènes.

Les TLR interviennent directement dans la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ils permettent aux cellules dendritiques et aux macrophages d'acquérir toutes les fonctionnalités nécessaires à l'activation des lymphocytes T naïfs. De façon spécifique, la présence de ligands des TLR dans les cargos phagocytés va induire un mode inductible de maturation du phagosome conduisant à l'apprêtement de complexe CMH/peptide, les structures phagocytées dépourvues de ligand des TLR comme les cellules apoptotiques ne seront pas présentées (Blander and Medzhitov, 2006a). L'expression des molécules de co-stimulation comme CD80, CD86 et CD40 nécessaire à l'expansion clonale des cellules T naïfs est également sous la dépendance des TLR (Banchereau et al., 2000). Enfin, les cytokines produites par les DC et les macrophages en réponse à l'activation des TLR permettent la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la sous-population fonctionnelle la plus adaptée à la nature de l'agent infectieux.

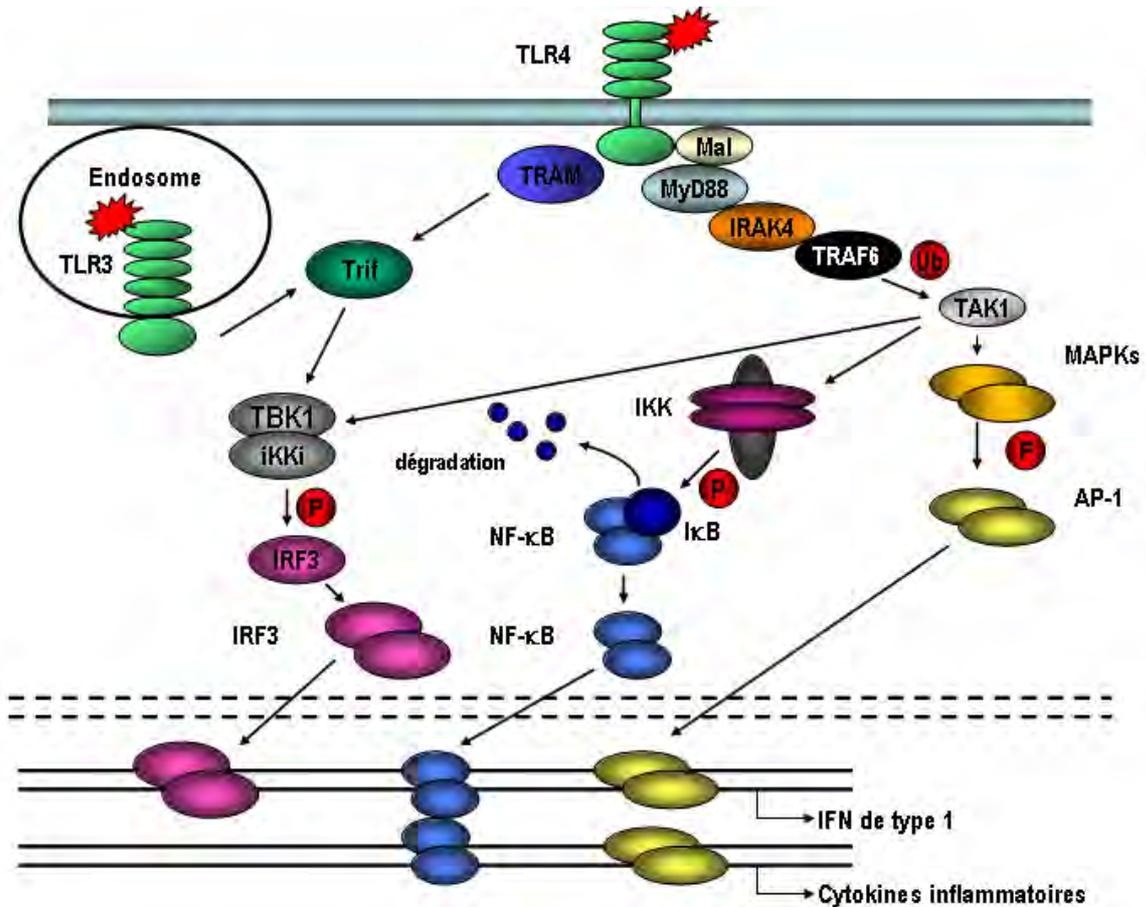


Figure 3: voies de signalisation des TLR

La signalisation en aval des TLR peut être divisée en une voie dépendante de MyD88 et une voie indépendante. Tous les TLR utilisent la voie dépendante de MyD88 à l'exception du TLR3. MyD88 est associé au récepteur par son domaine TIR, après fixation d'un ligand, Myd88 phosphoryle IRAK4 qui phosphoryle à son tour IRAK1. IRAK1 phosphoryle TRAF6 qui active par ubiquitination la protéine kinase TAK1. TAK1 joue un rôle central dans l'activation des facteurs de transcription AP-1, NF-κB et IRF3 qui permettent l'expression de gènes pro-inflammatoires et antimicrobiens. Les TLR2 et 4 utilisent l'adaptateur Mal qui potentialise l'action de MyD88. Les TLR3 et 4 peuvent utiliser une voie indépendante de MyD88 qui fait appelle aux molécules adaptatrices TRAM et Trif.

Tableau 1 : les TLR et leurs ligands

TLR	Adaptateurs	Localisation	Espèces	ligands
TLR 1	MyD88/Mal	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	PAM3CSK4
TLR 2	MyD88/Mal	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	PAM2CSK4, MALP2, LTA, ZYM
TLR 3	TRIF	Compartiments vésiculaires	Humain/Souris/rat	dsRNA, Poly-IC, viral RNA, siRNA, endogenous mRNA
TLR 4	Myd88/Mal/TRIF/TRAM	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	LPS, MMTV, VSV-G, Taxol, F protein, Fibronectin, HSP60, HSP70, Hyaluronan
TLR 5	Myd88	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	Flagellins
TLR 6	Myd88/Mal	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	MALP2, LTA, Zym
TLR 7	Myd88	Compartiments vésiculaires	Humain/Souris/rat	ssRNA
TLR 8	Myd88	Compartiments vésiculaires	Humain/Souris/rat	ssRNA
TLR 9	Myd88	Compartiments vésiculaires	Humain/Souris/rat	CpG-ODN
TLR 10	?	Membrane plasmique	Humain/Souris/rat	?
TLR 11	Myd88	Membrane plasmique	Souris/rat	profilin
TLR 12	?	?	Souris/rat	?
TLR 13	?	?	Souris/rat	?

CpG-ODN: synthetic oligodeoxyribonucleotides containing CpG motifs; LTA: lipoteichoic acid; MAL: MyD88 adapter-like; MALP2: macrophage-activating lipopeptide; MMTV: mouse mammary tumor virus; PAM3CSK4: synthetic triacylated lipopeptide; PAM2CSK4: synthetic diacylated lipopeptide; Poly-IC: polyinositol-polycytidylic acid; ssRNA: single stranded RNA, VSV-G: vesicular stomatitis virus G protein; ZYM: zymosan (d'après Krishnan et al. Exp Mol Med, 2007)

2.1.2. Les NLR (Nucleotide-binding domain, Leucin Rich containing protein)

Les protéines de types NLR constituent une large famille présente chez les plantes et les animaux. Plus de vingt gènes de ce type ont été identifiés chez l'homme. Le rôle critique des NLR dans les interactions avec les pathogènes a été identifié initialement chez les plantes (Staskawicz, 2001). L'importance de ces protéines dans les réactions inflammatoires et immunitaires des vertébrés commence seulement à être appréhendée.

2.1.2.1. Structure et ligands des NLR

La structure des protéines NLR est caractérisée par une organisation tripartite avec la présence de domaines LRR (Leucin Rich Repeat) en position C terminale, de domaines NBD (Nucleotide-binding domain) en position centrale et d'un domaine N terminal permettant le recrutement de molécules effectrices.

Les domaines NBD font parti d'une superfamille de domaine à activité NTPase qui permet l'hydrolyse de l'ATP ou du GTP. Des mutations dans la région de fixation de l'ATP abolissent la signalisation par les NLR (Duncan et al., 2007). L'hydrolyse de l'ATP permet

l'oligomérisation des domaines NBD. Les domaines LRR sont similaires à ceux présents dans la structure des TLR et sont classiquement des modules impliqués dans la reconnaissance de ligand. En l'absence de ligand, il a été proposé que les domaines LRR puissent jouer un rôle de régulation de l'activité des NLR en maintenant une conformation inhibant les domaines NBD. En effet, la délétion de régions proches des domaines LRR de NOD2 (un des NLR les mieux caractérisés) induit son activation constitutive (Tanabe et al., 2004). Enfin, les domaines effecteurs N terminal permettent la transduction du signal et le recrutement d'effecteurs. Il existe deux principaux sous-types de ces domaines : la sous-famille des CARD et la sous-famille des pyrine. Les domaines CARD et pyrine possèdent typiquement une structure composée de six hélices alpha et signalent via des interactions homophiliques (CARD-CARD et pyrine-pyrine). Le consortium HUGO a récemment mis en place une nomenclature internationale et simplifiée pour les gènes NLR qui tient compte du type de domaines amino terminal (<http://www.genenames.org/genefamily/nacht.html>)

Parmi le grand nombre de NLR identifiés chez les vertébrés, seuls quelques-uns ont été associés avec des ligands putatifs. Le champ d'investigation pour l'identification d'activateur des NLR reste considérablement ouvert.

Les premiers NLR clairement identifiés comme des PRR capables de reconnaître des PAMP spécifiques furent NOD1 et NOD2. Ces deux protéines possèdent des domaines CARD et réagissent à des composés de peptidoglycanes bactériens. Le motif reconnu par NOD2 est le MDP (Muramyl Di-Peptide), composé d'un sucre et de deux acides aminés (Girardin et al., 2003b) alors que NOD1 répond à l'acide gamma-D glutamyl-meso-diaminopimelique (meso-DAP) (Girardin et al., 2003a). Le motif meso-DAP est caractéristique des peptidoglycanes des bactéries Gram-, il est retrouvé dans quelques bactéries Gram+ du genre *Listeria* et *Bacillus*. Le motif MDP est lui généralisé aux bactéries Gram+ comme aux bactéries Gram-. Ces observations impliquent un large spectre de reconnaissance pour les gènes *Nod* et en particulier *Nod2*. NOD1 et NOD2 ont été impliqués dans le contrôle de la prolifération de plusieurs bactéries comme *L. monocytogenes* et *S. flexneri* (Kobayashi et al., 2005). Deux autres NLR ont été impliqués dans la détection de motifs microbiens, IPAF et NAIP qui induisent tous les deux une réponse contre la flageline, le composé majeur des flagelles bactériens, mais la reconnaissance directe n'a pas été démontrée. Enfin, des travaux montrent que NALP1 est capable de reconnaître le MDP et d'induire une réponse contre un facteur de virulence bactérien, le facteur létal de l'anthrax (LF) (Boyden and Dietrich, 2006). NALP1 ne peut être classé facilement dans les sous-familles des NLR car il possède un

domaine CARD en position C-terminal et un domaine pyrin en position N-terminal, suggérant des capacités multiples de signalisation. La capacité de NALP1 à être directement activé par le MDP a été montrée *in vitro* (Faustin et al., 2007). À l'inverse les preuves d'association directe entre NALP1 et LF sont aujourd'hui manquantes. Il faut noter que chez les plantes où les NLR sont fréquemment impliqués dans la détection de facteurs de virulence microbiens, la reconnaissance est souvent indirecte, nécessitant la présence de récepteurs adaptateurs (Mackey et al., 2002). L'activation de NALP1 requiert l'activité protéasique du LF (Fink et al., 2008). Il est possible que la reconnaissance du LF par NALP1 soit dépendante du clivage d'un adaptateur.

2.1.2.2. Signalisation des NLR

Deux types de réponses sont sous la dépendance des NLR : (1) l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 qui rejoint et peut amplifier la signalisation des TLR et (2) l'activation de la caspase 1 qui conduit à la sécrétion d'interleukines atypiques et à la mort cellulaire.

La capacité d'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoires a bien été documentée pour les gènes *Nod1* et *Nod2*. En présence de leurs ligands respectifs (respectivement meso-DAP et MDP), NOD1 et NOD2 vont pouvoir s'oligomériser en homodimères. Ces interactions homophiles vont permettre le recrutement de la serine/thréonine kinase RICK (RIP2) qui va être activée par ubiquitination (Hasegawa et al., 2008) (Hitotsumatsu et al., 2008). De façon similaire à la signalisation des TLR, l'ubiquitination de RICK permet le recrutement de la kinase TAK1 requise pour l'activation des voies des MAP kinases et du complexe IKK. NF- κ B et AP-1 vont permettre la production d'IL-6, de TNF- α et d'IL-8 en réponse à la stimulation des NOD (Kobayashi et al., 2005) (Li et al., 2004).

La production de cytokines est généralement contrôlée au niveau transcriptionnel. Après une maturation dans l'appareil de golgi, ces médiateurs sont libérés par exocytose. Les cytokines qualifiées d'atypiques IL-1 β , IL-18 et IL-33 sont synthétisées sous forme d'un précurseur inactif localisé dans le cytoplasme. La production des formes biologiquement actives est dépendante du clivage des précurseurs par la caspase 1, illustré par l'incapacité des souris déficientes pour cette protéase à produire de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Ghayur et al., 1997) (Cerretti et al., 1992) (Li et al., 1995). La caspase 1 est également produite sous la forme d'un zymogène: la pro-caspase 1, composée d'un pro-domaine en position N terminale portant un motif de recrutement CARD suivi de deux sous-unités qui forment le domaine protéasique

(Lamkanfi and Dixit, 2009). Le pro-domaine permet le recrutement de la pro-caspase 1 dans un complexe multiprotéique où des changements conformationnels permettent sa maturation protéolytique.

Par analogie à l'apoptosome, le complexe macromoléculaire qui contrôle la mort cellulaire en réponse à des dommages mitochondriaux, le groupe de Tschoop a appelé inflammasome un ensemble multiprotéique capable d'induire *in vitro* la production d'IL-1 β (Martinon et al., 2002). Ces complexes contiennent des NLR et des adaptateurs (en particulier la molécule ASC) qui permettent le recrutement de la pro-caspase 1 et son clivage en forme active. Plusieurs études ont confirmé l'existence des inflammasomes *in vivo*, mais la composition exacte et la stœchiométrie des molécules composant ces complexes restent encore mal connues. Quatre molécules NLR ont été directement impliquées dans la formation d'inflammasomes en réponse à des stimuli spécifiques : NALP1, NALP3, IPAF et NAIP (Lamkanfi and Dixit, 2009).

Des études réalisées à l'aide de protéines purifiées ont permis de décrire les mécanismes de formation de l'inflammasome NALP1, dont la mise en place se déroule en deux étapes successives. La fixation du ligand est le processus initial. Il permet l'activation des domaines NBD et l'hydrolyse de l'ATP. Cette première étape permet l'oligomérisation des NLR et le recrutement de la molécule adaptatrice ASC. Le complexe ainsi formé recrute la pro-caspase1 et induit son clivage en forme active (figure 4).

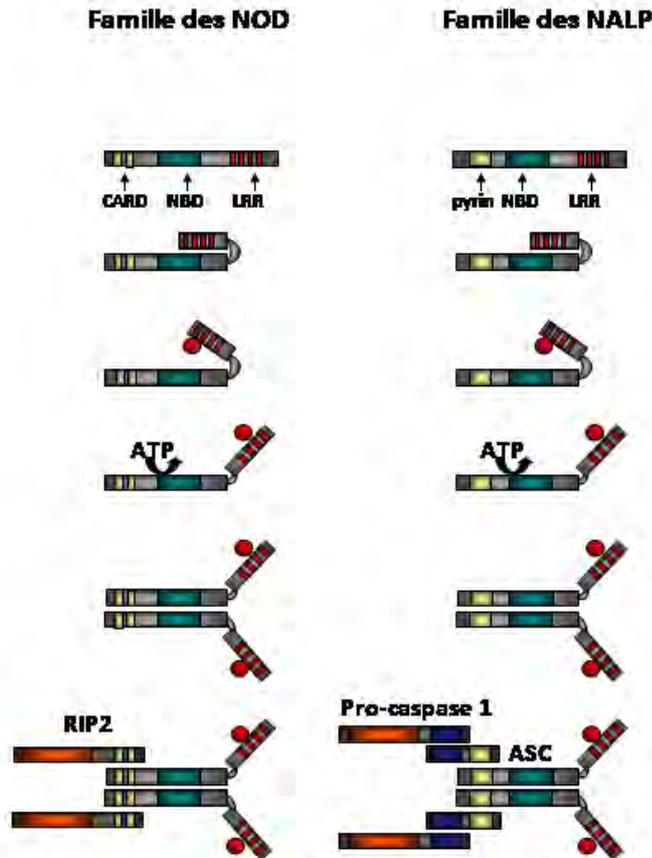


Figure 4: Modèle proposé d'activation des NLR

La fixation des ligands sur les domaines LRR des protéines NLR résulte en un changement conformationnel permettant l'hydrolyse de l'ATP et l'oligomérisation. NOD1 et NOD2 peuvent alors recruter RIP2 qui va s'auto-phosphoryler et activer les cascades de signalisation conduisant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Les protéines NALP recrutent l'adaptateur ASC qui va pouvoir lier la pro-caspase1, celle-ci, à son tour va s'auto-activer et cliver ses substrats, en particulier la pro-IL-1 β .

2.1.2.3. Régulateurs négatifs de l'activation des NLR

Plusieurs travaux récents ont permis de mettre en évidence différents points de contrôle de l'activation des NLR et de la formation de l'inflammasome. Comme dans la voie des TLR, les mécanismes de régulation semblent agir sur la disponibilité des molécules adaptatrices. Il a été montré que Bcl-2 et Bcl-X_L, deux molécules initialement décrites comme anti-apoptotiques étaient capables de se lier à NALP1 et d'inhiber le recrutement des adaptateurs ASC après une stimulation par le MDP. De façon cohérente, ces deux protéines ont également un effet inhibiteur sur l'activation de la caspase 1 et la production d'IL-1 *in vitro* comme *in vivo* (Bruey et al., 2007). Des travaux récents ont également montré que la localisation subcellulaire des adaptateurs ASC était impliquée dans le contrôle de l'activation de l'inflammasome. En l'absence de stimulation par des PAMP, ASC est séquestré dans le noyau. A l'inverse la stimulation de lignées monocytaires/macrophagiques par des stimuli comme de l'ARN bactérien induit la relocalisation d'ASC au niveau cytoplasmique et sa colocalisation avec des NLR et la caspase 1. Cette redistribution des adaptateurs est corrélée avec la capacité des cellules à produire de l'IL-1 β . L'expression de formes mutantes d'ASC, où l'export cytoplasmique est limité par plusieurs séquences NLS, inhibe la réponse cellulaire (Bryan et al., 2009). Les mécanismes moléculaires responsables de la localisation nucléaire ou cytoplasmique d'ASC ne sont pour l'heure pas connus mais la mise en évidence d'une grande coopération entre la voie des TLR et des NLR suggère une possible implication d'un signal initial transmis par les TLR.

2.1.2.4. Les NLR dans les réponses immunes

2.1.2.4.1. Rôle des NOD

Comme décrit plus haut, les motifs reconnus par NOD1 et NOD2 sont conservés dans un grand nombre de bactéries et des études *in vitro* ont montré l'implication de ces protéines dans la reconnaissance de plusieurs bactéries pathogènes comme *Shigella flexneri* (Girardin et al., 2001), des *Escherichia coli* entéro-invasives (Kim et al., 2004a), *Chlamydia* (Welter-Stahl et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Travassos et al., 2005), *Campylobacter jejuni* (Zilbauer et al., 2007) ou encore *Helicobacter pylori* (Boughan et al., 2006). Malgré cela, les études réalisées *in vivo* ne confirment pas toujours l'importance des gènes *Nod* dans les réponses antibactériennes, par exemple l'impact de *Nod1* sur l'activation des cellules épithéliales par *Chlamydia in vitro* n'est pas confirmé *in vivo* quand des souris déficientes pour *Nod1* sont infectées par voie vaginale (Welter-Stahl et al., 2006). Pour l'heure *Nod1* a

seulement été directement impliqué dans le contrôle *in vivo* de l'infection par *H.pilory*. En effet des souris *Nod1*^{-/-} présentent une charge bactérienne accrue après infection intragastrique par rapport aux souris contrôle (Viala et al., 2004). *Nod2* a quand à lui été impliqué dans le contrôle de l'infection par la bactérie *L.monocytogenes*, son absence chez la souris entraîne une augmentation de la susceptibilité à l'infection, une charge bactérienne plus élevée et une diminution de la production de certains peptides antimicrobiens par rapport aux animaux contrôles sauvages (Kobayashi et al., 2005). La différence entre les effets observés *in vitro* et *in vivo* peut s'expliquer par le phénomène de redondance et de complémentation par les TLR au niveau des défenses globales de l'organisme. Comme les TLR, les récepteurs NOD participent à la première ligne de défense innée mais sont également impliqués dans l'initiation des réponses adaptatives. Des travaux récents montrent l'implication de l'activation de NOD1 dans l'effet de l'adjuvant complet de Freud sur les réponses T et B (Fritz et al., 2007).

Chez l'homme, des mutations de *Nod2* ont été associées à la maladie de Crohn, une pathologie chronique caractérisée par une inflammation intestinale. Les cellules mononuclées du sang de patients présentant ces mutations ne répondent pas au MDP avec une diminution de l'activation de NF- κ b corrélée à une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6, IL-1 β (Inohara et al., 2003), (van Heel et al., 2005). Des mutations de *Nod1* ont été associées au risque de développer des maladies allergiques (Hysi et al., 2005) (Kabesch et al., 2003a). Les mécanismes reliant *Nod1* aux maladies allergiques et à l'atopie ne sont pas connus.

2.1.2.4.2. Rôle des inflammasomes

L'implication des inflammasomes dans l'inflammation, l'immunité innée et la défense de l'hôte est montrée par la susceptibilité accrue de souris déficientes pour la caspase 1 à de nombreuses infections. Un rôle protecteur de la caspase 1 a été décrit lors d'infections par *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Legionella* et *Francisella*. (Franchi et al., 2009). De façon comparable à la situation observée pour les TLR où l'immunodépression est plus sévère chez les animaux déficients pour MyD88 que pour des TLR individuels, le phénotype des souris déficientes pour des NLR individuels ne mime pas complètement celui obtenue chez les souris déficientes pour la caspase 1, suggérant un phénomène de redondance des NLR *in vivo*. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action protectrice des inflammasomes.

La caspase 1 est responsable du clivage sous forme active des cytokines IL-1 β et IL-18.

Alors que la première possède des effets pléiotropiques qui en font un des médiateurs les plus puissants de l'inflammation, la seconde joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs. Avec l'IL-12, l'IL-18 joue un rôle majeur dans l'établissement des réponses T_{H1}.

La formation et l'activation des inflammasomes peuvent induire une mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose. Cette mort se caractérise par une perte de l'intégrité membranaire et l'absence de condensation nucléaire. Ce processus est impliqué dans la mort cellulaire des macrophages en réponse à l'infection par *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Listeria* et *Legionella*. Ce mécanisme, en plus de libérer différents médiateurs inflammatoires détruit la « niche » des pathogènes intracellulaires. Il faut également noter que certains pathogènes comme *T.gondii* utilisent les cellules de l'immunité innée comme transporteur pour accomplir leur dissémination dans l'organisme, la mort de ces cellules pourrait donc être un mécanisme de défense efficace face à ce type de stratégie microbienne.

2.2. Le système adaptatif

2.2.1. Introduction

Les vertébrés ont développé une stratégie de défense extrêmement sophistiquée associant de façon synergique l'immunité innée et une immunité dite adaptative. Cette dernière dépend de cellules munies de récepteurs spécifiques codés par des gènes subissant des réarrangements spécifiques de ces lignées. Ces récepteurs, immunoglobulines de surface (BCR) ou récepteurs d'antigènes des lymphocytes T (TCR) possèdent un répertoire d'une grande diversité initiale générée spontanément en l'absence de toute stimulation antigénique. Le répertoire potentiel initial des lymphocytes T ou B se situe aux environs de 10^{15} récepteurs différents.

Cette formidable capacité de diversité, qui permet théoriquement la reconnaissance spécifique d'un nombre quasi-infini de pathogènes différents, est toute fois limitée dans le cadre des lymphocytes T. En effet, ceux-ci ne détectent pas les antigènes sous leur forme native mais présentés sous forme peptidique par les molécules du CMH. La capacité de réponse sera donc conditionnée par la capacité de ces molécules à former des complexes avec les peptides microbiens. À l'échelle de la population générale, le caractère extrêmement polymorphe des gènes du CMH assure des capacités de présentation presque infinies. À l'échelle individuelle, cette étape peut s'avérer limitante et les gènes du CMH sont souvent retrouvés dans les études

généétiques sur les susceptibilités aux infections, chez l'homme comme dans les modèles expérimentaux.

L'étape de reconnaissance passée, l'efficacité de la réponse adaptative va être conditionnée par la capacité des lymphocytes et en particulier les lymphocytes T CD4 à mettre en œuvre les effecteurs les plus adaptés au contexte infectieux. Pour ceci, leur activation s'accompagne d'un processus de différenciation complexe qui peut conduire les lymphocytes T vers au moins quatre lignages différents. Le choix du programme de différenciation le plus adapté qui définit la stratégie globale de l'organisme face à l'agent infectieux est une étape cruciale pour l'efficacité des réponses adaptatives.

La complexité du système immunitaire a des contreparties : (1) L'immense diversité de récepteurs générée peut conduire à l'émergence de cellules auto-réactives capables d'induire des réponses auto-immunes (2) ; l'impact des lymphocytes sur l'ensemble des cellules de l'immunité innée amplifie les effets négatifs d'une réponse aberrante comme dans le cas des maladies allergiques. Malgré les différentes stratégies mises en place pour prévenir l'activation inadaptée des lymphocytes, la majorité des désordres immunopathologiques chez l'homme sont associés à des dérèglements du système adaptatif.

Dans ce chapitre, nous aborderons l'ontogénie des lymphocytes T, leurs spécialisations en sous-populations effectrices et leurs fonctions.

2.2.2. Ontogénie des lymphocytes T, sélection positive et négative des thymocytes

Les lymphocytes T sont une population cellulaire hétérogène par leurs fonctions et leurs phénotypes. Ces cellules dérivent de précurseurs lymphoïdes présents dans la moelle osseuse qui migrent précocement dans le thymus, l'organe central de leur différenciation où va se réaliser la génération aléatoire de récepteur à l'antigène, la différenciation en sous populations CD4⁺ et CD8⁺ et l'élimination d'une grande partie des cellules auto-réactives par le mécanisme de tolérance centrale. Il existe plusieurs types de lymphocytes T caractérisés par la nature de leur TCR. Nous nous intéresserons ici à la population lymphocytaire T majoritaire dite conventionnelle exprimant un TCR composé des chaînes α et β

Les étapes de maturation thymique s'accompagnent d'un changement de marqueurs phénotypiques à la membrane des thymocytes. Les thymocytes les plus immatures n'expriment ni le marqueur CD4 ni le marqueur CD8 et sont donc appelés doubles négatifs (DN CD4-CD8-), en avançant dans le processus de différenciation, ils acquièrent l'expression

des marqueurs CD4 et CD8 (doubles positifs DP CD4+CD8+). Enfin l'étape terminale avant l'export en périphérie et marquée par la perte d'un des deux marqueurs pour donner des cellules simples positives (SP CD4+CD8- ou CD4-CD8+).

Le choix définitif des précurseurs vers un lignage T s'effectue au stade DN, étape où s'initient les mécanismes de réarrangement génique permettant l'expression d'un TCR fonctionnel. Chaque cellule va assembler la région codant pour la partie du TCR impliquée dans la reconnaissance de l'antigène à partir de différents segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) (Brandt and Roth, 2002). Ce processus est complexe et nécessite de nombreuses molécules, mais il peut être grossièrement schématisé en deux étapes: clivage de l'ADN grâce aux molécules RAG-1 et RAG-2 (Mombaerts et al., 1992) (Shinkai et al., 1992) puis liaison des deux extrémités clivées par la machinerie protéique NHEJ (non-homologous end-joining). Dans un premier temps, seule la chaîne β va être réarrangée, son expression à la surface du thymocyte en association avec une pré-chaîne α invariable (pT α) va permettre à la cellule de recevoir des signaux de survie, d'inactiver la machinerie de recombinaison et d'avancer dans sa voie de différenciation (von Boehmer et al., 1998).

L'atteinte progressive du stade DP comporte six à huit cycles de division et s'accompagne de la recombinaison des segments de gènes V et J codant pour la chaîne α du TCR après réexpression de la machinerie de recombinaison. Si un réarrangement fonctionnel a lieu et si les chaînes α et β s'apparient, le récepteur à l'antigène est alors exprimé. Sa spécificité va conditionner le devenir du thymocyte en développement qui va, à ce stade, subir le processus de sélection positive.

La sélection positive permet la survie sélective des cellules qui expriment un TCR restreint pour le CMH du soi, condition indispensable à la participation des lymphocytes aux réponses immunitaires en périphérie. Avant sélection, au stade DP, les thymocytes n'expriment plus de récepteur à l'IL-7 ni le facteur de survie Bcl-2. Ils sont donc naturellement prédestinés à la mort dite "par négligence" qui se produit pour 90% d'entre eux, à moins qu'ils n'intègrent un signal de survie leur permettant d'être sélectionnés positivement (Germain, 2002). Ce signal est transduit suite à l'interaction entre le TCR du thymocyte DP et le complexe CMH/peptide des cellules du stroma thymique.

Classiquement, les antigènes exogènes liés aux molécules de CMH I signalent au système immunitaire la présence de cellules infectées qu'il s'efforce de détruire, alors que les antigènes présentés par les molécules de CMH II permettent la coordination des différents

acteurs immunitaires dans la lutte contre les pathogènes. En accord avec cette dichotomie, les LT $\alpha\beta$ comprennent deux lignages: les LT CD4⁺ (Helper; auxiliaires) reconnaissent les complexes CMH II/peptide alors que les LT CD8⁺ (cytotoxiques) reconnaissent les ligands CMH I/peptide.

L'utilisation de souris transgéniques pour des constructions codant pour les chaînes α et β d'un TCR de spécificité connue a notamment permis d'intégrer cette théorie dans le contexte de la sélection thymique. Les thymocytes exprimant un TCR restreint pour le CMH II se développent sélectivement en LT CD4⁺, et inversement les thymocytes exprimant un TCR restreint pour le CMH I se développent en LT CD8⁺. Ceci se traduit par la perte de l'expression de l'un des deux corécepteurs. Les mécanismes impliqués dans le choix du lignage CD4 vs CD8 font l'objet d'intenses recherches et controverses depuis plus de vingt ans et ne seront pas développés ici.

La transition du stade DP au stade SP s'accompagne de la mise en place du processus de tolérance centrale marquée par l'élimination des thymocytes auto-réactifs identifiée par Matzinger au début des années 80. Deux mécanismes de sélection négative ont été décrits, le premier aboutit à l'élimination physique des précurseurs auto-réactifs (délétion clonale) et est médié principalement par les cellules dendritiques (Kappler et al., 1987), alors que le second, permis par les cellules épithéliales thymiques, conduit à leur inactivation fonctionnelle (anergie) (Ramsdell et al., 1989).

Une fois ces étapes terminées, les LT vont quitter le thymus pour la périphérie. Contrairement aux cellules de l'immunité innée, ces cellules ne sont pas encore capables de participer efficacement aux réponses immunes. Pour cela elles devront être au préalable activées par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles que sont les cellules dendritiques et dans une moindre mesure, les macrophages. Certaines cellules sortent du thymus avec une fonctionnalité préétablie comme les cellules régulatrices naturelles (nTreg) mais la majeure partie des cellules naïves vont acquérir leurs fonctionnalités en fonction du contexte biologique dans lequel elles seront activées.

2.2.3. Les lymphocytes T CD4

Depuis les travaux fondateurs de l'immunologie moderne, il est bien reconnu que deux types de réponses peuvent être mis en place pour assurer la défense de l'organisme: l'un dépendant des anticorps et l'autre dépendant de cellules, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de cette dichotomie sont restés largement incompris jusqu'au milieu des années

80. La découverte de Mossmann et Coffman en 1986 de clones de LT CD4⁺ produisant de façon sélective de l'IFN- γ ou de l'IL-4 a montré que la population CD4⁺ n'était pas homogène mais contenait différentes sous-populations avec des fonctions spécifiques (Mosmann et al., 1986). Il est aujourd'hui bien établi chez l'homme comme dans les organismes modèles que sont la souris et le rat, qu'au moins quatre possibilités de différenciation s'offrent à une cellule naïve (T_{H1}, T_{H2}, TH₁₇, iTreg) et que le choix de l'une ou l'autre dépend de signaux reçus au moment de l'interaction initiale avec l'antigène. Cette spécialisation permet ensuite le recrutement et l'activation d'effecteurs les plus adaptés à la situation pathologique grâce à la production d'un panel de cytokines et de chimiokines spécifiques. Les processus de différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules effectrices sont résumés dans la figure 5.

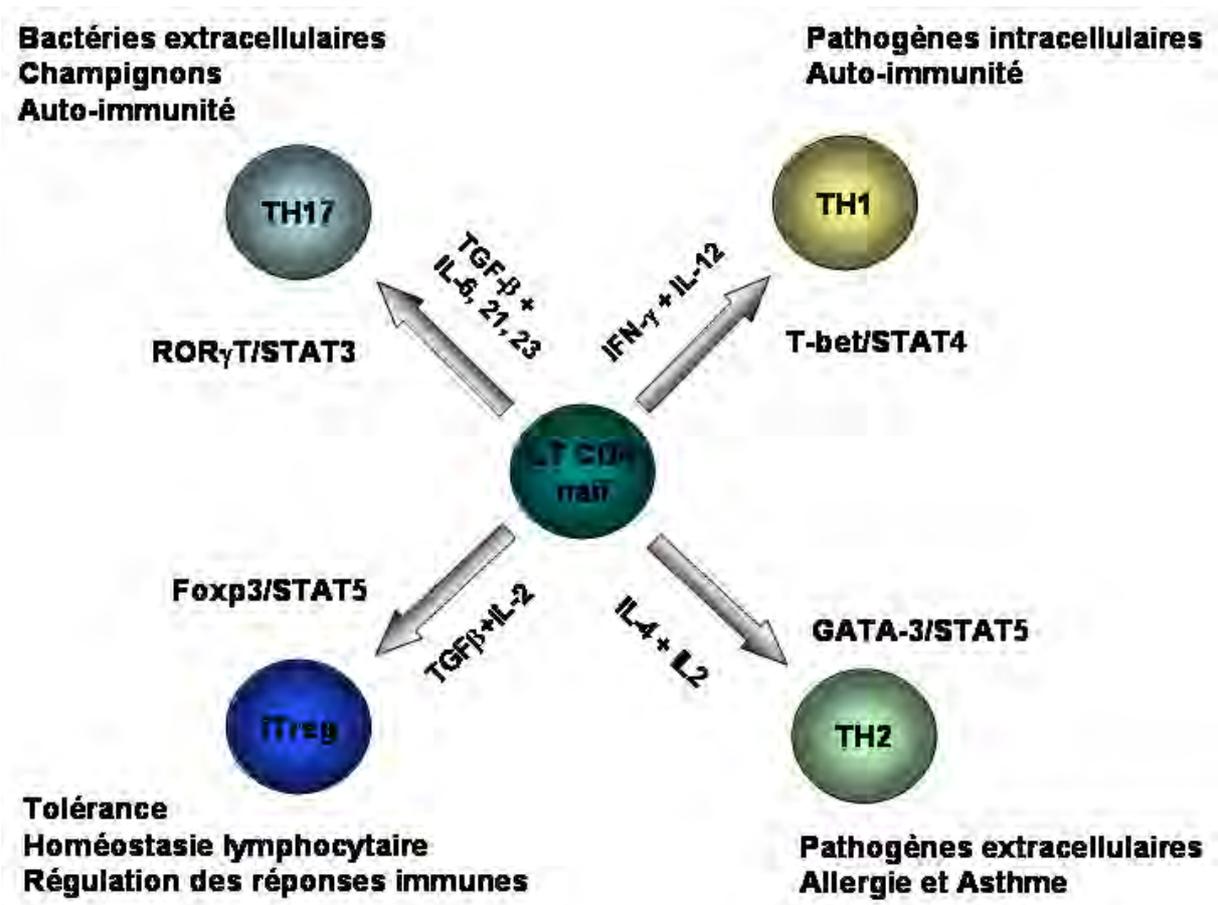


Figure 5: Diversification des lymphocytes T CD4

Représentation schématique des sous-populations lymphocytaires T CD4 induites après activation par le TCR. Les cytokines impliquées dans la différenciation de chaque sous-population sont indiquées ainsi que les facteurs de transcription clé dans le processus de différenciation et dans le maintien du phénotype. Les fonctions normales et pathologiques de chaque sous population sont également indiquées

2.2.3.1. Les lymphocytes T_{HI} : organisateurs des réponses cellulaires

Les lymphocytes T_{HI} sont responsables de la réponse contre les pathogènes intracellulaires (Mosmann and Coffman, 1989) (Paul and Seder, 1994) et chez l'homme, ils jouent un rôle crucial dans la résistance aux infections micobactériennes et parasitaires.

Les cytokines types produites par les cellules T_{HI} sont principalement l'IL-2, la lymphotoxine α ($LT\alpha$) et l'IFN- γ . Ce dernier joue un rôle majeur dans l'activation des macrophages en augmentant de façon considérable leurs activités antimicrobiennes (Suzuki et al., 1988). L'IFN- γ intervient également comme un signal permettant aux lymphocytes B de produire des Ig de classe G possédant la capacité à se lier aux protéines du complément et aux récepteurs Fc γ de haute affinité. Ces anticorps permettent l'opsonisation et la phagocytose des particules microbiennes. Chez la souris, les isotypes d'Ig qui dépendent de l'IFN- γ sont les IgG2a et les IgG3 (Coffman et al., 1993), chez le rat, ce sont les IgG2b (Gracie and Bradley, 1996). Chez l'homme, les IgG capables de se lier au complément sont les IgG1 et les IgG3 mais le rôle de l'IFN- γ dans la génération de ces sous classe reste mal connu (Abbas et al., 1996).

Les lymphocytes T_{HI} via leur production d'IFN- γ et d'IL-2 participent à la différenciation des cellules T CD8+ cytotoxiques et la génération de cellules mémoires (Williams et al., 2006). Cette orientation de la réponse immune par les cellules T_{HI} explique le rôle de ces lymphocytes dans l'élimination des pathogènes intracellulaires.

Différenciation des cellules T_{HI}

La différenciation en T_{HI} va se produire après l'activation d'un lymphocyte naïf par une cellule présentatrice d'antigène (APC) productrice d'IL-12. La production d'IL-12 par les APC est dépendante de leur état d'activation. Elle est induite par la voie des TLR et de l'adaptateur MyD88 (Hsieh et al., 1993). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique composée des chaînes IL12p40 et IL12p35. Son récepteur est composé de deux chaînes: IL12R β 1 dont l'expression est constitutive dans les lymphocytes naïfs et augmente au cours de l'activation et IL12R β 2 qui est induit par l'activation du TCR (Szabo et al., 1997) (Afkarian et al., 2002). Le récepteur à l'IL-12 utilise la voie de transduction du signal dépendante des protéines kinases de la famille Janus, en particulier Jak2 et Tyk2 et permet l'activation du facteur de transcription STAT4 et la production d'IFN- γ . Cette production initiale va avoir un rôle majeur dans l'amplification du phénomène de différenciation. En effet l'IFN- γ agit de façon autocrine pour induire, *via* son récepteur, l'activation des kinases Jak1 et Jak2 et du facteur de transcription

STAT1 responsable de l'expression de T-bet (Szabo et al., 2000) (Lighvani et al., 2001). *Tbx21* (le gène codant pour T-bet) est considéré comme un gène régulateur primordial dans la différenciation et le maintien du phénotype T_{H1} , il contrôle le niveau d'expression de l'IFN- γ . Son expression dans des cellules T_{H2} ou dans des cellules naïves (T_{H0}) induit leur production d'IFN- γ (Mullen et al., 2001) (Szabo et al., 2000).

2.2.3.2. Les lymphocytes T_{H2}

Les lymphocytes T_{H2} sont responsables de la défense de l'hôte contre les parasites extracellulaires comme les helminthes (Mosmann and Coffman, 1989) (Paul and Seder, 1994). Ils produisent de l'IL-4, 5, 9 et 13. L'IL-4 joue un rôle majeur dans la différenciation T_{H2} et est le médiateur principal de la commutation isotypique des lymphocytes B vers la production d'IgE (Swain et al., 1990) (Kopf et al., 1993). Cet isotype contrôle les fonctions effectrices des basophiles et des mastocytes. Les lymphocytes T_{H2} contrôlent aussi directement l'activation et le recrutement des éosinophiles.

Différenciation des cellules T_{H2}

Les premières observations sur le développement des cellules T_{H2} *in vitro* montraient la nécessité de la présence d'IL-4 et d'IL-2 (Le Gros et al., 1990) (Swain et al., 1990). Dans un schéma similaire à celui observé lors de la différenciation T_{H1} , l'activation du TCR associée à la signalisation dépendante du récepteur à l'IL-4 et du facteur de transcription STAT6 vont induire l'expression du facteur de transcription clé dans le phénotype T_{H2} : GATA3, responsable du contrôle de la production d'IL-4 et d'IL-5. L'expression de GATA3 et de l'IL-4 sont les événements initiaux d'une boucle d'auto-amplification conduisant à la différenciation complète en T_{H2} . Toutefois, les sources d'IL-4 qui initient la boucle d'auto-amplification dépendante de la voie STAT6 *in vivo* restent controversées, cette production précoce pourrait être attribuée à des cellules T mémoires ou à des cellules de l'immunité innée comme les basophiles (Xin et al., 2007) (Sokol et al., 2008).

Une voie indépendante de STAT6 a été mise en évidence dans la différenciation des T_{H2} . En effet lors d'infections par des helminthes, le nombre absolu de cellules T_{H2} différenciées est similaire chez des souris sauvages et chez des souris déficientes pour la molécule STAT6 (Jankovic et al., 2000). Plusieurs travaux récents soulignent le rôle de la voie de Notch dans la différenciation des T_{H2} *in vivo*. Notch est un récepteur membranaire impliqué dans un grand nombre d'événements de différenciation. Il est composé d'un domaine extracellulaire de reconnaissance des ligands associé de façon non covalente à un domaine

transmembranaire. Après reconnaissance de ces ligands, Notch est clivé au niveau d'un site situé dans son domaine transmembranaire par le complexe γ -secrétase. Le domaine intracellulaire de Notch est alors transloqué dans le noyau où il s'associe avec les protéines RBPJ et MAML1 pour réguler le niveau transcriptionnel de ses gènes cibles. L'absence de RBPJ et de Notch bloque la différenciation des cellules T_{H2} *in vivo* en réponse à des antigènes parasitaire (Tu et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que Notch était capable de transactiver les gènes *Gata3* et *Il4* (Fang et al., 2007) (Tanaka et al., 2006). Les événements moléculaires conduisant à la différenciation T_{H1} ou T_{H2} sont résumés dans la figure 6.

2.2.3.3. Equilibre et déséquilibre des réponses T_{H1} et T_{H2}

Comme décrit précédemment, les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} se caractérisent par des profils de production de cytokines particuliers associés à des fonctions spécifiques. Une autre caractéristique importante de ces sous-populations est leur capacité de se contrôler mutuellement. En effet, la présence d'IFN- γ ou d'IL-4 inhibe respectivement la différenciation en cellules T_{H2} et T_{H1} . Cette régulation croisée dépend d'interactions entre les gènes maîtres des processus de différenciation. T-bet, le facteur de transcription clé des cellules T_{H1} interagit directement avec GATA-3 et empêche la fixation de ce dernier sur les régions trans-activatrices des gènes *Il4* et *Il5* (Hwang et al., 2005). Une régulation au niveau transcriptionnel est aussi observée. Ainsi l'expression de GATA-3 inhibe l'expression de STAT4 (Usui et al., 2003) et inversement, T-bet peut inhiber l'expression de GATA-3 (Usui et al., 2006).

Cet équilibre entre sous-populations a été proposé comme un mécanisme majeur de contrôle des réponses immunes permettant la mise en œuvre des mécanismes de défense les plus adaptés à la nature des pathogènes. Inversement, une anomalie au sein de cet équilibre va être responsable de réponses exagérées qui vont provoquer le développement de désordres immunopathologiques. Un déséquilibre en faveur des réponses T_{H1} est associé au développement de maladie auto-immune spécifique d'organe comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaques ou l'arthrite induite par le collagène (CIA), un modèle de polyarthrite rhumatoïde. Plusieurs observations supportent cette association; (1) les cytokines de type 1 comme l'IFN- γ sont retrouvées dans le système nerveux central pendant la phase aiguë de l'EAE puis leurs concentrations chutent au cours de la rémission (Renno et al., 1995) ; (2) des souris déficientes pour T-bet ou STAT-4 sont résistantes au développement de l'EAE (Bettelli and Kuchroo, 2005) ; (3) le traitement par l'IL-12 aggrave la sévérité de l'arthrite induit par le collagène chez la souris (Germann et

al., 1996). Dans ces modèles, les lymphocytes T_{H2} présentent un rôle protecteur (Chen et al., 1994) (Kuchroo et al., 1995). A l'inverse, de nombreuses évidences montrent un rôle critique des réponses T_{H2} exacerbées dans les maladies atopiques et allergiques, alors qu'une immunothérapie réussie se traduit par une augmentation des taux d'IFN- γ chez les patients allergiques (Jutel et al., 1995) (Durham et al., 1996).

