

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Alexandre SENEGAS

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII* :  
MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES CONTRIBUANT  
A L'ARRET DE LA GESTATION DANS UN MODELE MURIN DE  
**PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII* :  
MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES CONTRIBUANT  
A L'ARRET DE LA GESTATION DANS UN MODELE MURIN DE  
TOXOPLASMOSE ACQUISE**

Soutenue publiquement le 26 juin 2007

Membres du jury

Rapporteur Externe :	Mr Gérard CHAOUAT, DR1
Rapporteur Externe :	Mr Yves CARLIER, PU-PH
Rapporteur Interne :	Mme Françoise STOLL-KELLER, PU-PH
Directeur de Thèse :	Mr Ermanno CANDOLFI, PU-PH
Co-directeur de Thèse :	Mr Jean-Paul KLEIN, DR1

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Alexandre SENEGAS

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII* :  
MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES CONTRIBUANT  
A L'ARRET DE LA GESTATION DANS UN MODELE MURIN DE  
**PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII* :**  
**MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES CONTRIBUANT**  
**A L'ARRET DE LA GESTATION DANS UN MODELE MURIN DE**  
**TOXOPLASMOSE ACQUISE**

Soutenue publiquement le 26 juin 2007

Membres du jury

Rapporteur Externe :	Mr Gérard CHAOUAT, DR1
Rapporteur Externe :	Mr Yves CARLIER, PU-PH
Rapporteur Interne :	Mme Françoise STOLL-KELLER, PU-PH
Directeur de Thèse :	Mr Ermanno CANDOLFI, PU-PH
Co-directeur de Thèse :	Mr Jean-Paul KLEIN, DR1



*A mes parents et mon frère*

# Remerciement

Je remercie mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Ermanno Candolfi, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et lui exprime toute ma reconnaissance pour avoir guidé ce travail. Accompagnant chaque étape tout en me laissant une grande liberté, nos échanges m'ont permis de m'enrichir tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, Monsieur Jean-Paul Klein, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son analyse scientifique expérimentée et rigoureuse a été une aide plus que précieuse dans l'élaboration de ce manuscrit.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Odile Villard, pour son implication et sa contribution considérable dans la réalisation de ce travail mais également pour son dynamisme et son enthousiasme quotidiens.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Le Professeur Yves Carlier, Monsieur le Docteur Gérard Chaouat et Madame le Professeur Françoise Stoll-Keller, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur Luc Marcellin et Madame Agnès Neuville, Praticiens Hospitaliers, pour leur collaboration ainsi que leur disponibilité à l'égard de mes travaux.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de recherche et de diagnostic de l'institut de parasitologie, qui, chacun à sa manière, a partagé ma vie au laboratoire et en particulier Thomas, Marie et Cécile, pour leur soutien ainsi que leur contribution, mes co-locataires de la bibliothèque, les "sénior" pour leurs conseils avisés (en particulier Marie Schöller-Guinard) ainsi que les responsables animalerie pour toutes les préparations expérimentales.

J'aimerais remercier mes proches, amis et famille, qui m'ont accompagné durant cette période, qui ont partagé mes avancées et qui m'ont soutenu également dans les moments de doutes. Je tiens à citer mon frère, qui a toujours représenté un modèle à suivre, et Jules, qui est comme mon petit frère.

Enfin, il y a des remerciements plus difficiles que d'autres. A mes parents qui m'ont construit avec amour et attention, élevé dans le respect et le partage et inculqué des valeurs morales comme l'abnégation et la volonté. Ce travail correspond à l'aboutissement d'une partie de leur éducation. Je suis extrêmement fier de les remercier pour tout cela.

---

# Table des matières

## INTRODUCTION

---

<i>TOXOPLASMA GONDII</i> ET LA TOXOPLASMOSE .....	1
<b>1. Description de <i>T. gondii</i> .....</b>	<b>2</b>
1.1. Différents stades .....	2
1.1.1. Sporozoïte .....	2
1.1.2. Tachyzoïte .....	3
1.1.3. Interconversion tachyzoïte – bradyzoïte .....	5
1.1.4. Bradyzoïte .....	6
1.2. Organisation moléculaire .....	6
1.2.1. Protéines de surface .....	7
1.2.2. Protéines des micronèmes .....	8
1.2.3. Protéines des rhoptries .....	8
1.2.4. Protéines des granules denses .....	9
<b>2. Cycle biologique de <i>T. gondii</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1. Infection de l'hôte définitif .....	10
2.2. Infection des hôtes intermédiaires .....	11
<b>3. Aspects génétiques et phylogénétiques .....</b>	<b>12</b>
3.1. Taxonomie .....	12
3.2. Diversité génétique .....	12
3.2.1. Méthode de typage et marqueurs génotypiques .....	12
3.2.2. Caractéristiques des trois types de <i>T. gondii</i> .....	13
3.3. Distribution des 3 types de <i>T. gondii</i> .....	14
<b>4. Manifestations physiopathologiques et traitements de la toxoplasmose .....</b>	<b>14</b>
4.1. Prévalence et diagnostic de la toxoplasmose humaine .....	14
4.2. Manifestations physiopathologiques .....	14
4.2.1. Toxoplasmose acquise .....	14
4.2.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé .....	15

---

4.2.3. Toxoplasmose congénitale.....	15
4.3. Traitements et prophylaxie.....	16
<b>5. Réponse immunitaire face à <i>T. gondii</i> .....</b>	<b>17</b>
5.1. Réponse innée .....	17
5.1.1. Toll-Like Récepteurs .....	17
5.1.2. Activation des cellules épithéliales intestinales.....	19
5.1.3. Activation des macrophages et des polynucléaires neutrophiles.....	19
5.1.4. Activation des cellules dendritiques - Rôle de l'IL-12 .....	20
5.1.5. Autres cellules immunitaires .....	22
5.2. Réponse adaptative.....	23
5.2.1. Réponse de type Th1 et IFN- $\gamma$ .....	23
5.2.2. Réponse de type Th2 et prévention des phénomènes immuno- pathologiques .....	24
5.2.2.1. IL-10 .....	24
5.2.2.2. Lipoxine A <sub>4</sub> (LXA <sub>4</sub> ).....	25
5.3. Phase chronique - Persistance du parasite.....	25
 GESTATION .....	 27
<b>1. Gestation et développement fœtal chez la souris.....</b>	<b>29</b>
1.1. Système reproducteur.....	29
1.2. Cycle ovarien et accouplement .....	29
1.3. Implantation .....	30
1.3.1. Phase pré-implantatoire du développement embryonnaire.....	30
1.3.2. Mécanismes moléculaires de l'implantation de l'embryon.....	30
1.3.3. Réponse maternelle à l'implantation (décidualisation) .....	32
1.4. Formation et rôle du placenta (placentation).....	33
1.4.1. Différenciation et migration des cellules trophoblastiques.....	33
1.4.2. Contrôle de la placentation – Rôles des cellules uNK.....	35
1.4.3. Rôles du placenta .....	36
1.5. Développement embryonnaire .....	37
1.6. Mise bas.....	38

---

---

<b>2. Mécanismes immunologiques permettant la tolérance du massif</b>	
<b>foeto-placentaire .....</b>	<b>39</b>
2.1. Reconnaissance des antigènes d'histocompatibilité trophoblastiques par les	
cellules uNK .....	40
2.2. Inhibition de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	
dirigée contre les trophoblastes .....	42
2.3. Inhibition de l'activité des LTCD8 <sup>+</sup> .....	42
2.3.1. sHLA-G .....	43
2.3.2. IDO .....	43
2.3.3. Interactions Fas/FasL .....	43
2.4. Orientation Th2 et limitation de la production d'IFN- $\gamma$ et de TNF- $\alpha$ .....	44
2.4.1. Rôle de la progestérone et de la PGE <sub>2</sub> .....	44
2.4.2. Rôle de l'IL-10 .....	45
2.4.3. Rôle du TNF- $\alpha$ .....	45
2.4.4. Rôle de l'IFN- $\gamma$ .....	46
2.5. Rôle des autres cytokines .....	46
<b>3. Infection maternelle et gestation .....</b>	<b>47</b>
3.1. Limitation de la fertilité .....	47
3.2. Altération de l'état général de la mère .....	48
3.3. Modification de l'environnement cytokinique associé à la gestation .....	48
3.4. Perturbation du développement placentaire et des échanges	
materno-fœtaux .....	49
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>50</b>

## **MATERIEL ET METHODES**

---

<b>1. Protocole expérimental .....</b>	<b>51</b>
1.1. Souris .....	51
1.2. Génotypage des souris .....	51
1.3. Souches de <i>T. gondii</i> .....	52
1.4. Mise en reproduction et infection .....	52

---

<b>2.</b>	<b>Analyses histologiques des unités fœto-placentaires .....</b>	<b>53</b>
2.1.	Préparation des coupes .....	53
2.2.	Déparaffinage .....	53
2.3.	Coloration hémalun-éosine .....	54
2.4.	Marquage anti- <i>T. gondii</i> .....	54
2.5.	Marquage anti-Bax .....	55
2.6.	Marquage et comptage des cellules uNK .....	55
2.6.1.	Marquage PAS (peroxid acid Schiff).....	55
2.6.2.	Marquage DBA-lectin-FITC.....	56
2.6.3.	Comptage des cellules uNK.....	56
2.7.	Marquage TUNEL.....	56
<b>3.</b>	<b>Mesure de la parasitémie sanguine et fœto-placentaire.....</b>	<b>57</b>
3.1.	Extraction d'ADN à partir du sang et des unités fœto-placentaires .....	57
3.2.	Extraction de l'ADN de la souche RH de <i>T. gondii</i> et constitution de la gamme de référence .....	57
3.3.	PCR conventionnelle.....	57
3.4.	PCR quantitative en temps réel .....	58
<b>4.</b>	<b>Dosage sérique et placentaire de l'IFN-<math>\gamma</math>, du TNF-<math>\alpha</math>, de l'IL-4, de l'IL-6 et de l-IL-10.....</b>	<b>59</b>
4.1.	Obtention des échantillons .....	59
4.2.	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	59
<b>5.</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>60</b>
5.1.	Extraction et dosage protéique .....	60
5.2.	Electrophorèse .....	60
5.3.	Immunoblot .....	61
5.4.	Analyses informatiques .....	62
<b>6.</b>	<b>RT-PCR quantitative en temps réel (rtqPCR) .....</b>	<b>62</b>
6.1.	Extraction .....	62
6.2.	Réaction de transcription reverse .....	62
6.3.	PCR quantitative .....	62
<b>7.</b>	<b>Méthodes statistiques.....</b>	<b>64</b>