L'autorégulation entre les populations T_{H1} et T_{H2} a été le paradigme dominant pour expliquer les désordres immunopathologiques au cours des années 90. Plusieurs arguments ont permis récemment d'élargir cette vision quelque peu manichéenne. En effet, la neutralisation de l'IFN- γ (réalisée soit par des anticorps bloquants soit dans des souris déficientes pour l'IFN- γ) ne conduit pas à une moins grande sensibilité aux modèles d'auto-immunité. A l'inverse ces souris développent des réponses exacerbées dans les modèles EAE et CIA (Ferber et al., 1996) (Matthys et al., 1998). Les circuits cytokiniques de régulation des maladies auto-immunes sont donc plus complexes qu'initialement imaginé.

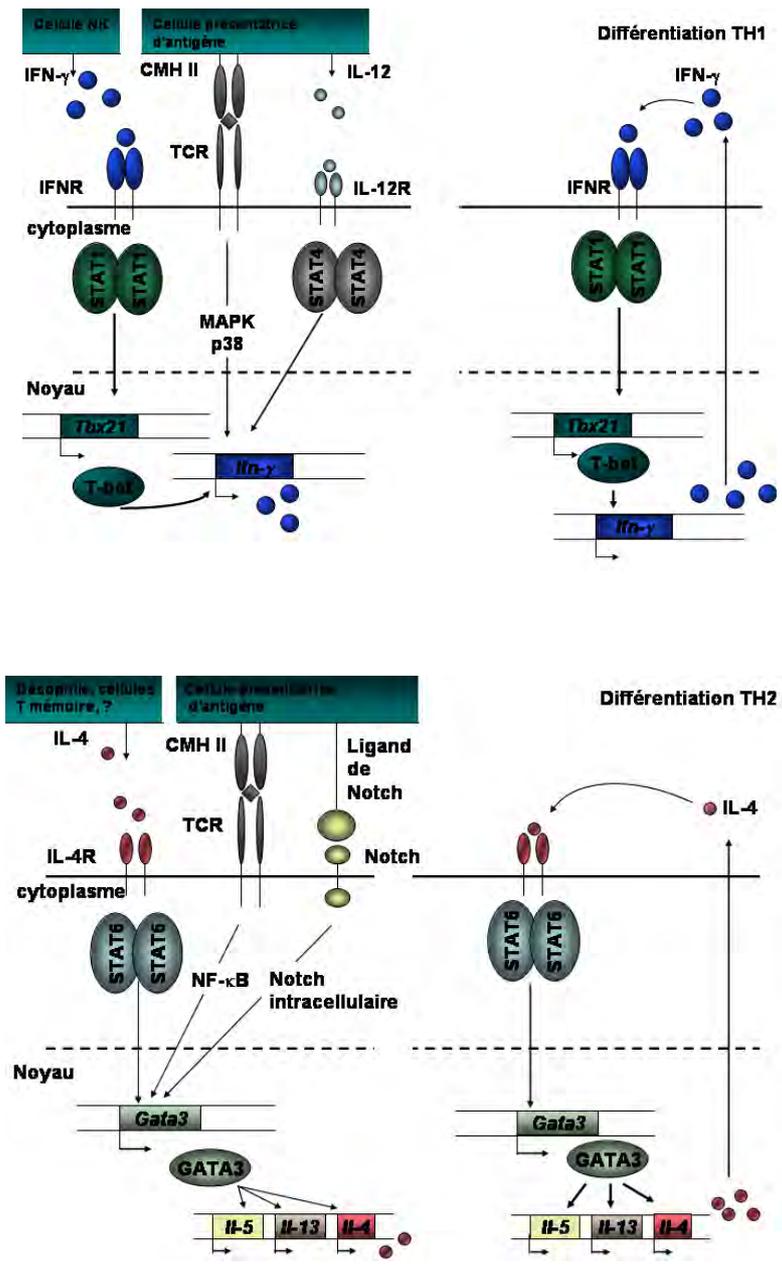


Figure 6: mécanismes impliqués dans la différenciation TH1 et TH2

- (A) L'activation d'un lymphocyte naïf en présence d'IL-12 induit la production d'IFN- γ . L'IFN- γ produit va agir de façon autocrine et de façon synergique avec l'IFN- γ produit par les cellules NK pour induire l'expression du facteur de transcription T-bet. T-bet induit un remodelage de la chromatine et la transcription du gène *IFNG* initiant ainsi une boucle d'auto-amplification de différenciation TH1
- (B) L'activation d'un lymphocyte naïf en l'absence d'IL-12 et en présence d'IL-4 induit l'expression du facteur de transcription GATA-3. GATA-3 induit un remodelage de la chromatine au niveau du locus des cytokines de type2 et inhibe l'expression du récepteur à l'IL-12. La production d'IL-4 joue un rôle amplificateur de la différenciation en induisant l'expression de GATA-3

2.2.3.4. Les lymphocytes T_{H17}

La découverte en 2000 grâce à des analyses bioinformatiques de la chaîne cytokinique p19 a permis d'expliquer un certain nombre d'observations à priori paradoxales (Oppmann et al., 2000). Cette sous-unité s'associe avec la chaîne p40 commune à l'IL-12 pour former la cytokine hétérodimérique IL-23. Cette mise en évidence a conduit à réévaluer les contributions relatives de l'IL-12 et de l'IL-23 dans le développement de l'EAE. En générant des souris déficientes pour la sous-unité p40 (absence d'IL-12 et d'IL-23), pour la sous-unité p35 (absence d'IL-12) et la sous-unité p19 (absence d'IL-23), Cua et ses collaborateurs ont montré de façon élégante que l'IL-23 était une cytokine majeure dans la physiopathologie de l'EAE (Cua et al., 2003). Deux années plus tard, le même groupe montrait que l'IL-23 permettait la génération de cellules T CD4 productrices d'un panel de cytokines bien distinct de celui observé dans les T_{H1} et les T_{H2} caractérisé par la production d'IL-17a, d'IL-17f, d'IL-6, d'IL-21 et d'IL-22 (Langrish et al., 2005). Ces travaux, très rapidement confirmés par des études indépendantes conduirent à baptiser cette nouvelle population les T_{H17} (Park et al., 2005) (Harrington et al., 2005). Cependant, le fait que les lymphocytes T CD4 naïfs n'expriment pas le récepteur à l'IL-23 indique que d'autres facteurs doivent contrôler les événements initiaux de la différenciation des cellules T_{H17} (Bettelli et al., 2006).

Initialement décrite dans des modèles d'auto-immunité, le rôle physiologique des cellules T_{H17} n'est pas encore complètement clarifié. La nature des cytokines produites suggère un rôle contre des pathogènes dont l'éradication est dépendante d'une forte réponse inflammatoire. Plusieurs bactéries aussi bien Gram-positives comme *Propionibacterium acnes* que Gram-négatives comme *Citrobacter rodentium* et *Klebsiella pneumoniae* peuvent générer de fortes réponses T_{H17} *in vivo* (Korn et al., 2009). L'IL-17 conduit les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales ainsi que les macrophages à produire de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, du TNF- α , des metalloprotéases et des chimiokines (Kolls and Linden, 2004) (Nakae et al., 2003).

Différenciation des cellules T_{H17}

Les mécanismes conduisant à la différenciation des cellules T naïves en cellules T_{H17} ont constitué un des champs de recherche prépondérant en immunologie ces dernières années. En 2006, trois études indépendantes ont montré que ce phénomène était sous la dépendance d'une combinaison entre deux cytokines a priori antagonistes: le TGF- β bien connu pour ses propriétés immuno-régulatrices et l'IL-6 qui possède de fortes capacités pro-inflammatoires

(Veldhoen et al., 2006) (Bettelli et al., 2006) Ces observations obtenues *in vitro* ont été confirmées dans des modèles expérimentaux *in vivo*. En effet, la surexpression du TGF- β dans des souris transgéniques pour ce gène conduit à une exacerbation de l'EAE associée à une forte génération de cellules T_{H17}. A l'opposé, une invalidation de ce gène spécifique au compartiment lymphocytaire T induit l'absence de développement de T_{H17} et la prévention de l'EAE. De même, les souris déficientes pour l'IL-6 résistent au développement de la maladie et ne génèrent pas la population pathogène. En présence d'IL-6 et de TGF- β , les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α sont induits Cette induction s'accompagne de l'expression de la cytokine IL-21 qui joue un rôle important dans l'amplification de la différenciation et de l'expression du récepteur à l'IL-23.

Après la controverse initiale sur le rôle de l'IL-23 dans la différenciation des T_{H17}, son rôle a aujourd'hui été précisé. Cette cytokine joue un rôle critique dans la différenciation terminale des T_{H17} (McGeachy et al., 2009) ainsi que dans la survie et le maintien de la fonctionnalité de ces cellules. Le processus de différenciation peut donc se résumer en trois étapes: (1) phase d'initiation de la différenciation initiée par l'IL-6 et le TGF- β (2) phase d'amplification *via* l'IL-21 (3) phase de stabilisation réalisée par l'IL-23. De façon importante, tous les médiateurs impliqués utilisent des récepteurs couplés au facteur de transcription STAT3.

2.2.3.5. Les lymphocytes T CD4 régulateurs

Survivre à une infection requiert la génération d'une réponse immune contrôlée, capable d'éliminer l'agent infectieux tout en limitant les dommages collatéraux causés à l'organisme par une inflammation exacerbée. Le système immunitaire doit aussi pouvoir supprimer les réponses immunitaires aberrantes ou excessives qui peuvent être délétères pour l'organisme, par exemples des réponses dirigées contre les composés du soi dans les maladies auto-immunes, contre un fœtus allogénique au cours d'une grossesse, contre des composés inoffensifs de l'environnement dans l'allergie ou encore contre la flore commensale dans certaines maladies inflammatoires. Le concept de lymphocytes suppresseurs capables d'effectuer l'ensemble de ces fonctions a été proposé dès le début des années 70 (Gershon and Kondo, 1970), mais la découverte de marqueurs moléculaires permettant l'identification de ces cellules et leur caractérisation comme un lignage spécifique n'a réellement débutée qu'au milieu des années 90. Un flot ininterrompu de publications (plus de 13.000 ces 10 dernières

années) ont permis des avancées considérables dans la compréhension de la biologie de ces cellules T régulatrices (Treg).

Aujourd'hui, plusieurs types de Treg ont été décrits sur la base de leurs origines et de leurs mécanismes d'action. Les deux sous-populations principales sont les cellules régulatrices dites naturelles (nTreg) qui sont générées dans le thymus et qui régulent les cellules T auto-réactives, et les cellules régulatrices induites (iTreg) qui sont générées en périphérie à partir de lymphocytes CD4⁺ naïfs. La découverte de l'expression du facteur de transcription Foxp3, décrit comme crucial dans le développement et la fonction des nTreg, dans les iTreg rend la frontière entre les deux sous populations plus subtile (Chen et al., 2003). Le rôle respectif des deux sous populations dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques chez l'homme et la souris n'a pas été établi.

Les mécanismes de suppression utilisés par les Treg pour limiter les réponses effectrices sont multiples et semblent différents suivant les modèles étudiés. Ceux-ci dépendent soit de contacts cellulaires soit de médiateurs solubles comme les cytokines immuno-régulatrices IL-10 et TGF- β . Les cellules régulatrices sont capables d'exercer leurs fonctions suppressives directement sur les cellules effectrices mais peuvent aussi moduler l'activation des cellules présentatrices d'antigène pour limiter l'activation et la différenciation des cellules effectrices. Les mécanismes fonctionnels des cellules régulatrices et leurs génération ont été décrit dans plusieurs revues en particulier l'excellent article de Vignali et al (Vignali et al., 2008) et ne seront pas abordés plus en détail ici.

2.2.4. Les lymphocytes T CD8

L'identification des sous-populations de lymphocytes T CD4 a naturellement conduit à rechercher de telles capacités de différenciation au sein du compartiment lymphocytaire CD8. Bien que généralement considéré comme une population relativement homogène capable de cytotoxicité et productrice d'IFN- γ , les lymphocytes CD8 peuvent, comme les cellules CD4, acquérir différentes propriétés en fonction de l'environnement cytokinique dans lequel va se passer leur différenciation. Ainsi en présence d'un mélange d'IL-2 et d'IL-4, les LT CD8 sont capables de produire des quantités importantes d'IL-4 (Seder et al., 1992). Rapidement, on baptisa Tc1 les cellules T CD8 productrices d'IFN- γ mais pas d'IL-4 ni d'IL-5 et Tc2 les cellules productrices d'IL-4 et 5 mais pas ou peu d'IFN- γ . La polarisation des lymphocytes T CD8 n'a pas été uniquement décrit *in vitro* mais également chez des patients atteints de maladies impliquant le système immunitaire comme l'asthme (Ying et al., 1997), la maladie

du greffon contre l'hôte (Betts and Kemeny, 2009) ou encore certaines formes de cancer (Ito et al., 2005). Très récemment une sous-population de cellules T CD8 productrices d'IL-17 a été mise en évidence et baptisée Tc17 (Kondo et al., 2009). L'hétérogénéité des populations CD4 effectrices est donc retrouvée dans les lymphocytes T CD8, néanmoins le rôle relatif de ces sous populations dans les réponses physiologiques et physiopathologiques et les facteurs moléculaires impliqués dans leur différenciation sont moins bien connus.

Enfin des cellules T CD8 régulatrices capables de contrôler les réponses CD4 effectrices ont été décrites dès le début des années 70 (Gershon and Kondo, 1970). L'absence de marqueur spécifique des cellules T CD8 régulatrices a compliqué l'étude de cette sous-population mais diverses expériences montrent de façon claire l'implication de lymphocytes T CD8 régulateurs dans l'inhibition des réponses T CD4. Par exemple, la déplétion du compartiment T CD8 réalisée chez la souris à l'aide d'anticorps augmente la fréquence des rechutes dans un modèle d'EAE. Dans ce cas, les cellules T CD8 régulatrices pourraient lyser les effecteurs T CD4 encéphalitogènes (Jiang et al., 1992). Dans le modèle de maladie induite par les sels d'or et dépendant d'une activation du compartiment CD4, la résistance du rat LEW peut être levée par la déplétion des cellules CD8 (Savignac et al., 2001). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action des CD8 régulateurs comme la lyse des cellules effectrices par un mécanisme de cytotoxicité dépendant des molécules perforines (Lu et al., 2008). La production cytokinique des LT CD8 pourrait être impliquée dans leur action suppressive. En effet des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- γ sont incapables de générer des LT CD8 régulateurs ce qui implique un rôle critique de cette cytokine dans la fonction et/ou la génération de ces cellules (Lu and Cantor, 2008). L'IL-10 a également été proposée comme candidate pour cette fonction (Endharti et al., 2005).

2.2.5. Conclusions

Après cette description de quelques acteurs majeurs du système immunitaire, nous pouvons voir la complexité du système biologique. Les cellules de l'immunité innée grâce à leur panoplie de récepteurs sont capables de contrôler les infections et d'initier les réponses adaptatives. Les lymphocytes avec une très grande plasticité vont se différencier en cellules effectrices pour contrer au mieux les agents infectieux. Au moment opportun, les cellules régulatrices vont pouvoir contrôler la réaction inflammatoire pour maintenir l'homéostasie de l'organisme. Dans les chapitres suivants nous verrons à travers l'exemple de *Toxoplasma gondii* comment un agent infectieux peut limiter et tirer avantage des réponses immunes

prévues pour l'éradiquer. Nous aborderons ensuite, avec les maladies allergiques, un exemple de désordre immuno-pathologique où, malgré les différents systèmes de régulation, le système immunitaire génère des réponses inadaptées qui deviennent nocives pour l'organisme.

3. Le système immunitaire face au parasite *Toxoplasma gondii*

3.1. *Toxoplasma gondii*, cycle biologique

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire du phylum des Apicomplexa. Il possède un cycle biologique hétéroxène. L'hôte définitif, chez qui se déroule la reproduction sexuée, est un félin, le chat en particulier. La multiplication asexuée intervient chez les hôtes intermédiaires qui regroupent l'ensemble des homéothermes, l'homme y compris (Figure 7).

Son cycle peut également se dérouler selon un mode coccidien monoxène classique. Les hôtes définitifs réalisent dans ce cas un cycle complet sans passage chez l'hôte intermédiaire.

Parmi les formes de différenciation parasitaire rencontrées au cours du cycle, trois sont infectieuses : elles peuvent ré-initier le cycle coccidien chez le félin ou le cycle asexué chez un autre homéotherme. Il s'agit :

- du tachyzoïte: forme fortement proliférative du parasite responsable de la toxoplasmose aiguë ;
- du bradyzoïte: retrouvé à l'intérieur du kyste tissulaire, forme latente présente en cas d'infection chronique ;
- du sporozoïte: issu de la reproduction sexuée, il est contenu dans l'oocyste, forme de résistance du parasite dans le milieu extérieur.

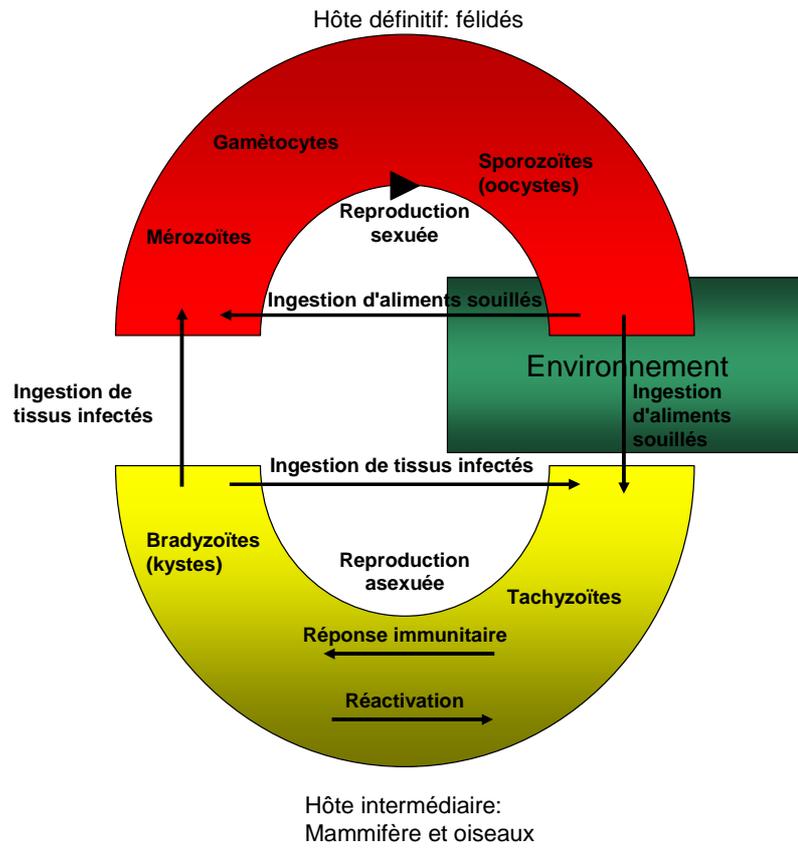
3.1.1. Cycle sexué

L'hôte définitif félin s'infecte le plus souvent en ingérant des kystes présents dans le cerveau ou les muscles de petits rongeurs. Il peut également se contaminer par l'absorption d'oocystes. Après digestion par des enzymes protéolytiques du tractus digestif de la paroi kystique ou de l'oocyste, les bradyzoïtes ou sporozoïtes libérés envahissent les cellules épithéliales de l'intestin et s'y multiplient activement par schizogonie (reproduction asexuée). Après plusieurs générations schizogoniques, les mérozoïtes produits se différencient, au cours de la gamétogénèse, en microgamètes mâles flagellés et macrogamètes femelles immobiles. Issus de la fécondation, les oocystes sont, après rupture de la cellule intestinale infestée, éliminés dans le milieu extérieur avec les fèces du chat. Ils subissent alors une phase de sporulation à l'issue de laquelle ils deviennent infectieux. Les oocystes sporulés contiennent

deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes. Ils sont extrêmement résistants aux agents physiques et chimiques. Ingérés par un chat, ils initient un nouveau cycle sexué. Par contre, chez les hôtes intermédiaires, ils sont à l'origine du cycle asexué.

3.1.2. Cycle asexué

Le cycle asexué se déroule chez les hôtes intermédiaires homéothermes. La contamination se fait par voie digestive, soit par ingestion de kystes contenus dans la viande parasitée mal cuite, soit par ingestion d'oocystes sporulés présents sur les aliments souillés. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes libérés après action des enzymes protéolytiques, pénètrent dans l'épithélium intestinal où ils se transforment en tachyzoïtes. Les tachyzoïtes vont se multiplier activement et entraîner la lyse des cellules parasitées. Libérés, ils peuvent infecter les cellules adjacentes, et notamment celles du système réticulo-histiocytaire, ce qui leur permettrait une dissémination rapide par voie lymphatique et sanguine vers les ganglions et le foie, et de là, à l'organisme entier. Cette phase de dissémination et de prolifération intense durant laquelle le parasite est observé dans le foie, les poumons, les tissus lymphoïdes, les muscles striés et le cerveau, constitue la phase aiguë de l'infection. Dans la plupart des cas, des défenses immunitaires spécifiques s'établissent et permettent le contrôle de cette infection. Les tachyzoïtes sont alors progressivement éliminés. Certains se différencient en bradyzoïtes, forme à multiplication lente, et s'enkystent au niveau des tissus tels que les muscles lisses et le cerveau (tissus pour lesquels la pression du système immunitaire est la moins forte). Cet enkystement correspond à la phase chronique de l'infection qui persiste de manière latente pendant toute la durée de vie de l'hôte. Ce cycle asexué peut également se dérouler chez le félin.



Cycle vital du parasite *Toxoplasma Gondii*

3.2. La Toxoplasmose

Toxoplasma gondii est l'agent infectieux responsable de la toxoplasmose capable d'affecter la majorité des animaux à sang chaud. Chez l'homme, la séroprévalence est estimée à environ 30% de la population mondiale et 40% de la population en France (Walker and Zunt, 2005). Généralement asymptomatique, l'infection aiguë passe souvent inaperçue. La toxoplasmose peut se révéler dangereuse en trois circonstances : (i) Au cours de la grossesse, le système immunitaire du fœtus étant immature, (ii) en cas de déficience du système immunitaire en particulier lors des traitements immunosuppresseurs effectués pour les transplantations et chez les patients atteints du SIDA, (iii) lorsque l'infection survient avec une souche hyper-virulente de *T.gondii*.

3.2.1. La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une primo-infection toxoplasmique acquise par la mère en cours de grossesse. Le fœtus est alors contaminé par voie transplacentaire et l'immaturation de son système immunitaire l'empêche de réagir contre le parasite. L'infection congénitale est d'autant plus grave que la contamination se produit tôt au cours de la grossesse. Elle peut être responsable de sévères complications cérébrales (calcifications intracrâniennes, hydrocéphalie), oculaires (chorio-rétinite, atrophie optique) ou viscérales (atteinte hépatique, ictère). Des enfants asymptomatiques à la naissance peuvent, en l'absence de traitement, avoir tardivement des complications neurosensorielles majeures (microcéphalie, retard mental, convulsions, chorioretinite avec cécité) (Koppe et al., 1986). Le nombre de cas de séroconversion au cours de la grossesse est estimé à environ 1500 cas par an en France (Wallon et al., 1999), la probabilité de passage transplacentaire du toxoplasme est variable: elle est d'environ 6% au 1^{er} trimestre pour atteindre 72% à 36 semaines d'aménorrhée (SA).

3.2.2. La toxoplasmose du sujet immunodéprimé

À la suite d'une primo-infection, le parasite s'enkyste sous forme dormante dans certains tissus ou organes comme les muscles striés ou le myocarde, mais aussi le cerveau. Une réactivation parasitaire à la faveur d'un déficit de l'immunité cellulaire, est à l'origine de la quasi-totalité des infections toxoplasmiques graves chez les patients atteints du SIDA et les patients traités par transplantation ou greffe de moelle osseuse. Cette réactivation correspond à une conversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes, consécutive à l'état d'immunodépression,

suivie d'une multiplication et d'une dissémination des tachyzoïtes dans l'organisme du patient.

Cas des malades atteints de SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise)

La toxoplasmose cérébrale est une des principales infections opportunistes et la première cause de dommages cérébraux chez les patients infectés par le virus du SIDA (Luft and Remington, 1992). Elle intervient principalement suite à une réactivation d'une infection latente et est généralement mortelle en l'absence de traitement. Environ un tiers des patients sidéens séropositifs pour *T.gondii* développe une toxoplasmose cérébrale en l'absence de traitement prophylactique.

Cas des malades transplantés et des greffés

Chez les patients greffés, la toxoplasmose peut survenir suite à une réactivation d'une infection latente ou suite à une primo infection si un organe contenant des kystes de *T.gondii* est transplanté chez un receveur séronégatif (Luft et al., 1983). Les risques les plus élevés de développer une toxoplasmose après transplantation se retrouvent chez les patients séronégatifs qui reçoivent des allogreffes cardiaques de donneurs séropositifs (Michaels et al., 1992). La transplantation de moelle osseuse est également associée à un très fort risque de réactivation de toxoplasmose pour le receveur. En effet, irradié avant la greffe, le receveur porteur latent de *T.Gondii* perd la capacité de répondre contre le parasite. Cette capacité n'est pas restaurée par le greffon qui ne contient pas les cellules immunocompétentes sensibilisées vis-à-vis du parasite (Gonzalez et al., 2000).

Les manifestations cliniques des toxoplasmoses cérébrales chez les patients infectés par le VIH et les patients transplantés sont sensiblement identiques et incluent des migraines, des déficits neurologiques, ainsi que des phénomènes d'ataxie et d'hémiplégie (Walker and Zunt, 2005).

3.3. Subversion de la réponse immunitaire innée par le parasite

Toxoplasma gondii est capable de survivre et de persister dans des hôtes intermédiaires immunocompétents tout au long de leur vie. Dès sa pénétration dans l'organisme, le parasite déclenche une réaction immunitaire innée qui vise à le supprimer, mais qu'il utilise pour s'établir et persister à l'état kystique dans l'organisme qui l'héberge. En fait, *T. gondii* a développé de multiples stratégies pour éviter et limiter la réponse antiparasitaire de l'hôte. Cette "évasion" est permise par des mécanismes qui modulent

l'expression et la sécrétion de cytokines immuno-modulatrices et qui interfèrent avec des cascades de signalisation afin d'abolir la mise en place de mécanismes effecteurs antimicrobiens.

Malgré cette capacité à interférer avec la réponse de l'hôte, celle-ci n'est pas complètement abrogée. *T. gondii* doit gérer une balance subtile entre induction et suppression de la réponse de l'hôte intermédiaire pour maintenir ce dernier en vie et établir un environnement favorable au développement parasitaire. Ces conditions sont nécessaires pour permettre *in fine* la transmission à l'hôte définitif. Les différentes réponses face au parasite décrites plus bas sont résumées dans la figure 8.

3.3.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le contrôle de l'infection par *T.gondii*

3.3.1.1. Rôle de l'épithélium intestinal

Suite à l'ingestion de kystes ou d'oocystes, les bradyzoïtes ou sporozoïtes infectent activement les entérocytes de l'épithélium intestinal. Les cellules infectées vont produire et sécréter un panel de chimiokines qui va permettre le recrutement de macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques puis ultérieurement de lymphocytes au site d'infection. Les chimiokines produites par les entérocytes sont principalement MCP-1, MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4) (Mennechet et al., 2002).

3.3.1.2. Rôle des neutrophiles

Suite à l'infection, un recrutement rapide de neutrophile est observé. Cet influx cellulaire est important puisque la déplétion des neutrophiles à des temps précoces de l'infection à l'aide d'un anticorps monoclonal limite la survie des animaux et la mise en place d'une immunité protectrice cellulaire de type T_{H1} (Bliss et al., 2001). D'autre part, des animaux déficients pour l'IL-17, la cytokine clé pour le recrutement des neutrophiles, sont plus susceptibles que des animaux contrôles malgré des réponses T et NK normales. Une augmentation d'un facteur 100 du nombre de parasites retrouvés dans la rate, le foie, l'intestin et le cerveau est observé dans les animaux IL17^{-/-} par rapport aux animaux contrôles. Cette observation est corrélée à une diminution drastique du nombre de neutrophiles et de polynucléaires au site d'infection (Kelly et al., 2005).

3.3.1.3. Rôle des macrophages

Les macrophages sont les cellules phagocytaires les plus importantes et jouent un rôle critique dans la limitation de la dissémination du parasite. Les macrophages infectés par *T.gondii* sont une source importante d'IL-12 qui agit sur les NK puis ultérieurement sur les lymphocytes T pour induire leur production d'IFN- γ permettant ainsi la mise en place d'une boucle d'amplification puisque l'IFN- γ est un acteur majeur de l'activation des fonctions effectrices des macrophages. D'autres cytokines produites par les macrophages comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α participent également à la boucle d'auto amplification des fonctions antimicrobiennes (Sibley et al., 1991) (Langermans et al., 1992).

Les macrophages activés par l'IFN- γ disposent d'un large éventail de moyens pour lutter contre le toxoplasme. Grâce à l'induction de la NO synthase inductible (iNOS), ils peuvent produire de fortes quantités de NO en utilisant le métabolisme de la L-arginine. Le NO peut tuer directement les tachyzoïtes par l'inhibition d'enzymes mitochondriales et nucléaires (Brunet, 2001) et l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme iNOS (l'aminoguanidine) chez la souris augmente la prolifération initiale du parasite et limite l'inflammation (Khan et al., 1997). La production de NO est un signal important pour que le parasite passe du stade tachyzoïte au stade bradyzoïte. L'activation des macrophages par l'IFN- γ induit également l'expression d'une autre enzyme, l'indolamine 2-3 dioxygénase. Cette enzyme dégrade le tryptophane intracellulaire, privant ainsi le toxoplasme de cet acide aminé pour lequel il est auxotrophe, ce mécanisme entraîne un arrêt de la réplication du parasite (Daubener and MacKenzie, 1999). La réaction oxydative induite par la phagocytose génère des radicaux oxygénés délétères pour le parasite (Murray et al., 1985). Les parasites peuvent cependant échapper à ce mécanisme puisqu'ils possèdent une superoxyde dismutase, et une catalase capables de dégrader certains dérivés de l'oxygène.

Un autre mécanisme important par lequel les macrophages sont capables de dégrader le toxoplasme est le processus d'autophagie qui cible la membrane de la vacuole parasitophore (VP). Formée lors de l'invasion de la cellule hôte, cette membrane est normalement incapable de fusionner avec les lysosomes protégeant ainsi les toxoplasmes de la voie de dégradation classique des macrophages (Mordue et al., 1999). Deux études récentes ont montré que la VP pouvait être ciblée et dégradée par des macrophages activés (Ling et al., 2006) (Andrade et al., 2006). Dans les travaux réalisés par Ling et ses collaborateurs, le mécanisme décrit est dépendant des GTPases p47 induites par l'IFN- γ . Il existe 6 protéines de cette famille, mais seul IGTP et LRG-47 sont impliqués dans la résistance à l'infection par *T.gondii*. Les souris déficientes pour ces deux protéines meurent d'une infection aigüe de façon similaire aux

animaux déficients pour l'IFN- γ (Butcher et al., 2005). Les observations réalisées *in vitro* montrent que les macrophages sont capables de dégrader la membrane de la VP, le parasite dénudé se retrouve prisonnier dans un autophagosome qui peut ensuite fusionner avec les lysosomes pour assurer la dégradation complète du parasite. Les travaux du groupe d'Andrade ont permis l'identification d'un autre mécanisme, conduisant également à la dégradation des VP et à l'élimination du parasite, indépendant des GTPases induites par l'IFN- γ mais dépendant de la signalisation en aval de la molécule CD40 exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques. Le ligand de CD40 (CD154) est exprimé par les lymphocytes T CD4+ activés et l'interaction CD40/CD154 joue un rôle important dans l'augmentation des fonctions antimicrobiennes des cellules de l'immunité innée.

3.3.1.4. Rôle des cellules dendritiques

L'activation et la maturation des cellules dendritiques (DC) en réponse à une infection jouent un rôle critique dans le développement d'une réponse adaptative. Classiquement, la maturation est décrite comme l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et des molécules de co-stimulation qui permettent la prolifération des cellules T naïves alors que l'activation correspond à la production de cytokines qui orientent la différenciation des cellules T (Kobayashi et al., 2003). En réponse à différents signaux et en particulier l'activation des TLR, les DC migrent du site d'infection vers les organes lymphoïdes secondaires où elles sont responsables de l'activation et de la polarisation des cellules T naïves. Dans le cadre de l'infection toxoplasmique, les DC sont probablement la source majeure d'IL-12 et sont vitales pour le contrôle de l'infection *in vivo* (Scott and Hunter, 2002). La déplétion des DC supprime la production d'IL-12 et augmente la susceptibilité des souris à l'infection aiguë, et le transfert de DC dans un animal préalablement déplété améliore la survie et restaure la production d'IL-12 et d'IFN- γ (Liu et al., 2006). Le récepteur aux chimiokines CCR5 a été impliqué dans le recrutement des DC et leur production d'IL-12 lors de l'infection par *T.gondii*, les ligands de CCR5 sont les chimiokines CCL3, 4 et 5 produites par les neutrophiles. Les animaux déficients pour CCR5 ont une production d'IL-12 réduite par rapport aux animaux contrôles et présentent un nombre élevé de kystes dans le cerveau (Aliberti et al., 2002).

3.3.1.5. Rôle des PRR dans les réponses innées anti-toxoplasme

Il a été proposé que les TLR jouent un rôle important dans la réponse innée anti-toxoplasme, en effet, les souris déficientes pour MyD88 l'adaptateur principal permettant la

signalisation de ces récepteurs montrent une grande susceptibilité à l'infection par une souche de toxoplasme normalement avirulente (Scanga et al., 2002). Ces souris présentent une parasitémie élevée et une forte diminution de la production d'IL-12 par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Plusieurs TLR sont probablement impliqués dans la réponse puisque l'analyse de souris déficientes pour un seul TLR (TLR1^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR6^{-/-}, TLR9^{-/-} et TLR11^{-/-}) ne montre qu'une augmentation modeste de la susceptibilité par rapport aux animaux contrôles (Miller et al., 2009). Les seuls autres récepteurs couplés à MyD88 sont les récepteurs à l'IL-1 et l'IL-18 mais aucune de ces deux cytokines ne semble exercer un rôle critique dans le contrôle de l'infection (Vossenkamper et al., 2004) (Hitziger et al., 2005). Différents PAMP de *T.gondii* doivent donc activer plusieurs TLR. Plusieurs molécules de parasite ont été décrites comme des ligands des TLR: (1) la profiline, qui est impliquée dans la mobilité du parasite et dans l'invasion cellulaire, active le TLR11 chez la souris (Yarovinsky et al., 2005); (2) des protéines avec des ancras glycosylphosphatidylinositol (GPI) localisées à la surface du parasite ont été récemment décrites comme activatrices des TLR2 et 4 (Debierre-Grockiego et al., 2007); (3) la protéine de *T.gondii* de choc thermique HSP70 (TgHSP70) active la voie de NF- κ B d'une façon dépendante des TLR2 et 4 (Aosai et al., 2002).

Pour l'heure aucun rôle pour les gènes NLR n'a été documenté dans le cadre de l'infection par *T.gondii*.

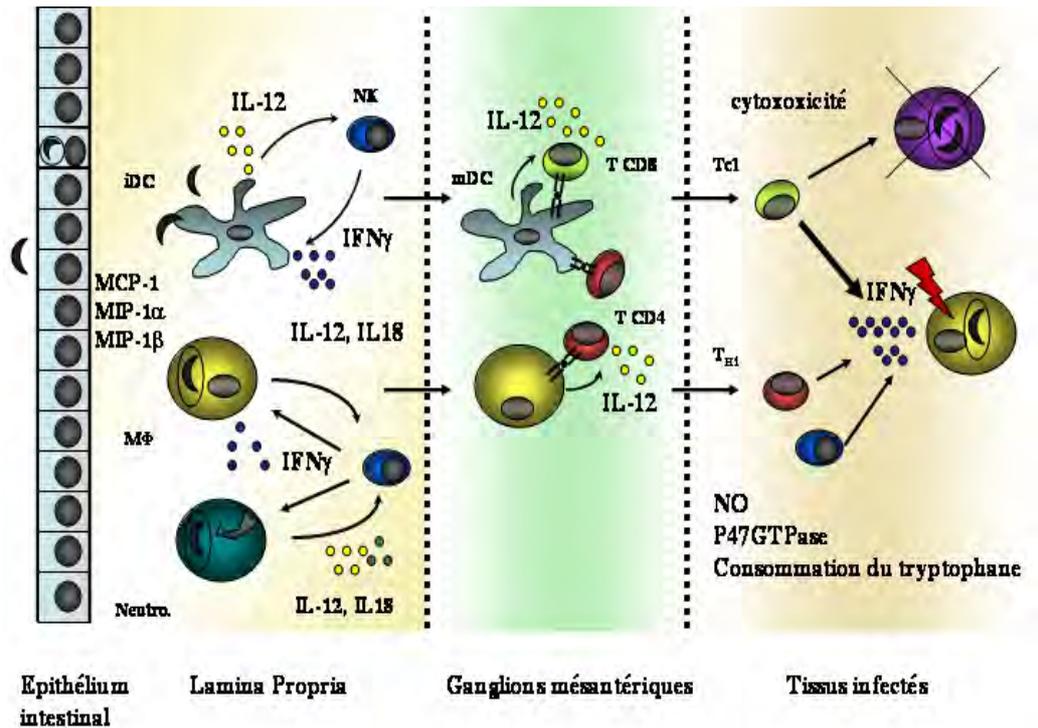


Figure 8: réponse immune lors de la phase aiguë de l'infection toxoplasmique

Suite à l'ingestion de kystes, les bradizoïtes sont relargués dans l'intestin. Après conversion à l'état tachyzoïte, les parasites gagnent l'épithélium et infectent les entérocytes. Les entérocytes infectés produisent des chimiokines et des cytokines qui attirent les neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques. Les neutrophiles et macrophages sont capables de phagocyter le parasite et de produire des cytokines comme l'IL-12 et l'IL-18 qui stimulent les cellules NK pour produire de l'IFN- γ et des chimiokines qui permettent le recrutement de cellules T. Les cellules dendritiques sont la majeure source d'IL-12 et jouent un rôle critique dans la présentation antigénique aux cellules T et dans l'induction de la différenciation T_{H1}. Les macrophages sont les cellules phagocytaires les plus importantes et sont cruciales pour limiter la dissémination du parasite. L'IFN- γ produit par les cellules NK, les lymphocytes CD4 T_{H1} et CD8 Tc1 active les fonctions microbicides des macrophages.

3.3.2. Modulation de la réponse innée par le toxoplasme

3.3.2.1. Production de cytokines anti-inflammatoires au cours de la réponse anti toxoplasme

Différentes cytokines anti-inflammatoires sont induites au cours de l'infection par le toxoplasme. Ces réponses sont nécessaires pour l'hôte afin de se prémunir contre une réponse inflammatoire exacerbée mais sont également utilisées par le parasite pour favoriser sa prolifération. L'IL-10 produite lors de l'infection va limiter la réponse des macrophages infectés et induire une diminution de la production d'IFN- γ et de TNF- α ainsi qu'une réduction de la production de NO permettant ainsi la survie du parasite (Gazzinelli et al., 1992). Malgré son rôle favorisant le développement du toxoplasme l'IL-10 est cruciale pour l'hôte puisque son absence dans des souris IL10^{-/-} se traduit par la mort des animaux lors de la phase aiguë de la maladie associée à une réponse T_{H1} massive. La déplétion des populations T CD4 dans ce modèle à l'aide d'un anticorps monoclonal protège les animaux (Gazzinelli et al., 1996). Le TGF- β joue un rôle similaire, il est produit par les lymphocytes de l'épithélium intestinal suite à l'infection par voie orale et permet de limiter la pathologie intestinale (Mennechet et al., 2004). D'autre part, il induit une désactivation des macrophages et limite leur production de TNF- α (Bermudez et al., 1993) et diminue également la production d'IFN- γ par les cellules NK (Hunter et al., 1995). Son rôle potentiel dans la génération de cellules T régulatrices n'a pas été étudié.

3.3.2.2. Induction de mécanismes immuno-régulateurs par *T.gondii*

Différents mécanismes sont utilisés par le toxoplasme pour s'assurer un environnement favorable et lui permettre de gagner ses organes cibles avant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative qui pourrait le détruire. Parmi ceux-ci, *T. gondii* est capable d'induire la production de médiateurs anti-inflammatoires puissants. Le groupe d'Alan Sher a montré que l'infection par *T.gondii* induisait *in vivo* la production de lipoxine A₄ (LXA₄), un métabolite issu de l'acide arachidonique (Aliberti et al., 2002). Les lipoxines possèdent de nombreuses propriétés anti-inflammatoires, elles sont produites grâce à l'action des enzymes lipoxigénases (5-LO et 15-LO) et exercent leurs effets en se fixant sur plusieurs récepteurs couplés à des protéines G parmi lequel FPRL-1. Au cours de l'infection par le toxoplasme, les concentrations sériques de LXA₄ augmentent progressivement tout comme l'expression de la 5-LO dans les macrophages spléniques. En analysant l'effet de l'infection sur des souris déficientes pour la 5-LO, il a été montré que la production de LXA₄ était responsable d'une

inhibition de la production d'IL-12, d'IFN- γ et de TNF- α . L'induction de lipoxines par *T.gondii* est une stratégie bénéfique à la fois pour le pathogène et pour l'hôte, en effet, les souris déficientes pour la 5-LO meurent rapidement après l'infection et présentent une encéphalite incontrôlée avec un recrutement massif de leucocytes dans le cerveau. Les mécanismes par lesquels *T.gondii* induit l'expression de la 5-LO par les macrophages et la production de LXA₄ ne sont pour l'heure pas connus. Il a également été montré que, bien que dépourvu des lipides qui constituent les substrats des lipoxygénases, *T.gondii* possède une activité 15-LO (Bannenberg et al., 2004). Cette observation suggère que le parasite participe activement à la synthèse des LXA₄ pour se prémunir d'une trop forte réponse inflammatoire.

3.3.2.3. Modulation de la voie NF- κ B et de la voie des MAPKinase par *T.gondii*

Plusieurs études montrent que *T.gondii* est capable d'interférer avec des voies de signalisation importantes dans la production des cytokines pro-inflammatoires, en particulier la voie de NF- κ B et celle des MAP kinases. Suite à l'infection, le traitement des cellules par du LPS se révélait inefficace pour induire la sécrétion d'IL-12 et de TNF- α du fait de la séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme. (Butcher et al., 2001). Après cette découverte initiale, le même groupe montrait que l'effet observé était dépendant de l'invasion active et de la survie du toxoplasme dans la vacuole parasitophore. En effet, des antigènes solubles de tachyzoïtes comme des parasites inactivés par la chaleur et opsonisés par des anticorps se sont révélés inefficaces pour inhiber la réponse au LPS. De plus le traitement par la pyriméthamine et le 6-thioxantine qui sont toxiques pour *T.gondii* restaure la réponse au LPS (Butcher and Denkers, 2002). Le groupe d'Eric Denkers a mis en évidence qu'après infection par une souche virulente de toxoplasme (souche RH) et malgré la phosphorylation et la dégradation d'I κ B, NF- κ B n'était pas transloqué dans le noyau. Le mécanisme utilisé par le toxoplasme ne passe pas par l'inhibition d'IKK ni par un blocage généralisé de l'import nucléaire mais affecte la phosphorylation des dimères p65/RelA, un événement nécessaire pour la translocation nucléaire et la fixation du facteur sur ses séquences cibles (Shapira et al., 2005). La protéine du toxoplasme HSP70 (tgHSP70) a été proposée comme candidat pour expliquer l'effet observé sur l'import nucléaire de NF- κ B. En utilisant un système d'oligonucléotides antisens ciblant le gène HSP70, il a été montré que les parasites modifiés avaient une capacité infectieuse diminuée et induisaient une réponse cellulaire augmentée avec une forte production de NO et une bonne translocation de NF- κ B (Dobbin et al., 2002). Les effets observés étaient

dans ce cas spécifiques des souches virulentes et la modification de l'expression de tgHSP70 n'avait pas d'impact sur les capacités prolifératives et inflammatoires des souches avirulentes.

La voie des MAP kinase qui permet l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 suite à l'engagement des TLR est également activement « piratée » par le toxoplasme. Suite à l'infection de macrophages de souris, les protéines p38 et c-Jun sont rapidement phosphorylées. Cette étape est rapidement suivie par leur désactivation. Suite à un traitement ultérieur des cellules par du LPS, l'activation des MAPK et en particulier de p38 est sévèrement diminuée (Kim et al., 2004b).

En conclusion, en perturbant la voie de NF- κ B et des MAPK, *T.gondii* est capable de limiter les réponses inflammatoires et en particulier la production d'IL-12 et de TNF- α .

3.3.2.4. Modulation de la voie STAT3 par *T.gondii*.

L'IL-10 exerce son effet immunosuppresseur via son récepteur et l'activation de la molécule STAT3 qui permet (1) l'inhibition de gènes inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α et (2) l'expression de gènes codant pour des molécules anti-inflammatoires comme la protéine SOCS1 qui est un régulateur négatif de la signalisation en aval du récepteur à l'IFN- γ (Williams et al., 2004). La modulation de l'activité de STAT3 est donc une cible de choix pour *T.gondii*. Suite à l'invasion cellulaire, STAT3 est phosphorylée en quelques minutes et ce indépendamment de l'IL-10 puisque le phénomène est relevé dans des macrophages de souris IL-10^{-/-} (Butcher et al., 2005). Comme pour l'effet observé sur NF- κ B et sur la voie des MAPK, la phosphorylation est dépendante de la viabilité des parasites et n'est donc pas observé après traitement des macrophages par des antigènes de tachyzoïtes solubles ou par des parasites inactivés par la chaleur.

3.3.2.5. Modulation de la réponse à l'IFN- γ par *T.gondii*

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des mécanismes anti-toxoplasme comme l'activation des GTPase de la famille p47 ou l'induction de la iNOS sont sous la dépendance de l'IFN- γ . Cette cytokine a été décrite comme pouvant réguler l'expression de plus de 200 gènes (Boehm et al., 1997). Parmi ceux-ci, l'IFN- γ induit l'expression des molécules de CMH de classe II comme de classe I par les CPA et joue donc un rôle majeur dans l'initiation des réponses adaptatives. Dans le cadre de l'infection par *T.gondii*, les réponses CD4 et CD8 sont puissantes et efficaces, il est donc crucial pour le parasite de pouvoir retarder leur mise en place pour avoir le temps de se disséminer dans l'organisme.

Plusieurs études montrent que le toxoplasme est capable d'inhiber l'expression membranaire des molécules CMH II et I induite par l'IFN- γ (Luder et al., 1998) (Luder et al., 2001) et la synthèse *de novo* de molécules de CMH II. Cet effet a été observé dans sur des macrophages péritonéaux de souris mais également sur différentes lignées cellulaires de souris, de rat et d'homme, montrant que l'inhibition de l'expression des molécules de classe II est un phénomène général, indépendant de l'espèce hôte, ce qui suggère un rôle important dans la stratégie infectieuse de *T.gondii*. Plus récemment, ces observations ont été confirmées sur des cellules dendritiques immatures et il a été montré que ce mécanisme était induit uniquement par un parasite vivant (McKee et al., 2004). Les cellules dendritiques sont reconnues comme les meilleures activatrices des lymphocytes naïfs.

L'IFN- γ agit via son récepteur (IFNR) qui active la voie JAK/STAT et en particulier STAT1, cependant, ni l'expression de l'IFNR ni de STAT1 ne sont affectées par l'infection (Luder et al., 2001). La phosphorylation de STAT1 et son import nucléaire apparaissent également normaux (Lang et al., 2006). Néanmoins, l'expression des gènes de réponse à l'IFN- γ IRF-1 et CIITA est réduite dans des macrophages murins infectés, ce qui suggèrent que le toxoplasme pourrait interférer avec la fixation de STAT1 sur ses séquences cibles (Lang et al., 2006). Les mécanismes exacts d'inhibition de la réponse à l'IFN- γ par *T.gondii* restent toutefois encore à préciser.

3.3.2.6. Utilisation de la mobilité cellulaire et de la migration par *T.gondii*

Lors d'une infection orale, le toxoplasme traverse et infecte l'épithélium intestinal avant de se disséminer dans différents organes et en particulier le cerveau. Les mécanismes utilisés par le parasite pour coloniser l'organisme sont restés longtemps mal compris. Une étude récente du groupe d'Isabelle Tardieux a apporté un éclairage important sur la façon dont *T.gondii* utilise le système immunitaire afin de se propager chez son hôte. Suite à l'infection de l'épithélium intestinal et la production de chimiokines par les entérocytes, des cellules dendritiques (positives pour le marqueur CD11c) et des monocytes/macrophages (positifs pour le marqueur CD11b) sont recrutés *in situ* puis sont capables de migrer dans les organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes T. Plutôt que de transiter à l'état extracellulaire, il a été montré que *T.gondii* utilise les capacités migratoires de ces cellules pour disséminer dans un premier temps dans les nœuds lymphatiques mésentériques puis dans la circulation sanguine, pour enfin gagner le cerveau et les muscles striés où il va s'enkyster. Les cellules CD11b⁺ et CD11c⁺ infectées. Par un mécanisme encore inconnu, le franchissement de la

barrière hémato-encéphalique est facilitée pour les cellules CD11b+ parasitées (Courret et al., 2006). Des travaux réalisés *in vitro* montrent que l'infection de cellules dendritiques murines ou humaines par *T.gondii* induit un état d'hyper-mobilité et augmente leurs capacités à migrer à travers une monocouche de cellules endothéliales et à travers des matrices extracellulaires. Le traitement des DC par la toxine pertussique (PTX) qui inhibe le fonctionnement des protéines Gi bloque l'effet pro-migratoire du toxoplasme suggérant que ce mécanisme est dépendant de cette sous famille des protéines G (Lambert et al., 2006).

3.3.2.7. Modification des réponses de l'hôte par le toxoplasme: rôle des protéines des rophries

Des avancées majeures ont été récemment réalisées dans la compréhension des mécanismes utilisés par le toxoplasme pour modifier les réponses cellulaires de l'hôte en utilisant des approches génétiques.

Trois types de souches de toxoplasmes ont été établis en se fondant sur des différences de virulence chez la souris. Malgré une homologie génétique de 99% entre les trois souches, les parasites de types I sont hyper-virulents et les souris infectées meurent au cours de l'infection aiguë alors que les parasites de type II et de type III établissent une infection chronique. Ces deux derniers se différencient par des variations de virulence en fonction des souches de souris hôtes (Laliberte and Carruthers, 2008). Les événements méiotiques qui s'accomplissent lors de la phase sexuée du parasite permettent, en cas de co-infection du chat par différentes souches, de générer une population de parasites F1 hétérogène grâce à des phénomènes de recombinaison. L'identification de marqueurs génétiques sur le génome de *T.gondii* a permis de mettre en œuvre des études de liaison et d'identifier cinq QTL associés à la virulence des populations F1 (*VIR1,2,3,4,5*) (Sibley et al., 1992) (Saeij et al., 2006). Après avoir établi des profils de gènes candidats en se basant sur les fonctions prédites des protéines, le degré de polymorphismes entre les souches et le niveau d'expression génique, deux gènes codant pour des protéines localisées dans les rophries furent identifiés, *Rop16* et *Rop18* (Saeij et al., 2006) (Taylor et al., 2006). Les rophries sont des organelles spécifiques des apicomplexa, leur conservation dans l'ensemble du phylum suggère un rôle important dans la stratégie parasitaire de ces pathogènes.

Les quelques protéines des rophries connues se répartissent en deux familles, les protéines RON qui jouent un rôle majeur dans le processus d'invasion et dans la formation de la vacuole parasitophore et les protéines ROP qui interfèrent avec le fonctionnement de la

cellule hôte. Lors de la phase d'invasion cellulaire, le contenu de ces organelles est libéré par des mécanismes encore mal connus et les protéines ROP peuvent atteindre trois destinations différentes: la lumière de la vacuole parasitophore, la membrane de la vacuole parasitophore ou encore l'intérieur de la cellule hôte et plus particulièrement le noyau (Boothroyd and Dubremetz, 2008).

La protéine ROP18 possède une activité sérine/thréonine kinase et cette activité est responsable de l'effet de la protéine sur la virulence (El Hajj et al., 2007). ROP18 est localisée dans la membrane de la vacuole parasitophore et son niveau d'expression entre différentes souches est directement responsable de leurs différences de pathogénicité. Les études réalisées *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence de phosphorylation de protéines de la cellule hôte par ROP18 et il est possible que l'effet de cette dernière soit indirect (El Hajj et al., 2007).

La protéine ROP16 possède également un domaine sérine/thréonine kinase, elle est extrêmement polymorphe entre les différentes souches de toxoplasme. Après l'invasion cellulaire et la formation de la VP, ROP16 est exportée en quelques minutes dans le noyau. Elle agit sur la durée de la phosphorylation des facteurs de transcription STAT3 et STAT6 (Saeij et al., 2006). Le maintien au long terme de la phosphorylation de STAT3 et STAT6 est inversement corrélé à la capacité des parasites à induire la production d'IL-12 par les cellules infectées. L'import nucléaire de ROP16 est dépendant d'une NLS (séquence de localisation nucléaire) mais n'est pas une condition indispensable pour l'effet sur les protéines STAT, suggérant que la protéine possède d'autres fonctions non encore décrites.

Si seul ROP16 et ROP18 ont été pour l'heure formellement identifiées, certains arguments suggèrent que d'autres protéines des rophtries participent à la modulation de la réponse de la cellule hôte. La protéine PP2C-hn contient comme ROP16 une NLS permettant son import nucléaire dans la cellule infectée, elle possède un domaine phosphatase 2C (Gilbert et al., 2007). De façon intéressante, il a été montré par des analyses de séquences que plusieurs protéines de rophtrie possèdent un domaine kinase dégénéré (El Hajj et al., 2006). Ces «pseudo-kinases» pourraient jouer un rôle régulateur d'enzymes fonctionnelles par des mécanismes de séquestration des substrats. De tels phénomènes ont déjà été décrits dans des cascades de signalisation (Pils and Schultz, 2004).

3.4. Facteurs d'hôte contrôlant la susceptibilité à la toxoplasmose

Les études réalisées pour comprendre les bases génétiques de la susceptibilité à la toxoplasmose ont été principalement réalisées chez la souris. A la fin des années 80, le groupe de McLeod identifiait, à partir de l'analyse d'une population F2, 5 locus contrôlant la susceptibilité à la phase aiguë de la maladie montrant ainsi le caractère polygénique du phénomène de résistance. Parmi ceux-ci, l'identification du rôle du locus contenant les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité H-2 soulignait le rôle du système immunitaire (McLeod et al., 1989).

Toujours dans le modèle murin, des études ont montré que le fond génétique de l'hôte influe sur le nombre de kystes en phase chronique d'infection. Des études successives utilisant des souris consanguines, congéniques, mutantes et enfin transgéniques ont montré que le nombre de kystes intracérébraux est contrôlé par le gène L^d du CMH de classe I, avec une légère influence du gène *Nramp* (McLeod et al., 1995). Plus récemment, il a été montré que la résistance à l'encéphalite toxoplasmique, restreinte par le gène L^d du CMHI varie selon la souche parasitaire inoculée. Les souris porteuses de ce gène sont résistantes aux souches de type II, mais pas aux souches de type I. Ceci suggère qu'un peptide présent chez les souches de type II, mais absent chez les souches de type I, interagit avec le produit du gène L^d (Johnson et al., 2002) et montre le rôle critique du compartiment lymphocytaire CD8 dans le contrôle de la maladie.

Chez l'Homme, de tels facteurs génétiques de résistance à la toxoplasmose n'ont été que très partiellement identifiés. Il semble que certains gènes du CMH soient impliqués dans la résistance à la toxoplasmose acquise et congénitale. Chez les patients atteints du SIDA, Suzuki et ses collaborateurs ont identifié l'allèle HLA-DQ3 comme marqueur de susceptibilité à l'encéphalite toxoplasmique, alors que HLA-DQ1 serait un marqueur de résistance (Suzuki et al., 1996). Les allèles HLA-DQ auraient également des effets sur l'issue de la toxoplasmose congénitale, DQ3 étant souvent associé à une hydrocéphalie (Mack et al., 1999).

Enfin, notre groupe a décrit récemment l'identification d'un locus baptisé *Toxo1* qui gouverne la susceptibilité du rat à la toxoplasmose. Alors que dans le modèle souris, le caractère résistant correspond à la survie des animaux à la phase aiguë de la maladie, nous avons montré que le rat LEW est réfractaire au parasite et qu'il est capable de l'éliminer avant que la dissémination s'accomplisse, cette caractéristique unique est contrôlée par le chromosome 10 du rat. Ce modèle sera décrit en détail dans la dernière partie de l'introduction.

La complexité des facteurs génétiques impliqués reflète la diversité biologique sous-jacente du parasite et la complexité des mécanismes immunitaires impliqués dans la résistance. L'identification des gènes et des mécanismes moléculaires contrôlant le devenir de l'infection est une étape critique dans la perspective de développement de nouvelles approches thérapeutiques.

4. Le système immunitaire dans l'atopie et les maladies allergiques

4.1. Généralités

L'atopie est définie comme la prédisposition génétique au développement de réponses liées aux immunoglobulines E (IgE) (Johansson et al., 2001). C'est sur ce terrain qu'apparaissent, sous l'effet de facteurs d'environnement, l'asthme allergique, la dermatite atopique (DA, eczéma infantile) et la rhinite allergique (rhume des foins) qui sont les trois facettes d'un même syndrome : les maladies atopiques ou allergiques. Les personnes atopiques sont ainsi caractérisées par des taux sériques élevés d'IgE, à la fois totales et spécifiques d'allergènes. La prévalence des maladies allergiques a augmenté de façon spectaculaire dans le monde occidental depuis les années 1960 conduisant certains auteurs à utiliser le terme d'état épidémique. Aujourd'hui, plus de 10% des enfants des pays « du nord » sont atteints d'asthme et près de 15% souffrent de DA dans certains pays (Cookson, 2004). Il est aujourd'hui admis que le mode de vie occidental et la société de consommation sont reliés à l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques poussant de nombreux groupes à chercher à identifier les facteurs environnementaux responsables de ces effets. Parmi ceux-ci, l'alimentation et la sédentarisation ainsi que l'hygiène et la pollution qui caractérisent notre société font figure de candidats majeurs (Devereux, 2006).

Le développement des maladies allergiques repose sur un fort déterminisme génétique. La première étude visant à identifier les locus et les gènes responsables de l'atopie a été réalisée à la fin des années 80 (Cookson et al., 1989), depuis un grand nombre de travaux ont permis de mettre en évidence le caractère complexe de l'état atopique avec l'identification de plusieurs locus et voies physiopathologiques impliqués. Enfin, il faut noter que si certaines études estiment à 30% la proportion de la population présentant un caractère atopique, tous ne vont pas développer de maladies allergiques (Pearce et al., 1999), ce qui suggère que les forts taux d'IgE sont plus un facteur de risque important qu'un agent causal. Ces dernières années plusieurs travaux ont montré un rôle critique des épithéliums et de leur fonction de barrière dans le développement des symptômes allergiques (Vercelli, 2008).

Les maladies atopiques ou allergiques répondent donc parfaitement à la définition des pathologies multifactorielles, résultantes d'interactions multiples entre différents facteurs environnementaux et de nombreux gènes.

4.2. Développement de l'atopie : production des IgE

Les IgE sont les médiateurs majeurs des mécanismes qui s'effectuent pendant la phase initiale des maladies allergiques. Ces immunoglobulines se lient aux mastocytes présents dans la peau et les muqueuses grâce aux récepteurs Fc à haute affinité (FcεRI). La pénétration d'allergènes spécifiques des IgE à travers les surfaces épithéliales induit le pontage des récepteurs FcεRI. Ce phénomène peut se dérouler dans les différents organes cibles de l'allergie : les poumons (asthme allergique), la peau (dermatite atopique), ou le nez (rhinite) et induit en quelques minutes la dégranulation des mastocytes et la synthèse de médiateurs lipidiques. Cette réaction d'hypersensibilité de type I correspond à la phase précoce de la réaction allergique (Turner and Kinet, 1999). Les cytokines et les chimiokines produites lors de la phase précoce vont être responsables de l'initiation de la phase tardive en permettant le recrutement et l'activation d'autres cellules parmi lesquelles des éosinophiles et des lymphocytes T_{H2} qui constituent les infiltrats inflammatoires allergiques.

L'étude des mécanismes cellulaires et humoraux régulant la production d'IgE a donc un intérêt majeur dans la compréhension des voies physiopathologiques impliquées dans l'étiologie des maladies allergiques.

4.2.1. Commutation isotypique des IgM vers les IgE

Initialement, tous les lymphocytes B produisent des anticorps de type IgM. Les éléments V, D et J qui codent pour la partie variable de la chaîne lourde des immunoglobulines sont localisés de façon adjacente aux exons C_μ qui codent pour la partie constante des IgM. Dans des conditions appropriées, les LB peuvent modifier les isotypes des anticorps qu'ils produisent tout en maintenant leur spécificité antigénique. Dans ce mécanisme appelé commutation isotypique, des segments d'ADN génomique sont coupés, permettant la juxtaposition des éléments VDJ aux exons C_γ, ε et α qui codent respectivement les domaines constants des isotypes IgG, E et A

Dans le cas des IgE, deux signaux sont nécessaires, le premier est fourni par des cytokines (IL-4 et IL-13); le second dépend de l'activation de la molécule CD40 sur les lymphocytes B (Vercelli et al., 1989). L'IL-4 ou IL-13 induisent après interaction avec leur récepteur sur les lymphocytes B l'activation des tyrosines kinases JAK1 et JAK3 de la famille des Janus Kinases, ce qui conduit à la phosphorylation de STAT6, un régulateur de la transcription. Les souris déficientes en IL-4, IL-13 ou STAT6 sont incapables de développer des réponses T_{H2} et de réaliser la commutation isotypique (McKenzie et al., 1999), ce qui

démontre le rôle clé de ces voies de signalisation. L'activation de STAT6, en synergie avec le facteur de transcription NF- κ B est responsable de l'expression du locus C ϵ (Shen and Stavnezer, 1998). Les séquences introniques générées après épissage des ARNm C ϵ sont capables de s'associer à la matrice d'ADN complémentaire formant des structures appelées boucle R et laissant le brin d'ADN opposé non apparié. Les boucles R sont à leurs tours capables d'être reconnues et clivées par des nucléases (Tian and Alt, 2000). Le rôle de CD40 dans la commutation isotypique est très probablement l'induction d'enzymes critiques dans les processus de ligation et de réparation de l'ADN. L'enzyme cytidine déaminase (AID) qui est exprimée de façon spécifique dans les LB activés et les centres germinatifs fait figure de candidat majeur pour cette fonction (Muramatsu et al., 1999). L'activation de CD40 est indispensable à la commutation de classe vers tous les isotypes et les patients atteints du syndrome hyper-IgM, chez qui CD154, le ligand de CD40 est déficient, ne produisent ni IgG, ni IgA, ni IgE. De façon plus générale, la signalisation en aval de CD40 est extrêmement importante dans la biologie du LB : elle intervient dans la survie, la prolifération, la formation des centres germinatifs, dans la génération de LB mémoires (Xu et al., 1994) et enfin dans la maturation d'affinité et la commutation isotypique (Kawabe et al., 1994).

L'IFN- γ joue un rôle négatif dans le contrôle des réponses IgE, en plus d'agir sur les sources d'IL-4 (LT_{H2}), il semble avoir un effet direct sur les lymphocytes B. Le traitement des LB par l'IFN- γ induit l'expression du facteur de transcription T-bet et réprime l'expression du locus C ϵ .

4.3. Les lymphocytes TH2 au cœur de l'atopie et des maladies allergiques

4.3.1. LT_{H2} et IgE

Les signaux nécessaires pour la commutation isotypique des lymphocytes B mais de façon plus générale pour leur activation complète sont fournis pour les lymphocytes T CD4 et dépendent à la fois de médiateurs solubles et d'interactions cellulaires. Ce processus appelé reconnaissance liée implique que pour qu'un LB puisse produire des Ac spécifiques d'un antigène donné, une cellule T CD4 spécifique du même antigène est été au préalable activée. Quand un LB naïf reconnaît un antigène via son BCR (IgM membranaire), l'antigène est internalisé puis présenté sous forme peptidique par les molécules de CMH II aux lymphocytes auxiliaires. L'interaction avec un lymphocyte T CD4 de même spécificité conduit à la mise en place d'une synapse immunologique facilitant les contacts moléculaires entre des protéines membranaires et la sécrétion polarisée de cytokines vers la cellule cible. Comme vu

précédemment, les cytokines nécessaires dans la production des IgE sont l'IL-4 et l'IL-13 qui sont les cytokines signatures des lymphocytes T_{H2} (LT_{H2}), ces cellules expriment également CD154 et sont donc parfaitement qualifiées pour induire la commutation isotypique vers les IgE. De façon cohérente, des polymorphismes dans les molécules GATA3, le facteur de différenciation clé qui permet la génération des LT_{H2} , ont été associés au développement de l'asthme et au niveau sérique des IgE (Pykalainen et al., 2005).

4.3.2. Lymphocytes T_{H2} et phase tardive des réactions allergiques

Si les cellules T_{H2} sont impliquées dans l'état atopique, elles jouent également un rôle critique au cours du développement des maladies allergiques. Suite à la réaction d'hypersensibilité immédiate, des LT_{H2} sont recrutés au site inflammatoire. Les cytokines qu'ils produisent permettent le recrutement et l'activation de cellules effectrices que sont les éosinophiles ; elles agissent également sur les cellules résidentes des tissus cibles. Ainsi, l'IL-13 agit sur les kératinocytes pour induire l'expression de la metalloprotéinase MMP-9. Un des substrats principaux de cette enzyme est le collagène de type IV exprimé dans la membrane basale de l'épiderme. Dans des travaux réalisés *in vitro* sur des membranes basales équivalentes, l'expression de MMP-9 est capable d'induire la dégradation du collagène IV et augmente la perméabilité de la membrane aux lymphocytes T (Purwar et al., 2008). Ce mécanisme pourrait avoir un rôle physiopathologique important dans la dermatite atopique en favorisant la migration des leucocytes dans l'épiderme. Dans des modèles d'asthmes expérimentaux générés chez la souris, il a été montré que l'IL-13 est importante dans la production de mucus. En effet, la neutralisation spécifique de cette cytokine par des anticorps anti-IL-13 ou des récepteurs solubles diminue très significativement cette production ainsi que l'hyperréactivité bronchique (Grunig et al., 1998) (Wills-Karp et al., 1998).

L'IL-5 est cruciale dans la biologie des éosinophiles. Elle régule non seulement la prolifération, la différenciation et l'activation des éosinophiles, elle fournit également un signal de mobilisation rapide des éosinophiles à partir de la moelle osseuse (Dent et al., 1990) (Foster et al., 1996). Les souris déficientes en IL-5 présentent une réduction de l'éosinophilie bronchoalvéolaire suite à l'induction d'un modèle d'asthme, associée à une diminution de l'hyperréactivité bronchique.

4.3.3. Rôle des cellules dendritiques dans la différenciation T_{H2}

Les cellules dendritiques sont des acteurs essentiels de l'activation lymphocytaire T et de nombreuses évidences pointent leur rôle dans le développement des maladies allergiques.

Suite à la rencontre avec l'allergène, les cellules dendritiques capturent, appréhendent et transportent l'allergène aux nœuds lymphatiques drainant où il est présenté aux lymphocytes CD4 naïfs. L'état d'activation conditionne la différenciation des cellules T, les rendant soit anergiques soit effectrices. Dans des conditions normales la capture de l'allergène à travers la barrière épithéliale ne suffit pas à rendre les cellules dendritiques capable d'activer les cellules T naïves, un signal de danger supplémentaire est nécessaire à leur pleine maturation et à la levée de la tolérance (Eisenbarth et al., 2002). Ces signaux de danger proviennent des pathogènes de l'environnement ou dérivent indirectement de ceux-ci. C'est le cas du LPS, composant de la paroi bactérienne Gram négative, ubiquitaire dans l'environnement, y compris dans la poussière à l'intérieur des habitations. La force du signal de danger semble être particulièrement importante dans l'induction des réponses T_{H2} . Ainsi, dans un modèle d'asthme expérimental chez la souris, l'inhalation d'ovalbumine en présence de faibles doses de LPS (100ng) favorise la différenciation des LT_{H2} en induisant la maturation des cellules dendritiques en l'absence de production d'IL-12. A l'inverse l'inhalation du même allergène en présence de fortes doses de LPS (1 μ g) favorise une réponse T_{H1} protectrice (Eisenbarth et al., 2002) (Piggott et al., 2005).

Plusieurs travaux ont récemment souligné le rôle de l'épithélium dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques conduisant à la mise en place de la réponse T_{H2} . Une avancée majeure a été réalisée avec l'identification du rôle de l'hormone TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) dans l'épithélium. TSLP a été initialement identifiée comme un facteur de croissance dans le surnageant de lignée cellulaires stromales thymiques (Friend et al., 1994). L'expression de TSLP dans les corpuscules de Hassal du thymus est associée à la génération de cellules régulatrices chez l'homme (Watanabe et al., 2005). En périphérie, l'ARNm de TSLP est exprimé par les kératinocytes de la peau et des poumons, par les cellules épithéliales des bronches et les cellules des muscles lisses mais la protéine n'est pas détectable par immunohistochimie dans la peau de patients normaux ni dans des zones de peau normales de patients souffrant de dermatite atopique. En revanche, la protéine est largement exprimée dans les lésions cutanées de DA (Soumelis et al., 2002). De façon similaire, TSLP est exprimé dans l'épithélium bronchique de patients asthmatiques (Ying et al., 2005). Parmi ses multiples fonctions TSLP a la capacité d'activer de façon très particulière les cellules dendritiques: elle induit une forte expression des molécules de CMH et de co-stimulation, mais pas la production d'IL-12. Ces caractéristiques font des cellules dendritiques activées par TSLP (TSLP-DC) des inducteurs extrêmement efficaces de la différenciation T_{H2} .

Classiquement, les cellules T_{H2} sont décrites pour produire de l'IL-4, 5, 9 et 13 mais peu ou pas de TNF- α . Quand des cellules T naïves sont stimulées *in vitro* par des TSLP-DC, elles expriment les cytokines "classiques" T_{H2} mais aussi de fortes quantités de TNF- α (Soumelis et al., 2002). Les cellules ainsi différenciées sont appelées T_{H2} inflammatoires. De façon importante, le TNF- α est impliqué dans l'asthme et certains haplotypes associés à une augmentation de la sécrétion de TNF- α sont aussi associés à une plus grande susceptibilité à l'asthme (Moffatt and Cookson, 1997). Il est donc probable que les cellules impliquées dans les maladies allergiques soient plus de phénotype T_{H2} inflammatoire que de phénotype T_{H2} conventionnel.

4.4. Le développement des maladies allergique, un échec des mécanismes immunorégulateurs?

Bien que les individus atopiques aient une prédisposition génétique à se sensibiliser aux allergènes communs de l'environnement, la forte augmentation de l'incidence des maladies allergiques observée au cours des dernières années dans les pays occidentaux ne peut s'expliquer uniquement par des aspects génétiques. Des modifications environnementales et de style de vie influencent cette évolution, constituant les fondements de l'hypothèse dite « de l'hygiène » (Strachan, 1989). Cette hypothèse propose que la plus faible exposition à des infections au cours de l'enfance soit une des causes de l'explosion des maladies allergiques. Les données épidémiologiques sur lesquelles repose cette théorie montrent une incidence réduite de sensibilisation allergique parmi les enfants ayant de nombreux frères et sœurs, à l'origine de nombreuses infections au cours des premières années de vie. Il existe une corrélation inverse entre l'incidence des maladies allergiques et, non seulement la taille de la fratrie, mais aussi d'autres indicateurs de l'exposition à des pathogènes au cours de l'enfance, comme le respect de règles d'hygiène élémentaires (Kramer et al., 1999) (Ball et al., 2000). Les fondements immunologiques de l'hypothèse de l'hygiène semblent être un développement inapproprié des réponses T_{H2} du à une exposition insuffisante aux microorganismes de l'environnement.

La notion d'équilibre entre les réponses T_{H1} et T_{H2} a servi de base pour expliquer l'hypothèse de l'hygiène. En effet, au delà de leur différence de phénotypes, les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} ont la capacité de réguler réciproquement leur génération et leur activation (voir paragraphe 2.1.2.2.2). La faible exposition, au cours de la prime enfance, à des pathogènes induisant des réponses de type T_{H1} comme les infections virales pourrait donc conduire à un

défaut des réponses immune de type T_{H1} entraînant un développement mal contrôlé des réponses T_{H2} (Shirakawa et al., 1997). Il est à ce titre intéressant de noter que la prévalence des maladies allergiques est plus faible chez les patients atteints de sclérose en plaques que dans la population normale (Oro et al., 1996). Cette hypothèse simple et alléchante souffre cependant de quelques contradictions. En effet, aussi bien dans la DA que dans l'asthme allergique, des marqueurs des réponses T_{H1} sont observés dans les phases tardives des maladies et il est aujourd'hui clair que l'équilibre entre les réponses T_{H1} et T_{H2} ne peut expliquer à lui seul le développement des désordres immunopathologiques.

Un mécanisme alternatif au contrôle des réponses T_{H2} par les T_{H1} est celui des cellules T régulatrices qui sont de contrôler les réponses adaptatives, qu'elles soient T_{H1} ou T_{H2} (Shevach, 2002). Une mutation dans le gène codant pour le facteur de transcription FOXP3, exprimé très fortement et spécifiquement dans les cellules T régulatrices, est à l'origine d'une mauvaise régulation du système immunitaire chez l'homme, doublée d'une polyendocrinopathie et d'une entéropathie. C'est le syndrome IPEX (immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked) ou encore XLAAD (X-linked Autoimmunity and Allergic Dysregulation), qui s'accompagne de manifestations allergiques, avec un eczéma sévère, des taux sériques élevés d'IgE, une éosinophilie et des allergies alimentaires (Chatila et al., 2000) (Bennett et al., 2001) (Wildin et al., 2001). Enfin, deux études indépendantes mettent en évidence un défaut de régulation des réponses T_{H2} par les cellules T régulatrices de patients atopiques (Grindebacke et al., 2004) (Ling et al., 2004). Ce défaut de régulation pourrait être une conséquence d'un problème fonctionnel des cellules T régulatrices, d'une plus grande proportion de cellules effectrices au sein de la population $CD4+CD25+$ étudiée, ou d'une résistance des lymphocytes T_{H2} effecteurs aux mécanismes régulateurs. En accord avec l'hypothèse de l'hygiène, des infections fortes et répétées seraient nécessaires à la mise en place efficace du compartiment T régulateur. En effet, les modèles murins montrent la nécessité de stimulations répétées afin de générer des cellules régulatrices.

Ainsi, les mécanismes de la réponse allergique mettraient en jeu une diminution des cytokines T_{H1} couplée à une déficience des lymphocytes régulateurs, suite à des infections microbiennes réduites dans l'enfance. Ils seraient à l'origine du glissement d'un phénotype normal, puis atopique vers la maladie allergique. Le fatalisme de cette orientation est dépendant du terrain génétique.

4.5. Les facteurs génétiques dans l'atopie et les maladies allergiques

Les études génétiques dans les champs de l'atopie et des maladies allergiques sont un parfait exemple de complémentarité entre les différentes approches stratégiques. Fondées sur les études fonctionnelles réalisées chez l'homme et les modèles expérimentaux, elles ont permis par approche « gène candidat », l'identification de gènes intervenants dans le fonctionnement du système immunitaire dans des cohortes de patients. Par ailleurs, des études d'association sur l'ensemble du génome ont permis de souligner les rôles jusqu'alors sous-estimés des tissus cibles dans les processus allergiques (Vercelli, 2008).

Les polymorphismes géniques associés à l'atopie et aux maladies allergiques, identifiés par une approche de gène candidat, peuvent être schématiquement regroupés en trois groupes:

(1) Le premier groupe de gène est impliqué dans l'initiation de la réponse immunitaire et l'induction de la réponse adaptative. Il touche les cellules de l'immunité innée et en particulier les cellules dendritiques. Ainsi l'inflammation allergique et la production d'IgE sont fortement régulées par des polymorphismes dans les gènes codant pour des PRR comme CD14 (Baldini et al., 1999), les TLR 2, 4, 6 et 10 (Eder et al., 2004) (Werner et al., 2003) (Tantisira et al., 2004a) (Lazarus et al., 2002) et les NLR NOD1 et NOD2 (Hysi et al., 2005) (Kabesch et al., 2003a). Des variants des cytokines immunorégulatrices IL-10 et TGF- β influencent également la susceptibilité à l'allergie (Hobbs et al., 1998) (Silverman et al., 2004). Enfin à l'extrême frontière entre l'immunité innée et adaptative, les molécules de CMH II sont très fortement associées à la réponse IgE spécifique d'allergènes (Shiina et al., 2004).

(2) Le second groupe comprend des gènes importants dans la différenciation T_{H2} et les fonctions effectrices lymphocytaires. Des variants de *GATA3* (Pykalainen et al., 2005), *IL4* (Kabesch et al., 2003b), *IL4RA* (Loza and Chang, 2007), *STAT6* (Schedel et al., 2004), *IL13* (Vladich et al., 2005), *IL5* et *IL5RA* (Kabesch et al., 2007) (Namkung et al., 2007) ont été associés à l'atopie et à l'allergie. Les polymorphismes dans ces gènes peuvent modifier le niveau d'expression des ARNm ou l'activité biologique des protéines. En accord avec le rôle critique de la voie T_{H1} dans le contrôle de la différenciation et des fonctions effectrices des lymphocytes T_{H2}, les gènes *Tbx21* (qui code pour T-bet) et *IL12B* (qui code pour la sous unité IL12p40) sont également liés au caractère allergique (Tantisira et al., 2004b) (Morahan et al., 2002). Enfin le gène *MS4A2* (ou encore *FCER1B*) qui code pour la chaîne B du récepteur Fc ϵ R1 a été associé par plusieurs groupes indépendants à la susceptibilité à l'asthme allergique (Shirakawa et al., 1994).

(3) Le troisième groupe est composé de gènes intervenant dans les fonctions des épithéliums avec en premier lieu le rôle de barrière. La filaggrine est une protéine contenue dans les kératinocytes de la couche granuleuse qui permet l'arrangement des filaments de kératine et participe à la formation de l'enveloppe cellulaire de la couche cornée. Le gène de cette protéine qui participe à la fonction de la barrière cutanée appartient au complexe de différenciation épidermique du chromosome 1q21. Des mutations de la filaggrine ont été mises en évidence de façon significative dans les cas de DA, d'asthme et d'atopie. Les enfants, porteurs d'une mutation, présentaient un risque augmenté de développer une DA, mais en l'absence de DA, la présence de mutations n'est en revanche pas associée à un risque d'asthme (Morar et al., 2007). La protéine SPINK5 dont des mutations sont responsables du développement du syndrome de Netherton est un inhibiteur de protéase à sérine qui joue un rôle important dans le contrôle des processus de desquamation de l'épiderme (Descargues et al., 2005). Des mutations dans cette protéine ont été associées à l'asthme et l'eczéma (Walley et al., 2001).

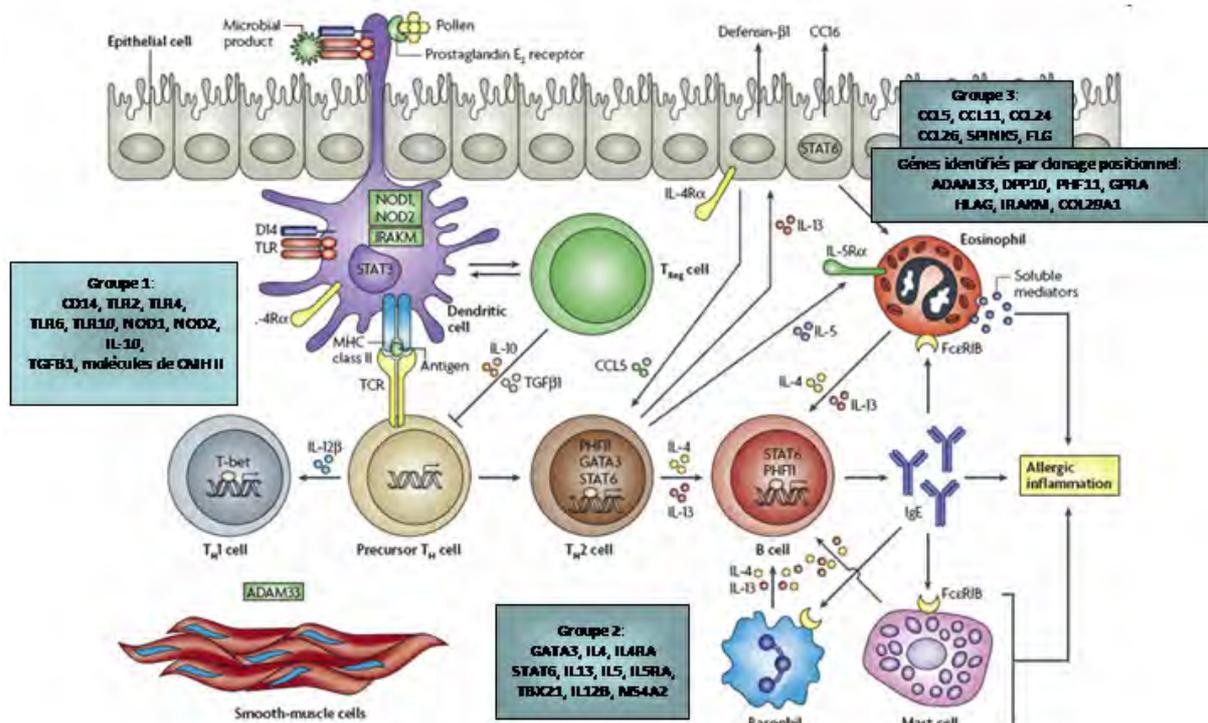
L'épithélium joue également un rôle important dans l'initiation des réponses immunes en produisant en réponse à des agressions des chimiokines et des cytokines qui permettent le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée. Les gènes codant pour les protéines CCL5, CCL11, CCL24 et CCL26 qui sont de puissants agents contrôlant la migration des éosinophiles ont tous été impliqués dans la susceptibilité aux maladies allergiques (Vercelli, 2008).

Il est remarquable de constater à quel point les approches génétiques basées sur des gènes candidats soulignent et valident les données physiopathologiques obtenues par des études fonctionnelles. L'autre démarche génétique d'analyse de liaison sur le génome entier qui s'effectue sans à priori a permis l'identification de nouveaux acteurs de la pathogénie. Sans rentrer dans une description exhaustive de tous les gènes identifiés par cette approche, dont beaucoup n'ont qu'une fonction peu ou mal décrite, nous nous arrêterons sur l'identification d'*ADAM33* qui fut le premier gène à être identifié par clonage positionnel (Van Eerdewegh et al., 2002). Initialement mis en évidence sur une cohorte de patients caucasiens du Royaume-Unis et des Etats-Unis d'Amérique, son association avec l'asthme et l'hyper réactivité bronchique a été confirmée dans différentes populations de fond génétique différent (Holgate et al., 2007). A la différence de la grande majorité des autres gènes décrits, *ADAM33* n'est ni exprimé par les cellules épithéliales pulmonaires ni par les cellules du système immunitaire

mais par les fibroblastes et les cellules du muscle lisse du poumon. Ses plus forts niveaux d'expression sont observés au cours du développement, chez l'homme comme chez la souris (Holgate et al., 2007). Cette découverte a permis de repositionner l'organe cible au centre du schéma physiopathologique proposé dans le développement de ces désordres allergiques. La figure (9) représente les gènes majeurs identifiés et la compréhension actuelle des mécanismes impliqués dans les maladies allergiques.

4.6. Conclusion

Dans cette partie, nous avons pu voir la complexité du système immunitaire. Des familles multigéniques de PRR permettent au système immunitaire inné de détecter et de répondre à toutes les sortes de pathogènes. Cette première vague de réponse permet à l'organisme de contenir l'infection et de mettre en place une réponse clonale spécifique et adaptée grâce au système adaptatif. La capacité du compartiment lymphocytaire à organiser et potentialiser l'ensemble des mécanismes effecteurs antimicrobiens assure une protection efficace contre la majorité des infections que nous rencontrons. Toutefois, de subtiles modifications environnementales ou la capacité de certains agents pathogènes à interférer avec les réponses immunes sont capables de perturber le fonctionnement normal de notre système de défense conduisant au développement de pathologies. Ainsi, plus de deux millions de personnes décèdent chaque année suite à l'infection par les parasites *Plasmodium*, qui appartient comme *Toxoplasma gondii* au phylum des apicomplexa. Par ailleurs, des réponses immunitaires exagérées ou inappropriées sont la cause de désordres immunopathologiques comme l'allergie ou l'auto-immunité qui affectent plusieurs centaines de millions de personnes à travers le monde. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces pathologies pour développer de nouveaux modes de traitements.



Gènes de susceptibilité aux maladies allergiques:

Représentation des gènes impliqués et des voies physiopathologiques impliqués dans les maladies allergiques. Parmi les gènes identifiés, le groupe 1 intervient dans l'initiation des réponses immunes, il comprend des gènes codant pour des PRR (*CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR10*, *NOD1*, *NOD2*), des cytokines immunomodulatrices (*TGFB1*, *IL10*) et les molécules impliquées dans la présentation antigénique (*HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP*). Le second groupe de gènes de susceptibilité aux maladies allergiques est impliqué dans la différenciation et les fonctions effectrices des lymphocytes T_{H2} (*GATA3*, *IL4*, *IL4RA*, *STAT6*, *IL13*, *IL5*, *IL5RA*, *TBX21*, *IL12B*). Le troisième groupe de gènes est exprimé par les cellules épithéliales, il inclut des chimiokines (*CCL5*, *CCL11*, *CCL26* et *CCL24*) et des facteurs impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (*SPINK5*, *FLG*). Le groupe de gènes identifiés par clonage positionnel comprend des gènes impliqués dans des fonctions immunologiques (*DPP10*, *PHF11*, *HLA-G*, *IRAKM*) ou des gènes exprimés par le muscle lisse (*ADAM33*, *GPR1A*). D'après Donata Vercelli. *Nat Rev Immunol*, 2008

5. Les modèles expérimentaux chez le rat BN et LEW

5.1. Introduction

Une des limites principales des travaux réalisés chez l'homme et en particulier aux études génétiques dans le cadre des maladies complexes est le manque de reproductibilité des résultats. Un éditorial publié dans la revue de référence *Nature Genetics* en 2005 soulignait la difficulté à reproduire les études d'association (Axton, 2005). Si des problèmes méthodologiques sont responsables d'un grand nombre d'artéfacts, la biologie des maladies complexes doit également être considérée avec un regard particulièrement critique sur les interactions entre les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Le cas de la molécule CD14 et de son implication dans l'allergie en est un exemple frappant. CD14 est un corécepteur qui facilite l'activation du TLR4 en réponse au LPS mais peut également s'associer à d'autres ligands (Finberg and Kurt-Jones, 2006) et TLR (en particulier le TLR3 qui reconnaît l'ARN double brin) (Lee et al., 2006). Plusieurs études ont décrit l'impact d'un polymorphisme touchant la région promotrice de CD14 (CD14-159CT) dans l'inflammation allergique pour aboutir à des conclusions a priori contradictoires: certains travaux soulignent un rôle protecteur de la mutation (Jones et al., 2002) (Leynaert et al., 2006), d'autres un rôle aggravateur (Ober et al., 2000) (Woo et al., 2003) ou encore, une absence de rôle (Kabesch et al., 2004). Les interactions entre les gènes et l'environnement ont permis de faire émerger une théorie cohérente. En effet l'allèle C de CD14 est associé à de forts taux sérique d'IgE chez les enfants en contact permanent avec des animaux de compagnie (chien, chat), alors qu'une association inverse est observée chez les enfants exposés à des animaux de ferme (cheval, vache, chèvre, mouton ou cochon) (Eder et al., 2005). Comme CD14 intervient dans la reconnaissance de ligands microbiens, il est probable que le type et la concentration de ces molécules dans l'environnement influencent directement l'effet du polymorphisme sur la production d'IgE.

Les interactions entre différents variants de gènes au sein d'une même voie physiopathologique peuvent également compliquer les études d'association dans le cas d'un caractère complexe. Fréquemment, un variant considéré individuellement n'a qu'un impact minime ou non significatif sur le trait mais peut agir de façon synergique avec d'autres variants pour augmenter son impact sur le risque de développer une maladie. Cette notion est illustrée par l'influence des gènes intervenant dans la différenciation T_{H2} sur l'atopie et les maladies allergiques. Dans une population d'enfants allemands, la présence combinée de

certains polymorphismes dans les gènes *IL13*, *IL4*, *IL4RA* et *STAT6* augmente le risque d'atopie d'un facteur 10.8 et celui de développer un asthme d'un facteur 16.8 par rapport au risque maximal causé par chacun de ces SNP de façon individuelle (Kabesch et al., 2006).

La complexité que traduisent les travaux décrits précédemment souligne l'intérêt de l'utilisation de modèles animaux dans les études génétiques, en effet, les animaleries modernes permettent un bon contrôle des conditions environnementales et l'utilisation de lignées consanguine limite les problèmes causés par l'hétérogénéité génétique des populations humaines. C'est cette approche qu'a choisie notre groupe pour étudier la génétique de traits complexes. Nos travaux se basent sur l'utilisation de deux souches de rat de laboratoire: les rats LEW et les rats BN. Ces animaux, très largement éloignés sur l'arbre phylogénique de cette espèce présentent de grandes différences au niveau du système immunitaire qui sont associées à des différences de susceptibilité à l'égard de différentes pathologies. Nous avons donc développé une approche génétique à la fois simple et puissante pour identifier les gènes et les voies physiopathologiques impliquées dans la susceptibilité à développer une maladie de type allergique induite par des sels de métaux lourds et dans le contrôle de l'infection toxoplasmique.

5.2. Les caractéristiques immunologiques chez les rats LEW et BN

Les réponses immunes de certaines souches de souris et de rats sont "naturellement" orientées. Le rat Brown Norway (BN) et la souris Balb/c développent préférentiellement des réponses de type T_{H2} , alors que le rat Lewis (LEW) et les souris B10.D2 ou C57BL/6 développent préférentiellement des réponses de type T_{H1} (Gorham et al., 1996) (Fournie et al., 2001).

Cette susceptibilité a des conséquences en pathologie. L'étude de la Leishmaniose expérimentale a permis de montrer que les souris Balb/c sont incapables de contrôler l'infection du fait d'une réponse T_{H2} exagérée alors que les souris C57Bl/6 qui développent une réponse T_{H1} réussissent à éradiquer le parasite (Scott, 1998). Les cellules T CD4+ jouent ici un rôle crucial. Les cellules T CD4+ des animaux résistants sont essentiellement de type T_{H1} et celles des animaux susceptibles de type T_{H2}

3.2.1 Les sous populations lymphocytaires définies par l'expression du marqueur CD45RC

La découverte de l'hétérogénéité fonctionnelle des lymphocytes T CD4 a suscité la recherche de marqueurs capables de caractériser ces différentes sous-populations *in vivo*.