---

---

## RESULTATS

---

<b>1. Mécanismes abortifs induits par l'infection à <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>65</b>
1.1. Apparition de résorptions chez la souris Swiss infectée .....	65
1.2. Faible charge parasitaire dans les unités fœto-placentaires .....	67
1.3. Présence d'hémorragies et de décollements placentaires dans les unités fœto-placentaires infectées .....	67
1.4. Dilatation des artères spiralées dans les unités fœto-placentaires infectées.....	68
1.5. Apoptose des cellules placentaires et implication de la voie mitochondriale .....	69
1.6. Diminution du nombre de cellules uNK dans les unités infectées.....	72
1.7. Analyse de la réponse de type Th1 maternelle et fœto-placentaire lors de l'infection .....	73
1.7.1. L'IFN- $\gamma$ : cytokine Th1 majeure produite lors de l'infection .....	73
1.7.2. Production utérine des ARNm codant l'IFN- $\gamma$ .....	75
1.7.3. Production placentaire d'IL-15 et du VEGF.....	75
<b>2. Rôle de l'IFN-<math>\gamma</math> dans les processus ABORTIFS induits lors de l'infection par <i>T. gondii</i> .....</b>	<b>78</b>
2.1. Diminution du pourcentage de résorptions chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées .....	78
2.2. Augmentation de la charge parasitaire maternelle et utérine chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées .....	79
2.3. Absence d'hémorragies et de décollements placentaires chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées .....	79
2.4. Absence de la dilatation des artères spiralées chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées .....	80
2.5. Diminution du nombre de cellules uNK dans les unités fœto-placentaires chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées.....	81
2.6. Absence d'apoptose dans les unités fœto-placentaires des souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées.....	82
2.7. Rétablissement de la production des ARNm placentaires codant l'IL-15 chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> .....	83

---

DISCUSSION .....	85
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	95
BIBLIOGRAPHIE .....	97

---

# Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADCC	Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps
ARN	Acide RiboNucléique
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine Serum Albumine
CMH	Complexe Moléculaire d'Histocomptabilité
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
DAB	Diaminobenzidine
DBA-lectin	<i>Dolichores biflores</i> lectin
DCs	Cellules dendritiques
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FITC	Fluoresceine-Iso-Thio-Cyanate
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Heure
HLA	Human Leucocytes Antigens
HRP	Horse Radish Peroxidase
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup>	Invalide pour le récepteur de l'interféron-gamma
LB	Lymphocyte B
LIF	Leucocyte Implantation Factor
LPS	LipoPolySaccharide
LT	Lymphocyte T
LXA <sub>4</sub>	Lipoxine A <sub>4</sub>
M $\Phi$	Macrophage
MLAp	Mesometrial Lymphoid Agregate of pregnancy
min	Minute
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NK	Cellule Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
P4	Progestérone
PAS	Peroxid Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS-SVFI	PBS contenant 10 % SVFI
PBST	PBS-Tween 20 à 0,05 %
PCR	Polymerase chain reaction
PIBF	Progestérone Induced Blocking Factor
PMNs	Polynucléaires Monocytes Neutrophiles
q.s.p	Quantité suffisante pour
rtqPCR	Real Time Quantitative PCR
sec	Seconde

---

STAg	Soluble Tachyzoite Antigen
SVFI	Sérum de Veau Fœtal Inactivé
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor-beta
TLRs	Toll-Like Receptors
TMB	TétraMéthylBenzidine
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling
uNK	Cellules NK utérine
VEGF	Vascular endothelium growth factor

---

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Formation de l’ocyste mature.....	2
<b>Figure 2.</b> Structure du tachyzoïte de <i>T. gondii</i> .....	3
<b>Figure 3.</b> Pénétration de <i>T. gondii</i> dans une cellule hôte.....	4
<b>Figure 4.</b> Facteurs associés à l’interconversion des formes tachyzoïte-bradyzoïte .....	6
<b>Figure 5.</b> Cycle de <i>T. gondii</i> et voies de contamination de l’homme .....	11
<b>Figure 6.</b> Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l’atteinte de l’enfant en fonction de la période de primo-infection de la mère .....	16
<b>Figure 7.</b> Activation des TLRs par <i>T. gondii</i> .....	18
<b>Figure 8.</b> Réponse immunitaire intestinale innée à <i>T. gondii</i> .....	20
<b>Figure 9.</b> Phase d’initiation de la réponse innée à <i>T. gondii</i> .....	21
<b>Figure 10.</b> Contrôle de la réponse inflammatoire durant l’infection à <i>T. gondii</i> .....	25
<b>Figure 11.</b> Principaux types de placentation et relations entre les cellules fœtales trophoblastiques et le sang maternel.....	28
<b>Figure 12.</b> Développement embryonnaire pré-implantatoire et implantation chez la souris.....	30
<b>Figure 13.</b> Acteurs participant à l’implantation embryonnaire et voies de signalisation impliquées dans l’apposition et l’adhérence du blastocyste .....	32
<b>Figure 14.</b> Développement placentaire chez la souris .....	34
<b>Figure 15.</b> Structure du placenta de souris (hémo-trichorial).....	35
<b>Figure 16.</b> Développement embryonnaire chez la souris.....	38
<b>Figure 17.</b> Structure du placenta humain (hémo-monochorial) .....	39
<b>Figure 18.</b> Différentes reconnaissances du système HLA entre la mère et les trophoblastes extravillositaires fœtaux .....	41
<b>Figure 19.</b> Protocole de préparation des coupes blanches.....	53
<b>Figure 20.</b> Cornes utérines de souris non infectée (a) et infectée par <i>T. gondii</i> (b) .....	65
<b>Figure 21.</b> Pourcentage de souris gestantes (a) et de résorptions (b) entre les groupes non infecté et infecté à différents temps de gestation.....	66
<b>Figure 22.</b> Méthode d’obtention des coupes blanches (a) et marquage utérin de <i>T. gondii</i> à J10 d’infection (b) .....	67
<b>Figure 23.</b> Unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b) colorées à l’hémalun-éosine.....	68
<b>Figure 24.</b> Artères spiralées colorées à l’hémalun-éosine à J10 (a) et mesure de leur dilatation (b) .....	69
<b>Figure 25.</b> Unité fœto-placentaire infectée colorée à l’hémalun-éosine et grossissement permettant d’observer la fragmentation nucléaire localisé dans la <i>decidua basalis</i> .....	69
<b>Figure 26.</b> Marquage TUNEL à J10 des unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b).....	70

---

<b>Figure 27.</b> Quantification de l'expression placentaire à J10 des protéines Bax, p53 et Bcl2 (a) et Marquage de la protéine Bax dans les unités fœto-placentaires infectées (b) .....	71
<b>Figure 28.</b> Marquages PAS et DBA-lectin des cellules uNK à J10 à partir d'unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b) .....	72
<b>Figure 29.</b> Quantification du nombre de cellules uNK matures de la <i>decidua basalis</i> à partir d'une coloration hémalum-éosine .....	73
<b>Figure 30.</b> Cinétique de production sérique et utérine de l'IFN- $\gamma$ .....	74
<b>Figure 31.</b> Production utérine à J10 des ARNm codant l'IFN- $\gamma$ .....	75
<b>Figure 32.</b> Production utérine des ARNm codant l'IL-15 (a) et le VEGF (b).....	76
<b>Figure 33.</b> Pourcentage de résorptions à J10 dans le modèle de souris sv129 .....	78
<b>Figure 34.</b> Artères spiralées colorées à l'hémalum éosine à J10 d'une souris Swiss (a) et d'une souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> (b) et mesure de la dilatation des artères entre souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées et non infectées (c).....	80
<b>Figure 35.</b> Quantification à J10 du nombre de cellules uNK matures dans la <i>decidua basalis</i> chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> infectées et non infectées .....	81
<b>Figure 36.</b> Unités fœto-placentaires d'une souris Swiss (a) et IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> (b) colorées au PAS à J10 .....	82
<b>Figure 37.</b> Production utérine à J10 chez les souris IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> des ARNm codant le VEGF (a) et l'IL-15 (b) .....	85
<b>Figure 38.</b> Hypothèses sur les mécanismes de résorption induit lors d'une infection par <i>T. gondii</i> .....	96

---

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Activités de la membrane de la vacuole parasitophore de <i>T. gondii</i> .....	5
<b>Tableau 2.</b> Protéines de surface de <i>T. gondii</i> .....	7
<b>Tableau 3.</b> Protéines des micronèmes actuellement caractérisées : propriétés et fonctions .....	8
<b>Tableau 4.</b> Protéines de rhoptries .....	9
<b>Tableau 5.</b> Protéines GRA .....	10
<b>Tableau 6.</b> Principaux gènes de <i>T. gondii</i> utilisés dans l'étude du polymorphisme génétique.....	13
<b>Tableau 7.</b> Principales caractéristiques biologiques des différents types de <i>T. gondii</i> .....	13
<b>Tableau 8.</b> Etapes majeures du développement chez la souris .....	29
<b>Tableau 9.</b> Caractéristiques des ELISA réalisés .....	60
<b>Tableau 10.</b> Anticorps primaires et secondaires utilisés .....	61
<b>Tableau 11.</b> Séquences des amorces et caractéristiques des rtqPCR réalisées selon la cible quantifiée .....	63
<b>Tableau 12.</b> Quantification sérique et placentaire de <i>T. gondii</i> chez les souris sv129 .....	79

# Introduction

## Introduction

## **TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE**

La toxoplasmose est une infection due à un protozoaire à développement intracellulaire obligatoire, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), dont la distribution varie en fonction des régions du globe. Le cycle parasitaire comprend un hôte définitif, les félins dont le chat domestique, et des hôtes intermédiaires, les mammifères et les oiseaux. La contamination humaine s'effectue principalement par l'alimentation lors de la consommation de viande crue ou mal cuite contenant des kystes, formes de résistance du parasite.