La molécule CD45 est une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine phosphatase (PTP) qui possède un grand domaine extracellulaire fortement glycosylé et sialylé, dont la taille varie entre les différents isoformes de la protéine. Ces isoformes sont générés par épissage alternatif des exons A, B et C. L'expression de CD45 est restreinte aux cellules hématopoïétiques et la présence de ses différents isoformes est associée à différents niveaux de différenciation et d'activation cellulaire. La fonction des domaines extracellulaires reste à être définie alors qu'il est bien établi que le domaine intracellulaire qui possède l'activité tyrosine phosphatase régule l'activation des kinases de la famille Src (principalement Lck dans les lymphocytes T et Fyn dans les lymphocytes B), ces dernières intervenant dans la transduction du signal en aval des récepteurs à l'antigène.

Chez le rat, le niveau d'expression de CD45RC (absence des exons A et B mais présence de l'exon C) permet de séparer les lymphocytes T CD4 et CD8 en deux sous-populations: les cellules CD45RC^{high} qui expriment fortement le marqueur et les cellules CD45RC^{low} qui l'expriment plus faiblement. La différence phénotypique est associée à des différences fonctionnelles *in vitro* comme *in vivo*. Après activation polyclonale, les lymphocytes T CD45RC^{high} produisent préférentiellement des cytokines de type 1 comme l'IFN- γ et l'IL-2 alors que les cellules T CD45RC^{low} ont plus un profil de cellules T_{H2} avec une production d'IL-4, 10 et 13 et sont impliquées dans l'aide aux lymphocytes B (Mosmann and Coffman, 1989) (McKnight et al., 1991) (Fournie et al., 2001). Ces deux sous populations présentent des caractéristiques remarquables d'inter-régulation, ainsi l'injection de cellules T CD4+CD45RC^{high} chez un rat receveur athymique induit l'apparition d'un syndrome généralisé et léthal caractérisé par des infiltrats inflammatoires massifs dans le foie, les poumons, la thyroïde et le pancréas, à l'inverse le transfert de cellules T CD4+CD45RC^{low} ou le co-transfert des deux sous populations n'induisent pas de pathologie (Powrie and Mason, 1990). Ces observations montrent que des cellules CD4CD45RC^{high} potentiellement auto-agressives peuvent être contrôlées par la fraction CD4CD45RC^{low}. A l'inverse, dans un modèle de désordre immunopathologique induit par l'injection de sel de mercure (et qui sera décrit plus en détail par la suite), les cellules T CD45RC^{high} jouent un rôle protecteur et les CD45RC^{low} sont les cellules effectrices de la maladie. Dans ce modèle, la déplétion du compartiment CD45RC^{high} aggrave les symptômes auto-immuns (Mathieson et al., 1993). L'ensemble de ces travaux montre que les deux sous populations contiennent des cellules qui, dans un contexte

particulier, peuvent être dangereuses pour l'organisme et que les deux sous populations sont capables de s'auto-réguler, le rapport entre les deux sous-populations doit donc être considéré comme une caractéristique importante du système immunitaire. Notre groupe a également montré que la dichotomie observée entre les cellules CD4 CD45RC^{high} et CD4 CD45RC^{low} était également retrouvé pour le compartiment CD8 (Xystrakis et al., 2004a). *In vitro* les lymphocytes T CD8 CD45RC^{high} produisent des cytokines de type 1 et ont une activité cytolytique. A l'inverse les LT CD8CD45RC^{low} ont des profils de production de cytokines orientés vers des réponses de type 2 avec notamment l'expression des interleukines 4 et 13, ces cellules possèdent *in vitro* comme *in vivo* des propriétés suppressives et sont capables d'inhiber la différenciation des cellules CD4 naïves vers la voie T_{H2} (Xystrakis et al., 2004b).

Les rats LEW et BN qui sont caractérisés par des polarisations inverses des réponses immunes présentent des différences très significatives dans le rapport entre les sous populations CD45RC^{high} et CD45RC^{low}, aussi bien dans le compartiment CD4 que CD8. En effet, les sous population CD45RC^{low} sont sous représenté chez le rat LEW par rapport au rat BN (respectivement 35% vs 55%) (Subra et al., 2001) (Xystrakis et al., 2004a). Le ratio entre ces sous populations est donc contrôlé génétiquement et est associé à des différences de polarisation des réponses immunes *in vivo*. L'analyse de chimères hématopoïétiques réalisées par le transfert de moelle osseuse d'origine LEW ou BN dans des receveurs F1 (LEWxBN) irradiés montre que le ratio high/low est déterminé par des facteurs intrinsèques aux cellules hématopoïétiques (Subra et al., 2001). Notre groupe a identifié un locus important sur le chromosome 9 du rat appelé *Cec1* qui contrôle la proportion relative des sous populations high et low (Subra et al., 2001) (Xystrakis et al., 2004a).

Il faut noter que CD45RC ne peut toutefois pas être considéré comme un marqueur optimal car les sous populations CD45RC^{high} et CD45RC^{low} sont en fait relativement hétérogènes. Ainsi, la population de lymphocytes exprimant faiblement la marqueur CD45RC comporte au moins 4 sous-populations cellulaires: (1) les cellules venant de quitter le thymus (2) les cellules régulatrices exprimant le facteur de transcription Foxp3 (3) les cellules activées et (4) des cellules mémoire de phénotype T_{H2}. La même hétérogénéité est observée au sein de la fraction CD45RC^{high} avec (1) des cellules naïves et (2) des cellules mémoires de phénotype T_{H1} (Fournie et al., 2001).

5.3. La maladie induite par les sels de métaux lourds

5.3.1. Le rat BN: un modèle pour l'étude de l'atopie et des désordres immunopathologiques associés aux IgE

En accord avec la polarisation préférentielle des réponses immunes du rat BN vers des réponses de type 2, les concentrations sériques d'IgE chez cet animal sont significativement supérieures à celles observées chez le rat LEW (10 μ g/ml vs 0.5-2 μ g/ml) (Fournie et al., 2001). Cet état "atopique" peut se convertir en désordre immunopathologique systémique important quand le rat BN est traité par des sels de métaux lourds (sel d'or et sel de mercure). L'injection à des doses non toxiques de ces produits induit chez le rat BN une splénomégalie et une hypertrophie de toutes les chaînes ganglionnaires associée à une lymphoprolifération des lymphocytes T CD4 et B. Au cours de la maladie apparaît une hyperimmunoglobulinémie touchant principalement les isotypes IgE et IgG1, des anticorps sont également produits, en particulier des anticorps anti-ADN ou anti-laminine. Ces derniers se déposent sur les membranes basales glomérulaires et sont responsables du développement d'une glomérulopathie. Une des caractéristiques remarquables de ce modèle est l'aspect transitoire de la maladie, après un mois de traitement par les sels d'or ou de mercure, les symptômes disparaissent et les rats deviennent résistants si les injections sont reprises.

Si les injections de sels de mercure ou d'or induisent de façon similaire différents événements, certains symptômes sont spécifiques de la maladie mercurielle qui est de façon générale beaucoup plus sévère. Le traitement s'accompagne d'une perte de poids importante chez les animaux reflétant un état général précaire et d'une vascularite touchant différents organes comme les poumons, le foie ou l'intestin. Cette vascularite est associée à la production d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA). C'est donc un des rares modèles permettant de reproduire certains des symptômes observés dans les vascularites à ANCA chez l'homme. Par ailleurs, il faut souligner que, dans le modèle mercure, la glomérulopathie induite par les sels de mercure est sévère et s'accompagne d'une protéinurie avec syndrome néphrotique.

Au niveau cellulaire, les sels d'or et de mercure agissent comme des activateurs polyclonaux des lymphocytes T et B. Différentes études réalisées chez le rat BN ou chez des souches de souris susceptibles ont permis d'élucider quelques mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la maladie. Comme lors des réponses immunes normales, la production d'anticorps par les LB dépend d'une aide des LT et le blocage à l'aide d'anticorps des signaux de co-stimulation impliqués dans l'interaction T-B comme CD40/CD154, OX40/OX40L ou encore CD80-86/CD28 prévient la génération d'anticorps (Biancone et al., 1996) (MacPhee et

al., 2006). Comme le traitement par les métaux lourds induit la production d'IgE et d'IgG1, deux isotypes dont la production est sous la dépendance de l'IL-4, il a été proposé que la maladie était dépendante des cellules T_{H2} et que les cellules T_{H1} pouvaient avoir un rôle protecteur. En effet, la neutralisation de l'IL-4 à l'aide d'anticorps ou l'utilisation de souris déficientes pour cette cytokine limite l'hyperimmunoglobulinémie IgE et IgG1, ce qui montre que ce phénomène est dépendant de l'IL-4 (Bagenstose et al., 1998) (Kono et al., 1998). Toutefois la production d'auto-anticorps anti-ADN et les dépôts d'Ig glomérulaires ne sont pas affectés suggérant l'implication d'une réponse mixte à la fois T_{H1} et T_{H2} . Cette hypothèse est confirmée grâce à l'utilisation de souris déficientes pour l'IFN- γ . Chez ces animaux, le traitement par les sels de mercure n'induit pas la production d'auto-anticorps et les lésions tissulaires sont réduites (Kono et al., 1998) (Hu et al., 1999). En conclusion, si, comme dans les maladies allergiques, les réponses T_{H2} jouent un rôle important dans la maladie induite par les sels de métaux lourds, la pathologie est en fait plus complexe qu'initialement imaginé.

5.3.2. La résistance du rat LEW aux traitements par les sels de métaux lourds: une base pour les études génétiques

La forte susceptibilité du rat BN au traitement par les sels de métaux lourds n'est pas une caractéristique générale de l'espèce *Rattus Norvegicus*. En effet le rat LEW est lui hautement résistant au développement de la maladie. Le traitement du rat LEW par les sels de mercure n'induit aucun des symptômes observés chez le BN mais ce traduit par une immunosuppression active dépendante du compartiment CD8 le rendant résistant au développement de l'EAE à laquelle il est normalement susceptible (Castedo et al., 1993). Ces différences de réponse entre les deux souches LEW et BN font de ce modèle un système de choix pour l'analyse génétique des gènes et des voies physiopathologiques impliqués dans cette maladie. Notre équipe a entrepris la recherche des facteurs génétiques mis en jeu dans le contrôle de ces différences par une analyse de liaison sur une population F2 LEWxBN. Ces études ont permis d'identifier 3 locus contrôlant la susceptibilité du rat BN aux sels d'or initialement baptisés *Atps1* (*Atps*: Aurothiopropanol sulfonate, sels d'or) *Atps2* et *Atps3*. *Atps1* est colocalisé avec la région du CMH sur le chromosome 20, *Atps2* est localisé sur le chromosome 10, dans une région qui comprend le groupe de gènes de la réponse T_{H2} en particulier l'IL-4. Une association avec la région synthénique chez l'homme est retrouvée dans le cas des maladies allergiques. Enfin *Atps3* est localisé sur le chromosome 9, les analyses statistiques ont montré que le "poids" de ce locus d'environ 7 cM sur la réponse IgE et la production auto-anticorps était particulièrement important (Lod Score=16) (Mas et al., 2000).

Pour affiner la localisation des gènes présents dans ces locus et en particulier dans *Atps3* (rebaptisé par la suite *Aiid3*: Aurothiopropanol sulfonate-induced immunological disorder), l'équipe a créé des lignées congéniques qui nous ont permis de réduire la taille de la région portant les gènes de contrôle de la maladie induite par les sels d'or de 7 à 1.2 cM (Mas et al., 2004). L'autre conclusion majeure obtenue à partir de ces lignées congéniques était la parfaite co-localisation entre *Aiid3* et *Cec1*, ce dernier locus contrôlant le niveau d'expression du CD45RC sur les populations lymphocytaires CD4 et CD8, c'est-à-dire le rapport entre les populations lymphocytaires CD45RC^{high} et CD45RC^{low} (Xystrakis et al., 2004a). Ces données suggèrent fortement qu'un déséquilibre entre les sous populations lymphocytaires se traduit par des différences de susceptibilité à la maladie. De façon importante les deux locus *Aiid3* et *Cec1* sont compris dans une région définie par le groupe de Thomas Olson qui contrôle la susceptibilité du rat à l'EAE (locus *EAE4*) (Dahlman et al., 1999). Ces travaux ont conduit à proposer que la région du chromosome 9 du rat portant *Aiid3/Cec1* joue un rôle majeur dans le fonctionnement du système immunitaire et à émettre l'hypothèse qu'un même gène contrôle l'ensemble de ces phénotypes.

5.4. La toxoplasmose

5.4.1. Le rat LEW: un modèle unique de résistance à la toxoplasmose

Le rat est un modèle de choix pour l'étude de la toxoplasmose humaine, aussi bien pour les phases aiguë et chronique de l'infection que pour la toxoplasmose congénitale (Dubey and Frenkel, 1998). C'est en étudiant ce modèle que l'équipe de Marie-France Cesbron a montré une absence de kystes intracérébraux chez le rat LEW contrairement au rat témoin F344. L'analyse de la dissémination du parasite a montré qu'à l'inverse des rats BN ou F334 chez lesquels des foyers parasitaires sont révélés dans les ganglions mésentériques, la rate et le sang quatre jours après infection, aucun foyer n'a pu être mis en évidence chez le rat LEW. Ces résultats indiquent donc que les tachyzoïtes sont incapables de disséminer et de se multiplier au sein de l'organisme du rat LEW. De façon cohérente, aucune réponse humorale n'était détectée chez le rat LEW, ce qui suggérait une élimination précoce du parasite, avant la mise en place de la réponse adaptative (Sergent et al., 2005).

L'absence de kystes intracérébraux, l'absence de dissémination parasitaire, et l'absence de production d'anticorps (Ac), chez le rat LEW, suite à une infection orale par le toxoplasme, permettent de conclure que le rat LEW est naturellement résistant à l'infection toxoplasmique. Cette découverte était inattendue puisque *T.gondii* est connu pour être

capable d'infecter tous les homéothermes. Il est également intéressant de noter que la résistance du rat LEW n'est dépendante ni de l'âge, ni du sexe du rat. Ce modèle offrait donc de nouvelles perspectives dans l'étude des facteurs génétiques et immunologiques contrôlant l'infection toxoplasmique.

A partir de là, des analyses génétiques ont été entreprises en collaboration avec notre équipe. Une première étude de la susceptibilité d'une population F1 (LEWxBN) a permis de montrer le caractère dominant de la résistance, en effet les rats hybrides de première génération ne développent pas de kyste dans le cerveau et présentent une réponse humorale faible ou absente. L'implication du système immunitaire a été testée dans des systèmes de chimère hématopoïétiques où des rats receveurs F1 (LEWxBN) ont été irradiés létalement et reconstitués avec des cellules de moelle osseuse de rats BN ou LEW respectivement. La susceptibilité (sérologie positive, présence de kystes) des rats ainsi reconstitués était dépendante de l'origine des cellules hématopoïétiques et non des cellules radio-résistantes, montrant ainsi l'implication d'un mécanisme immunologique (Sergent et al., 2005).

Des études ont également été effectuées sur l'IFN- γ qui est la cytokine majeure impliquée dans le contrôle de l'infection toxoplasmique. Comme vu en détail dans la partie 2.2.3.1, l'IFN- γ , produit par les cellules T et NK activées, induit les fonctions anti-toxoplasme des macrophages. On sait également que les rats LEW et en particulier les cellules T CD8 de ces animaux sont de meilleurs producteurs d'IFN- γ que les rats BN. Cette particularité physiologique pourrait expliquer la différence de sensibilité des deux souches de rat vis à vis de l'infection toxoplasmique. Cette hypothèse a été testée en traitant des rats LEW et BN avant et pendant la phase aiguë de l'infection par un anticorps anti-IFN- γ . Chez le rat BN, ce traitement a pour effet d'augmenter le nombre de kystes en phase chronique d'infection. Chez les rats LEW, aucun kyste intracérébral n'a pu être mis en évidence suite à un tel traitement. Par contre, il a pu être noté que la sérologie des rats devenait légèrement positive. Les titres en Ac observés sont largement inférieurs à ceux obtenus pour les rats BN, mais leur présence indique qu'un traitement anti-IFN- γ permet de modifier la résistance des rats LEW à la toxoplasmose (Sergent et al., 2005).

5.4.2. Identification du locus *Toxo1* qui contrôle la susceptibilité du rat à la toxoplasmose.

La résistance du rat LEW à l'infection toxoplasmique et la susceptibilité des rats BN offraient l'opportunité d'entreprendre une analyse génétique pour identifier les déterminants

génétiques de ce caractère. Notre équipe a donc initié une analyse de liaison sur une population F2 LEWxBN. Les animaux ainsi générés furent infectés par voie orale avec des kystes de *T.gondii* de la souche prugnaud puis phénotypés pour déterminer la réponse anticorps et la présence de kyste dans le cerveau. Une association forte entre la résistance à l'infection et une région de 12 cM du chromosome 10 baptisée *Toxo1* fut détectée (Cavailles et al., 2006). Pour affiner la localisation du locus et étudier l'impact du fond génétique sur le pouvoir protecteur, des lignées congéniques réciproques furent développées (BN.LEW-*Toxo1* et LEW.BN-*Toxo1*). Ces lignées permirent de confirmer les résultats de l'analyse de liaison et, de façon importante, ont apporté la preuve que *Toxo1* contrôle la susceptibilité à la toxoplasmose de façon indépendante du fond génétique. En effet, des rats LEW dans lesquels la région *Toxo1* BN a été introduite deviennent susceptibles, à l'inverse, l'introduction de la région LEW dans des rats BN protège les animaux. Les lignées congéniques ont également permis de faire la dissection génétique du locus et d'affiner la localisation de *Toxo1* dans une région de 1.7 cM (Cavailles et al., 2006).

Comme la résistance est dépendante des cellules hématopoïétiques mais ne semble pas dépendre du compartiment lymphocytaire (absence de réponse Ac), nous avons émis l'hypothèse que le locus *Toxo1* pouvait réguler la réponse des cellules de l'immunité innée vis-à-vis du parasite. En raison de leur rôle primordial dans la physiopathologie de la toxoplasmose, les macrophages nous semblaient être une cible intéressante pour des études fonctionnelles.

OBJECTIFS

Mon travail de thèse réalisé au sein de l'équipe du Dr Gilbert Fournié a porté sur deux modèles différents avec pour objectif majeur l'identification de gènes de contrôle des réponses immunes en faisant appel dans les deux cas à une stratégie commune de clonage positionnel.

Le premier modèle est celui de la maladie induite par les sels de métaux lourds à laquelle le rat BN est sensible et le rat LEW résistant. Chez le rat BN, l'injection de sels d'or induit une forte réponse IgE et peut donc être considéré comme un modèle de maladie allergique. Comme présenté dans l'introduction, notre groupe dans des études précédentes avait identifié une région du chromosome 9 du rat, *Aiid3*, qui contrôle la susceptibilité à la maladie induite par les sels d'or. Il n'était pas connu si *Aiid3* contrôlait également la maladie mercurielle qui partage avec celle induite par les sels d'or la composante IgE mais s'accompagne d'un syndrome néphrotique avec protéinurie ainsi que d'une vascularite à ANCA affectant différents organes.

Le second modèle est celui de la toxoplasmose à laquelle le rat LEW est réfractaire et le rat BN sensible. Comme présenté dans l'introduction, notre équipe dans des études précédentes avait identifié sur le chromosome 10 du rat, le locus *Toxo1*, qui exerce dans ce modèle un contrôle majeur sur l'issue de l'infection toxoplasmique *in vivo*.

Afin d'identifier les gènes impliqués dans le contrôle des désordres immunopathologiques induits par les sels d'or et de mercure chez le rat BN et dans la résistance du rat LEW à la toxoplasmose, la stratégie commune qui a été utilisée est la suivante :

- (1) Etudier l'impact des locus de contrôle sur les différents paramètres de la maladie.
- (2) Réduire par dissection génétique à l'aide de lignées et sous-lignées congéniques pour le chromosome 9 (modèle sels de métaux lourds) et pour le chromosome 10 (modèle toxoplasmose) les intervalles génomiques de contrôle.
- (3) répertorier les gènes présents au niveau dans ces intervalles lorsque ils ont été réduits à des valeurs de l'ordre ou inférieur à une mégabase (devant contenir en moyenne moins de vingt gènes) et identifier parmi ces gènes des gènes candidats en fonction des phénotypes étudiés.
- (4) Réaliser des études fonctionnelles et génomiques en vue de l'identification des gènes et de leurs mécanismes d'action.

RESULTATS

ARTICLE 1 : Contrôle génétique de la susceptibilité aux maladies induites par les sels de métaux lourds par le locus *Aiid3*

Ce travail s'inscrit dans le prolongement des travaux développés au laboratoire depuis plusieurs années. Le contrôle génétique de la capacité à développer des réponses IgE exacerbées, paramètre important des maladies allergiques, peut être exploré à l'aide du modèle des rats BN et LEW traités par des sels de métaux lourds. Dans cet article, par une stratégie de dissection génétique à l'aide de lignées sous-congéniques, j'ai pu mettre en évidence le rôle majeur d'une région de 117 Kb sur le chromosome 9 qui contrôle la production d'IgE en réponse aux sels d'or et aux de sels de mercure. De façon importante, nous avons montré que un (des) variant(s) génique(s) de cet intervalle contrôle la susceptibilité du rat BN à développer l'ensemble des symptômes auto-immuns provoqués par les sels de mercure qui sont un syndrome néphrotiques avec protéinurie causé par des dépôts glomérulaires d'auto-anticorps et une vascularite granulomateuse dans les poumons.

Nous avons pu mettre en évidence une implication du compartiment lymphocytaire CD8 dans le contrôle des réponses IgE et une association entre la capacité à produire de fortes quantités d'IFN- γ et le pouvoir protecteur de ces lymphocytes. Nous avons également montré une dissociation entre la protection vis-à-vis des réponses IgE exacerbées et les autres symptômes auto-immuns. Nos données suggèrent que l'intervalle identifié influence l'ensemble des fonctions lymphocytaires.

Le locus de contrôle comprends 4 gènes, seulement deux d'entre eux sont polymorphes et impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire, le gène *C3* et le gène *Vav1*. Différents arguments suggèrent fortement un rôle majeur de ce dernier. Ce travail apporte des éléments importants pour l'étude génétique chez l'homme des désordres immunopathologiques.

Genetic mapping of a rat 117 kilobases locus that controls the development of atopy through a CD8-dependent mechanism

Short title: CD8-dependent control of atopy in the rat

Olivier Papapietro^{a,b}, Céline Colacios^{a,b}, Audrey Casemayou^a, Isabelle Bernard^a, Valérie Garcia^c, Dominique Lagrange^a, Olivier Andreoletti^c, Jean-François Bernaudin^d, Abdelhadi Saoudi^{a,e} and Gilbert J. Fournié^{a,e}.

a INSERM, U563, F-31000 Toulouse, France and University Toulouse III Paul Sabatier, F-31000 Toulouse, France

c UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôte Agent Pathogène, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31000 Toulouse, France

d Histologie-Biologie Tumorale and ER2 University Paris 6 Hôpital Tenon 75020 Paris

Corresponding author : Gilbert J. Fournié, INSERM U563, Pavillon Lefebvre, Hôpital Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse cedex 3, France. Phone: 33-5-62-74-45-02; Fax: 33-5-62-74-45-58 ; e-mail: gilbert.fournie@inserm.fr.

Manuscript information: 29 pages, 4 figures, 3 tables

Word and character counts: abstract: 245 words ; manuscript: 40452 characters

Nonstandard abbreviations: c9: chromosome 9; atps: aurothiopropanol sulfonate

b: O.P. and C.C. contributed equally to this work

e: A.S. and G.J.F. contributed equally to this work

ABSTRACT :

Atopy, the genetic predisposition to become IgE-sensitized to allergens, plays a major role in the pathogenesis of allergic diseases. The BN rat is commonly used as a model of atopy and allergic diseases; it develops a dramatic IgE response to heavy metals exposure. In contrast, the LEW rat is resistant to these pathological manifestations. Using the BN-LEW model we previously identified on chromosome 9 (c9) a locus that plays a major role in controlling the IgE response under gold salts injections. In this work, by using interval specific congenic lines, we narrowed down this locus to 117 kilobases (kb). The 117 kb region from LEW origin introgressed into the BN genome (BN.LEWc9-Bf congenic line) abolished the IgE response observed in BN rats treated with gold or mercury salts. It also protects from the autoantibody production and immune-mediated disease triggered by mercury salt injections. *In vitro*, T cell functional studies revealed that the resistance provided by the 117 kb region is associated with the ability of CD8 T cells to produce high amounts of IFN- γ . Under mercury treatment, the CD8 depletion restored the IgE response of the BN.LEWc9-Bf resistant rats, thus demonstrating that the resistance is mediated by CD8 T cells. Among the four genes located within the 117 kilobases, we found mis-sense mutations in coding regions of *Vav1* and *C3*. Thus, our findings put into focus the CD8-mediated control of IgE synthesis by *Vav1* and *C3* pathways as a mechanism of susceptibility to allergic diseases.

INTRODUCTION:

Atopy, the genetic predisposition to become IgE-sensitized to allergens commonly occurring in the environment (1), plays a key role in allergic diseases (2). Although efforts have largely been directed to the understanding of the pathophysiological mechanisms underlying allergic diseases, there is still little known about the involved genetic factors. The identification of risk genes and understanding of their mechanisms of action remain current challenges in allergic diseases. In humans, reaching this goal is difficult due to the genetic heterogeneity of patient populations and to the variability of environmental factors. Studies in animal models may overcome these difficulties. Importantly, they also permit functional studies under stable environmental conditions. Thus, these rodent studies may not only point to disease-associated human orthologs genes but also lead to the identification of disease pathways (3).

The BN rat is commonly used as a model to study atopy and allergic diseases (4-6). In the BN rat, mercury or gold salts administration trigger a T-dependent polyclonal activation of B cells characterized by a dramatic increase in serum IgE concentration and a glomerulopathy (7, 8). Interestingly, similar features are observed in humans exposed to mercury and in rheumatoid patients treated with gold salts (9, 10). The IgE response induced by heavy metals in the BN rat is mediated by autoreactive T cells (11, 12). These T cells are characterized by their ability to secrete type-2 cytokines (13), particularly IL-4 that plays a key role in the regulation of IgE synthesis (14). The LEW rat is resistant to the heavy metal-induced IgE response (15). Thus the BN-LEW strain combination represents a model of choice to investigate the genetic control of atopy (16). In this regard, we previously identified a major locus of 1.2 centiMorgan (cM) on chromosome 9 that controls

the gold salt-triggered IgE response (*Iresp3* for Immunoglobulin response QTL 3¹) (17, 18). In the present study, we generated a set of congenic sub-lines that allowed us to narrow down *Iresp3* to a 117 kilobases region. In addition we provided evidence that this interval controls the mercury-triggered IgE response through a CD8-dependent mechanism.

¹ *Iresp3* was previously successively named *Atps3* for aurothiopropanol sulfonate QTL 3 and *Aiid3* for aurothiopropanol sulfonate-induced immunological disorder QTL 3 (<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/qtls.html?100>)

RESULTS:

A 117 kilobases interval on rat chromosome 9 controls the gold salt and mercury-triggered IgE response of the BN rat.

We first investigated the IgE response in the BN.LEWc9-B congenic line and the parental strains after aurothiopropanol sulfonate (atps) treatment. This congenic line is characterized by the introgression of a 1.2 cM region of the resistant LEW strain into the BN genomic background at the centromeric tip of chromosome 9. In agreement with our previous studies, we showed a dramatic decrease in IgE serum concentration in response to atps administration in the BN.LEWc9-B congenic rats as compared to BN rats (figure 1a) (18). Similar results were obtained in another congenic line harboring the same LEW region (BN.LEWc9-I congenic line; not shown). As expected, atps did not induce IgE response in LEW rats. We also analyzed whether this region controls the IgE response induced by HgCl₂, another heavy metal. We showed a dramatic decrease of IgE serum concentration in BN.LEWc9-B congenic rats (figure 1b), thus indicating that the IgE response to atps and HgCl₂ are likely under the same genetic control.

To narrow down this locus, we backcrossed BN.LEWc9-B and BN.LEWc9-I lines to generate a set of five congenic sub-lines, characterized by genomic recombination within the 1.2 cM interval (Table 1). In four congenic sub-lines (BN.LEWc9-Bc,-Bf,-Ia,-Ib), the IgE response to atps (figure 1c) and HgCl₂ (figure 1d) injections was dramatically reduced as compared to BN rats. By contrast, in the BN.LEWc9-Be sub-line, the IgE response was similar to that found in the BN parental strain. Thus, this genetic dissection allowed us to localize the genomic region that controls the IgE response to the 117 kb interval that characterizes the BN.LEWc9-Bf sub-line (figures 1e and 1f, Table 1). According to our own genetic map and to human and mouse syntenic regions, this 117 Kb interval contains four LEW genes, *C3* (complement 3 precursor), *Gpr108* (G protein coupled receptor 108),

Cip4/trip10 (Cdc42-interacting protein 4), and exons 1 to 15 of *Vav1*. The coding regions of these four genes were sequenced in BN.LEWc9-Bf, BN and LEW rats. Fourteen synonymous and three non-synonymous polymorphisms were identified (Table 2). The non synonymous polymorphism in exon 20 of *Vav1* cannot be involved in the genetic control of IgE response since it is located downstream of the point of recombination that characterizes the BN.LEWc9-Bf sub-line. In contrast, the two remaining non-synonymous polymorphisms, found in exon 32 of *C3* and in exon 1 of *Vav1* are candidates for the control of the IgE trait.

The 117 kilobases interval from LEW origin also protects BN rats from HgCl₂-induced immune disease.

Under HgCl₂ treatment, BN rats develop an immune type of glomerulonephritis with complement activation, intense proteinuria, anti-laminin and anti-DNA antibodies with linear and granular IgG1 deposits along glomerular basement membrane (7, 19, 20). They also develop tissue injury in several organs, associated to anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) (21). We therefore investigated whether the 117 kilobases interval from LEW origin controls these features. As shown in figure 2, BN.LEWc9-Bf rats were fully protected from the HgCl₂-triggered glomerulonephritis (figure 2a). No albuminuria was detected (figure 2b) and normal C3 levels were found in serum (figure 2c). In agreement with these observations, levels of anti-laminin and anti-DNA Ab were decreased (figure 2, d and e). We also observed that the dramatic decrease in body weight observed in the BN rats was markedly prevented in the BN.LEWc9-Bf congenic rats (mean % \pm SD of body weight at days 28 as compared to day 0: BN.LEWc9-Bf: 101 \pm 12, n=5 vs. BN: 71 \pm 3, n=4: p = 0.016).

Similarly, the ANCA-associated tissue lesions triggered by HgCl₂ injection observed in BN rats was prevented in the BN.LEWc9-Bf rats (figure 3). ANCA were barely detectable in BN.LEWc9-Bf congenic rats (figure 3b) as compared to BN rats (figure 3b). In BN rats, macroscopic examination showed mainly haemorrhagic lesions of lungs that were not observed in BN.LEWc9-Bf rats. Histological analyses showed a major interstitial eosinophilic granulomatous pneumonia in 4 rats among 5 tested with an extensive pattern, involving from 20% to 45 % of the lung parenchyma, destroying the airways wall and associated to angeitis (Figure 3c). These lesions were composed of macrophages, numerous plurinucleated giant cells and eosinophils with superadded necrotic eosinophilic central microabcess-like lesions in 3 rats. They were associated to eosinophil infiltrates around vessels and airways in the remaining parenchyma. In contrast in BN.LEWc9-Bf congenic rats, no pulmonary lesion was observed in 3/5 rats (Figure 3d) and only minor pathologic changes in 2/5, *ie.* one small granuloma involving 0.5% and 1% of the lung. Eosinophils were rarely observed except associated to the small granulomas. Thus the LEW genomic origin of the 117 kilobases interval has a dramatic effect on the immune disorders triggered by HgCl₂ injections. It controls the IgE response and both the anti-laminin-associated glomerulonephritis and the ANCA-associated tissue lesions observed in the BN strain.

The 117 kilobases interval from LEW origin controls IgE response through a CD8 T cell-dependent mechanism.

To investigate the cellular mechanisms responsible for the resistance of the BN.LEWc9-Bf sub-line to HgCl₂-induced immunological disorders, cytokine production by stimulated T cells was compared between BN and BN.LEWc9-Bf rats. For this purpose naïve CD4 and CD8 T cells were isolated and stimulated by anti-TCR and anti-CD28 antibodies. No difference in proliferation, nor in IL-2 secretion was observed between BN and BN.LEWc9-

Bf CD4 and CD8 T cells (Table 3). IL-4, IL-10, IL-17 and TNF- α were undetectable. IFN- γ secretion by CD4 T cells from BN and BN.LEWc9-Bf rats was identical. A three fold increase in IFN- γ secretion was found in CD8 stimulated T cells isolated from BN.LEWc9-Bf rats as compared to BN rats (Table 3). This difference in IFN- γ secretion prompted us to study the role of CD8 T cells in resistance of BN.LEWc9-Bf rats to HgCl₂-induced immunological disorders. For this purpose, HgCl₂-injected BN.LEWc9-Bf rats were treated with anti-CD8 antibody that depletes more than 90 % of CD8 T cells (figure 4a). This treatment restored the IgE response (figure 4b) but did not affect the anti-DNA and anti-laminin antibody production (figures 4c, 4d) nor the protection from renal and lung lesions (data not shown). Thus, the 117 kilobase LEW interval controls the HgCl₂-induced IgE response through a cellular mechanism that involves CD8 T cells and the HgCl₂-induced immune disease through CD8 T cell-independent mechanism.

DISCUSSION:

In this work, we generated a set of interval specific congenic lines that allowed us mapping the locus that controls the IgE response and heavy metals-induced immunological diseases to a 117 kb interval of chromosome 9. Importantly, we demonstrated that this locus controls the IgE response through a CD8-dependent mechanism and glomerulonephritis and ANCA-associated tissue lesions in a CD8 independent way.

CD8 T cells play important roles, either as effector or as regulatory T cells, in autoimmune diseases (22, 23), allergy (24), organ transplantation (25, 26), protection of the host against infectious diseases (27, 28), and cancer (29, 30). Our previous study showed that the difference in susceptibility between LEW and BN rats to develop respectively type-1 and type-2 mediated immune disorders was associated with a qualitative difference in their CD8 T cell compartment (16, 31). The bias that characterizes the BN immune system towards type-2 immune responses is associated with an intrinsic defect of the BN T CD8 cells to secrete the type-1 cytokine IFN- γ (31). Our present study extends these observations by showing that the defective IFN- γ production of BN CD8 T cells is genetically controlled by the 117 Kb interval of the chromosome 9. In addition, it demonstrates that the CD8 T cell compartment directs the susceptibility to develop an IgE response under HgCl₂ treatment but has not effect on other HgCl₂-induced immunological disorders such as the production of auto-antibodies and the development of glomerulonephritis and ANCA-associated tissue lesions. In agreement, studies in mice have shown that, under HgCl₂ exposure, the effector mechanisms involved in IgE response and glomerulonephritis are different (32). Numerous studies demonstrate that CD8 T cells down-regulate Th2-mediated immune responses via the secretion of IFN- γ (32-37). Whether neutralization of IFN- γ in our resistant congenic lines results also in an increased IgE response under HgCl₂ treatment remains to be determined.

The contribution of CD8 T cells in the development of heavy metals-induced

immunological disorders has been previously investigated in the susceptible BN and in the resistant LEW rats. The CD8 depletion in BN rats did not modify the induction phase of HgCl₂-induced IgE response (38). In contrast, CD8 T cells play a role during the recovery phase. Indeed, BN rats spontaneously recover from the disease even if mercury treatment is pursued. CD8⁺ T cells able to inhibit the proliferation of autoreactive T cells are present during the recovery phase (39) and their transfer into naïve rats confers protection to mercury (40). In addition, *in vivo* induction of neonatal tolerance to heavy metals was shown to suppress Th2-mediated immune responses via generation of a CD8 T cells-mediated regulatory response (41). In the LEW rat, the absence of IgE response to mercury is associated with a CD8-dependent state of immunosuppression (15) that is able to counteract the susceptibility to autoimmune diseases (12, 42). The absence of IgE response in the CD8 depleted LEW rats under HgCl₂ treatment (38) is likely due to the non-permissive genetic background of the LEW strain.

The role of CD8 T cells in atopy and allergic airway diseases is controversial. Several experimental studies support a beneficial effect. In experimental models of airway sensitization, CD8 T cells have been found to suppress IgE production and normalize airway responsiveness (43). Accordingly, antibody-mediated CD8 depletion results in airway hyperactivity and eosinophilia, two asthmatic hallmarks (44, 45). By contrast, under other experimental conditions CD8 T cells can enhance allergen-mediated immune responses, favouring the development of airway inflammation (46, 47). It is known that CD8 T cells have the potential to produce a wide array of cytokines and distinct subsets of CD8 T cells have been described in mice (48, 49), rats (50) and humans (51). Therefore, these apparent discrepancies could be explained by differential cytokine production by CD8 T cells that have been shown to play an important role in regulating the nature of an immune response.

The identified 117 kb locus that controls the heavy metal-induced immune diseases

includes only four genes. These genes do not show any difference in mRNA expression (data not shown). The BN and LEW exons of these 4 genes have been sequenced. No non-synonymous polymorphism has been found in *Gpr120* and *Trip10* while SNPs coding for amino acid substitutions were found in exon 32 of *C3* and exon 1 of *Vav1* (table 2). *C3* is of critical importance for B cell activation, T cell-dependent antibody response and tolerance to self antigens (52-54). While depletion of complement by cobra venom factor did not play a major role in the mercury-induced glomerulonephritis (55), its role in promoting Th2 effector functions, particularly IgE response in asthma has been described (56). The other candidate gene is the Rho guanine nucleotide exchange factor *Vav1* that plays a key role in T and B cell activation and differentiation (57). Moreover, *Vav1* has been shown to influence Th2 differentiation through cMaf and IL-4 expression (58). To our knowledge, the human genome wide association studies that have been performed until now have not identified *C3* or *Vav1* as genes of susceptibility to atopy or allergy. Thus association studies need to be performed to investigate the involvement of these genes.

In conclusion, this study illustrates the usefulness of the BN-LEW rat model to decipher the genetic control and the cellular bases of atopy. It points to the possible role of the *C3* and/or *Vav1* pathways in allergic diseases, which must be challenged in association studies in patients suffering from allergic diseases. Results from these studies should provide the bases for genetic and biochemical markers and for the development of new therapeutic approaches in allergic diseases.

REFERENCES

1. Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega Martell, J. A., Platts-Mills, T. A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P. & Williams, H. C. (2004) *J Allergy Clin Immunol* **113**, 832-6.

2. Cookson, W. O. & Moffatt, M. F. (2000) *Hum Mol Genet* **9**, 2359-64.
3. Lazar, J., Moreno, C., Jacob, H. J. & Kwitek, A. E. (2005) *Genome Res* **15**, 1717-28.
4. Prouvost-Danon, A., Abadie, A., Sapin, C., Bazin, H. & Druet, P. (1981) *J Immunol* **126**, 699-792.
5. Sapin, C., Hirsch, F., Delaporte, J. P., Bazin, H. & Druet, P. (1984) *Immunogenetics* **20**, 227-36.
6. Watanabe, A., Rossi, P., Renzi, P. M., Xu, L. J., Guttman, R. D. & Martin, J. G. (1995) *Am J Respir Crit Care Med* **152**, 64-70.
7. Pelletier, L., Hirsch, F., Rossert, J., Druet, E. & Druet, P. (1987) *Springer Semin Immunopathol* **9**, 359-69.
8. Tournade, H., Guery, J. C., Pasquier, R., Nochy, D., Hinglais, N., Guilbert, B., Druet, P. & Pelletier, L. (1991) *Nephrol Dial Transplant* **6**, 621-30.
9. Bigazzi, P. E. (1994) *Lupus* **3**, 449-53.
10. Tubbs, R. R., Gephardt, G. N., McMahon, J. T., Pohl, M. C., Vidt, D. G., Barenberg, S. A. & Valenzuela, R. (1982) *Am J Clin Pathol* **77**, 409-13.
11. Pelletier, L., Pasquier, R., Hirsch, F., Sapin, C. & Druet, P. (1986) *J Immunol* **137**, 2548-54.
12. Pelletier, L., Rossert, J., Pasquier, R., Villarroja, H., Belair, M. F., Vial, M. C., Oriol, R. & Druet, P. (1988) *Eur J Immunol* **18**, 243-7.
13. Saoudi, A., Castedo, M., Nochy, D., Mandet, C., Pasquier, R., Druet, P. & Pelletier, L. (1995) *Eur J Immunol* **25**, 1972-9.
14. de Vries, J. E., Gauchat, J. F., Aversa, G. G., Punnonen, J., Gascan, H. & Yssel, H. (1991) *Curr Opin Immunol* **3**, 851-8.
15. Pelletier, L., Pasquier, R., Rossert, J. & Druet, P. (1987) *Eur J Immunol* **17**, 49-54.
16. Fournié, G. J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D.,

- Bernard, I., Subra, J.-F., Pelletier, L., Druet, P. & Saoudi, A. (2001) *Immunol. Rev.* **184**, 145-60.
17. Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Pilipenko-Appolinaire, S., Kermarrec, N., Gauguier, D., Druet, P. & Fournie, G. J. (2000) *Eur J Immunol* **30**, 1698-705.
18. Mas, M., Cavailles, P., Colacios, C., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Christen, M. O., Druet, P., Pelletier, L., Gauguier, D. & Fournie, G. J. (2004) *J Immunol* **172**, 6354-61.
19. Druet, E., Sapin, C., Fournie, G., Mandet, C., Gunther, E. & Druet, P. (1982) *Clin Immunol Immunopathol* **25**, 203-12.
20. Sapin, C., Druet, E. & Druet, P. (1977) *Clin Exp Immunol* **28**, 173-9.
21. Mathieson, P. W., Thiru, S. & Oliveira, D. B. (1992) *Lab Invest* **67**, 121-9.
22. Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C. & Goverman, J. (2001) *J Exp Med* **194**, 669-76.
23. Liblau, R. S., Wong, F. S., Mars, L. T. & Santamaria, P. (2002) *Immunity* **17**, 1-6.
24. Kemeny, D. M., Noble, A., Holmes, B. J. & Diaz-Sanchez, D. (1994) *Immunol Today* **15**, 107-10.
25. Fowler, D. H., Breglio, J., Nagel, G., Eckhaus, M. A. & Gress, R. E. (1996) *J Immunol* **157**, 4811-21.
26. Martin, P. J. (1993) *J Exp Med* **178**, 703-12.
27. Cerwenka, A., Morgan, T. M., Harmsen, A. G. & Dutton, R. W. (1999) *J Exp Med* **189**, 423-34.
28. van Lier, R. A., ten Berge, I. J. & Gamadia, L. E. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**, 931-9.
29. Dobrzanski, M. J., Reome, J. B. & Dutton, R. W. (1999) *J Immunol* **162**, 6671-80.
30. Valmori, D., Scheibenbogen, C., Dutoit, V., Nagorsen, D., Asemissen, A. M., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Guillaume, P., Romero, P., Schadendorf, D., Lipp, M., Dietrich, P. Y., Thiel, E., Cerottini, J. C., Lienard, D. & Keilholz, U. (2002) *Cancer Res* **62**, 1743-50.

31. Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., Xystrakis, E., Fournie, E., van Breda Vriesman, P., Druet, P. & Saoudi, A. (2002) *J Immunol* **168**, 162-70.
32. Doth, M., Fricke, M., Nicoletti, F., Garotta, G., Van Velthuysen, M. L., Bruijn, J. A. & Gleichmann, E. (1997) *Clin Exp Immunol* **109**, 149-56.
33. Holmes, B. J., MacAry, P. A., Noble, A. & Kemeny, D. M. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 2657-65.
34. Hussell, T., Baldwin, C. J., O'Garra, A. & Openshaw, P. J. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 3341-9.
35. Noble, A., Staynov, D. Z., Diaz-Sanchez, D., Lee, T. H. & Kemeny, D. M. (1993) *Immunology* **80**, 326-9.
36. Savignac, M., Badou, A., Delmas, C., Subra, J. F., De Cramer, S., Paulet, P., Cassar, G., Druet, P., Saoudi, A. & Pelletier, L. (2001) *Eur J Immunol* **31**, 2266-76.
37. Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. (1997) *J Exp Med* **186**, 421-32.
38. Pelletier, L., Rossert, J., Pasquier, R., Vial, M. C. & Druet, P. (1990) *Scand J Immunol* **31**, 65-74.
39. Rossert, J., Pelletier, L., Pasquier, R. & Druet, P. (1988) *Eur J Immunol* **18**, 1761-6.
40. Bowman, C., Mason, D. W., Pusey, C. D. & Lockwood, C. M. (1984) *Eur J Immunol* **14**, 464-70.
41. Field, A. C., Caccavelli, L., Bloch, M. F. & Bellon, B. (2003) *J Immunol* **170**, 2508-15.
42. Pelletier, L., Galceran, M., Pasquier, R., Ronco, P., Verroust, P., Bariety, J. & Druet, P. (1987) *Kidney Int* **32**, 227-32.
43. Renz, H., Lack, G., Saloga, J., Schwinzer, R., Bradley, K., Loader, J., Kupfer, A., Larsen, G. L. & Gelfand, E. W. (1994) *J Immunol* **152**, 351-60.
44. Huang, T. J., MacAry, P. A., Kemeny, D. M. & Chung, K. F. (1999) *Immunology* **96**, 416-23.

45. Olivenstein, R., Renzi, P. M., Yang, J. P., Rossi, P., Laberge, S., Waserman, S. & Martin, J. G. (1993) *J Clin Invest* **92**, 1477-82.
46. Hamelmann, E., Oshiba, A., Paluh, J., Bradley, K., Loader, J., Potter, T. A., Larsen, G. L. & Gelfand, E. W. (1996) *J Exp Med* **183**, 1719-29.
47. Schwarze, J., Cieslewicz, G., Joetham, A., Ikemura, T., Hamelmann, E. & Gelfand, E. W. (1999) *J Immunol* **162**, 4207-11.
48. Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. & Dutton, R. W. (1994) *J Exp Med* **180**, 1715-28.
49. Sad, S., Marcotte, R. & Mosmann, T. R. (1995) *Immunity* **2**, 271-9.
50. Noble, A., Macary, P. A. & Kemeny, D. M. (1995) *J Immunol* **155**, 2928-37.
51. Salgame, P., Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R. L. & Bloom, B. R. (1991) *Science* **254**, 279-82.
52. Peng, Q., Li, K., Patel, H., Sacks, S. H. & Zhou, W. (2006) *J Immunol* **176**, 3330-41.
53. Rickert, R. C. (2005) *Curr Opin Immunol* **17**, 237-43.
54. Sohn, J. H., Bora, P. S., Suk, H. J., Molina, H., Kaplan, H. J. & Bora, N. S. (2003) *Nat Med* **9**, 206-12.
55. Capron, M., Bascou, C., Vial, M. C., Grossetete, J., Hinglais, N., Girard, J. F. & Druet, P. (1982) *Clin Exp Immunol* **49**, 611-7.
56. Drouin, S. M., Corry, D. B., Kildsgaard, J. & Wetsel, R. A. (2001) *J Immunol* **167**, 4141-5.
57. Tybulewicz, V. L., Ardouin, L., Prisco, A. & Reynolds, L. F. (2003) *Immunol Rev* **192**, 42-52.
58. Tanaka, Y., So, T., Lebedeva, S., Croft, M. & Altman, A. (2005) *Blood* **106**, 1286-95.
59. Druet, E., Praddaude, F., Druet, P. & Dietrich, G. (1998) *Eur J Immunol* **28**, 183-92.
60. Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T. & Hunig, T. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 239-47.

Acknowledgements

OP was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), CC by grants from the Société de Néphrologie and from ARSEP (Association de Recherche sur la Sclérose En Plaques). This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Association Arthritis Fondation Courtin, Agence Nationale de Recherche (ANR-06-MIME-O20-01) and Hôpitaux de Toulouse. Creation of congenic lines and sub-lines benefited from grants of the Genopole® Midi-Pyrénées and Association de Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP).

The authors thank the staff of the Zootechnic unit for careful handling and breeding of the rats, and the staff of the flow cytometric platform at the Institut Fédératif de Recherche 150 and the staff of the Genotoul anexplo platform at the Toulouse Genopole® for their help in cellular immunological investigations.

The authors have no conflicting financial interests.

Rats, Materials and Methods

Rats

The rats were kept in a 12-h light/dark cycle, in polystyrene cages containing cottonwood bedding characterized by low dust content, with free access to water and standard rodent chow and under specific pathogen-free conditions. The rats used in this study were males or females 7-13 weeks old at the start of the experiment. All breeding and experimental procedures were carried out in accordance with European Union guidelines and were approved by our local ethical committees.

Specific pathogen free (SPF) BN rats were obtained from Centre d'élevage R. Janvier (Le Genest St.Isle, France). The BN.LEWc9 congenic lines were produced as described (18) To produce congenic sub-lines, F1 hybrids, made by crossing the congenic line to the recipient strain, were backcrossed to the recipient strain. Litter mates issued from these backcrosses characterized by recombination events within the *Iresp3* locus were selected by genotyping using a set of polymorphic microsatellite markers. The sequences of the forward and reverse primers of the microsatellite markers that define the congenic lines and sub-lines (see table 1) are the following: D9Wox24: cctgggaatttcattcttgg; agctgtcctctgacctcaca. D9Cel5: tgctgccactttgtgtg; tttgagctggtaaggcata. D9Cel13: cacctccacaggtgcttcacacat; gtgtgggtgttttccagcctact. D9Cel1: tggtagatcggtgatctgaggaa; gggcagaggtagtctcagtcaatg. D9Cel9: tgatcatcagaccatttgtgtgtg; acctgcaagtgagtgatagactct; D9Got5: cctggagggaagtaataca; attctggctcctctgtccc. Preparation of genomic DNA and genotyping were performed as described (18). The selected recombinant rats were then backcrossed to the recipient strain. Males and females rats issued from this backcross, heterozygous for the reduced introgressed region were intercrossed to fix the recombinant chromosome in the homozygous state. Rats issued from this intercross, homozygous for the region, were selected for brother-x-sister mating and foundation of the new congenic sub-line.

Treatment:

Rats were injected s.c with Atps (Allochrysine, Solvay Pharma) at 20 mg/kg body weight or with HgCl₂ (Sigma) at 0.5 mg/kg body weight, three times a wk for 5 wk. Rats were weighed and bled retro-orbitally under anesthesia before the first injection, then once a week until sacrifice. Night urine samples were collected in metabolic cages on days 13, 20, 27 after the beginning of the injections. For CD8 T cell depletion, rats were weekly i.p injected with OX8 mAb (0.5 mg/injection). The efficiency of depletion was verified by analyzing PBMC by flow cytometry; less than 1% of CD8 T cells were detected in OX8-treated animals.

Antibodies.

The mAbs used for flow cytometry and for purification and activation of T cell subpopulations were as follows: W3/25 (anti-rat CD4), OX6 (anti-rat MHC class II), OX33 (anti-rat B220) OX8 (anti-rat CD8 α), OX21 (anti-human C3b inactivator), R73 (anti-rat TCR), V65 (anti-rat TCR $\gamma\delta$), JJ319 (anti-rat CD28), 341 (anti-rat CD8), and 3.2.3 (anti-rat NKR-P1). The hybridomas OX6, OX8, were kindly provided by Dr. D. Mason (Medical Research Council Cellular Immunology Unit, Oxford, U.K.) and the hybridomas JJ319, V65, and R73 by Dr. T. Hünig (Virology and Immunology Institute, Würzburg, Germany). The conjugated anti-rat mAbs used for flow cytometry were: FITC-conjugated 3.4.1, PE-conjugated R73 (BD Pharmingen) and APC-conjugated W3.25. For ELISA we used MARE (LO-IMEX), MARG1 (LO-IMEX). We used MARK-PO (LO-IMEX) as secondary. ab. For immunofluorescence studies we used anti-C3 complement rat antibody (12E2, ABBIOTEC), anti rat IgG-FITC (BETHYL) and anti-mouse Alexa 488 (RFE)

ELISA.

Enzyme immunoassays used to measured serum concentration of IgE, IgG1, anti-laminin and anti-DNA were performed as described (Druet et al, EJI 1998).

Albuminuria was measured on urine samples collected overnight in metabolic cages on days 13, 20 and 27 using a competitive ELISA. Microtiter plates (Falcon 3912 MicroTest III™, Becton Dickinson) were coated 2h at 37°C with mouse albumin (A3139, Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau-Chesnes, France ; 2µg/ml in carbonate buffer 0.05M pH 9.6), then treated 1h at 37°C with PBS containing 0.1% casein (PBSC). Urine samples or standards (1/10 final dilution) were pre-incubated 2h at 37°C with a rabbit anti-mouse albumin antiserum (Cappel, diluted 1/5000 in PBSC). These mixtures of urine and anti-albumin were then incubated in coated plates for 1 h at 37°C. After washings (PBS-Tween 20), bound anti-mouse albumin antibodies were revealed using a peroxylase labelled anti-rabbit IgG antibody (Jackson). Signal was revealed as described (59).

Histological and immunohistochemical analysis.

Lung and kidney biopsies were fixed them for 24h in formalin, dehydrated them for 24 h in 70% ethanol and embedded in paraffin. Paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin- eosin and examined by light microscopy. Lung lesions were assessed microscopically and their severity, *ie.* extent, was graded by evaluating the surface of the sections occupied by pathological changes. For that purpose the entire sections were scanned using the x 2.5 objective using a Zeiss microscope equipped with a Sony CCD digitization video camera generating from 10 to 16 computerized images per section, on which the % occupied by pathological changes was recorded and for each lung the pathological grade was expressed as the mean %. For immunohistochemical analysis, we prepared snap-frozen-4 microm section 4-mum sections and investigated their reactivity to various antibodies. For ANCA detection, sera from HgCl₂-injected rats were incubated on optimizes preparation of human neutrophils fixed in formalin (BMD). Bound antibodies were detected by incubation of the substrate with FITC-labeled anti-rat IgG.

Purification f CD4 and CD8 T cells.

Spleen cells were teased apart in RPMI (Sigma). The erythrocytes were lysed with NH₄Cl buffer (0.155 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4), and the cells were washed twice. T cells were negatively selected from spleen cells using anti-mouse IgG magnetic microbeads (Dyna, Oslo, Norway). Briefly, cells were washed and incubated 30 min on ice with a mixture of the following mAbs: OX6, OX33, 3.2.3, and V65. After washing and incubating with anti-mouse IgG-coupled microbeads under agitation, T cells were purified by magnetic depletion. The purity of the negatively selected cells was controlled by flow cytometric analysis using triple staining with 3.4.1-FITC, R73-PE, and biotinylated W3/25-APC (85-90%). For CD4 and CD8 T cell purification, total T cells negatively selected were stained with R-73-PE, W3-25-APC 3.4.1-FITC and separated on a Coulter cell sorter (Epics Altra; Beckman-Coulter, Fullerton, CA). The purity of sorted CD4 and CD8 T cell subsets was more than 98 %.

T cell stimulation.

The culture medium was RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) containing 10% FCS, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, and 2×10^{-5} M 2-ME. For cytokine profile studies, purified CD4 and CD8 T cell subsets were polyclonally stimulated using anti-TCR and anti-CD28 mAbs. For polyclonal activation, 1×10^5 CD4 or CD8 T cells were incubated with plate-bound anti-TCR mAb and soluble anti-CD28 mAb as already described (60).

Flow cytometry analysis.

For immunofluorescence staining, 10^6 cells were incubated in PBS containing 3% fetal calf serum (FCS) with mAbs for 20 min at 4°C. Data were collected on a FACS-Calibur (BD Biosciences) cytometer using the CELLQuest™ software (BD Biosciences) for analysis.

Cytokine production.

After 48h of culture supernatants were removed and stored at -20°C for cytokine

determination. We used the rat cytokine/ chemokine panel multiplex (MILLIPORE) on a Luminex 100 IS System. The cytokines investigated in the panel are: IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α .

Data analyses

Differences between groups were studied using the Mann-Whitney's non-parametric test.

Legends to figures

Figure 1. Genetic dissection of the *Iresp3* locus using sub-congenic lines.

Rats were injected sub-cutaneously three times a week with aurothiopropanol sulfonate (atps) at 20mg/kg or mercuric chloride at 0.5mg/kg. **a,b:** IgE concentrations in BN (n=4), LEW (n=4) and BN.LEWc9-B congenic rats (n=4) treated with atps (a) or HgCl₂ (b). **c,d:** IgE concentrations in five BN.LEWc9 congenic sub-lines (n≥4) treated with atps (c) or HgCl₂ (d); the genetic maps of these congenic sub-lines are drawn schematically in e and f and are given in Table 1. **e,f:** IgE concentrations at the peak of the response to atps at day 7 (e) and to HgCl₂ at day 14 (f), according to the genetic map of the congenics. Columns: black = BN genome; white = LEW genome; grey: undertermined genomic origin. On the left are indicated the microsatellite markers that define the congenic lines sub-lines as indicated in table 1.

Figure 2. BN.LEWc9-Bf congenic rats are protected from the anti-laminin-associated glomerulonephritis.

BN (n=4-9) and BN.LEWc9-Bf (n=4-8) rats were injected sub-cutaneously three times a week with mercuric chloride at 0.5mg/kg. **a:** histopathological features in glomeruli at day 28; upper part, staining for IgG deposits; middle part, staining for C3 deposits; lower part, hemoxylin-eosin staining. **b :** albuminuria at day 28. **c:** C3 concentrations at day 14. **d:** anti-laminin antibody at day 14 (A.U.: arbitrary units). **e:** anti-DNA antibody at day 14 (A.U.: arbitrary units). Each symbol represents the value obtained in one rat. Closed lozenges: BN rats; open circles: BN.LEWc9-Bf rats;

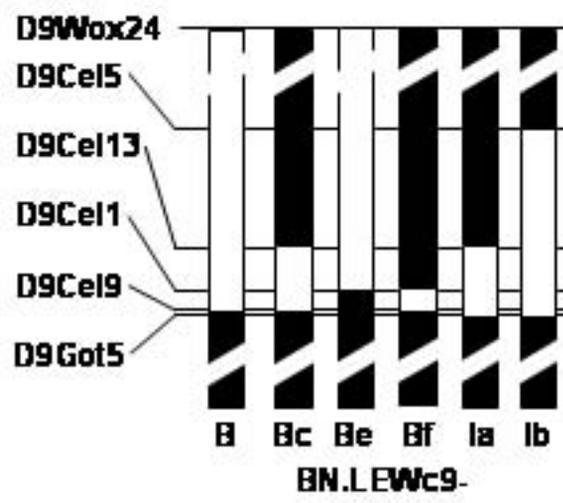
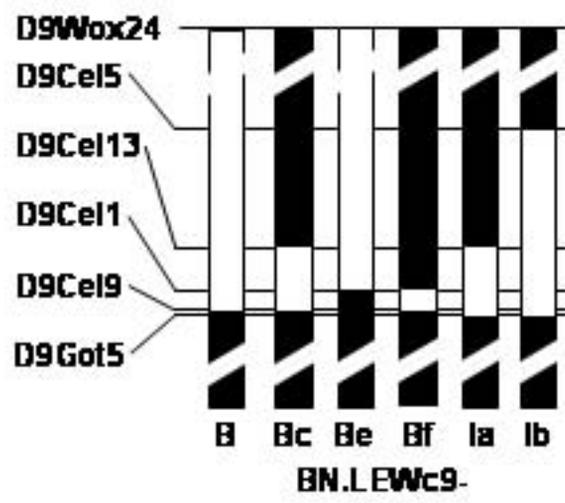
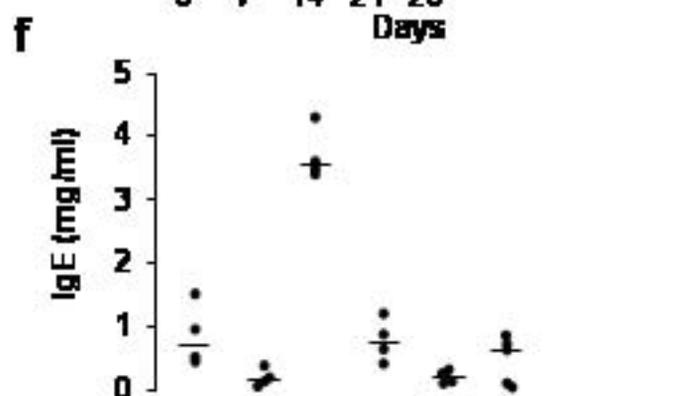
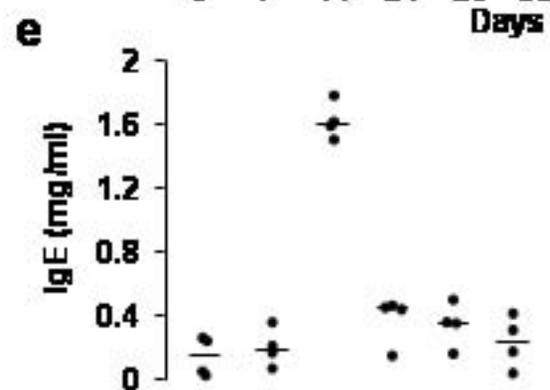
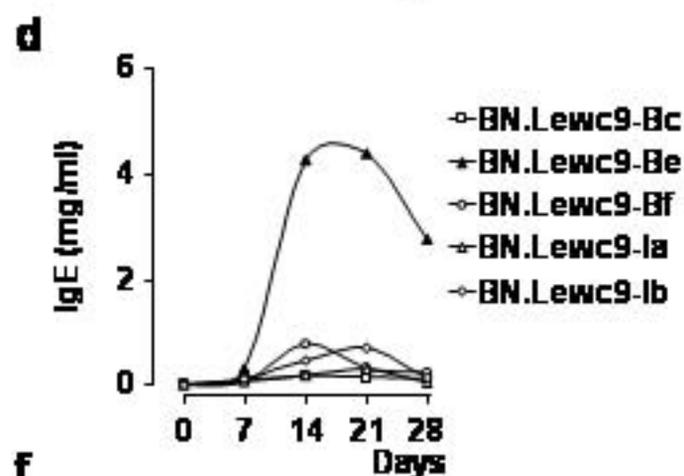
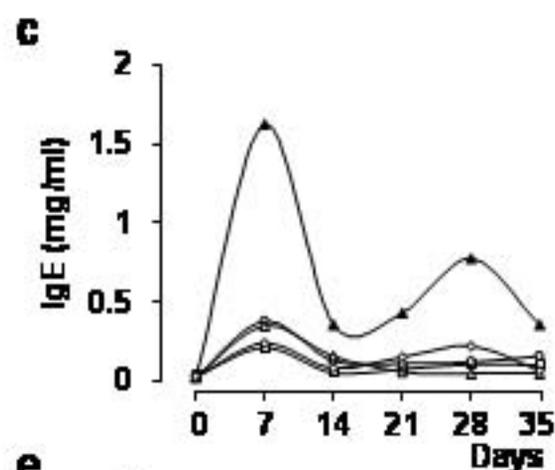
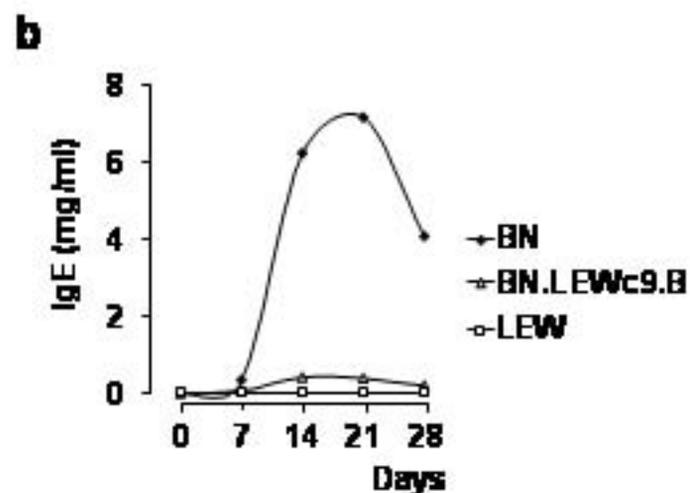
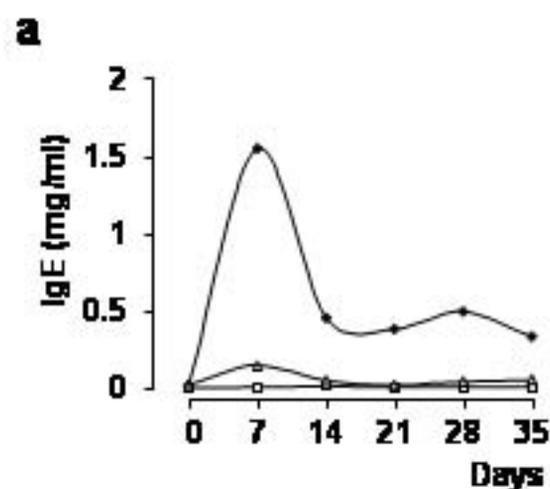
Figure 3. BN.LEWc9-Bf congenic rats are protected from the anti-neutrophilic cytoplamic antibody-associated lung tissue lesions.

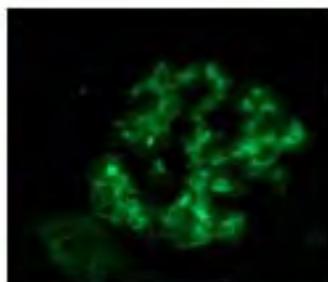
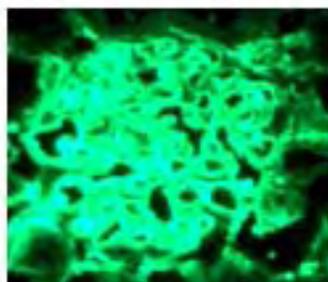
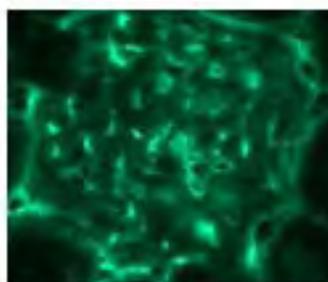
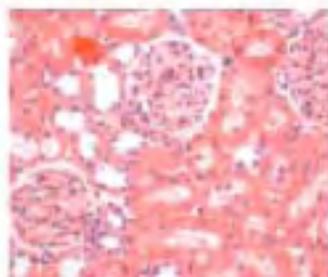
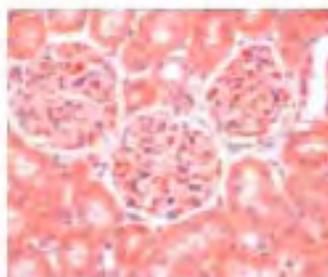
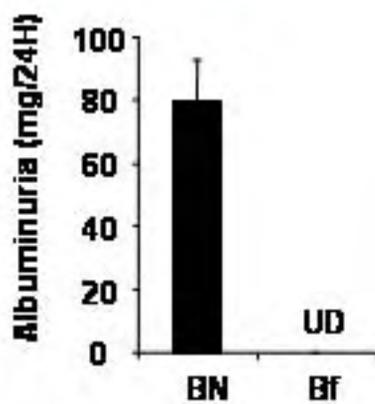
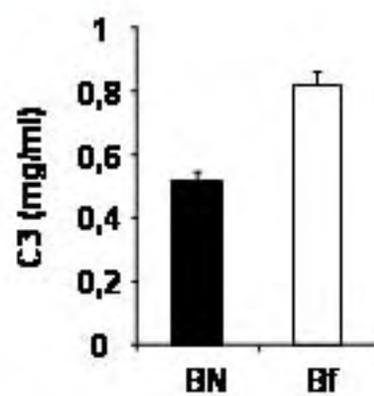
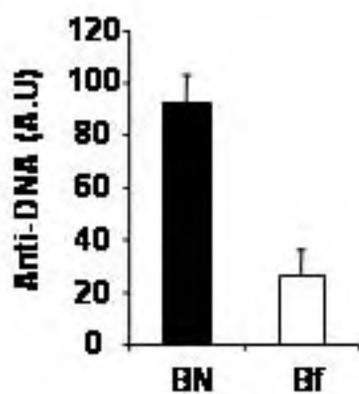
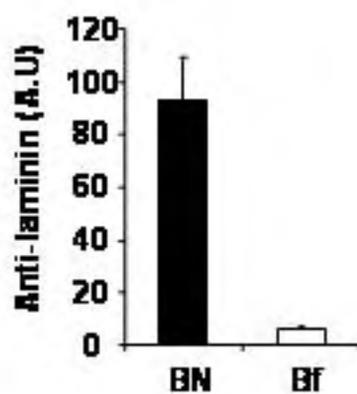
BN (n=6) and BN.LEWc9-Bf (n=5) congenic rats were injected sub-cutaneously three times a

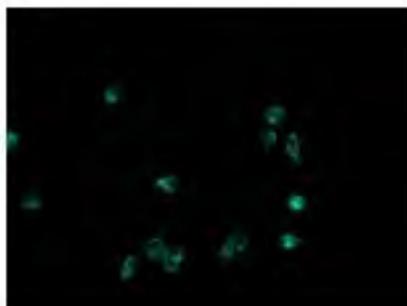
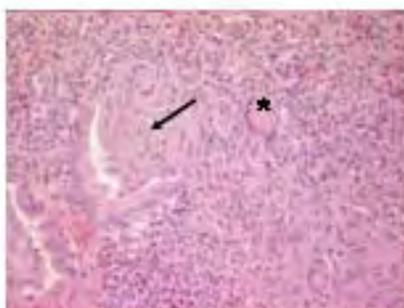
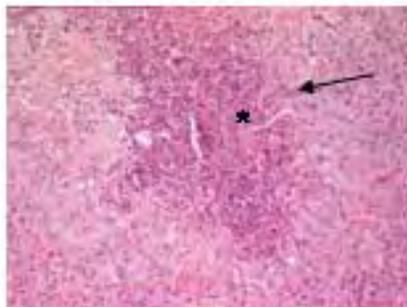
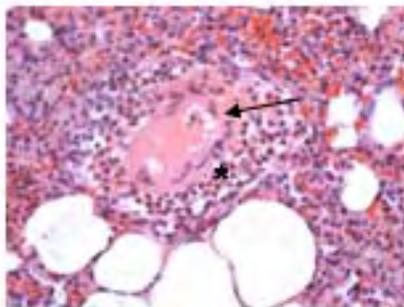
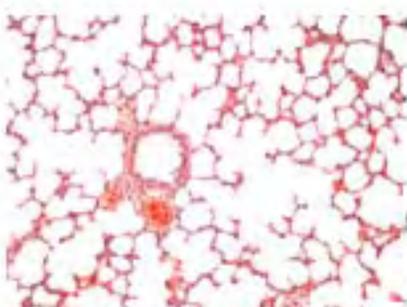
week with mercuric chloride at 0.5mg/kg. **a**: detection of ANCA Ab in serum from BN rats collected at day 14 after the beginning of the HgCl₂ injections on ; **b**: absence of ANCA Ab in serum from BN.LEWc9-Bf rats in the same experimental conditions.; **c, d, e, f, g**: panel of illustrationzs of lung lesions observed at day 14 in HgCl₂-treated BN rats (HE staining; 20X) : **c**: peri-bronchial (B) and vascular (V) infiltration by eosinophils; **d**: epithelioid and giant cells granuloma involving an airway wall associated to eosinophils; **e**: microabcess-like lesion within the granulomatous pneumonia (*); **f**: arterial angeitis lesions (arrow) with eosinophilic infiltrate (*); **g**: absence of lung lesions in BN.LEWc9-Bf rats in the same experimental conditions (HE staining ; 10X)

Figure 4. Depletion of the CD8 population under mercury-treatment, restores the IgE response of the BN.LEWc9-Bf congenic rats IgE but does not unlock the autoantibody induction.

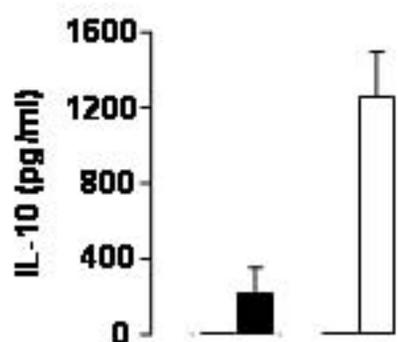
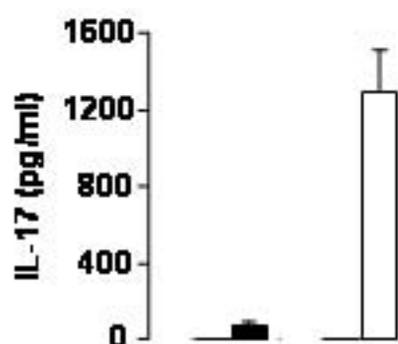
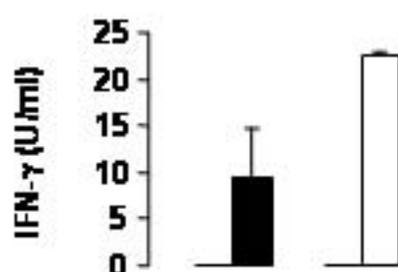
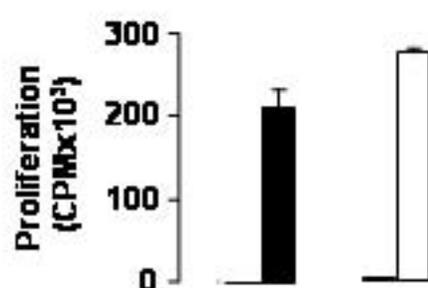
a: IgE response in HgCl₂-injected BN.LEWc9-Bf rats treated (closed squares) or not (open lozenges; PBS) with depleting anti-CD8 Ab (OX8). Symbols represent the mean values (OX8: n=4; PBS: n=5) **b,c**: anti-DNA (b) and anti-laminin Ab in in HgCl₂-injected BN.LEWc9-Bf rats treated (closed squares) or not (open lozenges; PBS) with depleting anti-CD8 Ab. (OX8). Symbols represent individual values and horizontal bars the medians. In each case, on the left, the closed lozenge with the horizontal bar shows the value found in one control HgCl₂-injected BN rat.



a**IgG deposit****C3 deposit****H&E****BN****BF****b****c****d****e**

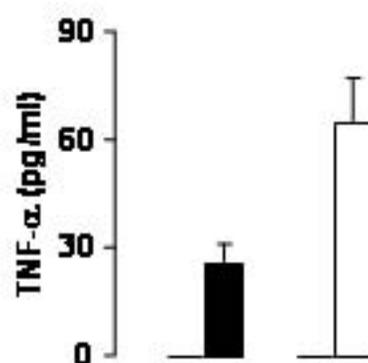
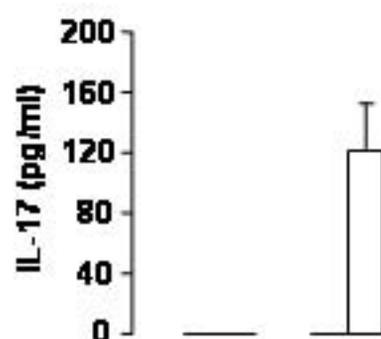
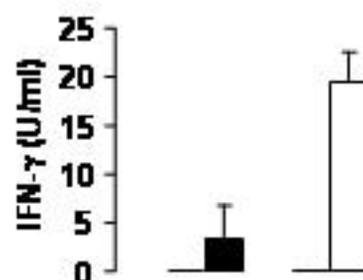
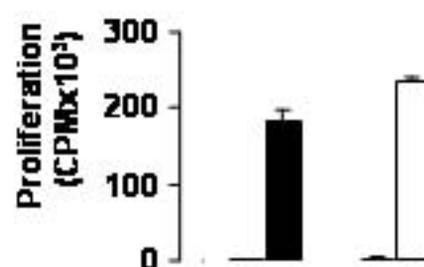
a**b****c****d****e****f****g**

CD4 T cell



Anti-TCR	+	+	+	+
Anti-CD28	-	+	-	+

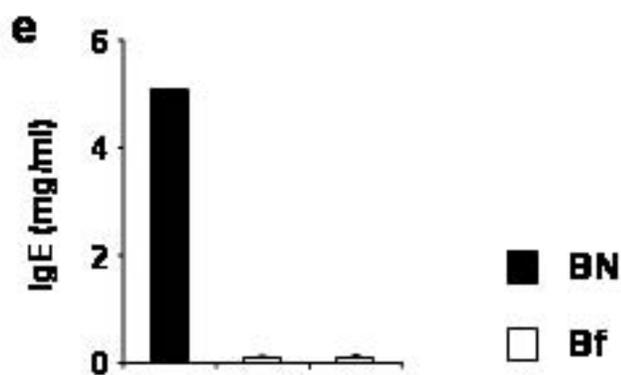
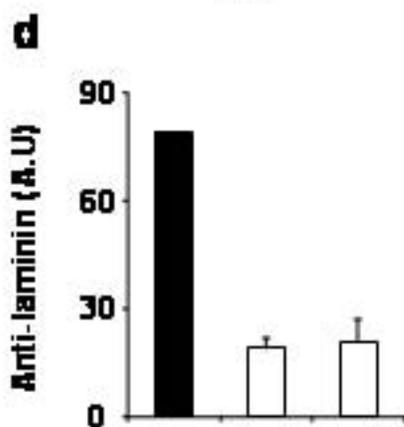
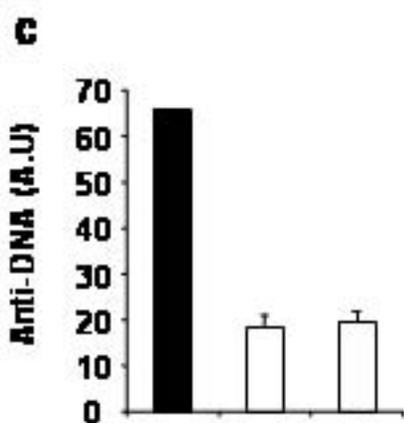
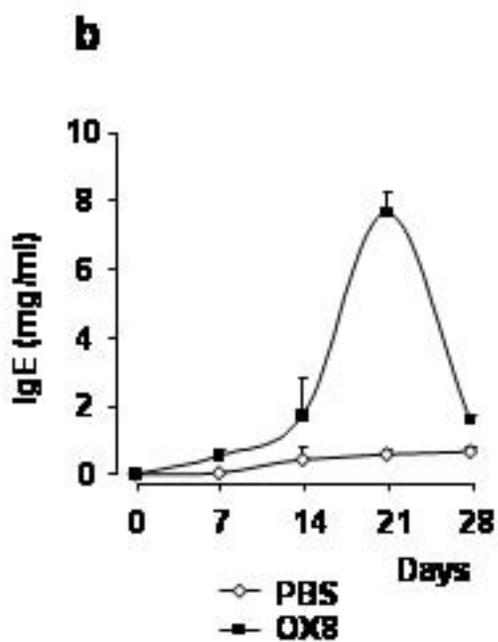
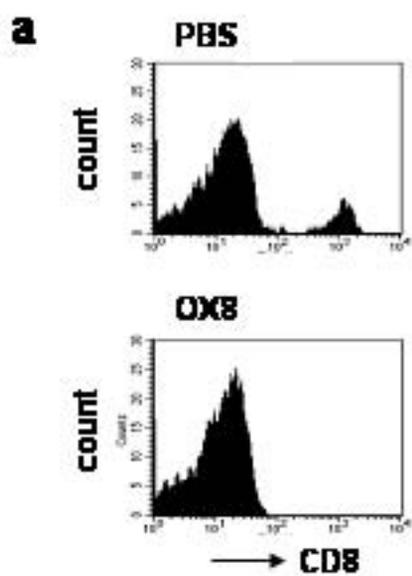
CD8 T cell



Anti-TCR	+	+	+	+
Anti-CD28	-	+	-	+

■ BN

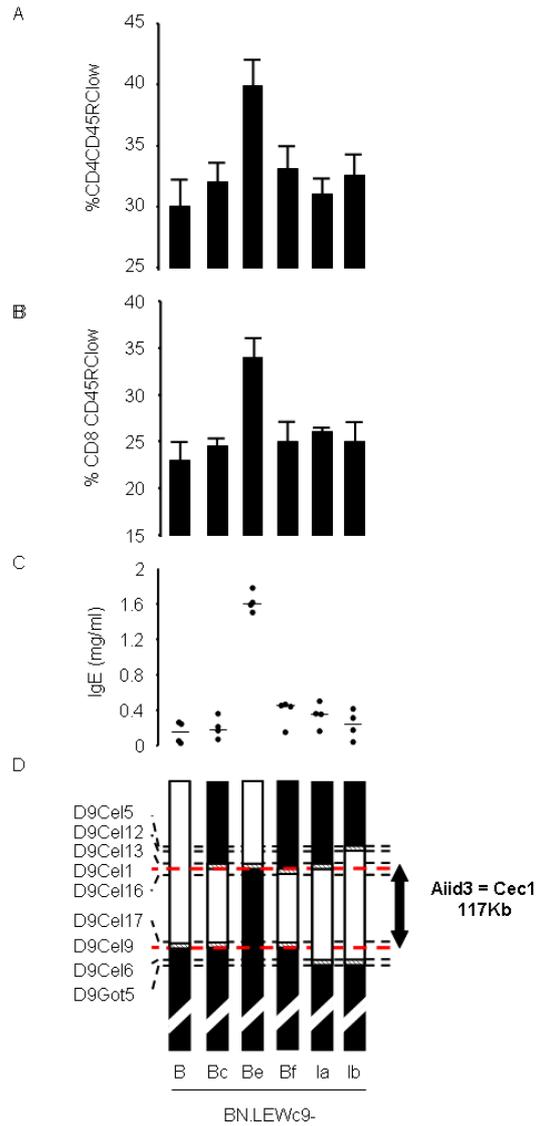
□ Bf



Colocalisation du locus *Aiid3* qui contrôle la susceptibilité aux maladies induites par les sels de métaux lourds et du locus *Cec1* qui détermine l'équilibre des sous populations lymphocytaires T CD45RC^{high} et CD45RC^{low}

Le niveau d'expression de l'isoforme RC de la phosphatase CD45 sur les populations lymphocytaires T permet de définir deux sous-populations au sein des cellules T CD8 et T CD4. Les cellules exprimant fortement cet isoforme sont appelés CD45RC^{high} et celles l'exprimant faiblement CD45RC^{low}. Ces sous-populations présentent des propriétés fonctionnelles différentes et des capacités d'inter-régulation. Le rapport quantitatif entre les deux sous-populations est un facteur génétiquement contrôlé qui caractérise les souches de rats de laboratoire. Chez le rat BN, susceptible aux maladies induites par les sels de métaux lourds, les sous-populations T CD4 et CD8 CD45RC^{low} sont surreprésentées par rapport au rat LEW résistant à ces pathologies. Nous avons émis l'hypothèse que le rapport entre les sous-populations est à la fois un marqueur et un agent causal des différences de susceptibilité aux désordres immunopathologiques.

Dans ce travail, à l'aide des lignées sous-congéniques qui nous ont permis de localiser précisément la région *Aiid3* qui détermine la susceptibilité des rats aux maladies induites par les sels de métaux lourds, nous montrons une co-localisation du locus *Cec1* qui détermine le rapport entre les sous-populations CD45RC^{high} et CD45RC^{low}. Ces données génétiques renforcent notre hypothèse. Elles fournissent des informations précieuses pour des travaux chez l'homme où le niveau d'expression de la molécule CD45RC sur les populations lymphocytaires a été associé au développement des vascularites à ANCA (Ordonez et al., 2009).



Dissection génétique des locus *Cec1* et *Aiid3* à l'aide des sous lignées congéniques de fond génétique BN

Proportion des cellules T CD4 CD45RC^{low} (A) et CD8 CD45RC^{low} (B) du sang dans la lignée congénique BN.LEWc9-B et les sous lignées congéniques BN.LEWc9-BC, Be, Bf, Ia et Ib. Après prélèvement retro-orbital et isolation sur gradient de ficoll, les cellules mononuclées sanguines ont été analysé par cytométrie en flux à l'aide des anticorps R-73 (anti-TCR α), W3-25 (anti-CD4), OX-8 (anti-CD8) et OX22 (anti-CD45RC). (C) Concentrations sériques d'IgE après 3 injections de sels d'or (J7) dans les sous lignées et lignées congéniques. (D) Carte génétiques des différentes lignées étudiées. Les colonnes noires, blanches et hachurées représentent respectivement les régions génomiques d'origine BN, LEW et les zones d'incertitudes entre les marqueurs bornes. L'analyse des différents génotypes et des phénotypes indique une colocalisation entre la région contrôlant le rapport entre les sous populations lymphocytaires CD45RC^{low} et CD45RC^{high} et celle contrôlant la réponse IgE aux sels de métaux lourds.

ARTICLES 2 et 3 : Contrôle génétique de la susceptibilité du rat à l'infection par le parasite *T.gondii*

L'ensemble de ces travaux correspond à la découverte du locus *Toxo1* contrôlant la résistance du rat LEW à l'infection par le parasite *Toxoplasma gondii*. De façon unique, cette souche de rat est capable d'éliminer le parasite avant sa dissémination dans le système nerveux central. La région génétique qui détermine la susceptibilité à l'infection *in vivo* est associée à la capacité des macrophages à permettre la réplication intracellulaire des parasites.

Nos études fonctionnelles ont montré que le contrôle de la prolifération parasitaire dans les macrophages est associé à la mort des cellules hôtes. Un tel mécanisme n'est pas observé dans des fibroblastes infectés. La mort des macrophages infectés qui sont normalement connus pour permettre la dissémination des parasites dans l'organisme fournit une hypothèse attractive pour expliquer la résistance complète du rat LEW à l'infection toxoplasmique.

Le travail de dissection génétique du locus à l'aide de sous-lignées congéniques nous a permis d'effectuer une localisation du ou des gènes de contrôle dans une région de 1.09 MB du chromosome 10. Ces résultats nous ont conduit à proposer deux gènes candidats majeurs pour expliquer les phénotypes *Alox15* et *Nalp1*. L'ensemble de ces travaux sert de base pour étudier le contrôle génétique de la susceptibilité à la toxoplasmose congénitale chez l'homme. Ils pointent également un rôle possible des récepteurs NLR dans la réponse aux infections parasitaires.

The rat *Toxo1* locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms

Pierre Cavallès^{a,b,c,d}, Véronique Sergent^{d,e,f}, Cordelia Bisanz^e, Olivier Papapietro^{a,b,c}, Céline Colacios^{a,b,c}, Magali Mas^{a,b,c,g}, Jean-François Subra^{a,b,c,h}, Dominique Lagrange^{a,b,c}, Maryline Caliseⁱ, Sylvie Appolinaireⁱ, Thomas Faraut^j, Philippe Druet^{a,b,c}, Abdelhadi Saoudi^{a,b,c}, Marie-Hélène Bessieres^k, Bernard Pipy^k, Marie-France Cesbron-Delauw^{e,l}, and Gilbert J. Fournié^{a,b,c,l,m}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Département de Génétique, Inserm U.563, Toulouse F-31300 France; ^bUniversité Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400 France; ^cInstitut Fédératif de Recherche 30 Hôpital Purpan, 31059 Toulouse, France; ^dCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5163, Institut Jean Roget, Université Joseph Fourier, F-38700 Grenoble, France; ^eService de Zootechnie, Institut Fédératif de Recherche 30, Hôpital Purpan, Toulouse, France; ^fInstitut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Génétique Cellulaire, F-31326 Castanet-Tolosan, France; and ^gEquipe d'Accueil 2405, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Fédératif de Recherche 31, Hôpital Rangueil, F-31059 Toulouse, France

Edited by John J. Mekalanos, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved November 15, 2005 (received for review August 5, 2005)

Toxoplasmosis is a healthcare problem in pregnant women and immunocompromised patients. Like humans, rats usually develop a subclinical chronic infection. LEW rats exhibit total resistance to *Toxoplasma gondii* infection, which is expressed in a dominant mode. A genome-wide search carried out in a cohort of F₂ progeny of susceptible BN and resistant LEW rats led to identify on chromosome 10 a major locus of control, which we called *Toxo1*. Using reciprocal BN and LEW lines congenic for chromosome 10 genomic regions from the other strain, *Toxo1* was found to govern the issue of *T. gondii* infection whatever the remaining genome. Analyses of rats characterized by genomic recombination within *Toxo1*, reduced the interval down to a 1.7-cM region syntenic to human 17p13. *In vitro* studies showed that the *Toxo1*-mediated refractoriness to *T. gondii* infection is associated with the ability of the macrophage to impede the proliferation of the parasite within the parasitophorous vacuole. In contrast, proliferation was observed in fibroblasts whatever the genomic origin of *Toxo1*. Furthermore, *ex vivo* studies indicate that macrophage controls parasitic infection spreading by a *Toxo1*-mediated mechanism. This forward genetics approach should ultimately unravel a major pathway of innate resistance to toxoplasmosis and possibly to other apicomplexan parasitic diseases.

The protozoan *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that infects humans and a broad spectrum of vertebrate hosts. It is found worldwide, and the infection is common as indicated by a high prevalence of specific Ab among almost all human populations. *T. gondii* infection occurs by oral ingestion of either cysts from infected animal tissues, or oocysts excreted by cats. In healthy individuals, *T. gondii* establishes a chronic asymptomatic infection characterized by a specific immune response and the encystment of dormant bradyzoites into host tissues. A serious threat to human health can occur under congenital infection or reactivation of a latent infection in immunodeficient patients (1).

Epidemiological studies have indicated that the genetic make-up of the host and of the parasite are involved in the phenotypic expression of toxoplasmosis (2–4). Genetic studies in humans are hampered by both population heterogeneity and environment variability. In experimental conditions, genetic and environmental factors are under control. Results from genetic studies in animal models can be applied to human pathology through comparative genomics (5, 6). Rats, like humans, usually develop subclinical toxoplasmosis (7); this contrasts with the severity of the disease developed in most strains of mice. Surprisingly, the LEW rat strain exhibits a complete resistance to *Toxoplasma* infection (8). Indeed, unlike susceptible BN and

F344 rats, LEW rats do not show trace of parasitic infection as shown by negative serology and lack of brain cysts. F₁ hybrid (LEW × BN) and (LEW × F344) rats are resistant to *T. gondii*, indicating a dominant effect of the involved gene(s) (9). We carried out genetic studies in LEW and BN rats, which are two extreme strains from an immunological point of view (10). Here, we demonstrate that a single chromosomal region of 1.7 cM on chromosome 10 (c10), fully controls the refractoriness of the LEW rat to *T. gondii* infection. *In vitro* and *ex vivo* studies showed that the *Toxo1*-mediated refractoriness of the LEW rat to *T. gondii* infection is associated with the ability of macrophages, to impede the proliferation of the parasite within the parasitophorous vacuole and to control the spreading of the parasitic infection.

Results

Linkage Analysis in (LEW × BN) F₂ Rats Identifies a Locus on Chromosome 10 That Controls *T. gondii* Infection. 107 (LEW × BN) F₂ rats were infected and studied. Anti-*T. gondii* Ab response was observed in 68 rats; it was high in 38 rats (titer $\leq 1/20,000$). Brain cysts were detected in 20 rats. The sex of the rats had no effect on these traits. Linkage analysis identified a single significant (11) locus spanning a 12-cM interval between D10Arb4 and D10Wox24 on c10, we named *Toxo1* (Table 3, which is published as supporting information on the PNAS web site). Segregation of anti-*T. gondii* Ab titers and of brain cyst numbers according to the genotypes of F₂ rats at D10Rat116 are shown in Fig. 1. All rats sharing the two LEW alleles (ll) showed no detectable or a weak anti-*T. gondii* Ab response. Conversely, all rats sharing the two BN alleles (nn) but one had high anti-*T. gondii* Ab titers ($\leq 1/20,000$). An intermediate response was observed in the 50 heterozygous rats (nl). The differences between the groups were significant, thus indicating an additive effect of the gene(s)

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: c10, chromosome 10; SFM, serum-free medium.