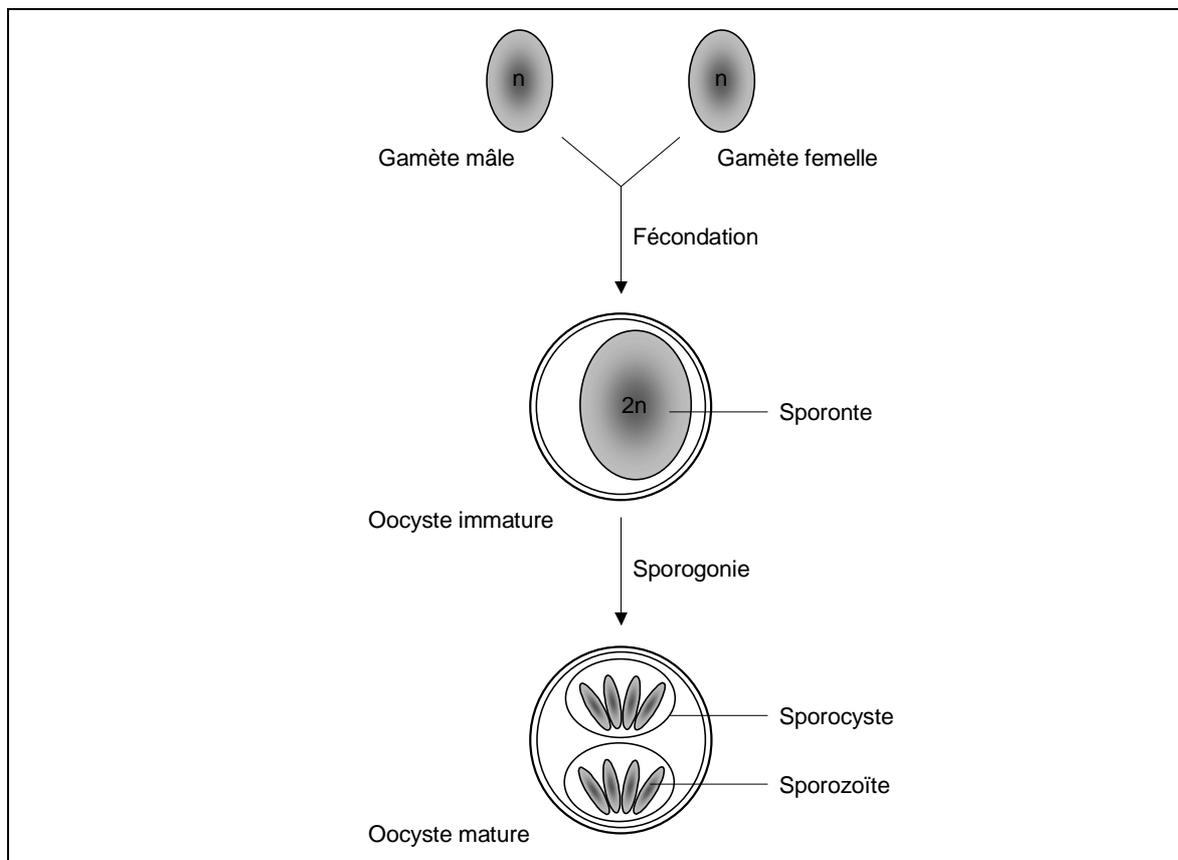
L'infection par *T. gondii* est le plus souvent bénigne chez l'homme. La multiplication du parasite est limitée par la réponse immunitaire mais celui-ci persistera dans certains tissus (muscles et cerveau) durant toute la vie de l'hôte. L'infection peut être grave chez les malades immunodéprimés (sidéens ou greffés) ou lors d'une transmission transplacentaire (toxoplasmose congénitale).

## 1. DESCRIPTION DE *T. gondii*

### 1.1. Différents stades

#### 1.1.1. Sporozoïte

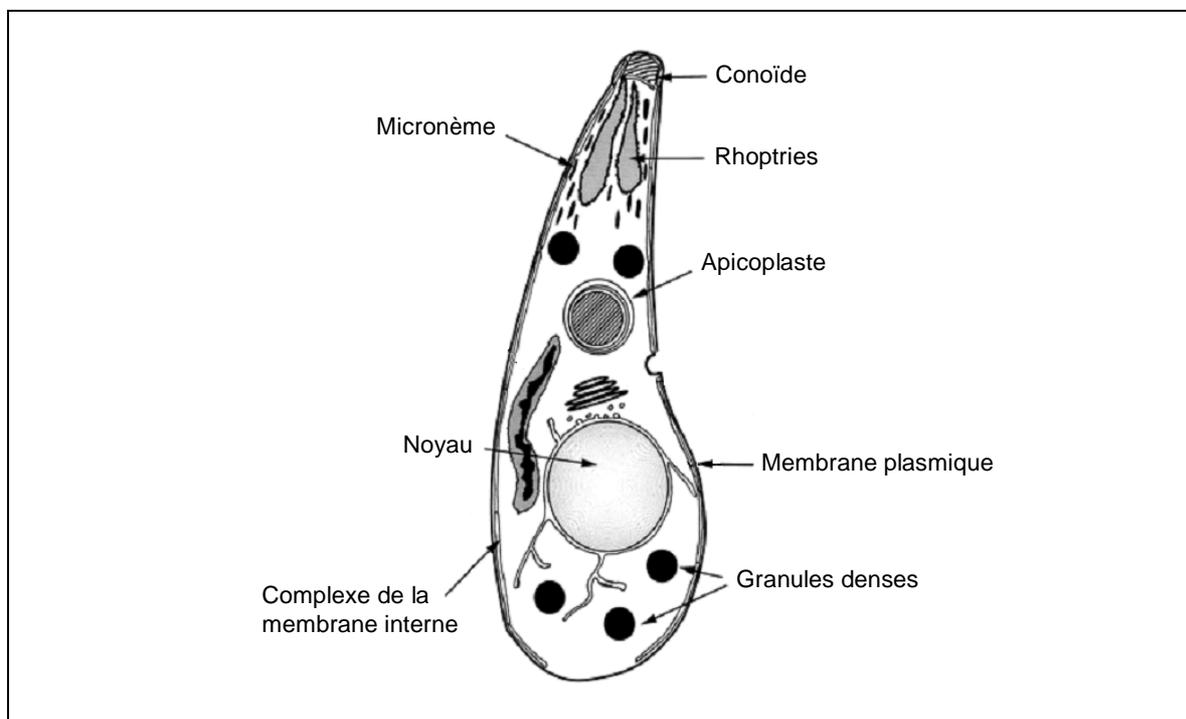
Lors de la reproduction sexuée qui a lieu dans l'épithélium intestinal des félinés, le sporozoïte (stade sexué de *T. gondii*) se différencie en gamète mâle ou femelle. Le zygote obtenu après fécondation, appelé sporonte, s'entoure d'une coque et forme un oocyste immature, de forme ovoïde (de 9 à 14  $\mu\text{m}$ ), libéré de sa cellule-hôte et excréte dans le milieu extérieur avec les fèces de l'animal. Les oocystes ainsi dispersés vont subir une phase de maturation, la sporogonie, correspondant à une série de divisions (une méiose suivie de deux mitoses) du zygote (diploïde) aboutissant à la formation d'oocystes matures infectieux contenant deux sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes (haploïdes) (**Figure 1**) (Coudert & Provôt, 1973). Forme de résistance tellurique, l'oocyste représente le stade de contamination le plus fréquemment impliqué dans la contamination des hôtes intermédiaires herbivores.



**Figure 1.** Formation de l'oocyste mature.

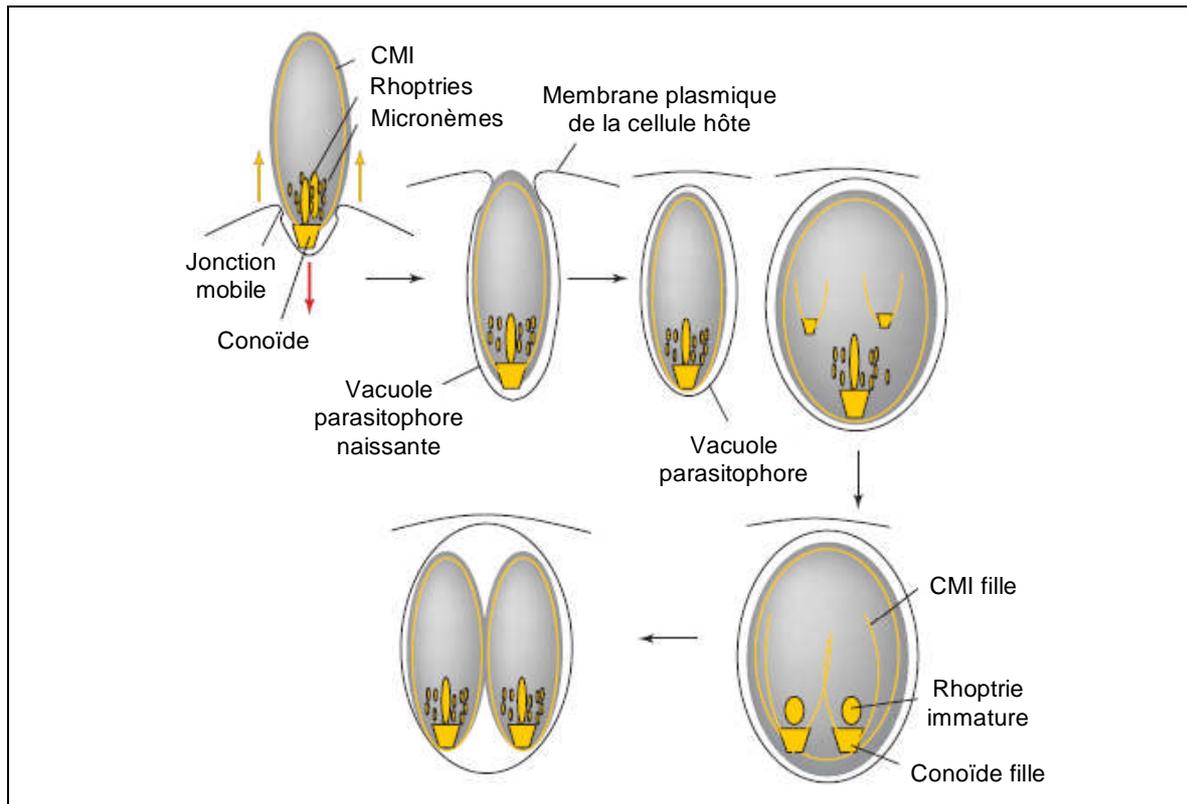
### 1.1.2. Tachyzoïte

Le tachyzoïte dérive du sporozoïte. Il a la forme d'un croissant asymétrique mesurant 6 à 7  $\mu\text{m}$  de long sur 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large. Il possède une extrémité antérieure effilée (complexe apical) comprenant le conoïde, l'apicoplaste, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses et une extrémité postérieure arrondie (**Figure 2**) (Black & Boothroyd, 2000).