^dP.C. and V.S. contributed equally to this work.

^fPresent address: Clinique d'Esquermes, 80 boulevard Montebello, 59000 Lille, France.

^gPresent address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U561, Hôpital Saint Vincent de Paul, 82 Avenue Denfert Rochereau, 75 674 Paris Cedex 14, France.

^hPresent address: Centre Hospitalier et Universitaire Angers, 4 Rue Larrey, 49033 Angers, France.

ⁱM.-F.C.-D. and G.J.F. contributed equally to this work.

^mTo whom correspondence should be addressed. E-mail: gfournie@toulouse.inserm.fr.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

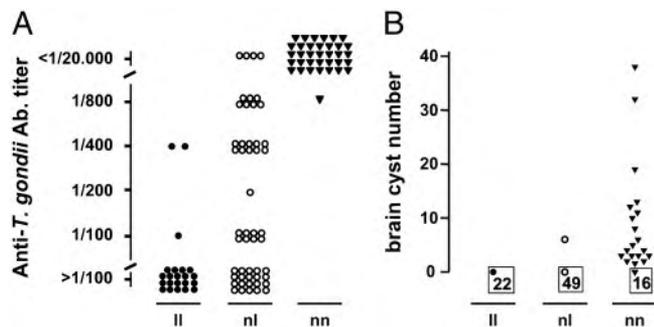


Fig. 1. Susceptibility to *T. gondii* infection in (LEW × BN) F₂ rats according to their genotype at the D10Rat116 microsatellite marker. A total of 107 rats were studied, of which 22 were homozygous LEW (II), 50 were heterozygous BN/LEW (nl), and 35 were homozygous BN (nn). (A) Anti-*T. gondii* Ab titers measured by immunofluorescence. Titers represent the last dilution of the serum at which positive results were observed. Titers >1/100 were considered as negative; titers ≤1/20,000 as strongly positive. II vs. nl, nl vs. nn, nn vs. II: $P < 0.001$. (B) Number of brain cysts. Framed numbers represent the rats that develop no brain cyst. II vs. nn and nl vs. nn, $P < 0.001$.

product(s) on anti-*T. gondii* Ab production. Brain cysts were observed in 19 of the 35 homozygous BN (nn) rats, in only one rat heterozygous BN/LEW (nl), and in none of the 22 homozygous LEW (II). These results indicate that *Toxo1* plays a major role in the control of *T. gondii* infection with a dominant or additive mode of action.

Studies in Reciprocal LEW/BN Congenic Lines Demonstrate That *Toxo1* Fully Controls the Outcome of *T. gondii* Infection. Twelve reciprocal LEW/BN congenic lines, of which nine had a recombination within *Toxo1* or at its boundaries, were studied to confirm and refine the localization of *Toxo1* (Fig. 3, which is published as supporting information on the PNAS web site). Results of genetic dissection of the traits are shown in Table 1. Rats from five LEW.BNc10 congenic lines (lineages B, C, F, G, and I) became susceptible to infection. Conversely, rats from three BN.LEWc10 congenic lines (lineages C, E, and J) became refractory. In the other congenic lines, the introgression of genomic segments from the other strain had no effect on the outcome of infection, compared to the parental strain. These results confirm the presence of *Toxo1* on c10 and pinpoint its localization to an interval of 4.4 cM between D10Rat116 and D10Wox24. Most importantly, these results demonstrate that *Toxo1* fully controls the outcome of *T. gondii* infection. Indeed, infection is hindered by the *Toxo1* LEW allele, even when the rest of the genome belongs to the susceptible BN strain. Conversely, infection does occur when animals are homozygous for the *Toxo1* allele of BN origin, even when the rest of their genome belongs to the refractory LEW strain.

Studies in F₂ (LEW × BN) and Congenic Rats Harboring Recombination Within *Toxo1* Narrow Down the Localization of the Gene(s) to a 1.7-cM Interval. The fact that the gene(s) carried by *Toxo1* control(s) the outcome of *T. gondii* infection independently of the genetic background, made it possible to refine further its localization in F₂ (LEW × BN) rats and in progenies of rats issued from backcrosses of the BN.LEWc10-C line that showed recombination within the locus. Rats recombining within the locus were not informative when recombination converted the homozygous LEW (II) genotype to a heterozygous LEW/BN (nl) genotype or vice versa. As expected, all of these rats ($n = 7$) showed phenotypes of resistance to *T. gondii* infection (data not shown). By contrast, recombination converting a homozygous BN genotype (nn) associated with susceptibility to a heterozygous BN/LEW genotype (nl) associated with resis-

Table 1. Genetic dissection of *T. gondii* infection phenotypes in congenic lines

Congenic lines	Microsatellite markers										Phenotypes				
	D10Mco17	D10Arb4	D10Mco14	D10Rat32	D10Rat116	D10Mgh7	D1Rat297*	D10Rat80	D10Mit2	D10Wox24	D10Rat58	D10Rat221	Anti- <i>T. gondii</i> [†]	Brain cysts [‡] n [§]	
LEW.BNc10-D	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	>1/500	-(0)	4
LEW.BNc10-H	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl	>1/500	-(0)	3
LEW.BNc10-B	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	≤1/20,000	+(2)	3
LEW.BNc10-C	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	≤1/20,000	+(3)	4
LEW.BNc10-F	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	≤1/20,000	+(4)	4
LEW.BNc10-G	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	≤1/20,000	+(3)	4
LEW.BNc10-I	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	≤1/20,000	+(3)	3
BN.LEWc10-A	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	≤1/20,000	+(3)	5
BN.LEWc10-F	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	≤1/20,000	+(2)	5
BN.LEWc10-C	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	>1/500	-(0)	5
BN.LEWc10-E	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	>1/500	-(0)	5
BN.LEWc10-J	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	>1/500	-(0)	5
<i>Toxo1</i> **							***	***	***	***	***	***			

*This marker, described as D1Rat297, is located on c10.

[†]Anti-*T. gondii* Ab titers quantitated by immunofluorescence; all rats of the group showed the indicated value.

[‡]Presence (+) or absence (-) of brain cysts; brackets: number of rats showing brain cysts.

[§]Number of tested rats. Rats were infected with 20 cysts of the Pru-β-gal strain.

[¶]Distance in cM (Kosambi units) between two adjacent markers

^{||}Genotypes: nn, II: homozygous BN (bold) or LEW.

Markers belonging to (*), and boundary markers of *Toxo1* (||).

Table 2. Genetic dissection of *T. gondii* infection phenotypes in F₂ (LEW × BN) and congenic rats recombinant within *Toxo1*

	Microsatellite markers							Phenotypes	
	D10Rat32 cM*	D10Rat31 1.3	D10Rat116 1.7	D10Mgh7 0.7	D1Rat297* 0.4	D10Rat80 0.6	D10Mit2 2.5	Anti- <i>T. gondii</i> * cysts [†]	Brain cysts [†]
F ₂ rat [‡]									
1	nn [§]	nn	nn	nn	nn	nn	nl	≤1/20,000	0
9	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nl	≤1/20,000	11
106	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nl	≤1/20,000	8
5	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nn	>1/100	0
76	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nn	>1/100	0
BN.LEWc10-Cb [§]	nn	nn	nl	nl	nl	nl	nl	>1/500	0
BN.LEWc10-Cc [§]	nn	nn	nn	nl	nl	nl	nl	>1/500	0
<i>Toxo1</i> * 				***	***				

*See Table 1 for description.

[†]Number of brain cysts

[‡]Five F₂ (LEW × BN) rats characterized by informative points of recombination within *Toxo1* as defined in Table 1. Rats were ordered according to their genotypes.

[§]Recombinant rats bred from (BN.LEWc10-C × BN) backcrosses characterized by points of recombination within *Toxo1*; BN.LEWc10-Cb: *n* = 5; BN.LEWc10-Cc: *n* = 4.

[¶]Genotypes: nn, nl: homozygous BN (bold) or LEW; nl: heterozygous BN/LEW.

tance were informative. As shown in Table 2, the susceptibility of the F₂ rats 1, 9, and 106 and the resistance of the F₂ rats 5 and 76 and of the BN.LEWc10-Cb and -Cc rats confirmed and refined the localization of *Toxo1*. The resistance of the BN.LEWc10-Cc rats with a recombination from nn to nl genotype between D10Rat116 and D10Mgh7 confirms D10Rat116 as the centromeric boundary of *Toxo1*. The susceptibility to *T. gondii* infection of the F₂ rat 9 that carries an nl genotype for D10Rat80 allowed the exclusion of the D10Rat80 marker from the locus. Thus, *Toxo1* was narrowed down to a 1.7-cM interval between D10Rat116 and D10Rat80, which expands to 7.6 megabases in the q24 region of c10 rat (www.ensembl.org). This region contains 86 identified or putative rat genes, of which 49 have orthologous counterparts in human (17p13.2–13.1) and/or mouse (11B3-B4) genomes and 25 are olfactory receptor genes (Table 4, which is published as supporting information on the PNAS web site). A three-way comparative map (human–rat–mouse) reveals conservation of gene order and of distances between genes, with the notable exception of a chromosomal inversion of ≈2.1 megabases between TEKT1 and ALOX15 in the human 17p13, as compared to the rat and mouse conserved syntenic regions (Fig. 4, which is published as supporting information on the PNAS web site).

***Toxo1* Controls the Proliferation of *Toxoplasma* Within Macrophages but Not Within Fibroblasts.** Previous experiments have shown that the LEW refractoriness to *T. gondii* infection is mediated by hematopoietic cells (9). The role played by MΦ in the immune defense against *T. gondii* (12) and its possible involvement in the parasite spreading during the early stages of infection (13) led us to investigate both penetration and proliferation of the parasite in rat MΦ *in vitro*. When parasites were incubated for 2.5 min with naive MΦ, the average number of parasites that had invaded 100 MΦ were similar in BN and in LEW preparations (BN: 18.2 ± 1.4; LEW: 18.0 ± 1.0; three independent experiments). The parasite-containing vacuoles were found to be GRA1 positive and negative for the lysotraker dye, indicating that, in both cases, efficient active invasion and parasitophorous vacuole formation are taking place. After 1 h of contact, infected MΦ were washed to remove extracellular *Toxoplasma* and cultured for 20 h to study intracellular proliferation of the parasite. A dramatic difference in the fate of *Toxoplasma* was observed. Within BN MΦ, the majority of vacuoles contained four or eight parasites, whereas within LEW MΦ, the

majority of vacuoles contained a single parasite (Fig. 2A). In both cases, the parasite-containing vacuoles were GRA1 positive. We further investigated whether these differences were under *Toxo1* control, and whether they were specific of the MΦ population. For this purpose, MΦ and fibroblast monolayers from BN, LEW, and congenic lines were infected with tachyzoites from the RH strain and their intracellular growth was measured by monitoring [³H]uracil incorporation. Results are shown in Fig. 2B. Within LEW MΦ, a 90% inhibition of the parasite growth rate was observed compared to their proliferation within BN MΦ. Results from MΦ prepared from congenic lines indicated that this inhibition is directed by *Toxo1*. Indeed, in the two BN.LEWc10-Cc and -E lines, the *Toxo1* LEW genome is responsible for an inhibition of the parasite proliferation identical to that of the resistant LEW parental strain. Conversely, in the LEW.BNc10-F lines, the *Toxo1* BN genome is responsible for the restoration of the ability of the parasite to proliferate efficiently in MΦ as in the susceptible BN parental strain. In contrast, parasite proliferation was observed in all fibroblast preparations (Fig. 2B) as well as in fibroblast cell lines from BN and LEW origin (data not shown), thus indicating that the *Toxo1*-mediated inhibition of the parasite proliferation in MΦ was not a general phenomenon.

***Toxo1* Controls Local Spreading of the Parasite After i.p. Infection.**

The observed *Toxo1*-dependent dramatic effect on parasite proliferation within MΦ *in vitro*, does not *per se* explain the total inhibition of the spreading observed in the resistant rat *in vivo*. The effect of *Toxo1* on the parasite spreading was investigated by inoculating 5 × 10⁸ YFP₂ tachyzoites i.p. to LEW, BN, and congenic lines. One hour later, the peritoneal fluid of each infected rat was collected, and the majority of parasites (≈1.6 × 10⁷) were found in extracellular position. No striking difference was found in their viability. They were then submitted to an *in vitro* invasion assay onto fibroblasts. A 98% inhibition of the invasion rate was observed for parasites collected from LEW peritoneal exudate as compared to the invasion rate determined for parasites collected from BN exudate. In the LEW.BNc10-F line, a 52% restoration of the ability of the parasite to invade efficiently fibroblasts compared to the susceptible BN parental strain was observed, indicating that this effect is under the control of *Toxo1* (Fig. 5, which is published as supporting information on the PNAS web site).

Discussion

Genetic studies on the susceptibility of rodents to toxoplasmosis have been confined to the mouse. Survival of mice and number

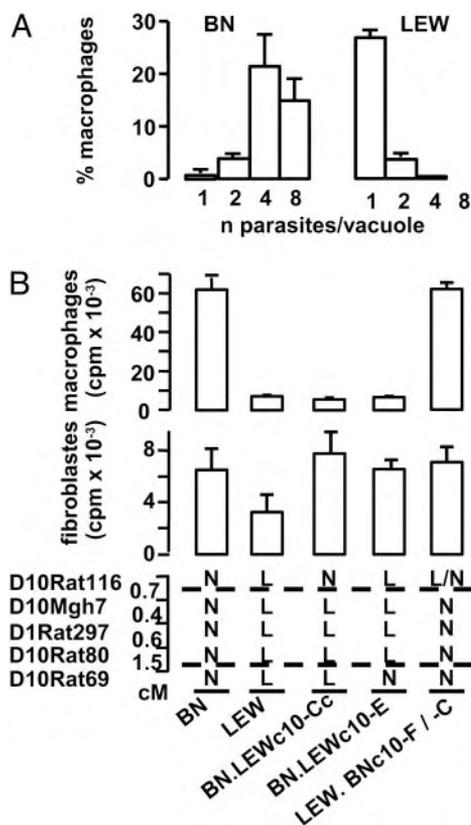


Fig. 2. *Toxo1* controls the proliferation of *T. gondii* within the macrophages. (A) BN or LEW MΦ were mixed with *T. gondii* for 1 h, washed, and cultured for 20 h. The figure represents the repartition of infected MΦ according to the number of parasites per parasitophorous vacuole. The columns and the bars show the mean result and the standard deviation of three independent experiments. (B) The intracellular growth of *T. gondii* on macrophage and fibroblast monolayers from BN, LEW, and congenic lines (BN.LEWc10-E, BN.LEWc10-Cc, LEW.BNc10-F, LEW.BNc10-C) was measured by monitoring [³H]Juracil incorporation into *T. gondii* RNA. From the two different LEW.BNc10 lines of the same BN genotype at *Toxo1*, the -F line was used for macrophage studies and the -C line was used for fibroblast studies. The columns and the bars show the mean result and the standard deviation of triplicates in one rat. These results are representative of two (fibroblasts) and three (macrophages) independent experiments. As a whole, studies on macrophages were performed on six BN, four LEW, and four rats of each congenic line with similar results. Dotted lines indicate the limits of *Toxo1* (boundary markers: D10Rat116 and D10Rat80). N, homozygous BN; L, homozygous LEW.

of cysts were found to be regulated by several loci (14, 15). These studies yielded valuable information on toxoplasmosis pathophysiology. However, in the mouse, infection often leads to an acute lethal disease. With respect to the clinical course and *in utero* transmission, the rat mimics more closely the human situation (7). In contrast to BN or F344 rats, LEW rats are refractory to *T. gondii* infection (8). This feature is not parasite strain-specific because it has been observed after oral infection with three different strains (Prugniaud, NED, CT1) and after *i.p.* infection with one additional strain (RH) (8). Using this unique rodent model, we found that a single locus, which we named *Toxo1*, directs toxoplasmosis outcome. In addition, we demonstrated that *Toxo1* controls both proliferation of the parasite within its parasitophorous vacuole and spreading by MΦ-dependent mechanisms.

Hosts usually contain dissemination of the parasite and are protected from symptomatic toxoplasmosis via a vigorous immune response (13). Parasites become encysted and persist in host tissues as dormant bradyzoites, as observed in the F₂ rats

bearing two BN alleles at *Toxo1* that develop a highly specific Ab response and brain cysts. The fact that not all rats show cysts in their brain is probably related to the relative resistance of BN rats to encystment (8), a trait likely to be under polygenic control (14, 15). In contrast, F₂ rats homozygous for the LEW allele of *Toxo1* show the characteristic LEW refractory state. Quite surprisingly, this locus alone confers a complete resistance to *T. gondii* infection, regardless of the remaining genome. The F₂ BN/LEW rats heterozygous at *Toxo1* showed intermediary Ab responses, and all but one were all free of brain cysts. Therefore, there is an additive effect of the gene products on the anti-*T. gondii* Ab response, and the resistance of LEW rats to brain cyst formation follows a dominant expression pattern.

Host genetic factors play a major role in the outcome of infections in humans. In most instances, the susceptibility to pathogens is likely to be controlled by several polymorphic genes (16). Instances of natural mutations of single germ-line genes associated with susceptibility or resistance to infectious diseases have been reported (17). In humans, the association of resistance to *Plasmodium vivax* with DARC gene mutations (18) and to HIV infection with CCR5 gene mutations (19) are examples of such a mechanism of simple inheritance. In the mouse, the *Nramp1* gene was identified by forward genetics as being responsible for the resistance to infections by intracellular pathogens (20). The identification of *Toxo1* provides a unique opportunity for insight in toxoplasmosis pathophysiology.

The mechanism of resistance of the LEW rat to toxoplasmosis works very efficiently, soon after infection. Indeed, from day 2 to 5 after infection, parasites cannot be detected in the LEW rat, neither locally at the site of infection nor in both draining lymph nodes and blood (9). Moreover, LEW rats and most of the F₂ rats bearing two LEW alleles at *Toxo1* barely develop an immune response. Thus, in the LEW rat, the parasite is rapidly cleared by an highly efficient host barrier. Refractoriness of LEW rat to toxoplasmosis is mediated by hematopoietic cells and occurs after *i.p.* as well as after oral infection (9). Moreover, MΦ plays a pivotal role in the immune defense against *T. gondii* (12) and is possibly involved in the spreading of parasites during the early stages of infection (13). Therefore, we investigated the fate of the parasite in the presence of rat peritoneal MΦ in both *in vitro* and *ex vivo* experiments. First, we found that upon primary contact, *T. gondii* can invade MΦ as well as fibroblasts from both LEW and BN rats. Therefore, as predicted from the dominant mode of control, refractoriness is not due to the lack of a host receptor required for parasitic invasion. Second, in an *ex vivo* experiment, we showed that within the first hour after infection, *Toxo1* from LEW completely abolished the invasive capabilities of resident extracellular parasites. Therefore, it seems that, shortly after primary invasion, *Toxo1* controls the parasite spreading in directing subsequent ability to invade neighboring cells. Although these effects remain to be determined at the molecular and biochemical levels, they show that the overall function of *Toxo1* involves a multistep process. Third, we demonstrated that, after penetration, *Toxo1* from LEW inhibits intravacuolar replication within the MΦ, but not within the fibroblast. This observation indicates that *Toxo1*-mediated effects are not a general phenomenon but rather are likely to operate specifically in hematopoietic cells such as MΦ. The extent to which other cells of the innate immunity are implicated in the phenotype of resistance remains to be determined. Particularly, the role of dendritic cells, which are likely to be involved in the dissemination of parasitic infection (21) has to be investigated.

T. gondii is a protozoan parasite that has adopted an intracellular lifestyle for eluding host defense mechanisms (22). Invasion of *T. gondii* occurs by active penetration of cells (23), using a system of adhesion-based motility called "gliding" that characterizes parasites of the apicomplexan phylum (24). In MΦ as in other host cells, invasion results in the formation of a unique

parasite-replicating compartment, the parasitophorous vacuole that avoids the phagolysosomal pathway (25–28). Here, we showed that proliferation of the parasite within its parasitophorous vacuole depends on a *Toxo1*-mediated host response. Replication proceeds in each mitotic cycle every 7–10 h until the host cell is lysed (\approx 48 h after infection). Therefore, the first cycle of replication can be blocked by some *Toxo1*-mediated response in M Φ activated by the parasite invasion. *T. gondii* infections are known to modulate reactive oxygen (29) and nitric oxide (NO) pathways (30) to ensure parasite survival within M Φ (31). We did not observe a reversion of the phenotype using inhibitors of the NO synthase, but did not investigate other oxygen-dependent pathways. Because, in LEW M Φ , parasites are still detected within the vacuole after 20 h of culture, a direct killing of the parasite soon after invasion is unlikely. Therefore, we suggest that the microbiostatic effect is due to a lack of parasitophorous vacuole expansion and/or maturation. Future studies should address the role of *Toxo1* in controlling processing of the parasitophorous vacuole. Moreover, it is possible that, *in vivo*, the entire process of parasite eradication involves a complex multistep mechanism that could explain the partial effect of the anti-IFN- γ Ab treatment observed in a previous study (9).

According to the rat genome sequence draft, the identified 1.7-cM interval extends 7.6 megabases in the q24 region of rat c10. This conserved syntenic region contains 86 identified or putative rat genes. Among these genes, several are likely to be expressed in hematopoietic cells. In our model, at least one gene controlling host–parasite interaction at the level of the parasitophorous vacuole is involved. Among the genes that are known to be present in *Toxo1*, there is no obvious candidate gene. However, one cannot exclude the involvement of several genes within the locus as observed in other murine models (32, 33). Another gene(s) involved in the host immune response could well be implicated. Genes that code for arachidonate lipooxygenases, such as Alox15, which are present in *Toxo1*, are candidates for such a mechanism (13). Further genetic dissection using rats with recombinations within *Toxo1* is needed to further narrow down this region and to identify the involved gene(s).

In conclusion, the forward genetics approach supported by our model should unravel a key pathophysiological pathway at work in *T. gondii* infection. This knowledge could be used in the therapeutics and prophylactics in human (1) and veterinary medicine (34). Pathogenesis associated with apicomplexan parasitic diseases is mainly due to tissue damage induced by uncontrolled parasite proliferation. Particularly, *Toxoplasma* encephalitis is due to parasite-mediated destruction of neuronal tissue, and malarial fevers and anemia are a consequence of red blood cell lysis. Thus, the identification of *Toxo1* gene(s) and of the mechanisms used to control the replication of these parasites within the parasitophorous vacuole could be useful for understanding other apicomplexan parasitic diseases. It should also unravel mechanisms that determine host-species barrier in this important group of parasites.

Materials and Methods

Rats. Breeding and experimental procedures were carried out in accordance with European guidelines and approved by our local ethical committee. F₁ (LEW \times BN) male and female rats were obtained from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France). F₂ (LEW \times BN) progeny was produced in our animal facilities (specific pathogen-free conditions). Congenic lines were produced according to the “speed congenics” procedure (35), for BN c10 alleles onto the LEW genome (LEW.BNc10 lines) and reciprocally (BN.LEWc10 lines). Rats were selected for introgression of the entire *Toxo1* locus and for recombination within the locus. When the rats showed homozygosity for the set of markers used to screen the genetic background (eighth and ninth backcrosses), the homozygous state for the introgressed

chromosomal regions was fixed by mating two heterozygous rats and selecting appropriate progenies. Congenic lines were maintained by brother–sister mating.

Genetic Markers and Genotype Analysis. Preparation of genomic DNA and genotyping were performed as described (36). For the initial genome screen, 109 polymorphic microsatellite markers were selected (<http://rgd.mcw.edu>) to cover the rat genetic map at \approx 99% with an average spacing of \approx 17 cM between markers. Linkage Kosambi maps were constructed in a previous study (36). After the initial linkage analysis, 11 c10 additional markers between D10Wox26 and D10Rat27 were used to refine the localization of *Toxo1*.

Parasites and Experimental Design of Infection *in Vivo*. Cysts from the recombinant *T. gondii* Prugniaud strain that expresses the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (Pru- β -gal) were used (37). Two-month-old Swiss mice were infected orally with 10 Pru- β -gal cysts. Their brains were collected 3 months later and ground in a Potter. Cysts were counted in a Thoma's cell and diluted in PBS. Rats were infected orally with 20 cysts. One month later, blood was collected from the retroorbital sinus for detection of anti-toxoplasma Ab response by Western blotting and quantification by indirect immunofluorescence (9). Rats were killed 6 weeks after infection, and their brains were collected for counting Pru- β -gal cysts in brain suspension, after addition of β -gal detection reagent (9).

Parasites and Experimental Design of Infection *in Vitro*. The RH strain of *T. gondii* used for the proliferation assay in rat peritoneal macrophages (M Φ) was maintained by injecting regularly female Swiss mice i.p. with 10⁴ tachyzoites in 0.5 ml of Hanks' balanced salt solution (HBSS) (38). The parasites were collected from the peritoneal cavities of mice on day 3 after infection by washing with 1 ml of HBSS, centrifuged at 500 \times g for 15 min at 4°C, suspended in serum-free medium (SFM, GIBCO), and counted.

Rat resident peritoneal cells were obtained by injection of sterile 199 medium with HBSS into the peritoneal cavity. Collected cells were centrifuged, and the cell pellet was suspended in SFM. Cells were allowed to adhere onto 24-well culture plates for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Nonadherent cells were then removed by washing with PBS. A total 98% of the adherent cells thus obtained had the morphological appearance of M Φ after May–Grunwald Giemsa staining and were detected as positive for nonspecific esterase. Rat subepithelial fibroblasts were obtained from shaved skin patches maintained for 7–10 days in the “DMEM + 4,500 mg/liter Glucose + GlutaMAX + Pyruvate” medium (GIBCO) containing 10% FCS, 1% Hepes, 1% nonessential amino acids, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 50 μ M 2-mercaptoethanol, at 37°C and 5% CO₂. When fibroblasts that grew away from the dermal explants were confluent, they were washed, trypsinized, and counted.

Toxoplasma Proliferation Assay in Peritoneal Macrophages and Fibroblasts. The intracellular growth of *T. gondii* in monolayer cells was monitored by [³H]uracil incorporation into *T. gondii* RNA (38). Briefly, 10⁶ M Φ in SFM were cultured for 1 h in 24-well Falcon plates, and 3.10⁴ fibroblasts in DMEM/10% FCS overnight in 48-well Falcon plates, at 37°C and 5% CO₂. After washing in SFM, macrophage monolayers were infected with 10⁵ tachyzoites, and fibroblast monolayers were infected with 3.10⁴ tachyzoites, for 1 h in SFM at 37°C and 5% CO₂. After washing to eliminate extracellular parasites, the cells were cultured for 20 h in the presence of [³H]uracil (2 μ Ci per well, 1 Ci = 37 GBq). The monolayers were then washed twice with PBS and disrupted with 1 M NaOH. After neutralization by 1 M HCl, the radio-

activity was assessed in a Amersham Pharmacia LKB 1217 beta-counter.

Studies of *Toxoplasma* Behavior in Macrophages and in Extracellular Fluids After i.p. Infection. For invasion studies, tachyzoites (RH strain) were delivered to M Φ monolayers at a ratio of 50:1 in 300 μ l of DMEM supplemented with 1 mM glutamine, 500 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. After 20-min contact on ice, invasion was allowed by settling for 2.5 min in a 37°C water bath. Monolayers were washed extensively in PBS to remove nonadherent parasites. Pulse-infected cells were directly fixed in 2.5% formaldehyde in PBS. In other experiments, invasion was allowed for 60 min and infected cells were returned to culture for 20 h before fixation to evaluate parasite replication. Slides were incubated sequentially with primary antibodies, followed by FITC secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). Parasites were stained with the anti-SAG1 mAb (TG05-54) in presence of 0.002% saponin. Vacuoles were stained with the anti-GRA1 mouse mAb (TG17.43.1). In some experiments, before fixation, slides were incubated with either the LysoTraker (Molecular Probes) red dye to evaluate compartment acidification or with propidium iodide to evaluate cell and/or parasite integrity. The average number of parasites per vacuole was determined from counts of 200–500 host cells in three independent experiments. Slides were mounted in Pro-long Anti-fade (Molecular Probes) and examined by using a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped for epifluorescence and phase-contrast.

For *ex vivo* experiments, we used the recombinant *T. gondii* RH strain expressing a tandem yellow fluorescent protein (RH-YFP₂), kindly provided by Boris Striepen (University of Georgia, Athens). i.p. infection was done with 5×10^8 tachyzoites. One hour later, peritoneal fluids were recovered, centrifuged, and resuspended in 600 μ l of supernatant. Extracellular parasites were counted, and their viability was determined with propidium

iodine. Then, a 2.5-min pulse invasion assay onto human foreskin fibroblast (HFF) cells was performed (300 μ l per slide). Slides were fixed and invasion rate was determined by counting the number of YFP₂ parasites per 100 cells. In this assay, two slides and a minimum of 1,000 cells were counted per sample.

Data Analyses. Association of individual markers with resistance to *T. gondii* infection was assessed by comparing the genotype distribution of rats showing or not anti-toxoplasma Ab or brain cysts, with Pearson's χ^2 statistics using SPSS. The significance of differences found between groups of F₂ (LEW \times BN) rats with different genotypes at the locus markers, initially derived from a Kruskal–Wallis H test, was subsequently confirmed by the Mann–Whitney test.

We thank Patrick Aregui, Audrey Boyer, Marie-Andrée Daussion, Thierry Ruiz, Corine Senty, Magali Toulouse, and Aline Tridon (Service de Zootechnie, Institut Fédératif de Recherche 30) for careful handling of the rats; Mathias Titeux for help with the fibroblast cultures; Daniel Gonzales-Dunia (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U.563, Toulouse F-31300 France) for providing LEW and BN fibroblast cell lines; Valérie Bans and Karine Musset for technical assistance; and Prof. Alain Hovnanian and Drs. Etienne Joly and Neil Ledger for critical reading of the manuscript. M.M. was supported by a grant from the Association de Recherche sur la Polyarthrite Rhumatoïde (ARP). J.-F.S. and C.C. were supported by grants from the Société de Néphrologie. J.-F.S. and P.C. were recipients of predoctoral grants from the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies (Microbiology Program and “Environment et Santé” Program). Congenic lines have been created with grants of the Genopole Midi-Pyrénées, ARP, Etablissement français des Greffes, Ligue Contre le Cancer, Université Paul Sabatier, Conseil Général de Région Midi-Pyrénées, and Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement.

1. Carruthers, V. B. (2002) *Acta Trop.* **81**, 111–122.
2. Couvreur, J., Desmonts, G. & Girre, J. Y. (1976) *J. Pediatr.* **89**, 235–240.
3. Mack, D. G., Johnson, J. J., Roberts, F., Roberts, C. W., Estes, R. G., David, C., Grumet, F. C. & McLeod, R. (1999) *Int. J. Parasitol.* **29**, 1351–1358.
4. Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M. & Howe, D. K. (2002) *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357**, 81–88.
5. Jacob, H. J. & Kwitek, A. E. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 33–42.
6. Korstanje, R. & Paigen, B. (2002) *Nat. Genet.* **31**, 235–236.
7. Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. (1998) *Vet. Parasitol.* **77**, 1–32.
8. Kempf, M. C., Cesbron-Delauw, M. F., Deslee, D., Gross, U., Herrmann, T. & Sutton, P. (1999) *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 137–142.
9. Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslee, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J. F., Fournie, G. J., Saoudi, A. & Cesbron-Delauw, M. F. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 6990–6997.
10. Fournié, G. J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J.-F., Pelletier, L., Druet, P. & Saoudi, A. (2001) *Immunol. Rev.* **184**, 145–160.
11. Lander, E. & Kruglyak, L. (1995) *Nat. Genet.* **11**, 241–247.
12. McCabe, R. E. & Remington, J. S. (1986) *Infect. Immun.* **52**, 151–155.
13. Aliberti, J. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 162–170.
14. McLeod, R., Skamene, E., Brown, C. R., Eisenhauer, P. B. & Mack, D. G. (1989) *J. Immunol.* **143**, 3031–3034.
15. Johnson, J., Suzuki, Y., Mack, D., Mui, E., Estes, R., David, C., Skamene, E., Forman, J. & McLeod, R. (2002) *Int. J. Parasitol.* **32**, 179–185.
16. Hill, A. V. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 593–617.
17. Casanova, J. L., Schurr, E., Abel, L. & Skamene, E. (2002) *Trends Immunol.* **23**, 469–472.
18. Tournamille, C., Colin, Y., Cartron, J. P. & Le Van Kim, C. (1995) *Nat. Genet.* **10**, 224–228.
19. Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., et al. (1996) *Nat. Med.* **2**, 1240–1243.
20. Forbes, J. R. & Gros, P. (2001) *Trends Microbiol.* **9**, 397–403.
21. Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D. & Tardieux, I. (2005) *Blood*, in press.
22. Sacks, D. & Sher, A. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 1041–1047.
23. Morisaki, J. H., Heuser, J. E. & Sibley, L. D. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 2457–2464.
24. Sibley, L. D. (2004) *Science* **304**, 248–253.
25. Joiner, K. A., Beckers, C. J., Bermudes, D., Ossorio, P. N., Schwab, J. C. & Dubremetz, J. F. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **730**, 1–6.
26. Suss-Toby, E., Zimmerberg, J. & Ward, G. E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8413–8418.
27. Mordue, D. G. & Sibley, L. D. (1997) *J. Immunol.* **159**, 4452–4459.
28. Mordue, D. G., Hakansson, S., Niesman, I. & Sibley, L. D. (1999) *Exp. Parasitol.* **92**, 87–99.
29. Takao, S., Smith, E. H., Wang, D., Chan, C. K., Bulkley, G. B. & Klein, A. S. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, C1278–C1284.
30. Fang, F. C. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 2818–2825.
31. Seabra, S. H., de Souza, W. & DaMatta, R. A. (2002) *Exp. Parasitol.* **100**, 62–70.
32. Morel, L., Blenman, K. R., Croker, B. P. & Wakeland, E. K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1787–1792.
33. Podolin, P. L., Denny, P., Lord, C. J., Hill, N. J., Todd, J. A., Peterson, L. B., Wicker, L. S. & Lyons, P. A. (1997) *J. Immunol.* **159**, 1835–1843.
34. Buxton, D. (1998) *Vet. Res.* **29**, 289–310.
35. Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M. & Longmate, J. (1997) *Immunol. Today* **18**, 472–477.
36. Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Pilipenko-Appolinaire, S., Kermarrec, N., Gauguier, D., Druet, P. & Fournie, G. J. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**, 1698–1705.
37. Dao, A., Soete, M., Sergent, V., Deslee, D., Fortier, B. & Dubremetz, J. F. (2002) *Parasitol. Res.* **88**, 69–72.
38. Thardin, J. F., M'Rini, C., Beraud, M., Vandaele, J., Frisach, M. F., Bessieres, M. H., Seguella, J. P. & Pipy, B. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 1432–1441.

Genetic dissection of *Toxo1* locus points out *Alox15* and *Nalpl* as major candidate genes for toxoplasmosis susceptibility

Short title: genetic control of toxoplasmosis in the rat

Olivier Papapietro^{1*}, Pierre Cavailles^{2*}, Cordelia Bizanz^{2*}, Bernard Pipy³, Marie-France Cesbron² and Gilbert Fournie¹.

¹ INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France; Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300 France

²; UMR 5163, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Grenoble, France

³ INSERM, EA 2405, IFR 31, Hôpital Rangueil, Toulouse, F-31400 France

Corresponding author: Gilbert J. Fournié, INSERM U563, Pavillon Lefebvre, Hôpital Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse cedex 3, France. Phone: 33-5-74-45-02; Fax: 33-5-62-74-45-58; email; gilbert.fournie@inserm.fr

Manuscript information 21 pages, 3 figures, 0 table

Word and character counts: abstract: 151 words; manuscript: 29402 characters

* equally contributed to this work

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a highly successful parasite, causing serious, even fatal, disease in the developing fetus and in immunocompromised patients. The identification of genes that control disease susceptibility and severity is difficult in humans. Results from genetic studies in animal models can be applied to human pathology through comparative genomics. In a rat model of toxoplasmosis, we previously identified on chromosome 10 the *Toxo1* locus that directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by a macrophages-dependent mechanism. Here, we demonstrate that the *Toxo1*-directed ability of the macrophages to restrict parasite proliferation is associated with deaths of parasite and of the infected cell. By genetic dissection using sub-lines congenic for *Toxo1*, we narrowed down the region of control to a 1.09 Mb interval syntenic to human 17p13. Among the 36 known genes located in the region, the lipoxygenase *Alox15* and *Nalpl1* are good candidate genes for testing in human cohorts.

INTRODUCTION:

Toxoplasma gondii is a mandatory intracellular parasite of the apicomplexa phylum that causes chronic infections in up to one-third of human populations. Although primary infection of immunocompetent hosts is most often asymptomatic, Toxoplasmosis remains an important public health problem (Jones et al., 2001). In congenitally infected babies and in immune-compromised patients, *T. gondii* causes loss of sight, cognitive function, and neurologic damage. Subsets of immune-competent adults can also develop serious organ damage such as encephalitis or myocarditis. Variations in incidence and severity of toxoplasmosis have been attributed to several factors, including host and parasite genetic factors (Mack et al.). Today, little is known about the genetic basis of host susceptibility or resistance to toxoplasmosis. In humans, genetic studies are hampered by the genetic heterogeneity of populations and by differences in environmental factors, particularly in virulence of various strains of *Toxoplasma* (Mack et al., 1999) (Saeij et al., 2006) (Taylor et al., 2006). The use of animal models allows control of both genetic and environmental factors. Results from animal studies, can be applied to human pathology through comparative genomics (Jacob and Kwitek, 2002).

With respect to clinical course and *in utero* transmission, toxoplasmosis in rats and humans are similar (Dubey and Frenkel, 1998). Thus, the rat which usually develops sub-clinical toxoplasmosis like humans is a useful and validated model for human toxoplasmosis. We took advantage of the observation that the LEW rat exhibits a unique phenotype of refractoriness to *T.gondii* infection (Sergent et al., 2005) to develop genetic studies in the rat model. We found that a single chromosomal region of 7.6Mb on rat chromosome 10 called *Toxo1* fully controls the refractoriness of the LEW rat to *T.gondii* infection and the ability of macrophages to impede parasite proliferation (Cavailles et al., 2006). Here, we demonstrate that restriction of parasite growth is associated with deaths of macrophage and parasite. By

genetic dissection in a panel of congenic sub-lines we narrow down *Toxol* to a 1.09 Mb region containing 36 genes. Among these genes, *Nalp1* a member of the NLR (Nod like receptor) family, which has been found to direct macrophage death after exposure to anthrax lethal factor (Boyden and Dietrich, 2006) and *Alox15*, a 12-15 lipoxygenase implicated in production of lipoxin A₄, an endogenous regulator of immunopathology in *T.gondii* infection (Aliberti et al., 2002b), are major candidate genes.

RESULTS

Genetic dissection of the *Toxo1* locus

Previous studies using reciprocal congenic lines demonstrate that *Toxo1* fully controls the outcome of *T.gondii* infection independently of the genetic background. The refractoriness to infection conferred by the LEW origin of *Toxo1* is characterised by the early elimination of the pathogen resulting in a barely detectable specific immune response and in the absence of brain cysts. These features are associated with the control by the *Toxo1* 7.6 Mb interval of the parasite proliferation within macrophages *in vitro* (Figure 1A). To refine the localisation of the gene(s) that control(s) this *in vitro* phenotype, we generated a panel of congenic sub-lines as described in the M&M section. Results from the genetic dissection are shown on Figure 1B. The parasites were able to proliferate within the macrophages from the congenic BN.LEWc10-Ce, -Cf and Cga sub-lines but not within the macrophages from the congenic BN.LEWc10-Cd and -Cg sub-lines. Thus the gene(s) controlling the parasite growth within macrophages is/are located within a ~1 Mb interval between the Au028423 and Au026393 microsatellite markers. According to the genome databases, this region contains 36 identified genes and 4 hypothetical genes. Examination of the genes within the *Toxo1* locus and of their biological effects on innate immunity led us to consider *Nalp1* and *Alox15* as major candidate genes. *Nalp1* is a member of the NLR family which directs inflammatory cell death in response to pathogen or cellular stress (Lamkanfi and Dixit, 2009) while *Alox15*, a 12/15 lipoxygenase is involved in lipoxin production which modulate innate immune response during *T.gondii* infection (Aliberti et al., 2002a).

Parasite and host cell fate during infection

Toxoplasma gondii actively invades host cells and creates a specific subcellular compartment, the parasitophorous vacuole (PV), which provides a stable and protective

environment for parasite multiplication. We previously reported that efficient active invasion and PV formation are taking place in both LEW and BN macrophages (Cavailles et al., 2006). Here we investigated PV integrity and parasite viability at later time points. We infected macrophages from BN or LEW rat with RH-YFP₂ parasites at a MOI of 1:3. IF staining with the parasitophorous vacuole membrane (PVM) marker GRA5 indicates that the intracellular parasite compartments were vacuoles and not phagosomes. No difference of parasite vacuoles could be detected by immunostaining 2 hours post infection (Fig 2 A left panels and 2 B). We next looked at 8 hours post infection. While in BN macrophages parasites start to divide, the majority of vacuoles in the LEW macrophages identified by their GRA5 staining contained no YFP-positive parasites. YFP-loss indicates a loss of parasite viability. Counting for YFP-parasites in GRA5 positive vacuoles at 8 hours post infection showed a dramatic drop of YFP-parasites in LEW rat macrophages: only 20% of GRA5-positive vacuoles still contained green parasites, *versus* 70% in BN macrophages (Fig 2B). Thus, control of the proliferation of *Toxoplasma* within LEW macrophages is associated with parasite death.

A striking observation was that more than 80% of the YFP-negative but GRA5-positive vacuoles are in LEW macrophages with a condensed nucleus (Fig2 A and C). This result led us to investigate in detail the viability of peritoneal macrophages from BN and LEW upon *T.gondii* infection. Cell death was visualized using propidium iodide staining (Fig2 D). In permissive BN macrophages we observed no significant death induction 6 hours post infection, while in non-permissive LEW macrophages up to 50% of the host cells lost membranous integrity 6 hours after infection with parasites. Furthermore, this death induction was dose dependent and needed live parasites since formaldehyde-fixed parasites were unable to induce death of LEW macrophages (data not shown). This *Toxoplasma*-induced cell death in LEW macrophages is characterized by the absence of nuclear and DNA fragmentation (Fig 2 E), and of phosphatidylserine exposure on the plasma membrane at the early phase of cell

death (data not shown). Thus the *Toxoplasma*-induced LEW macrophage cell death does not show the classical features of apoptosis. Studies in infected macrophages from the congenic rats unambiguously demonstrated that *Toxo1* controls the *Toxoplasma*-induced cell macrophage death (figure 2F). Indeed, whatever the genetic background, macrophages from rats bearing the BN *Toxo1* locus are protected from parasite-induced host cell death while rats bearing the LEW *Toxo1* are susceptible. Altogether our data associate the *Toxo1*-dependant restriction in parasite proliferation and survival with host cell-death. The cell-death implicated in this phenotype shows features of NLR-induced necrotic death and led us to analyse *Nalpl1* expression in resistant and permissive macrophages. No difference in *Nalpl1* expression was detected but analysis of exonic sequences reveals various non synonymous SNP between the LEW and the BN strain.

***Toxo1* controls *Alox15* expression and arachidonic acid metabolism**

Toxoplasma gondii actively used arachidonic acid (AA) metabolism and lipoxins to ensure a favourable environment for replication within the host cell (Aliberti and Bafica, 2005). Hence we investigated if polymorphisms or differences in *Alox15* expression could be associated with the *Toxo1* locus. Sequencing of exonic region of *Alox15* did not reveal any coding SNP between the LEW and the BN strains but a significant change in gene expression was noted between susceptible and resistant rats. In permissive macrophages from BN we found a two fold increase of mRNA transcript as compared to resistant macrophages from the BN.LEWc10-Cg congenic lines. This difference was confirm at the protein level, (Fig 3 A and B). In order to determine whether level of *Alox15* expression controls lipid metabolism of macrophages, [³H] AA metabolism was studied in permissive and non-permissive macrophages. At the end of the incorporation course, analysis of the culture medium was performed to assay the tritiated eicosanoids produced. A significant decrease in both total lipoxygenated AA metabolites and HETE was observed in non-permissive macrophages by

comparison with susceptible ones correlating with *Alox15* expression (Fig3 C and D). Thus, the *Toxo1* locus which control parasite proliferation and host cell death during *T gondii* infection controls differences in *Alox15* expression and AA metabolism. This result suggests that polymorphism(s) controlling *Alox15* expression can play a role in the parasite-macrophage interaction that results either in the successful parasite proliferation or in the death of both partners.

DISCUSSION

Genetic studies provide a powerful approach to identify risk factors and pathological pathways of human diseases. However, due to both genetic heterogeneity and environmental variability, these studies in humans often failed to give conclusive results (Chanock et al., 2007) (Vercelli, 2008). Experimental models are of value to investigate pathological pathways that could be at work in human diseases. In the rat model of toxoplasmosis, which mimics the human disease (Dubey and Frenkel, 1998), we had previously described the *Toxo1* locus that controls toxoplasmosis outcome *in vivo* and the parasite proliferation within macrophage *in vitro*. In the present work we narrowed down *Toxo1* to a ~1Mb interval and showed that the capacity of LEW macrophage to impede parasite growth is associated with the death of both the macrophage and the parasite. Genetic and functional studies herein described points out *Alox15* and *Nalpl1* as major candidate genes for this macrophage-dependent mechanism of *T. gondii* infection control.

Cell death is known to have an important role in immune system homeostasis and immune responses. Although the majority of studies on this role have focused on apoptotic cell death, other non-apoptotic cell-deaths are now recognized as important for the triggering of inflammation and immunity (Ting et al., 2008). In contrast to apoptosis which is a slow process marked by membrane blebbing and the packaging of cellular material, other cell death pathways including necrosis, pyroptosis and pyronecrosis are characterized by rapid loss of plasma membrane integrity. Unlike apoptosis, these cell death pathways result in the release of cellular components into the extracellular medium, which are responsible for pro-inflammatory reactions (Zong and Thompson, 2006). For *T.gondii*, which actively induced pro-survival proteins from the Bcl-2 family in host cell (Molestina et al., 2003) and exploit migratory properties of infected macrophages and dendritic cells to spread into the brain

(Courret et al., 2006) macrophages cell-death could represent a considerable obstacle for successful infection.

Recently an IFN- γ -dependent mechanism of necrotic cell-death of the *T.gondii*-infected cells has been described in the mouse (Zhao et al., 2009). However, this mechanism was restricted to avirulent strains and required IFN- γ -induced immunity-related GTPases (IRG proteins) expression. In our model, the *ToxoI*-controled cell-death is also efficient with the highly virulent RH strain; furthermore, we could not detect differences in IRG proteins expression between susceptible and resistant macrophages. Altogether, it is unlikely that the *ToxoI* locus mediates its biological effect by an IRG proteins-dependent mechanism.

Several non-apoptotic programs of cell-death in response to pathogen such as *Salmonella*, *Shigella* or *Listeria* have been described recently (Brennan and Cookson, 2000) (Cervantes et al., 2008) (Willingham et al., 2007). While they may differ in caspase requirement, they use the inflammasome platform to produce inflammatory cell-death with loss of plasma membrane integrity. Inflammasome is a large protein complex that includes NLR proteins and the adapter apoptosis-associated speck like protein containing a C-terminal CARD domain (ASC). In response to various stimuli, inflammasome assembly results in the recruitment and activation of several proteins including the pro-caspase1 (Ting et al., 2008). The striking association between the *ToxoI*-dependant control of infected cell-death and the presence of the highly polymorph *Nalp1* gene encoding a NLR within the locus led us to consider *Nalp1* as a major candidate gene for the biological effect of the *ToxoI* locus.

Successful infection by *T.gondii* is dependent on the exploitation by the parasite of several anti-inflammatory pathways. Among them, the eicosanoid mediator lipoxin A₄ (LXA₄) produces by oxygenation of arachidonic acid via 5-lipoxygenase (LO) and 12/15 LO mediates suppression of IL-12 secretion in murine DCs (Aliberti et al., 2002a) and inhibits the T_{H1} response. LO^{-/-} mice harbour greatly reduced brain cyst burdens but succumb to *T.gondii*

infection during the early phase of chronic disease due to an excessive inflammatory response (Aliberti et al., 2002b). Lipoxins also display pro-survival activity (Tang et al., 1996). In human, polymorphism within the *Alox15* promoter influences gene expression level and increased ALOX15 activity has been associated with attenuate inflammation (Wittwer et al., 2007). In this study, we show that the *Toxo1* locus from the LEW resistant rat is associated with a decrease in *Alox15* expression and in arachidonic acid metabolism. It is likely that polymorphism(s) which control *Alox15* expression should be implicated in the *Toxo1*-conferred resistance.

In this work we unambiguously mapped the *Toxo1* locus to a 1.09 Mb region. This locus controls the *in vivo* spreading of parasite within the host and is critically associated with macrophage responses to *T.gondii*. We showed that the refractoriness to toxoplasmosis controlled by the LEW origin of *Toxo1* is associated with the deaths of both the parasites and the infected macrophages. This study highlights the fate of the infected-macrophages as a key determinant for the toxoplasmosis outcome in the rat. The narrow localisation of the genetic control of this feature, within a ~1 Mb interval, points to *Alox15* and *Nalpl1* as major candidate genes. The potential role of *Alox15* is supported by the role of lipoxygenases and of their product, the lipoxins in toxoplasmosis pathophysiology on the one hand, and on the *Toxo1*-dependent control of *Alox15* expression and of products of AA metabolism. The potential role of *Nalpl1* is supported by the well established role of the NLR family of proteins in innate immunity and cell-death signalling. Further genetic dissection using rats with recombination within the *Toxo1* locus will help to determine the precise contribution of the two candidate genes in *T.gondii* infection both *in vivo* and *in vitro*. On these bases, ongoing works should give valuable clues to genetic factors and pathophysiological pathway at work in human toxoplasmosis.

RATS, MATERIAL AND METHODS

Rats

The rats were kept in a 12-h light/dark cycle, in polystyrene cages containing cottonwood bedding characterized by low dust content, with free access to water and standard rodent chow and under specific pathogen-free conditions. The rats used in this study were males or females of 7-13 weeks of age at the start of the experiment. All breeding and experimental procedures were carried out in accordance with European Union guidelines and were approved by our local ethical committees.

Specific pathogen free (SPF) BN (RTn) rats were obtained from Centre d'élevage R. Janvier (Le Genest St.Isle, France). The BN.LEWc10 congenic lines were produced as described (Mas et al., 2004). To produce congenic sub-lines, F1 hybrids, made by crossing the congenic line to the recipient strain, were backcrossed to the recipient strain. Littermates issued from these backcrosses characterized by recombination events within the *Tox1* locus were selected by genotyping using a set of polymorphic microsatellite markers. The sequences of the forward and reverse primers of the microsatellite markers that define the congenic lines and sub-lines are available on the Ensembl web site (<http://www.ensembl.org>). Preparation of genomic DNA and genotyping were performed as described (Mas et al., 2004). The selected recombinant rats were then backcrossed to the recipient strain. Males and females rats issued from this backcross, heterozygous for the reduced introgressed region were intercrossed to fix the recombinant chromosome in the homozygous state. Rats issued from this intercross, homozygous for the region, were selected for brother-x-sister mating and foundation of the new congenic sub-line.

Parasites

Tachyzoites of the RH and RH-YFP₂ (kindly provided by Boris Striepen, Athens) type I strains were maintained under standard procedures, by serial passage in human foreskin

fibroblast monolayers (HFFs) in D10 medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 500 units.ml⁻¹ penicillin and 50 µg.ml⁻¹ streptomycin) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Peritoneal macrophages preparations

Rat peritoneal cells were collected after injection of sterile PBS into the peritoneal cavity. Collected cells were centrifuged, and the cell pellet was suspended in serum free medium (SFM) supplemented with 500U/ml penicillin and 50µg/ml streptomycin. Cells were left to adhere for 1 hour at 37°C/5% CO₂. They were gently rinsed twice with SFM to remove non-adherent cells. More than 98% of the adherent cells were macrophages as demonstrated by May-Grünwald-Giemsa staining.

Toxoplasma proliferation assay using [³H] uracil incorporation

Intracellular growth of *T.gondii* in monolayer cells was monitored by [³H] uracil incorporation into *T.gondii* RNA as described (Thardin et al., 1993). Briefly, 10⁶ macrophages in SFM were cultured for 1h in 24-well Falcon plates. Macrophage monolayers were infected with tachyzoites at a MOI of 3:1 for 1 h in SFM at 37.C and 5% CO₂. After washing to eliminate extracellular parasites, the cells were cultured for 20 h in the presence of [³H] uracil (2µCi per well, 1Cu=37GBq). The monolayers were then washed twice with PBS and disrupted with 1 M NaOH. After neutralisation by 1 M HCl, the radio activity was assessed using the Microbeta Trilux scintillation counter (PerkinElmer).

Florescent dye staining and microscopy

Macrophages viability was routinely analyzed by propidium iodide staining. Peritoneal cells were incubated for 5 min in the presence of 1 µg/ml propidium iodide in SFM. Non viable cells take up the dye and show a red fluorescence. For staining of the parasitophorous vacuole, infected macrophages were permeabilized with 0.002% saponine or 0.1% triton-

X100 and stained with mAb anti-GRA5 and Bodipy or Texas Red. Macrophages and parasite nuclei were stained with Hoechst 33258. Coverslips were mounted in Mowiol (CSH Protocols, 2006) and the cells were observed and counted with a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped for epifluorescence and phase-contrast.

DNA fragmentation analysis

10^6 LEW macrophages were infected with 3×10^6 parasites for 1h, washed and incubated at 37°C for different times. As control, macrophages were treated with etoposide to induce apoptosis. After incubation, macrophages were transferred to lysis-buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM EDTA, 4% SDS, treated with 1µg/ml RNase (30 min, 37°C) and then with 100µg/ml proteinase K (30 min, 55°C). After phenol/chloroform extraction, DNA was recovered by ethanol precipitation and analysed on 1.8% agarose gels.

Western blot analysis

2.10^6 macrophages were lysed in 1% (vol/vol) Triton X-100 in 20mM Tris-HCL, pH 8, 150 mM NaCl plus 0.5mg/mL Na orthovanate, 1µg/mM pepstatin, leupeptin and aprotinin, and protease inhibitor cocktail (Roche). The lysates were centrifugated at 13.000 rpm for 15 min at 4°C then resolved by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes which were blocked overnight. Immunoblots were carried out using the anti-rat ALOX15 from Abcam and anti rat ACTIN-β from Sigma), peroxidase-labeled secondary antibody and a chemiluminescence detection kit from Pierce (Rockford, IL).

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen). All primers were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (Q-PCR) reactions were prepared with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master reaction mix (Roche Diagnostics) and run in

duplicate on a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics). *Alox15* expression was normalised on *Mdh1* and *Atp5-b* expression

Arachidonic acid metabolism study

Adherent macrophages were incubated in the presence of 1 μ ci [3 H]AA and culture for 18 h in SFM. The study of the [3 H]AA incorporation process was performed at the end of the incorporation period by collecting the supernatant of macrophages cultured with [3 H]AA in order to analyse lipids into which [3 H]AA had been incorporated. The LO 3 H-metabolites (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, leucotrienes (LT) B₄, C₄, D₄ and lipoxin A₄) were identified with a Berthold LB2821 TLC-linear analyser using retention times and co-migration with authentic standards.

Legends to figures

Figure 1: Genetic dissection of the *Toxo1* locus using congenic lines.

Rats were infected orally with 20 cysts from the recombinant *T.gondii* Prugniaud strain that expresses the β -galactosidase gene (pru- β -gal) as previously described (Dao et al., 2002). The intracellular growth of RH-*T.gondii* on peritoneal macrophages was measured by monitoring [3 H] uracil incorporation into *T.gondii* RNA as described (Thardin et al., 1993). (A) Results in BN, LEW, LEW.BNc10F and BN.LEWc10-C which allowed the localisation of *Toxo1* to a 7.6 Mb interval (Cavaillès et al., 2006). (B) Results in the parental BN.LEWc10-C congenic line and in five congenic sub-lines derived from this line as described in materials and methods and characterized by recombination within *Toxo1*, which allowed the localisation of the gene(s) of control within a 1.09 Mb interval. In (A) and (B) the upper part shows the parasites proliferation within macrophages; the columns and the bars show the mean result and standard deviation on triplicates from one macrophage preparation; the lower part shows the genetic map with the microsatellite markers; nn: homozygous BN; ll: homozygous LEW. All these results are representative of at least 4-5 independent experiments.

Figure 2: *Toxo1* controls parasites and host-cells fate after during macrophages infection.

(A, B). *Toxoplasma* proliferated within BN macrophages but died within LEW macrophages. BN and LEW macrophages were infected with RH-YFP₂ *T.gondii* (green). Two or eight hours post infection, cells were stained with anti-Gra5 antibody (red) and Hoechst 33258 (blue) that stains nucleus. Loss of YFP₂ fluorescence in Gra5 positive vacuole indicates parasite death (A: 8H, lower panel on the right). Ten randomly selected fields containing at

least 100 macrophages were counted per well and per experiment. A compilation of four individual experiments is shown in figure 2 B.

(C, D, E) *Toxoplasma* infection induced non-apoptotic cell-death in LEW macrophages. (C) co-localisation of Gra5 positive vacuole/YFP2 parasite and condensated host cell nucleus in BN and LEW infected macrophages. The columns show the mean values and the vertical bars the SD found in four independent experiments. (D) Propidium iodide staining of infected BN and LEW macrophages. Macrophages were left untreated or infected with RH *T.gondii*. Eight hours after the beginning of the culture, macrophages were stained with Hoechst 33258. Up to 50% of infected LEW macrophages but less than 15% of BN macrophages show loss of membrane integrity (E) *Toxoplasma*-induced macrophages cell-death is not associated with nucleus and DNA fragmentation. LEW macrophages were infected with RH-*T.gondii* or treated with etoposide (lane4) and stained with Hoechst 33258. Arrows indicate fragmented nucleus. DNA content of *T.gondii* infected-LEW macrophages were analysed on agarose gel at different time points post infection (lane 1: 6h, 2: 12h, 3: 18h) with etoposide treated LEW macrophage as control of apoptotic cell death (lane 4). No detectable DNA ladder could be observed in infected LEW macrophages. (F) *Tox1* controls host-cell survival after *T.gondii* infection. Macrophages from congenic rats were infected with RH-*T.gondii* and stained with propidium iodide eight hours post infection. Macrophages from BN.LEWc10-Cg rats bearing the LEW *Tox1* locus show cell-death induction after infection contrary to macrophages from LEW.BNc10-F rat bearing the BN *Tox1* locus. Importantly, the *Tox1* effect on host-cell survival was note whatever the genetic background.

Figure 3: *Tox1* controls the 12/15 lipoxygenase expression and arachidonic acid metabolism.

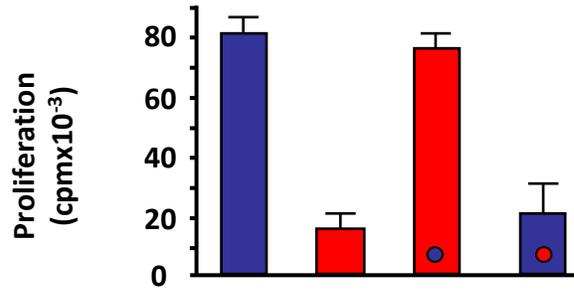
(A) Relative expression of *Alox15* mRNA and protein expression in naïve or infected macrophages from BN or BN.LEWc10-Cg (bearing the LEW *Toxol* locus). Significant differences were noted between the two rat strains. Permissive macrophages were associated with an increase in *Alox15* expression relative to non-permissive macrophages. (B) The difference in *Alox15* expression was confirmed at the protein level. 2µg of protein from BN or BN.LEWc10-Cg were analysed by western blot with the indicated antibodies. (C, D) Quantification of LO metabolites in supernatants from macrophages culture. Adherent macrophages were incubated in the presence of 1 µCi [³H] arachidonic acid for 18 h in SFM. At the end of incorporation, total LO [³H]-metabolites and HETE secreted in the culture medium were extracted, identified then measured as described in the M&M section..

REFERENCES

- Aliberti, J., and Bafica, A. (2005). Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 283-288.
- Aliberti, J., Hieny, S., Reis e Sousa, C., Serhan, C. N., and Sher, A. (2002a). Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol* 3, 76-82.
- Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. (2002b). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med* 196, 1253-1262.
- Boyden, E. D., and Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38, 240-244.
- Brennan, M. A., and Cookson, B. T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38, 31-40.
- Cavaillès, P., Sargent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Appolinaire, S., *et al.* (2006). The rat Tox1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 744-749.
- Cervantes, J., Nagata, T., Uchijima, M., Shibata, K., and Koide, Y. (2008). Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol* 10, 41-52.
- Chanock, S. J., Manolio, T., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Hunter, D. J., Thomas, G., Hirschhorn, J. N., Abecasis, G., Altshuler, D., Bailey-Wilson, J. E., *et al.* (2007). Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 447, 655-660.
- Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D., and Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107, 309-316.
- Dao, A., Soete, M., Sargent, V., Deslee, D., Fortier, B., and Dubremetz, J. F. (2002). Potential of beta-galactosidase-expressing *Toxoplasma gondii* for in situ localization and observation of rare stages of the parasite life cycle. *Parasitol Res* 88, 69-72.
- Dubey, J. P., and Frenkel, J. K. (1998). Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol* 77, 1-32.
- Jacob, H. J., and Kwitek, A. E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 3, 33-42.
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., and McAuley, J. B. (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* 154, 357-365.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 227, 95-105.
- Mack, D. G., Johnson, J. J., Roberts, F., Roberts, C. W., Estes, R. G., David, C., Grumet, F. C., and McLeod, R. (1999). HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 29, 1351-1358.
- Mas, M., Cavaillès, P., Colacios, C., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Christen, M. O., Druet, P., Pelletier, L., Gauguier, D., and Fournie, G. J. (2004). Studies of congenic lines in the Brown Norway rat model of Th2-mediated immunopathological disorders show that the aurothiopropanol sulfonate-induced

- immunological disorder (Aiid3) locus on chromosome 9 plays a major role compared to Aiid2 on chromosome 10. *J Immunol* *172*, 6354-6361.
- 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.
- Saeij, J. P., 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.
- Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslee, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J. F., Fournie, G. J., Saoudi, A., and Cesbron-Delauw, M. F. (2005). Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. *Infect Immun* *73*, 6990-6997.
- Tang, D. G., Chen, Y. Q., and Honn, K. V. (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5241-5246.
- 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.
- Thardin, J. F., M'Rini, C., Beraud, M., Vandaele, J., Frisach, M. F., Bessieres, M. H., Seguela, J. P., and Pipy, B. (1993). Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. *Infect Immun* *61*, 1432-1441.
- Ting, J. P., Willingham, S. B., and Bergstralh, D. T. (2008). NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 372-379.
- Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* *8*, 169-182.
- Willingham, S. B., Bergstralh, D. T., O'Connor, W., Morrison, A. C., Taxman, D. J., Duncan, J. A., Barnoy, S., Venkatesan, M. M., Flavell, R. A., Deshmukh, M., *et al.* (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* *2*, 147-159.
- Wittwer, J., Bayer, M., Mosandl, A., Muntwyler, J., and Hersberger, M. (2007). The c.-292C>T promoter polymorphism increases reticulocyte-type 15-lipoxygenase-1 activity and could be atheroprotective. *Clin Chem Lab Med* *45*, 487-492.
- Zhao, Y. O., Khaminets, A., Hunn, J. P., and Howard, J. C. (2009). Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN-gamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog* *5*, e1000288.
- Zong, W. X., and Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* *20*, 1-15.

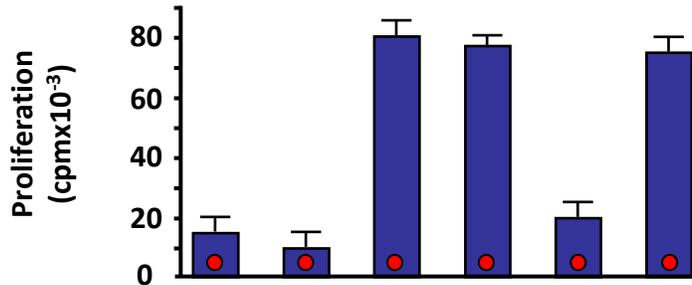
Ab responses + - + -
 Brain cyst + - + -



D10Rat116	nn			nn
D10Wox13	nn		nn	
D10Rat27	nn		nn	
D10Rat86	nn			
D10Mgh5	nn			nn

Toxo1: 7.6Mb

BN LEW
 LEW.BNc10-F BN.LEWc10-C

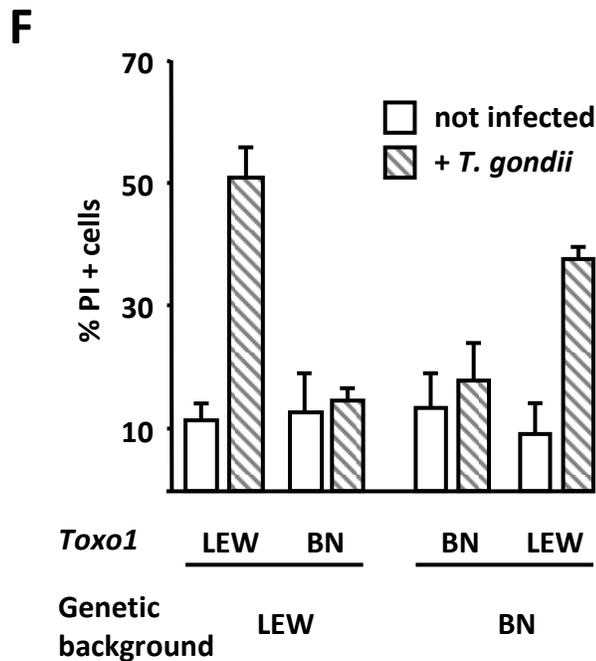
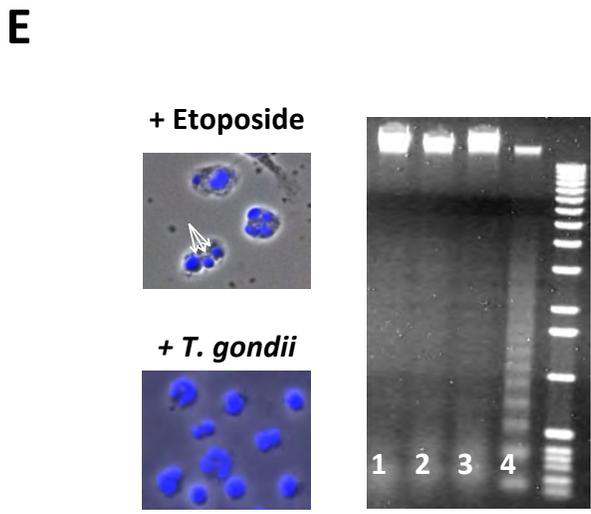
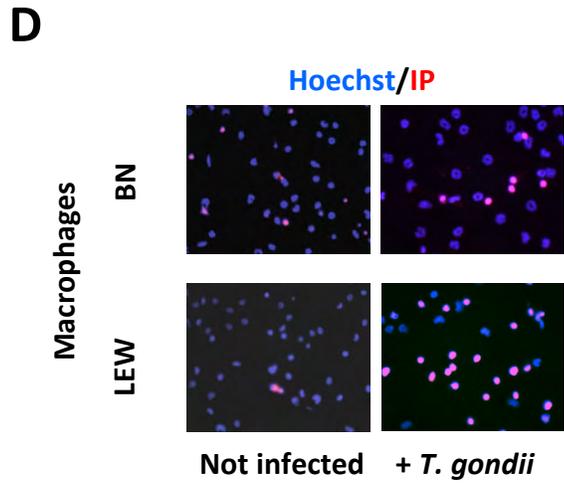
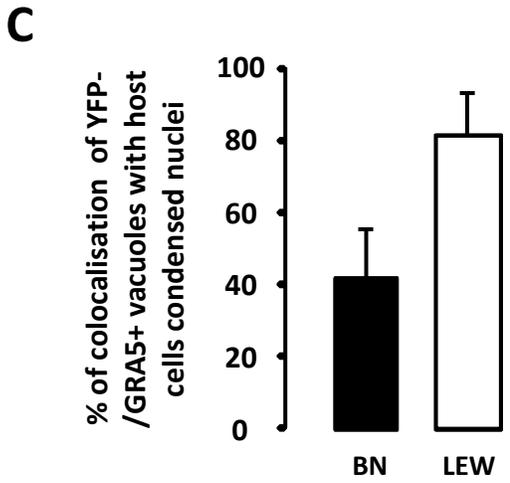
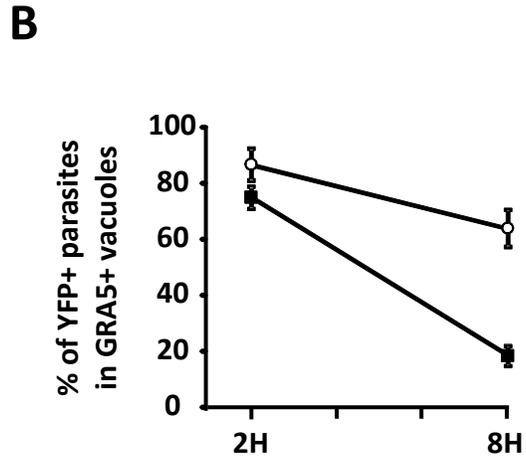
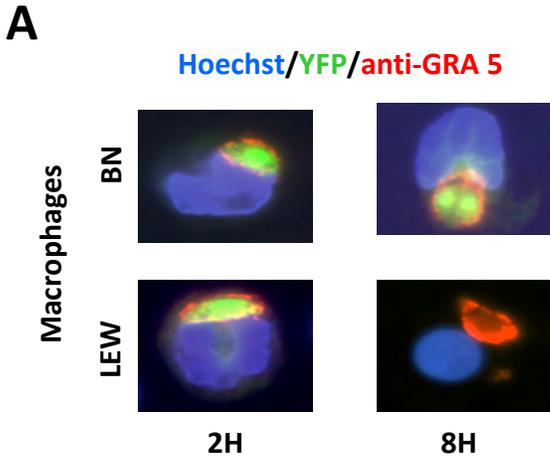


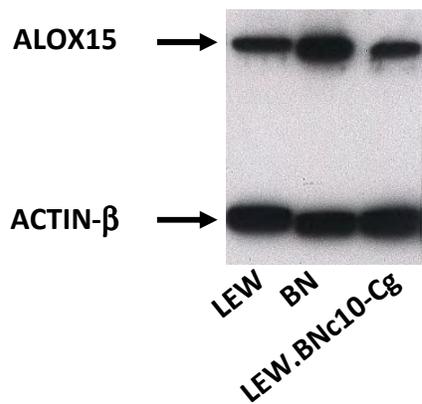
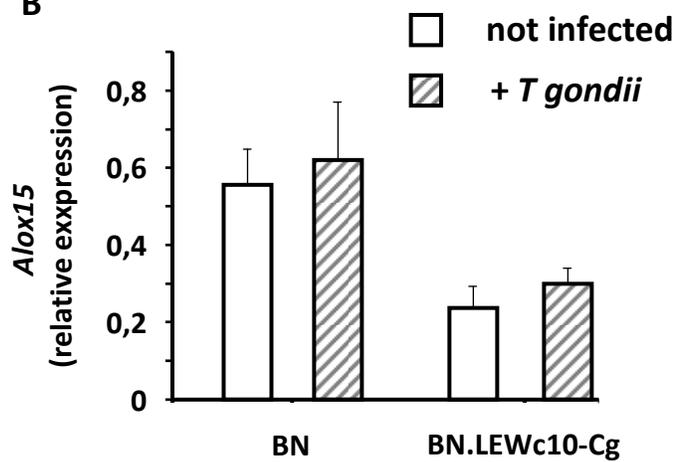
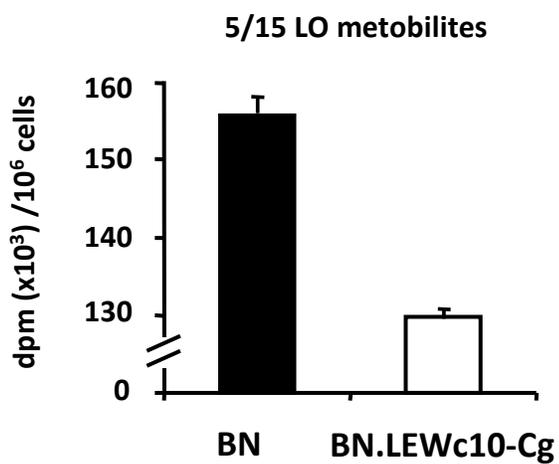
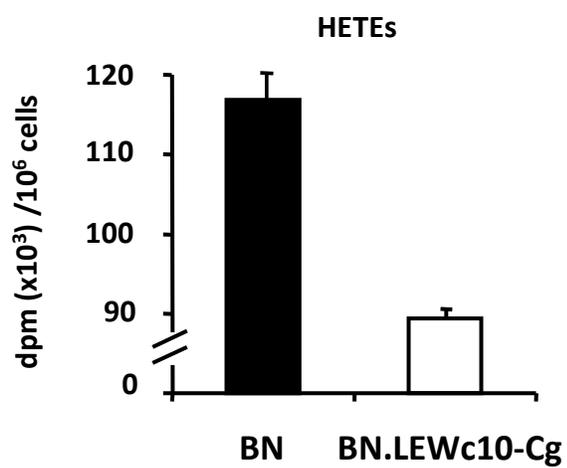
D10Rat116	nn	nn	nn	nn	nn	nn
D10Wox13		nn	nn	nn	nn	nn
D10Wox12		nn	nn	nn	nn	nn
D10Wox40			nn		nn	nn
Au028423			nn		nn	nn
Au048280			nn	nn		nn
Au025972			nn	nn		nn
Au026393			nn	nn		
D1Rat160				nn		
D10Rat80				nn	nn	nn
D10Rat86				nn	nn	nn
D10Mgh5	nn	nn	nn	nn	nn	nn

Toxo1: 1.09Mb

C Cd Ce Cf Cg Cga

BN.LEWc10-



A**B****C****D**

DISCUSSION

Les désordres immunologiques induits par les métaux lourds

Dissection génétique du locus *Cec1* : identification d'une région de 117 Kb

Comme décrit dans l'introduction, le niveau d'expression du marqueur CD45RC sur les populations lymphocytaires définit deux sous-populations qui présentent des fonctions différentes et des capacités de régulations mutuelles. Suivant les modèles physiopathologiques étudiés les sous-populations CD45RC^{high} et CD45RC^{low} peuvent toutes deux être pathogènes ou protectrices. Ainsi dans le modèle de la maladie mercurielle chez le rat BN, la déplétion des cellules CD45RC^{high} à l'aide de l'anticorps monoclonal OX22 aggrave la maladie (Mathieson et al., 1993). A l'inverse, la pathologie systémique induite dans des rats athymiques par le transfert de lymphocytes T CD45RC^{high} peut être prévenue par les lymphocytes T CD45RC^{low} (Powrie and Mason, 1990). Le pourcentage relatif entre les sous-populations CD45RC^{high} et CD45RC^{low} est un facteur génétiquement contrôlé et qui diffère entre différentes souches de rats de laboratoire. Notre groupe avait identifié sur le chromosome 9 le locus *Cec1* qui contrôle le rapport entre ces sous-populations chez les rats BN et LEW (Xystrakis et al., 2004a). Nous avons également montré une co-localisation de la région *Cec1* avec *Aiid3* et *Eae4*, des régions qui contrôlent respectivement la susceptibilité du rat BN à la maladie induite par les sels d'or et la susceptibilité des rats LEW et DA à l'EAE, un modèle de sclérose en plaque. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'un seul et même gène dans cette région influençait la nature du compartiment lymphocytaire T, avec un impact profond sur la susceptibilité des animaux à développer différentes pathologies impliquant le système immunitaire. Toutefois la taille importante des locus ne nous permettait pas d'identifier formellement de gènes candidats. D'autre part nous ne pouvions exclure que des gènes proches contrôlassent de façon indépendante les différents phénotypes.

Dans le travail présenté ici, nous avons pu mettre en évidence par dissection génétique des locus à l'aide de sous-lignées congéniques que la région *Cec1* était contenue dans un intervalle de 117 Kb comprenant chez le rat seulement quatre gènes identifiés. Ce locus contrôle ce phénotype à la fois dans la population CD4 et dans la population CD8. L'étape suivante était naturellement de tester ces sous-lignées dans les modèles expérimentaux de désordres immunopathologiques.

Dissection génétique du locus *Aiid3* : *Aiid3* et *Cec1* co-localisent dans 117 Kb

Les différentes sous-lignées congéniques ont été traitées par des injections régulières de sels d'or. Chez le rat BN, ce traitement induit l'apparition d'un syndrome d'hypergammaglobulinémie qui concerne principalement les isotypes IgE et IgG1. La susceptibilité du rat à cette maladie est contrôlée par le locus *Aiid3* précédemment décrit par l'équipe et localisé dans une région de 1.2 cM. L'analyse des résultats obtenus dans les différentes sous-lignées congéniques et en particulier dans la lignée BN.LEWc9-Bf nous permet ici de localiser précisément le locus *Aiid3* dans l'intervalle de 117 Kb identique à *Cec1*. L'hypothèse d'une association directe entre la nature du compartiment lymphocytaire T définie par le rapport entre sous-population CD45RC^{high} et CD45RC^{low} et la susceptibilité à la maladie induite par les sels d'or est donc confortée par ces résultats.

Le traitement des rats BN par des sels de mercure induit comme pour les sels d'or une hypergammaglobulinémie affectant principalement les isotypes IgE et IgG1, néanmoins la maladie est bien plus sévère. Les animaux perdent jusqu'à 30% de leur poids initial et peuvent mourir au cours de la période de traitement. Les dépôts d'immunoglobulines de type G sur les glomérules rénaux s'accompagnent d'un syndrome néphrotique avec une protéinurie importante. Enfin, une vascularite affectant différents organes est observée. Le traitement par le bichlorure de mercure induit donc un dérèglement majeur du système immunitaire qui reproduit l'ensemble des événements observés suite au traitement par les sels d'or mais s'accompagne de symptômes spécifiques et sévères. L'étude génétique de cette maladie qui reproduit différents traits observés en clinique humaine représente un intérêt majeur. Il apparaissait donc intéressant de tester nos lignées congéniques dans ce modèle pour étudier l'impact d'*Aiid3/Cec1* sur les différents paramètres de la maladie mercurielle. Nous avons ainsi mis en évidence que la sous-lignée BN.LEWc9-Bf dans laquelle l'intervalle de 117Kb de *Aiid3/Cec1* d'origine LEW a été introduit dans le génome BN est totalement protégée face à l'ensemble des symptômes. Etant donné le caractère complexe de la maladie mercurielle qui touche plusieurs organes et implique différents types cellulaires et la protection complète observée dans la lignée BN.LEWc9-Bf, nous pouvons émettre l'hypothèse que le contrôle exercé par le(s) gène(s) au sein d'*Aiid3/Cec1* intervient très en amont dans la cascade physiopathologique induite par les sels de mercure. Une modification de la nature du compartiment lymphocytaire T qui organise et régule les différents effecteurs du système immunitaire est de nature à répondre à ce critère.

Mécanismes physiologiques impliqués dans l'effet du locus *Aiid3/Cec1*

Ayant obtenu ces résultats de nature génétique, nous avons essayé de comprendre les bases physiologiques de la protection vis-à-vis de la maladie mercurielle observée dans la lignée BN.LEWc9-Bf. Comme le phénotype d'hypergammaglobulinémie affecte principalement les isotypes IgE et IgG1 dont la production est sous la dépendance des cytokines de type 2 et en particulier l'IL-4, une hypothèse simple et en accord avec la co-localisation des deux locus pouvait être aisément formulée. Selon cette hypothèse, la protection conférée par le locus *Aiid3/Cec1* serait responsable d'une différenciation préférentielle des LT vers la voie T_{H1} en réponse aux sels de mercure, capable d'inhiber les voies de différenciation T_{H2} . L'analyse de la production cytokinique des lymphocytes T CD4 et CD8 provenant de rat BN ou de la lignée BN.LEWc9-Bf suite à une stimulation polyclonale a montré une association entre la protection observée *in vivo* et un fort niveau de production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 *in vitro*, aucune production de cytokines de type 2 n'étant détectée dans ce système expérimental. Nous avons testé l'implication du compartiment CD8 dans la résistance des rats BN.LEWc9-Bf à l'aide de l'anticorps monoclonal OX-8 (anti-CD8 alpha) capable d'induire de façon efficace une déplétion de ce compartiment. Un tel traitement restaure la production d'IgE et d'IgG1 de la lignée initialement protégée à des niveaux similaires à ceux observés chez la souche parentale BN. L'ensemble de ces résultats montre que des polymorphismes génétiques capables d'influer sur le niveau de production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 sont associés à des différences de susceptibilité à développer des réponses de type T_{H2} proches de celles observées en clinique humaine dans les maladies allergiques.

L'impact de la déplétion du compartiment CD8 a également été testé sur les autres paramètres de la maladie mercurielle. Contrairement à l'effet majeur observé sur l'hypergammaglobulinémie, la protection de la lignée BN.LEWc9-Bf concernant le syndrome néphrotique, la production d'auto-anticorps et la vascularite n'est pas affectée par un tel traitement. De façon cohérente, la production d'auto-anticorps et l'apparition du syndrome néphrotique chez les souris traitées au mercure sont réduites en l'absence d'IFN- γ [Kovo, 1998 #117].

L'article princeps du groupe de Peter Mathieson et David Oliveira publié en 1993 pointait le compartiment CD4 à la fois comme acteur et comme régulateur de la vascularite induite par le mercure (Mathieson et al., 1993). Dans ce travail réalisé chez le rat BN, les auteurs montraient que la déplétion des cellules CD45RC^{high} aggravait le phénotype étudié. A

l'inverse, la déplétion du compartiment CD8 n'avait pas d'effet sur la maladie, ceci emmenait les auteurs à conclure que les cellules protectrices éliminées par le traitement par l'anticorps OX22 étaient contenues dans la fraction CD4 (Mathieson et al., 1993). Nous avons étudié par PCR quantitative l'expression d'un large panel de gène sur la population T CD4 au cours de la maladie mercurielle dans la lignée congénique BN.LEWc9-Bf et dans la souche parentale BN. Chez le rat BN, le traitement par le mercure induit une activation polyclonale du compartiment T CD4 caractérisée par des profils de production cytokinique mixtes avec l'expression d'IFN- γ et d'IL-4 et l'expression de différents marqueurs membranaires d'activation comme OX40 ou ICOS. Dans la lignée congénique à l'inverse, l'activation polyclonale est très largement réduite et nous n'avons pu détecter aucune induction de production cytokinique. Le traitement par l'anticorps OX8 qui élimine la population CD8 et lève la protection contre l'hypergammaglobulinémie ne s'accompagne pas d'une activation complète du compartiment CD4. Ces résultats peuvent découler de l'incapacité des lymphocytes CD4 des rats BN.LEWc9-Bf à répondre aux sels de mercure mais il est plus probable que la résistance des rats BN.LEWC9-Bf soit dépendante d'un mécanisme de tolérance exercé par les cellules T CD4 CD45RC^{high}. Dans cette dernière hypothèse les mécanismes régulateurs utilisés par les lymphocytes T CD4 CD45RC^{high} restent encore à découvrir. On peut noter que les cellules régulatrices FOXP3+ qui sont intégralement comprises dans la fraction CD45RC^{low} ne semblent pas impliquées dans ce modèle, des études supplémentaires étant nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires de régulation.

Le groupe du Dr Saoudi a récemment montré chez l'homme que les patients souffrant de vascularite à ANCA présentaient un pourcentage de cellules T CD4 CD45RC^{high} diminué par rapport à des patients contrôles. Dans cette étude, aucune association entre la vascularite et le compartiment CD8 n'a pu être mise en évidence (Ordonez et al., 2009). Ces travaux suggèrent que chez l'homme, le ratio entre les populations T CD4 CD45RC^{high} et CDR5RC^{low} est un facteur influençant la susceptibilité à développer des désordres immuno-pathologiques et valident la stratégie d'utilisation des modèles animaux pour remonter aux pathologies humaines.

Identification de gènes candidats dans le locus *Aiid3/Cec1*

L'avancée majeure fournie par ce travail est la localisation fine de la région contrôlant la susceptibilité aux désordres immuno-pathologiques induits par les sels de métaux lourds.

Quatre gènes situés dans cet intervalle sont répertoriés dans les bases de données : *C3*, *Gpr108*, *Trip10* et *Vav1*. Parmi ceux-ci *Gpr108* qui code pour un récepteur à sept segments transmembranaires exprimé dans les poumons et *Trip10*, un récepteur à l'hormone thyroïdienne ne présentent aucun polymorphisme codant entre les souches de rats LEW et BN. Les deux gènes restant sont impliqués à différents niveaux dans les réponses immunes et peuvent prétendre être de bons gènes candidats dans les phénotypes décrits. Toutefois plusieurs arguments incitent à exclure le gène *C3* de la (courte) liste des candidats : (1) les protéines du complément sont principalement produites par le foie alors que l'analyse de chimères hématopoïétiques nous a montré que le rapport entre les sous-populations T CD45RC^{high} et CD45RC^{low} et la susceptibilité/résistance à la maladie induite par les sels d'or sont dépendant de facteurs intrinsèques aux cellules hématopoïétiques ; (2) différentes études ont montré à l'aide du venin de cobra qui permet d'induire une décomplémentation *in vivo* que cette protéine n'avait pas d'impact sur la maladie mercurielle. Bien que nous ne puissions exclure la présence d'autres gènes ou de petits ARN inconnus dans le locus, le gène *Vav1* dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques apparaît clairement comme un candidat majeur.

Le gène *Vav1* code pour un facteur d'échange nucléotidiques (GEF : GDP/GTP exchange factors) qui active les GTPase de la famille Rho/Rac. Fortement conservé entre les espèces (92% d'homologie entre la protéine humaine et celle du rat), l'importance du gène *Vav1* dans les fonctions lymphocytaires T a été souligné par des modèles de souris invalidées *Vav1*^{-/-}. La protéine VAV1 intervient dans les processus de génération thymique des lymphocytes T et dans leurs fonctions effectrices en périphérie. Activée par phosphorylation en réponse à la stimulation du TCR, VAV1 contrôle la réponse calcique des lymphocytes T, l'activation des voies des MAP kinase et de NF-κB et le remodelage du cytosquelette d'actine (Tybulewicz, 2005). VAV1 peut également être méthylée en réponse à l'activation des molécules de co-stimulation CD28, cette modification post transcriptionnelle se traduit par l'import nucléaire de la protéine suggérant un rôle direct de VAV1 dans la régulation de l'expression génique. Ce haut degré de complexité de la protéine et ses effets multiples sur le compartiment lymphocytaire T font de *Vav1* un excellent gène candidat pour les phénotypes étudiés.

Conclusions et perspectives

Les résultats présentés ici ont permis de localiser à l'extrémité télomérique du chromosome 9 du rat une région de 117Kb qui joue un rôle majeur sur la susceptibilité du rat à développer un désordre immuno-pathologique systémique induit par les sels de mercure. Cette même région contrôle également le rapport entre les sous-populations lymphocytaires définies par le niveau d'expression du marqueur CD45RC. Différents arguments bibliographiques et expérimentaux suggèrent que les deux phénotypes sont reliés de façon fonctionnelle. Le gène *Vav1* qui est localisé dans le locus et est polymorphe entre les deux souches de rats nous apparaît comme le seul candidat majeur.

L'ensemble de ces résultats servira de base au développement des recherches ultérieures qui s'articuleront en trois axes : (1) la démonstration formelle du rôle de *Vav1* dans les différents phénotypes étudiés ; (2) l'identification des mécanismes mis en jeu dans les différents phénotypes ; (3) la recherche de variants de *Vav1* dans des cohortes de patients souffrant de maladies allergiques ou de vascularites à ANCA.

Pour étudier l'impact fonctionnel de la mutation identifiée dans *Vav1*, le modèle rat atteint ses limites, en effet les travaux de génie génétique sont difficilement réalisables dans cette espèce. Pour cette raison, l'équipe, en collaboration avec les groupes de Bernard Malissen et de Bernard Monsara, a entrepris le développement de souris « knock-in » où la mutation spécifique du rat BN sera introduite chez la souris. Cette stratégie suppose que l'impact de la mutation sera le même dans les deux espèces rat et souris, elle représente un pari audacieux pour notre équipe.

Les études d'association sur des cohortes de patients seront effectuées sur la plateforme « Centre de Ressource Génotypage et Séquençage » de la genopole® de Toulouse. Des marqueurs « TagSNPs » seront choisis en utilisant la base de donnée HapMap (<http://www.hapmap.org/cgi-perl>) pour couvrir le gène *Vav1* et génotypés en utilisant la technologie Illumina® qui permet le génotypage simultané de 1 à 384 SNP par échantillon. Pour collecter les échantillons biologiques, un réseau de recherche clinique regroupant quatre centres de dermatologie pédiatrique a été créé et une collection constituée d'ADN provenant de 1000 familles présentant un ou plusieurs enfants atteints de dermatite atopique est en cours de constitution. Pour l'heure, plus de 150 familles (parents et enfants) ont été génotypés pour des marqueurs de *Vav1*. Une association suggestive ($p < 0.01$) entre 2 SNP de *Vav1* et la dermatite atopique a pu être mise en évidence. Nous espérons que le génotypage d'un plus grand nombre de patients pourra associer de façon significative ces marqueurs à la maladie.

Contrôle génétique de la susceptibilité à la toxoplasmose

Toxo1 : un « nouveau » locus contrôlant la dissémination parasitaire et la réponse macrophagique.

L'étude génétique de la susceptibilité à la toxoplasmose se limitait principalement à des travaux réalisés chez la souris. Les résultats issus de ces analyses ont fournis des avancées non négligeables dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'infection. Cependant, la maladie développée par les souris, généralement létale, est assez éloignée de la pathologie humaine. A l'inverse, l'infection chez le rat est asymptomatique et reproduit fidèlement les événements se déroulant chez l'homme. Cette espèce est donc un modèle de choix pour l'étude de la toxoplasmose, les résultats obtenus ouvrent des possibilités intéressantes pour le transfert à la pathologie humaine.

T. gondii est généralement décrit comme capable d'infecter tous les hôtes à sang chaud. Chez l'homme, comme dans de nombreuses espèces, le système immunitaire par l'intermédiaire de réponses cellulaire et humorale arrive à limiter la dissémination parasitaire. Sous la pression de ces réponses, le parasite va s'enkyster dans le cerveau et les muscles lisses. La séronégativité vis-à-vis du toxoplasme est donc classiquement associée à une absence de primo-infection. Le rat LEW représente un modèle unique de résistance innée face à ce parasite ; chez cet animal, l'élimination du parasite est complète avant la mise en place d'une réponse humorale, elle se traduit par l'absence de kystes dans le cerveau. De façon importante et contrairement aux situations observées chez les souris, la protection s'applique aux trois principales souches de toxoplasme. L'identification des facteurs génétiques et des voies physiologiques qui sous-tendent cette résistance pourrait être utilisée pour le développement d'approches thérapeutiques ou prophylactique chez l'homme.