**Figure 2.** Structure du tachyzoïte de *T. gondii*. Adaptée de Black & Boothroyd, 2000.

La pénétration du tachyzoïte dans une cellule-hôte est un mécanisme actif lui permettant d'échapper aux processus de lyse cellulaire. En effet, cette invasion s'accompagne de la formation d'une vacuole parasitophore par invagination de la membrane plasmique de la cellule-hôte. La pénétration fait intervenir deux organelles spécialisées (les rhoptries et les micronèmes), l'insertion du conoïde et la formation d'une jonction mobile au point de contact entre le parasite et la membrane plasmique de la cellule-hôte. A l'intérieur de la vacuole, le parasite se divise par un processus qui fait apparaître initialement le conoïde et la formation concomitante du CMI (complexe de la membrane interne) (**Figure 3**). La formation de cette structure unique se produit à la jonction mobile entre le parasite et la membrane plasmique de l'hôte (Keeley & Soldati, 2004).



**Figure 3.** Pénétration de *T. gondii* dans une cellule-hôte. Processus actif dépendant de la capacité du parasite à invaginer la membrane plasmique menant à la formation de la vacuole parasitophore. CMI : complexe de la membrane interne. Adaptée de Keeley & Soldati, 2004.

La membrane de la vacuole parasitophore possède plusieurs fonctions dont l'acquisition de nutriments cellulaires, la manipulation des voies de signalisation de la cellule-hôte ou encore le maintien de l'intégrité structurale de la vacuole parasitophore (**Tableau 1**). En outre, l'absence des récepteurs SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor), est probablement responsable de sa résistance à la fusion avec les lysosomes et à son acidification, permettant ainsi d'assurer la survie du parasite.

**Tableau 1.** Activités de la membrane de la vacuole parasitophore de *T. gondii*. Adapté de Martin *et al.*, 2007.

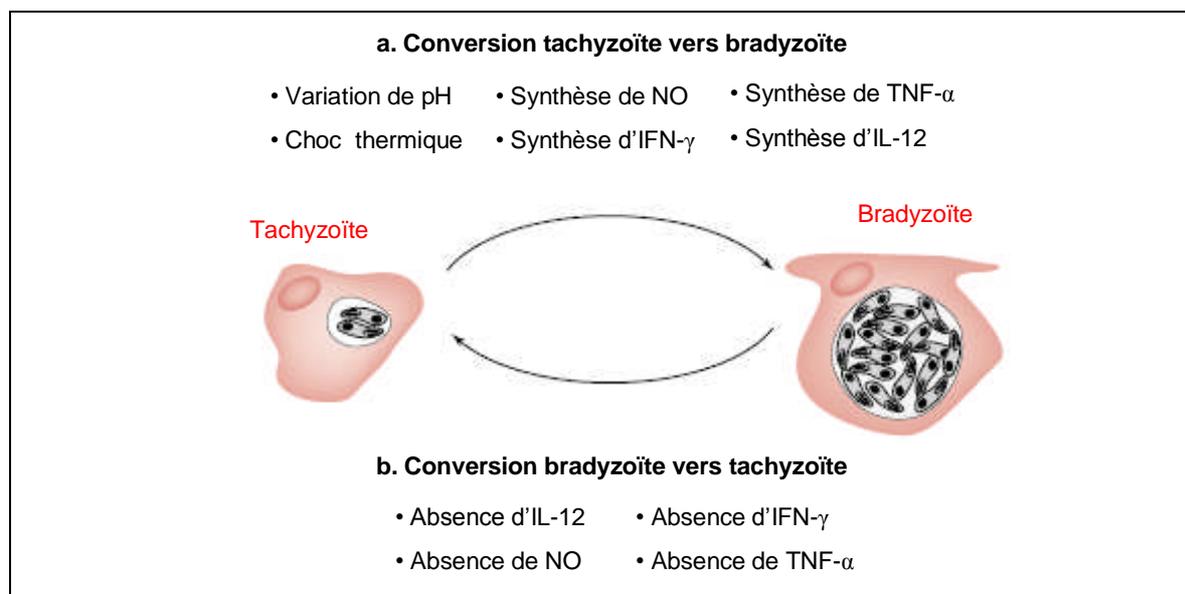
Activité	Description	Références
<b>Structurale</b>		
Réarrangement des microtubules de l'hôte	Altération des caractéristiques structurales des microtubules de l'hôte et réorganisation des microtubules autour de la vacuole parasitophore. Médiateurs inconnus	Andrade <i>et al.</i> , 2001; Cintra & De Souza, 1985; Coppens, 2006
Recrutement du MTOC	"Recrutement" du MTOC par la PVM le plus souvent par des extensions de la PVM. Médiateurs inconnus	Coppens <i>et al.</i> , 2006
Extensions de la PVM	Extensions membranaires émanant de la PVM et contenant de nombreuses protéines GRA le long des microtubules du MTOC	Bermudes <i>et al.</i> , 1994; Carey <i>et al.</i> , 2000; Coppens <i>et al.</i> , 2006; Lecordier <i>et al.</i> , 1999
Couverture de vimentine	Réorganisation des filaments intermédiaires de vimentine autour de la PVM. Bases moléculaires inconnues	Cintra & De Souza, 1985; Halonen & Weidner, 1994
Association à la MITO	Recrutement et association avec une grande affinité de la MITO de la cellule hôte à la PVM. Médié par ROP2	de Souza, 2005; Magno <i>et al.</i> , 2005; Schatten & Ris, 2004; Sinai & Joiner, 1997; Sinai & Joiner, 2001
Association au RE	Recrutement et association avec une grande affinité du RE de la cellule hôte à la PVM. Bases moléculaires inconnues	de Souza, 2005; Magno <i>et al.</i> , 2005; Schatten & Ris, 2004; Sinai & Joiner, 1997
<b>Acquisition de nutriments</b>		
Nutriments solubles (nucléotides, acides aminés, sucres)		
Perméabilité de la PVM	Accès bidirectionnel libre aux molécules < 1300 Da du cytoplasme de la cellule-hôte par des pores de la PVM. Bases moléculaires inconnues	Schwab <i>et al.</i> , 1994
Lipides		
Association à la MITO	Détournement de l'acide lipoïque mitochondrial vers les mitochondries du parasite. Bases moléculaires inconnues	Crawford <i>et al.</i> , 2006
Association au RE	Mécanisme potentiel pour le détournement de phospholipides et de stérols (dont le RE est la source). Bases moléculaires inconnues	Gupta <i>et al.</i> , 2005; Sinai <i>et al.</i> , 1997
Cholestérol (voie LDL)	Détournement de la voie LDL-cholesterol utilisant un mécanisme dépendant des microtubules. Rôle probable de GRA7 et d'autres protéines GRA	Coppens, 2006; Coppens <i>et al.</i> , 2000; Sehgal <i>et al.</i> , 2005
Corps lipidiques	Détournement du contenu des corps lipidiques. Bases moléculaires inconnues	Charron & Sibley, 2002; Coppens <i>et al.</i> , 2006; Nishikawa <i>et al.</i> , 2005
<b>Manipulation des voies de signalisation</b>		
Phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ – voie de NF $\kappa$ B	Rôle dans les modifications transitoires de l'activation du NF $\kappa$ B par la protéine TgIKK localisée sur la PVM ayant une activité I $\kappa$ B kinase	Molestina & Sinai, 2005a; Molestina & Sinai, 2005b
ROP4 – phosphorylation	Phosphorylation de ROP4, membre de la famille ROP2, par une kinase de l'hôte ou parasitaire dans les cellules infectées	Carey <i>et al.</i> , 2004
Protéines kinase de la famille ROP2	Activité kinase de nombreux membres de la famille ROP2. Les cibles potentielles inconnues	El Hajj <i>et al.</i> , 2006
Autre kinases/phosphatases et autres facteurs	Multiplés activités kinases, phosphatases et de régulation localisées à la PVM suggérées par des études protéomiques	Martin, Liu, Lynn et Sinai (non publié)

MITO : mitochondrie, RE : réticulum endoplasmique, PVM : membrane de la vacuole parasitophore, MTOC : centre organisateur des microtubules.

### 1.1.3. Interconversion tachyzoïte – bradyzoïte

Le bradyzoïte se présente sous la même forme que le tachyzoïte mais représente le stade quiescent du parasite. De nombreux facteurs favorisent l'initiation de la conversion du stade tachyzoïte en stade bradyzoïte tels que les variations de pH, les chocs thermiques ainsi que certains facteurs immunitaires dirigés contre le parasite : facteurs de stress oxydatif (capables

d'inhiber les fonctions mitochondriales du parasite) comme le NO (monoxyde d'azote) ou facteurs cytokiniques comme l'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma), le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) ou l'IL-12 (interleukin-12) (**Figure 4a**). La conversion du stade bradyzoïte en tachyzoïte a lieu en l'absence de ces mêmes facteurs (**Figure 4b**). L'implication des cytokines dans le mécanisme d'interconversion demeure difficile à évaluer *in vivo* elles seraient susceptibles d'agir indirectement (Lyons *et al.*, 2002).



**Figure 4.** Facteurs associés à l'interconversion des formes tachyzoïte-bradyzoïte. Le processus de conversion est réversible et est responsable de l'établissement de la phase chronique de la maladie. Adaptée de Lyons *et al.*, 2002.

#### 1.1.4. Bradyzoïte

Les bradyzoïtes se divisent lentement dans la cellule-hôte. La membrane de la vacuole parasitophore les contenant se modifie et devient particulièrement résistante aux digestions enzymatiques par la pepsine. L'ensemble de cette structure constitue le kyste. D'une forme sphérique ou ovoïde, ces kystes mesurent de 20 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre et se localisent préférentiellement dans les tissus musculaires et cérébraux. Caractéristiques de la phase chronique de l'infection, ils persistent dans l'organisme durant toute la vie de l'hôte sans entraîner de réaction d'élimination et représentent la forme de dissémination et de contamination principale des carnivores.

## 1.2. Organisation moléculaire

De nombreux travaux ont porté sur l'organisation moléculaire de *T. gondii* et notamment l'identification des protéines ayant un potentiel antigénique. Deux grandes familles peuvent être distinguées dans ce cas : les protéines de surface et les protéines

contenues dans les organelles sécrétoires spécifiques du parasite (micronèmes, rhoptries et granules denses).

### 1.2.1. Protéines de surface

Plus de 20 protéines de surface ou SAG (Surface AntiGen) ont été identifiées à ce jour (**Tableau 2**). Elles appartiennent à 5 superfamilles dénommées SAG1 à SAG5. Toutes sont ancrées à la surface du parasite par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidylInositol). Elles participent à l'attachement et à la pénétration dans la cellule-hôte ainsi qu'à la modulation de la réponse immunitaire (Lekutis *et al.*, 2001). La famille SAG1 est la plus abondante. Elle comprend la protéine SAG1 proprement dite, dont la structure tridimensionnelle composée de deux sous-unités identiques (homodimère) a été caractérisée par cristallographie (He *et al.*, 2002) et de nombreuses protéines homologues SRS (SAG1-Related-Sequence) (Jung *et al.*, 2004).

**Tableau 2.** Protéines de surface de *T. gondii*. D'après Lekutis *et al.*, 2001.

Famille SAG	Nombre Aa	Gène	Stade parasitaire		Référence
			Tachyzoïte	Bradyzoïte	
SAG1	319	<i>sag1</i>	+	-	Burg <i>et al.</i> , 1988
	420	<i>srs1</i>	+	-	Hehl <i>et al.</i> , 1997
	372	<i>srs2</i>	+	-	Manger <i>et al.</i> , 1998
	345	<i>srs3</i>	+	-	Manger <i>et al.</i> , 1998
	396	<i>srs4</i>	?	?	Manger <i>et al.</i> , 1998
	ND	<i>srs5</i>	-	-	Lekutis <i>et al.</i> , 2001
	393	<i>srs6</i>	?	?	Lekutis <i>et al.</i> , 2001
	?	<i>srs7</i>	?	?	Lekutis <i>et al.</i> , 2001
	?	<i>srs8</i>	?	?	Lekutis <i>et al.</i> , 2001
SAG2	186	<i>sag2a</i>	+	-	Prince <i>et al.</i> , 1990
	190	<i>sag2b</i>	+	?	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	365	<i>sag2c</i>	-	+	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	373	<i>sag2d</i>	-	+	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	340	<i>sag2e</i>	?	?	Mattson, non publié
SAG3	385	<i>sag3</i>	+	+	Cesbron-Delauw <i>et al.</i> , 1994
SAG4	172	<i>sag4a</i>	-	+	Odberg-Ferragut <i>et al.</i> , 1996
	180	<i>sag4b</i>	?	?	Manger <i>et al.</i> , 1998
SAG5	362	<i>sag5a</i>	-	+	Spano <i>et al.</i> , 2002
	367	<i>sag5b</i>	+	-	Spano <i>et al.</i> , 2002
	367	<i>sag5c</i>	+	-	Spano <i>et al.</i> , 2002

+ : présence, - : absence, ? : non déterminé.

### 1.2.2. Protéines des micronèmes

Une quinzaine de protéines des micronèmes sont identifiées à ce jour (**Tableau 3**). Elles sont libérées lors du contact initial du pôle apical du parasite avec la cellule-hôte et participent à l'attachement du parasite (Carruthers, 2002).

**Tableau 3.** Protéines des micronèmes actuellement caractérisées : propriétés et fonctions. D'après Dowse & Soldati, 2004.

Nom	Domaines, homologies	Complexe	Maturation	Fonctions
MIC1	2 TSP-like	MIC4-MIC1-MIC6		Transport de MIC4, MIC6 Se lie à la cellule-hôte
MIC2	1 integrin, 5 TSRs TM, C-tail	M2AP (hexamère)	N-term, C-term post-exocytose	Transport de M2AP Se lie à la cellule-hôte
MIC3	1 lectin-like	MIC3-MIC8	N-term intracellulaire	Se lie à la cellule-hôte
MIC4	5 EGF-like 6 apple	Dimérisation de MIC3 MIC4-MIC1-MIC6	N-term, C-term post-exocytose	Se lie à la cellule hôte
MIC5	PPIase	?	N-term intracellulaire	?
MIC6	3 EGF-like TM, C-tail	MIC4-MIC1-MIC6	N-term intracellulaire C-term post-exocytose	Escorte MIC1 et MIC4
MIC7	5 EGF-like	?	?	?
MIC8	1 lectin-like 10 EGF-like TM, C-tail	MIC3-MIC8	C-term post-exocytose	Escorte MIC3
MIC9	3 EGF-like TM, C-tail	?	?	?
MIC10	-	?	-	?
MIC11	-	?	Clivage du propeptide	?
MIC12	EGF-like, TSRs TM, C-tail	?	C-term post-exocytose	?
M2AP	-	MIC2 (hexamère)	N-term intracellulaire et post-exocytose	Transport/folding de MIC2
Sub1	Subtilase	?	N-term intracellulaire C-term post-exocytose	Protéase (substrat ?)
AMA1	Riche en cystéine	?	N-term intracellulaire C-term post-exocytose	Invasion de la cellule-hôte

TSP : thrombospondine, EGF : epidermal growth factor, PPIase : peptidyl-prolyl isomérase, TM : transmembranaire, C-term : partie carboxy-terminale, N-term : partie amino-terminale, C-tail : partie C-term cytoplasmique, TSRs : thrombospondin type 1 repeats. ? : non déterminé.

### 1.2.3. Protéines des rhoptries

Les protéines de rhoptries (ROP) sont sécrétées pendant la pénétration cellulaire puis intégrées à la vacuole parasitophore (Joiner & Roos, 2002; Ngo *et al.*, 2004). Elles sont essentielles aux étapes de pénétration, de répllication du parasite et à l'interaction avec la cellule-hôte (Carruthers *et al.*, 1999). Il existe deux grandes familles de protéines ROP : la première ne contient que ROP1, protéine soluble qui est sécrétée dans la vacuole parasitophore lors de la pénétration du parasite (Hakansson *et al.*, 2001). La deuxième famille (**Tableau 4**) a été défini à partir de la protéine ROP2 (Leriche & Dubremetz, 1991), qui

s'insère dans la membrane de la vacuole parasitophore pendant l'invasion de la cellule-hôte, exposant son extrémité amino-terminale dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Beckers *et al.*, 1994). Ces protéines transmembranaires sont impliquées dans les mécanismes permettant l'association des organelles cellulaires de l'hôte à la vacuole parasitophore (Carey *et al.*, 2004) et probablement dans les modifications épigénétiques de la cellule-hôte (Saeij *et al.*, 2007).

**Tableau 4.** Protéines de rhoptries. D'après El Hajj *et al.*, 2006.

Nom	Poids (kDa)	Nombre Aa	Peptide signal	Domaines hydrophobes	Prédiction d'une activité kinase <sup>a)</sup>		
					DK	GL	D
ROP2	55	561	+12-29	466-488	+	-	+
ROP4	60	578	+12-28	472-491	+	-	-
ROP5	59.5	549	+6-26	449-470	+	-	-
ROP7	57	575	+12-28	476-492	+	-	-
ROP8		575	+16-37	480-498	+	-	-
ROP11		514	+8-27	409-430	+	-	+
ROP17 (ROP2L1)		608	+1-24	509-532	+	+	+
ROP18 (ROP2L2)		539	+10-28	444-461	+	+	+
ROP2L3		559	+6-23	441-459	+	-	+
ROP2L4		490	?	291-313 389-313	+	+	+
ROP2L5		541	+4-24	323-342 440-459	+	-	+
ROP2L6		519	+6-23	428-446	-	-	-
ROP16		707	+3-23	598-615	+	-	+

<sup>a)</sup> prédiction d'une activité kinase : DK : domaine kinase ; GL : boucle glycine ; D : acide aspartique. + : présence, - : absence, ? : Non déterminé.

#### 1.2.4. Protéines des granules denses

Les granules denses sont des vésicules sécrétrices jouant un rôle majeur dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore (Mercier *et al.*, 2005). Les protéines des granules denses sont libérées à l'intérieur de la vacuole pendant et après la pénétration de la cellule hôte. Quatorze protéines ont été identifiées : 10 protéines GRA (Adjogble *et al.*, 2004 ; Ahn *et al.*, 2006), 2 nucléosides triphosphates hydrolases (NTPases) (Johnson *et al.*, 2003) et 2 inhibiteurs de protéases (**Tableau 5**) (Pszenny *et al.*, 2002). Les protéines GRA s'associent à la vacuole parasitophore par des interactions hydrophobes ou protéine/protéine, ainsi qu'au réseau tubulaire de la cellule-hôte intervenant ainsi dans le recrutement des nutriments et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule-hôte (Carruthers, 2002; Mercier *et al.*, 2005 ). Elles participent également à la pénétration, à la survie intracellulaire

du parasite et à sa multiplication (Cha *et al.*, 2001). Par ailleurs, elles semblent jouer un rôle dans la virulence des souches (Nischik *et al.*, 2001).

**Tableau 5.** Protéines GRA. D'après Mercier *et al.*, 2005.

Protéine (kDa)	Caractéristiques	Localisation	Stade parasitaire	
			Tachyzoïte	Bradyzoïte
GRA1 (23)	Soluble dans DG et PV	Peu associé à PVN	+++	++
GRA2 (28)	Hélice $\alpha$ amphiphile	PVN	+++	+
GRA3 (30)	TMD	PVM, PVN, PVE	+++	++
GRA4 (40/41)	TMD	PVN	+++	-
GRA5 (21)	Homologie avec GRA6	PVM, PVE	+++	+++
GRA6 (32)	TMD	PVN	+++	+
GRA7 (29)	TMD	PVN, PVM, PVE	+++	++
GRA8 (40)	TMD	PVM, PVE	+++	-
GRA9 (41)	Hélice $\alpha$ amphiphile	PVN	?	?
GRA10 (36)	TMD, motif RGD	PVM	?	?

DG : granule dense, PV : vacuole parasitophore, PVM : membrane de la vacuole parasitophore, PVN : réseau de la vacuole parasitophore, PVE : extensions de la vacuole parasitophore, TMD : domaine transmembranaire. Motif RGD : tripeptide Arg-Gly-Asp (motif de reconnaissance des intégrines). +++ : forte présence, ++ : moyenne présence, + : faible présence, - : absence, ? : Non déterminé.

## 2. CYCLE BIOLOGIQUE DE *T. gondii*

Le cycle comprend un hôte définitif (les félinés) chez qui se déroule le cycle complet du parasite : une reproduction asexuée suivie par une reproduction sexuée et des hôtes intermédiaires (oiseaux et mammifères dont l'homme) chez qui se déroule le cycle asexué.