Notre équipe a tiré profit de son expérience des études génétiques chez le rat pour identifier les régions chromosomiques contrôlant la résistance du rat LEW. De façon inattendue, étant donné le caractère complexe des maladies infectieuses, l'analyse de liaison sur une population F2 LEWxBN n'a révélé qu'un seul locus de contrôle baptisé *Toxo1*. Le « poids » phénotypique du locus a été confirmé à l'aide de lignées congéniques réciproques qui nous ont permis de montrer qu'un ou plusieurs gènes présents dans le locus contrôlent l'issue de l'infection toxoplasmique de façon indépendante du reste du génome.

Une première étude avait mis en évidence l'implication des cellules hématopoïétiques dans la résistance des rats LEW (Sergent et al., 2005). La recherche des mécanismes biologiques impliqués dans le contrôle de l'infection par le locus *Tox1* nous a amené à étudier la réponse des macrophages infectés par *T.gondii*. En effet, ces cellules jouent un rôle majeur et complexe dans les événements de la phase aiguë de la maladie, d'une part ils participent au contrôle de l'infection grâce à différents mécanismes permettant l'élimination du parasite, d'autre part, ils interviennent dans le transport et la dissémination parasitaire dans l'organisme et en particulier le cerveau. Nous avons donc mis en œuvre une stratégie *in vitro* pour étudier la prolifération du parasite dans les macrophages et montré que la résistance conférée par le locus *in vivo* est associée à l'incapacité du parasite à proliférer dans les macrophages péritonéaux. En accord avec le rôle des cellules hématopoïétiques dans le mécanisme de contrôle, la restriction de la prolifération n'est pas observée dans des fibroblastes.

Initialement localisé dans un intervalle de 7.6 Mb (1.7cM) grâce à l'analyse des rats F2 et des premières lignées congéniques développées, le locus *Tox1* a pu être restreint grâce à la génération de sous-lignées congéniques. Dans un premier temps, l'analyse phénotypique de ces lignées a porté sur la réponse macrophagique *in vitro*. L'étude de la réponse *in vivo* est en cours de caractérisation pour la dernière lignée générée très récemment (BN.LEWc10-Cga). Alors que la région qui contrôle la prolifération du parasite dans les macrophages est comprise entre les marqueurs Au028423 et Au026393 (1.09Mb), la région de contrôle de la réponse *in vivo* est pour l'instant définie entre les bornes Au028423 et D10Rat297 couvrant une région de 1.6Mb (données non montrées dans cette thèse). Toutefois, seulement 1 gène est présent dans les 0.5Mb, nous pouvons donc raisonnablement faire l'hypothèse d'une association complète entre les deux phénotypes.

Etudes fonctionnelles et génétiques : vers l'identification de gènes candidats

Notre démarche a été d'associer les connaissances bibliographiques sur les mécanismes d'immunité innée à des études fonctionnelles pour identifier des gènes candidats pouvant contrôler la réponse macrophagique vis-à-vis du toxoplasme. Parmi les 36 gènes contenus dans la région contrôlant cette réponse, notre attention a été particulièrement attirée par *Nalp1* et un groupe de 3 gènes codant pour des lipoxygénases : *Alox12*, *Alox12e* et *Alox15*.

Comme décrit dans le chapitre 2 de l'introduction, *Nalp1* fait partie de la famille de gènes qui codent pour les NLR, des récepteurs permettant la reconnaissance de pathogènes et l'initiation des réponses adaptatives. L'importance de ces récepteurs dans la réponse contre les pathogènes a été démontré récemment dans différents systèmes. L'exemple le plus pertinent pour notre étude est celui de la protéine NAIP, également membre de la famille des NLR, et de son implication dans la maladie du légionnaire. Causée par la bactérie intracellulaire *Legionella pneumophila*, cette maladie peut provoquer chez l'homme des formes sévères de pneumonies. *L.pneumophila* est présente dans les environnements aquatiques où elle infecte les protozoaires mais peut également proliférer au sein des macrophages et des monocytes dans une vacuole résistante à la fusion avec les lysosomes chez certains mammifères. Les souris de laboratoire sont généralement résistantes à l'infection par *Legionella pneumophila* à l'exception de la souche A/J. Dans ces animaux, les macrophages sont incapables de contenir la prolifération bactérienne. Des études génétiques réalisées entre la souche sensible A/J et la souche résistante C57BL/6J ont permis d'identifier le locus *Lgn1*, puis des allèles du gène *Naip5* comme déterminants centraux de la capacité des macrophages à limiter la prolifération bactérienne (Beckers et al., 1997) (Diez et al., 2003). Ces résultats ont pu être étendus récemment à l'homme (Vinzing et al., 2008). Le gène *Nalp1* qui contrôle la mort cellulaire des macrophages en réponse au facteur létal de l'anthrax apparaissait donc comme un candidat majeur. Nous avons mis en évidence dans le travail présenté dans cette thèse que le contrôle dépendant du locus *Toxo1* de la prolifération de *T.gondii* dans les macrophages s'accompagne de la mort nécrotique de ces derniers. Ce phénomène est cohérent avec l'implication de *Nalp1*, polymorphe entre les souches LEW et BN, dans le phénotype.

L'autre gène candidat identifié grâce aux données de la littérature est *Alox15* qui code une 12/15 lipoxygénase intervenant dans le métabolisme de l'acide arachidonique et en particulier dans la production de lipoxines A₄. Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction sur *Toxoplasma gondii*, ce médiateur est utilisé activement par le parasite pour limiter les réponses inflammatoires à son encontre. Chez la souris, où l'infection toxoplasmique est un événement hautement inflammatoire, l'absence ou l'inhibition des lipoxygénases réduisent le développement de kystes cérébraux mais conduisent au développement d'une encéphalite létale (Aliberti et al., 2002). Chez les espèces comme le rat ou l'homme qui développent des réponses moins exacerbées, le rôle des lipoxygénases dans l'infection toxoplasmique pourrait être à l'avantage exclusif du parasite. Nos résultats qui

associent la résistance des macrophages avec une diminution de l'expression d'*Alox15* et de la production des métabolites oxygénés de l'acide arachidonique suggèrent une implication de ce gène dans le phénotype de résistance.

Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, notre équipe a pu identifier puis localiser le locus *Toxo1* qui contrôle la susceptibilité du rat à l'infection par *T.gondii*. Des études fonctionnelles nous ont montré qu'une région de 1.09Mb détermine la réponse macrophagique vis-à-vis du parasite. Parmi les 36 gènes présents dans cet intervalle, au moins un variant du génome LEW permet les morts des parasites intracellulaires et des cellules hôtes. Ce mécanisme est proposé comme majeur pour expliquer l'incapacité du parasite à transiter dans l'organisme et à migrer dans le cerveau chez les rats LEW. Nos études soulignent l'implication possible des gènes *Nalp1* et *Alox15* dans le phénotype. La suite de ce projet se développera sur différents axes : (1) l'identification du rôle respectif des gènes candidats dans les phénotypes *in vivo* et *in vitro* grâce à la stratégie de dissection génétique ; (2) la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse macrophagique ; (3) La recherche de polymorphismes associés à la résistance ou à des différences de susceptibilité à la toxoplasmose chez l'homme.

Le travail de dissection génétique se poursuit au sein de notre laboratoire. Récemment un rat recombinant a pu être sélectionné et le processus de génération de lignée congénique et en cours. Cette nouvelle lignée sera d'une importance capitale pour évaluer les rôles respectifs de *Nalp1* et *Alox15*. En effet, la région génomique d'origine LEW dans cette lignée de fond génétique BN est située entre les marqueurs Au028423 et Au025972 (Voir Fig 1 de l'article 3) Cette région comprend *Alox15* mais pas *Nalp1*. Les premiers individus homozygotes pour cette région seront disponibles au début de l'année 2010.

Les études fonctionnelles visent à identifier les mécanismes mis en œuvre dans le processus de mort cellulaire induit par l'infection et en particulier le rôle de l'inflammasome et des caspases. D'autre part, nos études sur l'implication des lipoxycgénases et des lipoxines se poursuivent. Nos données préliminaires indiquent qu'un traitement des macrophages LEW par l'aspirine, qui oriente l'activité de l'enzyme COX-2 vers la production d'épi-lipoxines, reverse la capacité de restriction de la prolifération parasitaire. Enfin des études d'inhibition de l'expression génique seront réalisées. Après avoir essayé sans succès de réaliser cette stratégie dans les macrophages primaires de rat malgré l'utilisation de différents systèmes

(siRNA, RNA morpholinos), nous nous orienterons vers l'utilisation de lignées monocytaires humaines où l'utilisation de ces systèmes a déjà été documenté et validé.

Enfin, les approches génétiques chez l'homme ont d'ores et déjà été initiées en collaboration avec le groupe du Dr Rima McLeod (University of Chicago-Medical center). Pour cela, ce groupe dispose d'échantillons d'ADN provenant de deux cohortes de patients. La première cohorte (NCCCTS) est composée de 176 patients infectés *in utero* et présentant des phénotypes de gravité variés. La seconde cohorte (GENET-EMSCOT) est composée de mères diagnostiquées pour une infection toxoplasmique aigue au cours de la grossesse et de leurs enfants. Dans ce groupe composé de 457 couples mère-enfant, 225 enfants n'ont pas été infectés *in utero*. Parmi les 232 restants, différents phénotypes ont été observés à l'âge de trois ans (absence de signe clinique pour 66% des cas, maladie oculaire pour 15% des cas, maladie cérébrale pour 11% des cas et maladies oculaire et cérébrale pour des cas 8%). Différents TagSNP ont été sélectionnés dans les gènes orthologues humains d'*Alox15* et de *Nalp1*. Les résultats obtenus dans la cohorte NCCCTS montrent une association significative entre un SNP associé lipoxigenase et des différences de phénotypes ($p < 0.0005$). Une association avec *Nalp1* suggestive a également été observée ($p < 0.03$). Ces résultats doivent maintenant être confirmés dans l'autre cohorte. L'étude des patients n'ayant pas contractés de toxoplasmose congénitale malgré la primo-infection de leurs mères au cours de la grossesse sera d'un intérêt particulier.

Bibliographie

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* *383*, 787-793.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* *3*, 549-557.
- Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med* *196*, 1253-1262.
- Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B., and Subauste, C. S. (2006). CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* *116*, 2366-2377.
- Aosai, F., Chen, M., Kang, H. K., Mun, H. S., Norose, K., Piao, L. X., Kobayashi, M., Takeuchi, O., Akira, S., and Yano, A. (2002). *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. *Cell Stress Chaperones* *7*, 357-364.
- Axton, M. (2005). Framework for a fully powered risk engine. *Nat Genet* *37*, 1153.
- Bagenstose, L. M., Salgame, P., and Monestier, M. (1998). Mercury-induced autoimmunity in the absence of IL-4. *Clin Exp Immunol* *114*, 9-12.
- Baldini, M., Lohman, I. C., Halonen, M., Erickson, R. P., Holt, P. G., and Martinez, F. D. (1999). A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* *20*, 976-983.
- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., and Wright, A. L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* *343*, 538-543.
- Bannenber, G. L., Aliberti, J., Hong, S., Sher, A., and Serhan, C. (2004). Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. *J Exp Med* *199*, 515-523.
- Barroso, I., Luan, J., Middelberg, R. P., Harding, A. H., Franks, P. W., Jakes, R. W., Clayton, D., Schafer, A. J., O'Rahilly, S., and Wareham, N. J. (2003). Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* *1*, E20.
- Beckers, M. C., Ernst, E., Diez, E., Morissette, C., Gervais, F., Hunter, K., Housman, D., Yoshida, S., Skamene, E., and Gros, P. (1997). High-resolution linkage map of mouse chromosome 13 in the vicinity of the host resistance locus Lgn1. *Genomics* *39*, 254-263.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* *27*, 20-21.
- Bermudez, L. E., Covaro, G., and Remington, J. (1993). Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect Immun* *61*, 4126-4130.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.
- Bettelli, E., and Kuchroo, V. K. (2005). IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med* *201*, 169-171.
- Betts, R. J., and Kemeny, D. M. (2009). CD8⁺ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacol Ther* *121*, 123-131.
- Biancone, L., Andres, G., Ahn, H., Lim, A., Dai, C., Noelle, R., Yagita, H., De Martino, C., and Stamenkovic, I. (1996). Distinct regulatory roles of lymphocyte costimulatory pathways on T helper type-2 mediated autoimmune disease. *J Exp Med* *183*, 1473-1481.
- Bliss, S. K., Gavrilescu, L. C., Alcaraz, A., and Denkers, E. Y. (2001). Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* *69*, 4898-4905.

- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Boothroyd, J. C., and Dubremetz, J. F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* 6, 79-88.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331.
- Boughan, P. K., Argent, R. H., Body-Malapel, M., Park, J. H., Ewings, K. E., Bowie, A. G., Ong, S. J., Cook, S. J., Sorensen, O. E., Manzo, B. A., *et al.* (2006). Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* 281, 11637-11648.
- Boyden, E. D., and Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38, 240-244.
- Brandt, V. L., and Roth, D. B. (2002). A recombinase diversified: new functions of the RAG proteins. *Curr Opin Immunol* 14, 224-229.
- Bruey, J. M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C. L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., *et al.* (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 129, 45-56.
- Brunet, L. R. (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol* 1, 1457-1467.
- Bryan, N. B., Dorfleutner, A., Rojanasakul, Y., and Stehlik, C. (2009). Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol* 182, 3173-3182.
- Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. (2002). Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* 70, 5216-5224.
- Butcher, B. A., Greene, R. I., Henry, S. C., Annecharico, K. L., Weinberg, J. B., Denkers, E. Y., Sher, A., and Taylor, G. A. (2005). p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infect Immun* 73, 3278-3286.
- 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.
- Castedo, M., Pelletier, L., Rossert, J., Pasquier, R., Villarroya, H., and Druet, P. (1993). Mercury-induced autoreactive anti-class II T cell line protects from experimental autoimmune encephalomyelitis by the bias of CD8+ antiergotypic cells in Lewis rats. *J Exp Med* 177, 881-889.
- Cavaillès, P., Sergent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Appolinaire, S., *et al.* (2006). The rat Tox1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 744-749.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., and *et al.* (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.
- Chatila, T. A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H. M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A. M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106, R75-81.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Coffman, R. L., Leberman, D. A., and Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 54, 229-270.
- Cookson, W. (2004). The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 4, 978-988.
- Cookson, W. O., Sharp, P. A., Faux, J. A., and Hopkin, J. M. (1989). Linkage between

- immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* *1*, 1292-1295.
- Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D., and Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* *107*, 309-316.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744-748.
- Dahlman, I., Jacobsson, L., Glaser, A., Lorentzen, J. C., Andersson, M., Luthman, H., and Olsson, T. (1999). Genome-wide linkage analysis of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat identifies a major susceptibility locus on chromosome 9. *J Immunol* *162*, 2581-2588.
- Darvasi, A. (1997). Interval-specific congenic strains (ISCS): an experimental design for mapping a QTL into a 1-centimorgan interval. *Mamm Genome* *8*, 163-167.
- Darvasi, A. (1998). Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* *18*, 19-24.
- Daubener, W., and MacKenzie, C. R. (1999). IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol* *467*, 517-524.
- Davies, R. W. (1971). The genetic relationship of two quantitative characters in *Drosophila melanogaster*. II. Location of the effects. *Genetics* *69*, 363-375.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M. A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M. G., Mansur, D. S., Weingart, R., Schmidt, R. R., Golenbock, D. T., *et al.* (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *179*, 1129-1137.
- Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L., and Sanderson, C. J. (1990). Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* *172*, 1425-1431.
- Descargues, P., Deraison, C., Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., and Hovnanian, A. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet* *37*, 56-65.
- Devereux, G. (2006). The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* *6*, 869-874.
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S. E., Shin, H. S., Friedman, J., Dracopoli, N. C., and Lander, E. S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* *131*, 423-447.
- Dietz, H. C., Cutting, G. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M., Puffenberger, E. G., Hamosh, A., Nanthakumar, E. J., Curristin, S. M., and *et al.* (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* *352*, 337-339.
- Diez, E., Lee, S. H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., and Gros, P. (2003). *Birc1e* is the gene within the *Lgn1* locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet* *33*, 55-60.
- Dobbin, C. A., Smith, N. C., and Johnson, A. M. (2002). Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide. *J Immunol* *169*, 958-965.
- Dubey, J. P., and Frenkel, J. K. (1998). Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Vet Parasitol* *77*, 1-32.
- Duncan, J. A., Bergstralh, D. T., Wang, Y., Willingham, S. B., Ye, Z., Zimmermann, A. G., and Ting, J. P. (2007). Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8041-8046.
- Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B., and Hamid, Q. A. (1996). Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol* *97*, 1356-1365.
- Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., and Martinez, F. D. (2004). Toll-like receptor 2 as a

- major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* *113*, 482-488.
- Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., and Martinez, F. D. (2005). Opposite effects of CD 14/260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol* *116*, 601-607.
- Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* *196*, 1645-1651.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J. F. (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* *6*, 5773-5784.
- 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*, e14.
- Encinas, J. A., and Kuchroo, V. K. (2000). Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* *12*, 691-697.
- Endharti, A. T., Rifa, I. M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K., and Suzuki, H. (2005). Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* *175*, 7093-7097.
- Fang, T. C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D. M., Blacklow, S. C., and Pear, W. S. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* *27*, 100-110.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J. C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* *25*, 713-724.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Charadin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* *115*, 461-473.
- Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C. G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* *156*, 5-7.
- Fijneman, R. J., de Vries, S. S., Jansen, R. C., and Demant, P. (1996). Complex interactions of new quantitative trait loci, Sluc1, Sluc2, Sluc3, and Sluc4, that influence the susceptibility to lung cancer in the mouse. *Nat Genet* *14*, 465-467.
- Finberg, R. W., and Kurt-Jones, E. A. (2006). CD14: chaperone or matchmaker? *Immunity* *24*, 127-129.
- Fink, S. L., Bergsbaken, T., and Cookson, B. T. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 4312-4317.
- Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. (1996). Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* *183*, 195-201.
- Fournie, G. J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J. F., Pelletier, L., Druet, P., and Saoudi, A. (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol Rev* *184*, 145-160.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* *227*, 106-128.
- Frankel, W. N., Johnson, E. W., and Lutz, C. M. (1995). Congenic strains reveal effects of the epilepsy quantitative trait locus, El2, separate from other El loci. *Mamm Genome* *6*, 839-843.
- Friend, S. L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D. E., and Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* *22*, 321-328.
- Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J. G., Fsihi, H., Kufer, T. A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R. L., Girardin, S. E., and Philpott, D. J.

- (2007). Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 26, 445-459.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L., and Sher, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 148, 1792-1796.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157, 798-805.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322.
- Germann, T., Hess, H., Szeliga, J., and Rude, E. (1996). Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 795, 227-240.
- Gershon, R. K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., *et al.* (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386, 619-623.
- Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C., and Bradley, P. J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot Cell* 6, 73-83.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., *et al.* (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872.
- Girardin, S. E., Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2, 736-742.
- Gonzalez, M. I., Caballero, D., Lopez, C., Albuquerque, T., Hernandez, R., de la Loma, A., Canizo, C., Vazquez, L., and San Miguel, J. F. (2000). Cerebral toxoplasmosis and Guillain-Barre syndrome after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2, 145-149.
- Gorham, J. D., Guler, M. L., Steen, R. G., Mackey, A. J., Daly, M. J., Frederick, K., Dietrich, W. F., and Murphy, K. M. (1996). Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12467-12472.
- Gracie, J. A., and Bradley, J. A. (1996). Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur J Immunol* 26, 1217-1221.
- Griffiths, M. M., Encinas, J. A., Remmers, E. F., Kuchroo, V. K., and Wilder, R. L. (1999). Mapping autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* 11, 689-700.
- Grindebacke, H., Wing, K., Andersson, A. C., Suri-Payer, E., Rak, S., and Rudin, A. (2004). Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 34, 1364-1372.
- Grunig, G., Warnock, M., Wakil, A. E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D. M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D. D., Locksley, R. M., and Corry, D. B. (1998). Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282, 2261-2263.
- Halushka, M. K., Fan, J. B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., and Chakravarti, A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22, 239-247.
- 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.
- Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P. C., Nakano, H., Fukase, K., Nunez, G., and Inohara, N. (2008).

- A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* 27, 373-383.
- Hitotsumatsu, O., Ahmad, R. C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E. E., Lee, B. L., Shiffin, N., Advincula, R., Malynn, B. A., *et al.* (2008). The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* 28, 381-390.
- Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B., and Barragan, A. (2005). Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell Microbiol* 7, 837-848.
- Hobbs, K., Negri, J., Klinnert, M., Rosenwasser, L. J., and Borish, L. (1998). Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1958-1962.
- Holgate, S. T., Davies, D. E., Powell, R. M., Howarth, P. H., Haitchi, H. M., and Holloway, J. W. (2007). Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J* 29, 793-803.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Hu, H., Moller, G., and Abedi-Valugerdi, M. (1999). Mechanism of mercury-induced autoimmunity: both T helper 1- and T helper 2-type responses are involved. *Immunology* 96, 348-357.
- Hunter, C. A., Bermudez, L., Beernink, H., Waegell, W., and Remington, J. S. (1995). Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* 25, 994-1000.
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., and Glimcher, L. H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307, 430-433.
- Hysi, P., Kabesch, M., Moffatt, M. F., Schedel, M., Carr, D., Zhang, Y., Boardman, B., von Mutius, E., Weiland, S. K., Leupold, W., *et al.* (2005). NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* 14, 935-941.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509-5512.
- Ito, N., Suzuki, Y., Taniguchi, Y., Ishiguro, K., Nakamura, H., and Ohgi, S. (2005). Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 25, 2027-2031.
- Jacob, H. J., and Kwitek, A. E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 3, 33-42.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E., and Sher, A. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 164, 3047-3055.
- Jeru, I., Duquesnoy, P., Fernandes-Alnemri, T., Cochet, E., Yu, J. W., Lackmy-Port-Lis, M., Grimprel, E., Landman-Parker, J., Hentgen, V., Marlin, S., *et al.* (2008). Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1614-1619.
- Jiang, H., Zhang, S. I., and Pernis, B. (1992). Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256, 1213-1215.
- Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., *et al.* (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813-824.
- Johnson, J. J., Roberts, C. W., Pope, C., Roberts, F., Kirisits, M. J., Estes, R., Mui, E., Krieger, T., Brown, C. R., Forman, J., and McLeod, R. (2002). In vitro correlates of Ld-restricted resistance to toxoplasmic encephalitis and their critical dependence on parasite strain. *J Immunol* 169, 966-973.
- Jones, C. A., Holloway, J. A., Popplewell, E. J., Diaper, N. D., Holloway, J. W., Vance, G. H., Warner, J. A., and Warner, J. O. (2002). Reduced soluble CD14 levels in amniotic fluid and breast milk are associated with the subsequent

- development of atopy, eczema, or both. *J Allergy Clin Immunol* *109*, 858-866.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., and Muller, U. R. (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* *154*, 4187-4194.
- Kabesch, M., Depner, M., Dahmen, I., Weiland, S. K., Vogelberg, C., Niggemann, B., Lau, S., Illig, T., Klopp, N., Wahn, U., *et al.* (2007). Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. *Allergy* *62*, 423-428.
- Kabesch, M., Hasemann, K., Schickinger, V., Tzotcheva, I., Bohnert, A., Carr, D., Baldini, M., Hackstein, H., Leupold, W., Weiland, S. K., *et al.* (2004). A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* *59*, 520-525.
- Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S. K., and von Mutius, E. (2003a). Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol* *111*, 813-817.
- Kabesch, M., Schedel, M., Carr, D., Woitsch, B., Fritsch, C., Weiland, S. K., and von Mutius, E. (2006). IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 269-274.
- Kabesch, M., Tzotcheva, I., Carr, D., Hofler, C., Weiland, S. K., Fritsch, C., von Mutius, E., and Martinez, F. D. (2003b). A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 893-898.
- Kainulainen, K., Pulkkinen, L., Savolainen, A., Kaitila, I., and Peltonen, L. (1990). Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *N Engl J Med* *323*, 935-939.
- Kappler, J. W., Roehm, N., and Murrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* *49*, 273-280.
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* *1*, 167-178.
- 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.
- Khan, I. A., Schwartzman, J. D., Matsuura, T., and Kasper, L. H. (1997). A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13955-13960.
- Kim, J. G., Lee, S. J., and Kagnoff, M. F. (2004a). Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* *72*, 1487-1495.
- Kim, L., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. (2004b). *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *J Immunol* *172*, 3003-3010.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* *307*, 731-734.
- Kobayashi, T., Walsh, P. T., Walsh, M. C., Speirs, K. M., Chiffoleau, E., King, C. G., Hancock, W. W., Caamano, J. H., Hunter, C. A., Scott, P., *et al.* (2003). TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* *19*, 353-363.
- Kolls, J. K., and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* *21*, 467-476.
- Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F., and Takiguchi, M. (2009). Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol* *182*, 1794-1798.
- Kono, D. H., Balomenos, D., Pearson, D. L., Park, M. S., Hildebrandt, B., Hultman, P., and Pollard, K. M. (1998). The prototypic Th2 autoimmunity induced by mercury is dependent on IFN-gamma and not Th1/Th2 imbalance. *J Immunol* *161*, 234-240.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* *362*, 245-248.

- Koppe, J. G., Loewer-Sieger, D. H., and de Roever-Bonnet, H. (1986). Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* *1*, 254-256.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* *27*, 485-517.
- Korstanje, R., and Paigen, B. (2002). From QTL to gene: the harvest begins. *Nat Genet* *31*, 235-236.
- Kramer, U., Heinrich, J., Wjst, M., and Wichmann, H. E. (1999). Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* *353*, 450-454.
- Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N., and Glimcher, L. H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* *80*, 707-718.
- Laliberte, J., and Carruthers, V. B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci* *65*, 1900-1915.
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., and Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol* *8*, 1611-1623.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* *227*, 95-105.
- Lang, C., Algnier, M., Beinert, N., Gross, U., and Luder, C. G. (2006). Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes Infect* *8*, 1994-2005.
- Langermans, J. A., van der Hulst, M. E., Nibbering, P. H., and van Furth, R. (1992). Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun* *60*, 5107-5112.
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* *201*, 233-240.
- Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L. J., Klimecki, W. J., Silverman, E. K., Richter, B., Riva, A., Ramoni, M., Martinez, F. D., Weiss, S. T., and Kwiatkowski, D. J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* *190*, 9-25.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D., and Paul, W. E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* *172*, 921-929.
- Lee, H. K., Dunzendorfer, S., Soldau, K., and Tobias, P. S. (2006). Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* *24*, 153-163.
- Legare, M. E., Bartlett, F. S., 2nd, and Frankel, W. N. (2000). A major effect QTL determined by multiple genes in epileptic EL mice. *Genome Res* *10*, 42-48.
- Legare, M. E., and Frankel, W. N. (2000). Multiple seizure susceptibility genes on chromosome 7 in SWXL-4 congenic mouse strains. *Genomics* *70*, 62-65.
- Leynaert, B., Guilleud-Bataille, M., Soussan, D., Benessiano, J., Guenegou, A., Pin, I., and Neukirch, F. (2006). Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* *118*, 658-665.
- Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., Hedl, M., Nicolae, D. L., Abraham, C., and Cho, J. H. (2004). Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet* *13*, 1715-1725.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., and et al. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* *80*, 401-411.
- Lighvani, A. A., Frucht, D. M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B. D., Nguyen, B. V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W. E., and O'Shea, J. J. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15137-15142.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-

- cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608-615.
- Ling, Y. M., Shaw, M. H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G. A., Ferguson, D. J., and Yap, G. S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med* 203, 2063-2071.
- Liu, C. H., Fan, Y. T., Dias, A., Esper, L., Corn, R. A., Bafica, A., Machado, F. S., and Aliberti, J. (2006). Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 177, 31-35.
- Loza, M. J., and Chang, B. L. (2007). Association between Q551R IL4R genetic variants and atopic asthma risk demonstrated by meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 120, 578-585.
- Lu, L., and Cantor, H. (2008). Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 5, 401-406.
- Lu, L., Kim, H. J., Werneck, M. B., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19420-19425.
- Luder, C. G., Lang, T., Beuerle, B., and Gross, U. (1998). Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 112, 308-316.
- Luder, C. G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M. J., and Gross, U. (2001). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur J Immunol* 31, 1475-1484.
- Luft, B. J., Naot, Y., Araujo, F. G., Stinson, E. B., and Remington, J. S. (1983). Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. *Ann Intern Med* 99, 27-31.
- Luft, B. J., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211-222.
- Mack, D. G., Johnson, J. J., Roberts, F., Roberts, C. W., Estes, R. G., David, C., Grumet, F. C., and McLeod, R. (1999). HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 29, 1351-1358.
- Mackey, D., Holt, B. F., 3rd, Wiig, A., and Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754.
- MacPhee, I. A., Yagita, H., and Oliveira, D. B. (2006). Blockade of OX40-ligand after initial triggering of the T helper 2 response inhibits mercuric chloride-induced autoimmunity. *Immunology* 117, 402-408.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-426.
- Mas, M., Cavailles, P., Colacios, C., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Christen, M. O., Druet, P., Pelletier, L., Gauguier, D., and Fournie, G. J. (2004). Studies of congenic lines in the Brown Norway rat model of Th2-mediated immunopathological disorders show that the aurothiopropanol sulfonate-induced immunological disorder (Aiid3) locus on chromosome 9 plays a major role compared to Aiid2 on chromosome 10. *J Immunol* 172, 6354-6361.
- Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Pilipenko-Appolinaire, S., Kermarrec, N., Gauguier, D., Druet, P., and Fournie, G. J. (2000). Rat chromosome 9 bears a major susceptibility locus for IgE response. *Eur J Immunol* 30, 1698-1705.
- Mathieson, P. W., Thiru, S., and Oliveira, D. B. (1993). Regulatory role of OX22high T cells in mercury-induced autoimmunity in the brown Norway rat. *J Exp Med* 177, 1309-1316.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S., and Billiau, A. (1998). Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 28, 2143-2151.
- McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., McClanahan, T. K., O'Shea, J. J., and Cua, D. J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 314-324.
- McKee, A. S., Dzierszynski, F., Boes, M., Roos, D. S., and Pearce, E. J. (2004). Functional inactivation

- of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *173*, 2632-2640.
- McKenzie, G. J., Fallon, P. G., Emson, C. L., Grecnis, R. K., and McKenzie, A. N. (1999). Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med* *189*, 1565-1572.
- McKnight, A. J., Barclay, A. N., and Mason, D. W. (1991). Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *21*, 1187-1194.
- McLeod, R., Buschman, E., Arbuckle, L. D., and Skamene, E. (1995). Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* *7*, 539-552.
- McLeod, R., Skamene, E., Brown, C. R., Eisenhauer, P. B., and Mack, D. G. (1989). 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* *143*, 3031-3034.
- Mennechet, F. J., Kasper, L. H., Rachinel, N., Li, W., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2002). Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* *168*, 2988-2996.
- Mennechet, F. J., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Luangsay, S., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2004). Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *34*, 1059-1067.
- Michaels, M. G., Wald, E. R., Fricker, F. J., del Nido, P. J., and Armitage, J. (1992). Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants. *Clin Infect Dis* *14*, 847-851.
- Miller, C. M., Boulter, N. R., Ikin, R. J., and Smith, N. C. (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* *39*, 23-39.
- Moffatt, M. F., and Cookson, W. O. (1997). Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* *6*, 551-554.
- Moffatt, M. F., and Cookson, W. O. (1999). Genetics of asthma and inflammation: the status. *Curr Opin Immunol* *11*, 606-609.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.
- Morahan, G., Huang, D., Wu, M., Holt, B. J., White, G. P., Kendall, G. E., Sly, P. D., and Holt, P. G. (2002). Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet* *360*, 455-459.
- Morar, N., Cookson, W. O., Harper, J. I., and Moffatt, M. F. (2007). Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* *127*, 1667-1672.
- Mordue, D. G., Hakansson, S., Niesman, I., and Sibley, L. D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* *92*, 87-99.
- Morel, L., Blenman, K. R., Croker, B. P., and Wakeland, E. K. (2001). The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1787-1792.
- Morton, N. E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* *7*, 277-318.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* *136*, 2348-2357.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* *7*, 145-173.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* *292*, 1907-1910.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* *274*, 18470-18476.
- Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M., and Jaffee, E. A. (1985). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity

- against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *134*, 1982-1988.
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5986-5990.
- Namkung, J. H., Lee, J. E., Kim, E., Cho, H. J., Kim, S., Shin, E. S., Cho, E. Y., and Yang, J. M. (2007). IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans. *Allergy* *62*, 934-942.
- Ober, C., Tsalenko, A., Parry, R., and Cox, N. J. (2000). A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* *67*, 1154-1162.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* *13*, 715-725.
- Ordonez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F. E., Tervaert, J. W., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. (2009). CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* *4*, e5287.
- Oro, A. S., Guarino, T. J., Driver, R., Steinman, L., and Umetsu, D. T. (1996). Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* *97*, 1402-1408.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* *6*, 1133-1141.
- Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* *76*, 241-251.
- Pearce, N., Pekkanen, J., and Beasley, R. (1999). How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* *54*, 268-272.
- Piggott, D. A., Eisenbarth, S. C., Xu, L., Constant, S. L., Huleatt, J. W., Herrick, C. A., and Bottomly, K. (2005). MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* *115*, 459-467.
- Pils, B., and Schultz, J. (2004). Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes. *J Mol Biol* *340*, 399-404.
- Podolin, P. L., Denny, P., Armitage, N., Lord, C. J., Hill, N. J., Levy, E. R., Peterson, L. B., Todd, J. A., Wicker, L. S., and Lyons, P. A. (1998). Localization of two insulin-dependent diabetes (Idd) genes to the Idd10 region on mouse chromosome 3. *Mamm Genome* *9*, 283-286.
- Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* *172*, 1701-1708.
- Purwar, R., Kraus, M., Werfel, T., and Wittmann, M. (2008). Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol* *128*, 59-66.
- Pykalainen, M., Kinos, R., Valkonen, S., Rydman, P., Kilpelainen, M., Laitinen, L. A., Karjalainen, J., Nieminen, M., Hurme, M., Kere, J., *et al.* (2005). Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* *115*, 80-87.
- Ramsdell, F., Lantz, T., and Fowlkes, B. J. (1989). A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* *246*, 1038-1041.
- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J. Y., and Owens, T. (1995). TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* *154*, 944-953.
- Saeij, J. P., 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.
- Sakaguchi, S. (2000). Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* *12*, 684-690.
- Santiago, M. L., Mary, C., Parzy, D., Jacquet, C., Montagutelli, X., Parkhouse, R. M., Lemoine, R., Izui, S., and Reininger, L. (1998). Linkage of a major quantitative trait locus to Yaa gene-induced lupus-like nephritis in (NZW x C57BL/6)F1 mice. *Eur J Immunol* *28*, 4257-4267.
- Savignac, M., Badou, A., Delmas, C., Subra, J. F., De Cramer, S., Paulet, P., Cassar, G., Druet, P.,

- Saoudi, A., and Pelletier, L. (2001). Gold is a T cell polyclonal activator in BN and LEW rats but favors IL-4 expression only in autoimmune prone BN rats. *Eur J Immunol* *31*, 2266-2276.
- Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* *168*, 5997-6001.
- Schedel, M., Carr, D., Klopp, N., Woitsch, B., Illig, T., Stachel, D., Schmid, I., Fritzsche, C., Weiland, S. K., von Mutius, E., and Kabesch, M. (2004). A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* *114*, 1100-1105.
- Scott, P. (1998). Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with *Leishmania major*. *Immunol Res* *17*, 229-238.
- Scott, P., and Hunter, C. A. (2002). Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* *14*, 466-470.
- Seder, R. A., Boulay, J. L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-Sasson, S. Z., Le Gros, G., and Paul, W. E. (1992). CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* *148*, 1652-1656.
- Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslee, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J. F., Fournie, G. J., Saoudi, A., and Cesbron-Delauw, M. F. (2005). Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. *Infect Immun* *73*, 6990-6997.
- 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.
- Shen, C. H., and Stavnezer, J. (1998). Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol* *18*, 3395-3404.
- Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* *2*, 389-400.
- Shiina, T., Inoko, H., and Kulski, J. K. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* *64*, 631-649.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855-867.
- Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S., and Hopkin, J. M. (1997). The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* *275*, 77-79.
- Shirakawa, T., Li, A., Dubowitz, M., Dekker, J. W., Shaw, A. E., Faux, J. A., Ra, C., Cookson, W. O., and Hopkin, J. M. (1994). Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* *7*, 125-129.
- Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y., and Krahenbuhl, J. L. (1991). Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J Immunol* *147*, 2340-2345.
- Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* *132*, 1003-1015.
- Silverman, E. S., Palmer, L. J., Subramaniam, V., Hallock, A., Mathew, S., Vallone, J., Faffe, D. S., Shikanai, T., Raby, B. A., Weiss, S. T., and Shore, S. A. (2004). Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* *169*, 214-219.
- Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* *9*, 310-318.
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* *3*, 673-680.
- Staskawicz, B. J. (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol* *125*, 73-76.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* *299*, 1259-1260.
- Subra, J. F., Cautain, B., Xystrakis, E., Mas, M., Lagrange, D., van der Heijden, H., van de Gaar, M. J., Druet, P., Fournie, G. J., Saoudi, A., and

- Damoiseaux, J. (2001). The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol* *166*, 2944-2952.
- 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.
- Suzuki, Y., Wong, S. Y., Grumet, F. C., Fessel, J., Montoya, J. G., Zolopa, A. R., Portmore, A., Schumacher-Perdreau, F., Schrappe, M., Koppen, S., *et al.* (1996). Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis* *173*, 265-268.
- 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.
- Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* *185*, 817-824.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655-669.
- Tanabe, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M. M., Tromp, G., *et al.* (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo J* *23*, 1587-1597.
- Tanaka, S., Tsukada, J., Suzuki, W., Hayashi, K., Tanigaki, K., Tsuji, M., Inoue, H., Honjo, T., and Kubo, M. (2006). The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity* *24*, 689-701.
- Tantisira, K., Klimecki, W. T., Lazarus, R., Palmer, L. J., Raby, B. A., Kwiatkowski, D. J., Silverman, E., Vercelli, D., Martinez, F. D., and Weiss, S. T. (2004a). Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun* *5*, 343-346.
- Tantisira, K. G., Hwang, E. S., Raby, B. A., Silverman, E. S., Lake, S. L., Richter, B. G., Peng, S. L., Drazen, J. M., Glimcher, L. H., and Weiss, S. T. (2004b). TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 18099-18104.
- 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.
- Tian, M., and Alt, F. W. (2000). Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases in vitro. *J Biol Chem* *275*, 24163-24172.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Girardin, S. E., Boneca, I. G., Lemos, R., Bozza, M. T., Domingues, R. C., Coyle, A. J., Bertin, J., Philpott, D. J., and Plotkowski, M. C. (2005). Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* *280*, 36714-36718.
- Tu, L., Fang, T. C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S. E., Maillard, I., and Pear, W. S. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* *202*, 1037-1042.
- Turner, H., and Kinet, J. P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* *402*, B24-30.
- Tybulewicz, V. L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* *17*, 267-274.
- Usdin, K. (2008). The biological effects of simple tandem repeats: lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Res* *18*, 1011-1019.
- Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* *18*, 415-428.
- Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J., and Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* *203*, 755-766.
- Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K., *et al.* (2002). Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* *418*, 426-430.

- van Heel, D. A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K. A., Lundberg, A. M., Ahmad, T., McGovern, D. P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., *et al.* (2005). Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* *365*, 1794-1796.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* *8*, 169-182.
- Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K., and Geha, R. S. (1989). Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med* *169*, 1295-1307.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* *5*, 1166-1174.
- Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* *8*, 523-532.
- Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A. C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'Guessan P, D., Gunther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., *et al.* (2008). NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol* *180*, 6808-6815.
- Visscher, P. M. (1999). Speed congenics: accelerated genome recovery using genetic markers. *Genet Res* *74*, 81-85.
- Vladich, F. D., Brazille, S. M., Stern, D., Peck, M. L., Ghittoni, R., and Vercelli, D. (2005). IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest* *115*, 747-754.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., and Buer, J. (1998). Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR beta selection, TCR beta allelic exclusion and alpha beta versus gamma delta lineage commitment. *Immunol Rev* *165*, 111-119.
- Vossenkamper, A., Struck, D., Alvarado-Esquivel, C., Went, T., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Forster, I., and Liesenfeld, O. (2004). Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur J Immunol* *34*, 3197-3207.
- Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., and Longmate, J. (1997). Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* *18*, 472-477.
- Walker, M., and Zunt, J. R. (2005). Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts. *Clin Infect Dis* *40*, 1005-1015.
- Walley, A. J., Chavanas, S., Moffatt, M. F., Esnouf, R. M., Ubhi, B., Lawrence, R., Wong, K., Abecasis, G. R., Jones, E. Y., Harper, J. I., *et al.* (2001). Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* *29*, 175-178.
- Wallon, M., Liou, C., Garner, P., and Peyron, F. (1999). Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *Bmj* *318*, 1511-1514.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., *et al.* (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* *280*, 1077-1082.
- Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y. H., Cao, W., and Liu, Y. J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* *436*, 1181-1185.
- Weber, J. L., and May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* *44*, 388-396.
- Welter-Stahl, L., Ojcius, D. M., Viala, J., Girardin, S., Liu, W., Delarbre, C., Philpott, D., Kelly, K. A., and Darville, T. (2006). Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol* *8*, 1047-1057.
- Wenderfer, S. E., Slack, J. P., McCluskey, T. S., and Monaco, J. J. (2000). Identification of 40 genes on a 1-Mb contig around the IL-4 cytokine family gene cluster on mouse chromosome 11. *Genomics* *63*, 354-373.

- Werner, M., Topp, R., Wimmer, K., Richter, K., Bischof, W., Wjst, M., and Heinrich, J. (2003). TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 323-330.
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* *27*, 18-20.
- Williams, L., Bradley, L., Smith, A., and Foxwell, B. (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* *172*, 567-576.
- Williams, M. A., Tzgnik, A. J., and Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* *441*, 890-893.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* *282*, 2258-2261.
- Woo, J. G., Assa'ad, A., Heizer, A. B., Bernstein, J. A., and Hershey, G. K. (2003). The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 438-444.
- Xin, J., Ohmori, K., Nishida, J., Zhu, Y., and Huang, H. (2007). The initial response of CD4⁺ IL-4-producing cells. *Int Immunol* *19*, 305-310.
- Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J., and Flavell, R. A. (1994). Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* *1*, 423-431.
- Xystrakis, E., Cavailles, P., Dejean, A. S., Cautain, B., Colacios, C., Lagrange, D., van de Gaar, M. J., Bernard, I., Gonzalez-Dunia, D., Damoiseaux, J., *et al.* (2004a). Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J Immunol* *173*, 3140-3147.
- Xystrakis, E., Dejean, A. S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004b). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* *104*, 3294-3301.
- Yamada, T., Muramatsu, Y., Kim, J. K., Serikawa, T., and Matsumoto, K. (1994). Mapping of the gene for rat protein phosphatase 2C alpha (PP2C1) to chromosome 6. *Mamm Genome* *5*, 655-656.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hienny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C. J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D. S., Durham, S. R., and Kay, A. B. (1997). Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* *158*, 3539-3544.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T. H., and Corrigan, C. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* *174*, 8183-8190.
- Zilbauer, M., Dorrell, N., Elmi, A., Lindley, K. J., Schuller, S., Jones, H. E., Klein, N. J., Nunez, G., Wren, B. W., and Bajaj-Elliott, M. (2007). A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol* *9*, 2404-2416.

AUTEUR : Olivier PAPAPIETRO

Dissection génétique et études fonctionnelles du locus de contrôle de l'atopie Aiid3 et du locus de contrôle de la toxoplasmose Toxo1, dans le modèle des rats BN et LEW

Directeur de thèse : Docteur Gilbert Fournié

Lieu et Date de Soutenance : Hopital Purpan Toulouse, le 25 novembre 2009

Most human immune diseases are multifactorial, resulting from interactions between genetic and environmental factors. Their studies are hampered by genetic heterogeneity of human populations and by the variability of environment. In experimental conditions, using rodent models, environmental and genetic factors are under control. BN and LEW rats represent a powerful model to study immune-mediated diseases since they show strong differences in normal and pathological immune response. We used these strains to study genetic control of toxoplasmosis issue and mercury susceptibility. Oral *T.gondii* infection in BN rats lead to parasite dissemination within the host and brain cyst formation while in the LEW rats, parasites are quickly eradicate by an innate immune mechanism before reaching the brain. Linkage analyses in F2 (LEWxBN) rats followed by genetic dissection using reciprocal congenic and sub-congenic lines identified a major locus on chromosome 9 (c9) lead us to identified the Toxo1 locus in a 1.09Mb region that direct toxoplasmosis outcome independently of the genetic background. Further functional studies indicate a strong genetic association between the *in vivo* resistance and the ability of the macrophage to restrict parasite growth and survival. This restriction is dependant of host cell death. Two major candidate genes have been identified and their implications in congenital toxoplasmosis outcome in human cohorts are under investigation. By a similar strategy, genetic control of heavy metal-mediated immune disorder has been investigated. In the BN rats, mercury salt induced IgE production, auto-antibodies-mediated nephritic syndrome and ANCA-associated vasculatis while the LEW rats are completely resistant to the disease induction. In this work, we show that the *Aiid3* locus previously identified by our group control the set of the mercury-induced symptoms. Genetic dissection of the locus leads us to localize the gene(s) of control within a critical 117Kb region. 4 genes are present within this region and 2 are both polymorph and implicated in immune system homeostasis and function and appear as major candidate genes for the *Aiid3*-mediated biological effect. We found a major implication of the CD8 T cell compartments in the *Aiid3* mediated hyper IgE protection. We also demonstrate that the *Aiid3* locus controls the level ox CD45RC expression in CD4 and CD8 T cells which define the CD45RC^{high} and CD45RC^{low} subsets characterized by different cytokine profiles and functions. Importantly, this trait has been recently associated with susceptibility to ANCA-associated vasculatis in human cohorts.

MOTS CLES: Atopie, Auto-Immunité Systémique, Toxoplasmose, Clonage positionnelle, Lignées congéniques

DISCIPLINE : Immunogénétique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM U563, CPTP
CHU PURPAN, BP 3028
31024 Toulouse Cedex 3