### 2.1. Infection de l'hôte définitif

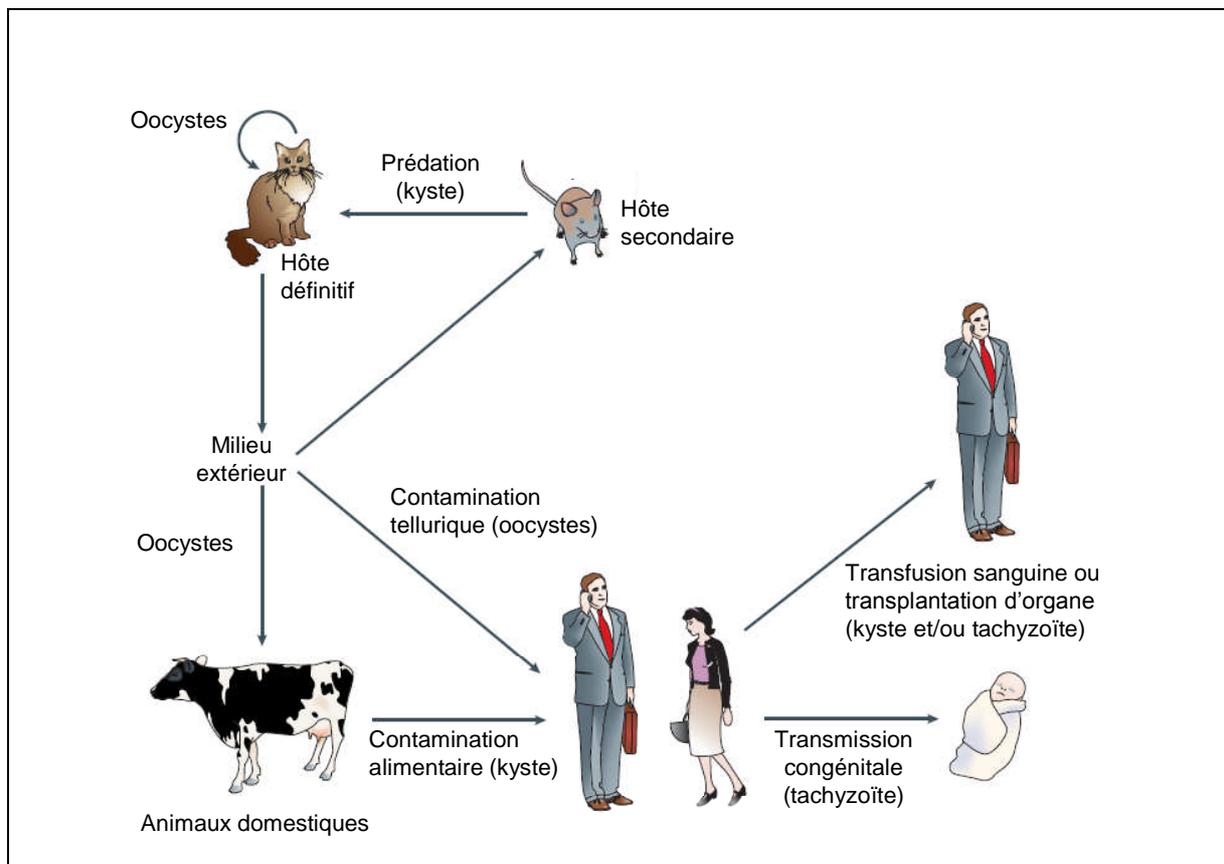
Si les félinés, et notamment le chat, se contaminent par des kystes contenus dans leur proie, les bradyzoïtes se transforment en tachyzoïtes qui vont se multiplier de façon asexuée dans les cellules de l'intestin grêle. Après cette phase de multiplication, la reproduction sexuée a lieu avec la formation d'oocystes immatures éliminés dans les fèces du chat dans le milieu extérieur où ils subissent une maturation. Cette élimination qui débute entre 3 et 10 jours après l'infection du chat dure 10 à 20 jours et correspond à une dissémination d'environ 100 millions d'oocystes (Tenter *et al.*, 2000). Le chat n'éliminera des oocystes immatures de façon massive que lors d'une primo-infection.

Si le chat se contamine avec des oocystes matures, les sporozoïtes vont tout d'abord se transformer en tachyzoïtes et se multiplier dans les tissus de l'hôte, puis le parasite va migrer vers l'intestin grêle où il effectue une reproduction sexuée donnant lieu à la formation d'oocystes.

## 2.2. Infection des hôtes intermédiaires

La contamination des hôtes intermédiaires, possible à partir de chacun des stades du parasite, peut avoir lieu lors d'une transmission inter-individuelle (horizontale) ou congénitale (verticale).

La transmission horizontale dont le mode de contamination principal est la voie orale, est possible soit par ingestion d'oocystes matures souillant la terre, l'eau, les végétaux, les crudités et les fruits ou lors d'un contact direct avec le chat ou ses fèces, soit par ingestion de kystes contenus dans la viande crue ou insuffisamment cuite. Un autre mode de contamination plus rare chez l'homme est possible lors d'une transplantation d'organe (kyste et/ou tachyzoïtes) ou lors d'une transfusion sanguine (tachyzoïtes). La transmission verticale, quant à elle, a lieu après passage transplacentaire de tachyzoïtes (**Figure 5**).



**Figure 5.** Cycle de *T. gondii* et voies de contamination de l'homme. Adaptée de Aliberti, 2005.

Chez l'hôte intermédiaire, le cycle parasitaire comporte 3 étapes. La première est la pénétration intestinale. Après digestion de la membrane du kyste ou de l'oocyste, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes libérés se transforment en tachyzoïtes qui pénètrent dans les entérocytes de la *lamina propria* en moins de 24 heures. La deuxième étape est la multiplication sanguine durant laquelle les tachyzoïtes se développent dans les cellules de l'hôte notamment les MΦ (Macrophages) et les DCs (Cellules Dendritiques) permettant probablement la diffusion du parasite à l'ensemble des organes de l'hôte (cœur, poumon, cerveau). C'est au cours de cette étape que peut avoir lieu la transmission congénitale. La dernière étape est la formation de kystes et l'évolution vers la chronicité. Au cours de cette étape et sous la pression de l'immunité spécifique, le parasite se multiplie plus lentement au niveau musculaire et cérébral et des kystes tissulaires se forment.

### 3. ASPECTS GENETIQUES ET PHYLOGENETIQUES

#### 3.1. Taxonomie

*T. gondii* appartient à l'embranchement des sporozoaires, à l'ordre des coccidies et au genre *Toxoplasma*. Il n'existe qu'une seule espèce décrite : *Toxoplasma gondii*. Découvert en 1908 par Nicolle et Manceaux (Nicolle & Manceaux, 1909), *T. gondii* fut décrit pour la première fois en 1923 par Janku (Janku, 1923). A partir de 1948, la mise au point de techniques de diagnostic biologique a permis une meilleure approche épidémiologique (Garin & Ambroise-Thomas, 1963; Naot & Remington, 1980).

#### 3.2. Diversité génétique

##### 3.2.1. Méthode de typage et marqueurs génotypiques

Le génome de *T. gondii* a une taille de 65 Mb réparti en 12 chromosomes (<http://toxomap.wustl.edu/> ou <http://toxodb.org/ToxoDB.shtml>). Depuis une quinzaine d'années, des études analysent la diversité génétique de *T. gondii*. Le typage repose sur l'analyse de plusieurs loci polymorphes. Les méthodes de typage ont fait appel à des techniques isoenzymatiques comme la MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Darde *et al.*, 1992), puis aux techniques de biologie moléculaire telles que la RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) (Howe & Sibley, 1995) ou l'analyse des microsatellites

(Ajzenberg *et al.*, 2002). Plus d'une cinquantaine de marqueurs génétiques sont décrits, les plus utilisés étant les gènes codant les antigènes majeurs de *T. gondii* (**Tableau 6**).

**Tableau 6.** Principaux gènes de *T. gondii* utilisés dans l'étude du polymorphisme génétique.

Localisation	Protéines	Gènes utilisés
Membrane plasmique	SAG, SRS, BAG, BSR	<i>sag1, sag2, sag3, sag4, srs1, srs2, srs3, bsr4</i>
Granules denses	GRA, NTPase	<i>gra1, gra2, gra3, gra4, gra5, gra6, gra7, ntp</i>
Rhoptries	ROP	<i>rop1</i>
Micronèmes	MIC	<i>mic1 à mic10</i>
Matrice du kyste	MAG	<i>mag1</i>
Cytosquelette	Actine, $\alpha$ -tubuline, $\beta$ -tubuline	<i>act1, tub1, tub2</i>

### 3.2.2. Caractéristiques des trois types de *T. gondii*

Les études concordent pour regrouper la majorité des souches analysées de *T. gondii* en 3 génotypes : types I, II et III (**Tableau 7**) (Ajzenberg *et al.*, 2002; Darde *et al.*, 1992; Howe & Sibley, 1995). Cependant, il existe quelques souches atypiques caractérisées par la présence d'allèles uniques qui ne sont pas retrouvés dans les 3 types principaux (Su *et al.*, 2003).

**Tableau 7.** Principales caractéristiques biologiques des différents types de *T. gondii*.

	Type I	Type II	Type III
<b>Répartition chez l'homme</b>	De 0 à 40 % des souches isolées	De 40 à 100 % des souches isolées	< 20 % des souches isolées
<b>Toxoplasmose acquise expérimentale</b>	Souris : très virulent (toxoplasmose aiguë létale) Rat : non virulent	Souris : non virulent Rat : non virulent	Souris : souvent létal Virulence intermédiaire entre type I et type II
<b>Toxoplasmose congénitale expérimentale</b>	Souris : transmission et gravité importante Cobaye et rat : transmission materno-foetale moyenne	Souris : transmission importante Cobaye et rat : transmission materno-foetale importante	N.D.
<b>Multiplication</b>	Multiplication rapide des tachyzoïtes Peu ou pas de conversion en bradyzoïtes et de formation de kystes <i>in vivo</i>	Multiplication lente Conversion en bradyzoïte et formation de kystes <i>in vivo</i>	Multiplication intermédiaire Formation de kystes <i>in vivo</i>

N.D. : Non Déterminé.

### **3.3. Distribution des 3 types de *T. gondii***

La distribution de ces différents types varie en fonction des régions du globe. Il existe en France une prédominance très nette du type II (85 %) alors que les souches de type I ne représentent que 8 % et celles de type III 2% (Honore *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 1997). Aux Etats-Unis, le type II prédomine également (Howe & Sibley, 1995). La situation est très différente dans d'autres pays avec une fréquence plus élevée de souches de type I en Espagne et en Grande-Bretagne (Aspinall *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2001) ou de souches atypiques au Brésil (Ferreira Ade *et al.*, 2006).

## **4. MANIFESTATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET TRAITEMENTS DE LA TOXOPLASMOSE**

### **4.1. Prévalence et diagnostic de la toxoplasmose humaine**

La prévalence de la toxoplasmose varie d'un pays à l'autre (de 7 à 80 %). Les prévalences inférieures à 30 % s'observent principalement en Amérique du Nord, en Grande-Bretagne, en Scandinavie et dans le Sud Est de l'Asie. Les prévalences supérieures à 60 % s'observent principalement en Afrique et Amérique Latine. En France, la prévalence a diminué régulièrement depuis 40 ans : 54 % en 1995 (Ancelle *et al.*, 1996) et 44 % en 2003 avec de fortes variations régionales encore mal expliquées.

Le diagnostic biologique de la toxoplasmose est effectué par la sérologie (recherche d'immunoglobulines G et M) et/ou la mise en évidence du parasite ou de l'ADN parasitaire. Un patient atteint de toxoplasmose effectuera alors une séroconversion correspondant au passage d'une séronégativité (absence d'anticorps dirigés contre *T. gondii*) à une séropositivité (présence d'anticorps dirigés contre *T. gondii*).

### **4.2. Manifestations physiopathologiques**

#### **4.2.1. Toxoplasmose acquise**

La toxoplasmose acquise après la naissance est le plus souvent bénigne ou asymptomatique chez les sujets immunocompétents. Les signes cliniques sont variables pouvant se manifester par une fièvre ou une asthénie. Des formes graves peuvent être

exceptionnellement observées lors d'infection par des souches atypiques. Le sujet guérit spontanément en quelques semaines. La mise en place de la réponse immune permet le passage à la phase chronique de la maladie. La présence de kystes persistant dans les tissus favorise alors l'acquisition d'une immunité définitive et protectrice.

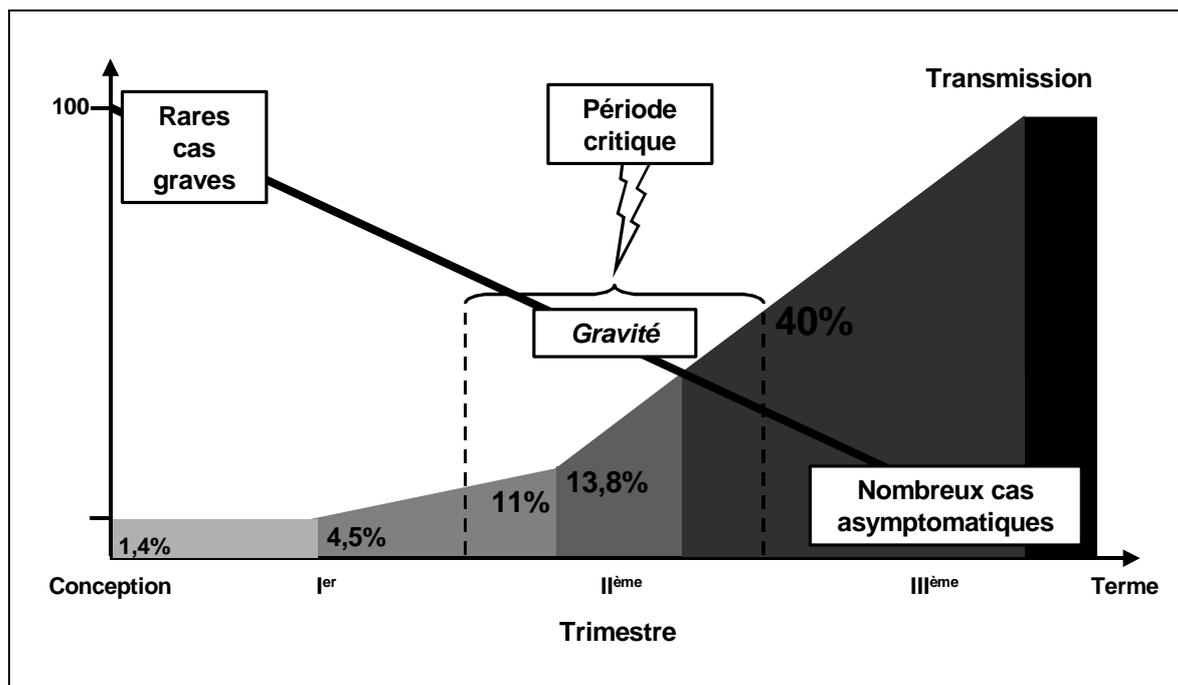
#### **4.2.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé**

Un nombre croissant de cas de toxoplasmose s'observe chez les sujets atteints de déficits immunitaires congénitaux ou acquis (SIDA) ou soumis à des traitements immunosuppresseurs (Morlat *et al.*, 1993). Il peut s'agir de primo-infection mais plus fréquemment de réactivation d'une toxoplasmose chronique due à l'effondrement de l'immunité. L'encéphalite toxoplasmique est la manifestation la plus fréquente (près de 80 % des cas) et mortelle en l'absence d'un traitement approprié (Bertoli *et al.*, 1995; Leport & Remington, 1992).

#### **4.2.3. Toxoplasmose congénitale**

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une toxoplasmose maternelle acquise au cours de la grossesse. Elle peut être à l'origine d'avortements spontanés, ou de malformations (Foulon *et al.*, 1999). En France, l'incidence annuelle des séroconversions chez les femmes enceintes a été estimée entre 6,6 et 14,8 pour 1000 grossesses soit entre 2800 et 6000 par an (Ancelle *et al.* 1996). Les cas de toxoplasmose congénitale concernent un à deux nouveaux-nés pour 1000 naissances, soit une estimation de l'ordre de 1000 cas annuels.

La fréquence de transmission materno-fœtale est proportionnelle à la taille du placenta au cours de la grossesse, alors que la sévérité des lésions est liée à l'âge du fœtus au moment de l'infection maternelle (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993) (**Figure 6**). En effet, pendant le premier trimestre de la grossesse, le risque de transmission materno-fœtale est faible (entre 1,4 et 11 %). Cependant, les fœtus contaminés sont exposés à des lésions graves (Dunn *et al.*, 1999) entraînant le plus souvent un avortement spontané. Pendant le deuxième trimestre, le risque de transmission s'élève entre 13,8 et 40 % car la barrière placentaire est moins efficace. Les lésions demeurent importantes : malformations majeures (hydrocéphalie), séquelles cérébrales (encéphalo-méningo-myélite, calcifications intra-craniennes), cardiaques, oculaires (choriorétinite) ou neuromusculaires. Au cours du troisième trimestre, la probabilité de transmission materno-fœtale est importante (50 à 83 %). L'enfant est souvent asymptomatique à la naissance (formes infracliniques ou retardées).



**Figure 6.** Risque de transmission materno-fœtale et gravité de l'atteinte de l'enfant, en fonction de la période de primo-infection de la mère.

Chez l'animal, la toxoplasmose congénitale a un impact économique majeur car il provoque un avortement dans 1 à 2 % chez les ovins et les caprins en Europe (Buxton, 1998) et 3 à 4 % en Amérique du sud (Freyre *et al.*, 1999) dans les zones d'élevage extensif.

### 4.3. Traitements et prophylaxie

Un traitement n'est justifié que dans la toxoplasmose congénitale et dans les formes graves de toxoplasmose survenant chez les malades immunodéprimés ou consécutives à une infection par une souche très virulente. Les choix thérapeutiques sont limités par le faible nombre de molécules actives sur *T. gondii* et le manque d'information sur leur efficacité ou leur tolérance chez la femme enceinte (Derouin, 2001). De plus, les traitements mis en œuvre chez les immunodéprimés et chez les femmes enceintes sont essentiellement efficaces lors de la phase aiguë de la maladie (Derouin & Garin, 1993; Morlat *et al.*, 1993). Ces traitements sont basés sur l'action de certains antibiotiques tels que la spiramycine, macrolide dont l'activité sur le ribosome est avant tout parasitostatique ; la pyriméthamine, inhibiteur de la synthèse de l'acide folique agissant sur la dihydrofolate réductase parasitaire (biosynthèse des nucléoprotéines) ou encore la sulfadiazine inhibant la déhydroptéroate synthétase, enzyme essentielle dans la synthèse des folates. Parmi les différentes associations d'antibiotiques, seules les associations entre pyriméthamine et sulfadiazine ont fait la preuve d'une grande efficacité sur *T. gondii*. Cette efficacité est liée au fait que ces 2 médicaments agissent en

cascade sur la voie de synthèse des folates, produisant un effet synergique et permettant ainsi de potentialiser l'effet anti-parasitaire.

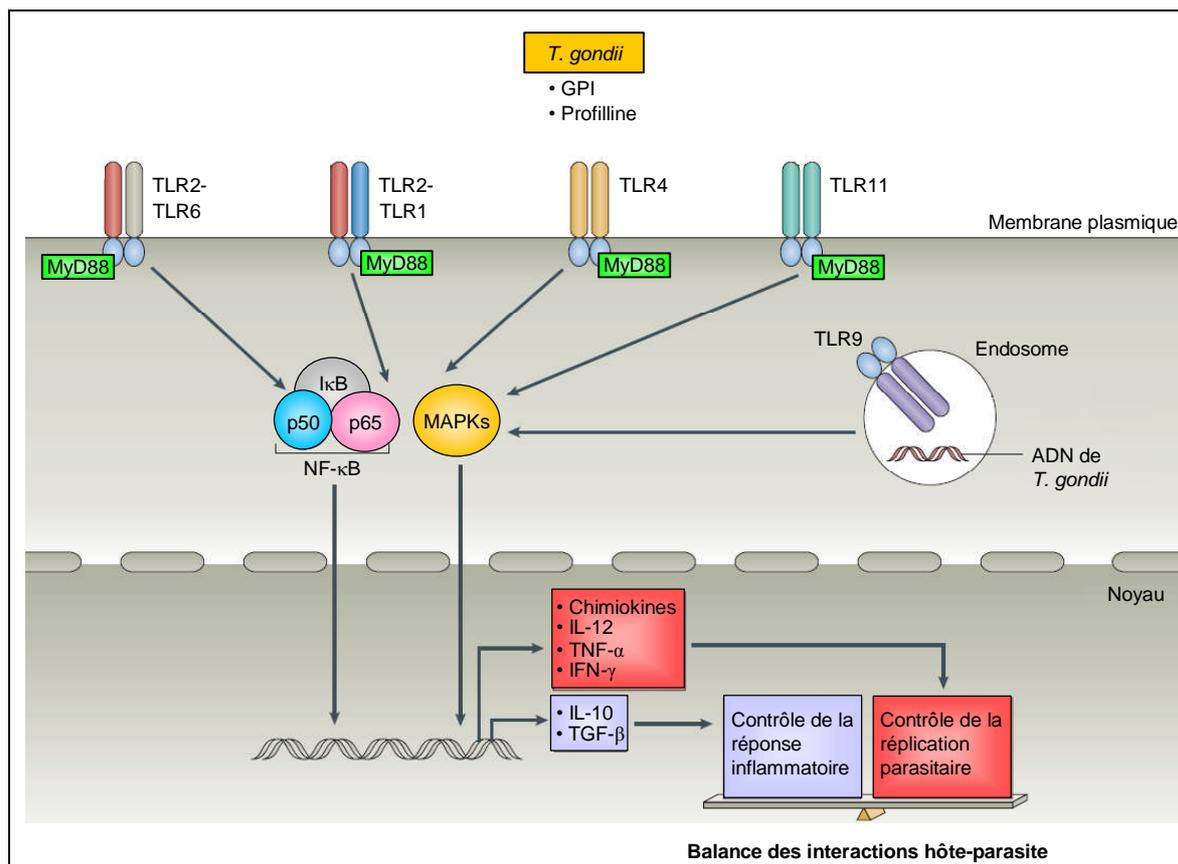
## 5. REPONSE IMMUNITAIRE FACE A *T. gondii*

La réponse immunitaire au cours de l'infection à *T. gondii* est complexe et compartimentée. De plus, *T. gondii* a la capacité d'infecter tous les organes, chaque tissu ayant sa propre réaction immunitaire spécifique, notamment le système nerveux central et le placenta. Généralement, chez un sujet immunocompétent, la primo-infection à *T. gondii* induit une réponse immunitaire protectrice probablement liée à la persistance de kystes dans certains tissus (muscle, cerveau). Cette immunité est probablement entretenue par la rupture périodique de ces kystes. Chez les sujets immunodéprimés (sidéens, greffés...), la multiplication et la dissémination incontrôlée des tachyzoïtes peuvent entraîner des lésions graves pouvant être fatales.

### 5.1. Réponse innée

#### 5.1.1. Toll-Like Recepteurs

Les IECs (Cellules Epithéliales Intestinales) ainsi que d'autres cellules immunitaires comme les DCs et les M $\Phi$ , expriment à leur surface des récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptor) reconnaissant un panel de molécules microbiennes regroupées sous le terme de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Le répertoire des PRRs est très large et inclut plusieurs classes de protéines telles que les récepteurs TLRs (Toll-Like Receptors), les récepteurs scavenger et les récepteurs C-type lectins. Bien que les mécanismes ne soient pas clairement décrits, les TLRs semblent représenter les éléments centraux de la reconnaissance des PAMPs dans le cas de l'infection par *T. gondii* (Khan, 2007) (**Figure 7**).



**Figure 7.** Activation des TLRs par *T. gondii*. D'après Aliberti *et al.*, 2003.  
GPI : glycosylphosphatidylinositol, MAPKs : MAP kinases.

Les MΦ et les PMNs sont capables de reconnaître spécifiquement *T. gondii* par le TLR11 dont la formation de l'homodimère semble suffisante pour activer le NF-κB (Nuclear Factor kappa B) et induire notamment la production d'IL-12 et de TNF-α essentielle à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative *via* les LTCD4<sup>+</sup> (Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>), ainsi que d'IL-15, nécessaire à l'activation des cellules NK (Natural Killer). Par ailleurs, des études menées chez la souris montrent que les ancres GPI des protéines membranaires et la profiline de *T. gondii* sont reconnues par les récepteurs TLR2 et TLR4 (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Chez des souris déficientes pour le TLR2, un défaut de production de NO par les MΦ associé à une incapacité à activer les fonctions anti-microbiennes est observé. A l'inverse, aucun changement dans la production cytokinique n'est remarqué (Trinchieri, 2003). Rakoff-Nahoum a démontré que le TLR4 exprimé par les cellules épithéliales joue un rôle protecteur vis-à-vis des dommages épithéliaux causés par *T. gondii* et permet le maintien de l'homéostasie intestinale en induisant l'expression de plusieurs facteurs tels que l'IL-6 et le TNF-α, qui sont cyto-protecteurs ou impliqués dans les réparations de tissus (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Enfin, Minns *et al.* ont rapporté que le TLR9 est indispensable à la mise en place

de la réaction immunitaire intestinale face à *T. gondii* (Minns *et al.*, 2006). En effet, le TLR9, localisé dans les endosomes et le réticulum endoplasmique, semble reconnaître l'ADN de *T. gondii* et activer la voie des MAP kinases (mitogen activated protein) permettant la synthèse d'IFN- $\gamma$ .

Des souris déficientes pour MyD88 (MYeloid Differentiation primary-response protein 88), protéine adaptatrice des TLRs, présentent une forte diminution de production d'IL-12 *in vivo* et *in vitro* après stimulation par un extrait protéique soluble issu de tachyzoïtes de *T. gondii* appelé STAg (Soluble Tachyzoite Antigen). De plus, après une infection par *T. gondii*, ces souris ont un taux de mortalité plus important que les souris sauvages lié à une baisse d'activation de la réponse immunitaire et de l'effet protecteur de l'IFN- $\gamma$ . Jusqu'ici, aucun TLRs spécifique n'a pu être associé au phénotype observé chez les souris déficientes pour MyD88.

### **5.1.2. Activation des cellules épithéliales intestinales**

L'infection par *T. gondii* ayant lieu le plus souvent par voie orale, la réponse immune débute localement dans la muqueuse digestive et plus particulièrement dans l'épithélium intestinal qui constitue la première barrière de défense de l'hôte (**Figure 8**).

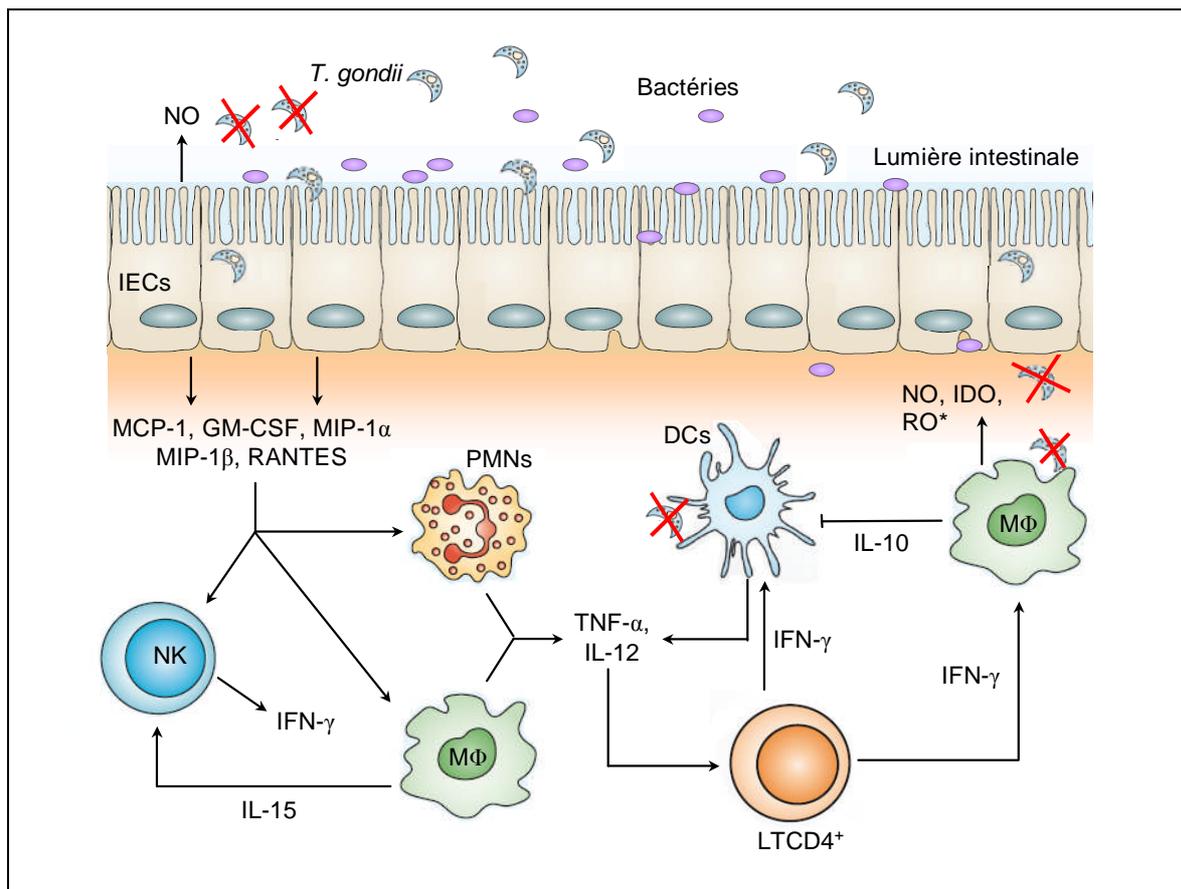
L'infection des IECs entraîne une synthèse de molécules cytotoxiques telles que le NO et les alpha défensines mais également de chimiokines comme MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ), MIP- $\beta$  et RANTES (Regulated on Activation and Normally T-cell Expressed) et de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) attirant les PMNs (Polynucléaires Monocytes Neutrophiles), les M $\Phi$  et les DCs vers le site d'inflammation (Buzoni-Gatel *et al.*, 2001; Mennechet *et al.*, 2002).

Enfin, les IECs semblent pouvoir jouer le rôle de CPA (Cellules Présentatrices d'Antigène). En effet, des résultats sur un modèle *in vivo* ont montré que ces cellules infectées par *T. gondii* ont une augmentation de l'expression des molécules CD40, CD1d, des molécules du CMH (Complexe Moléculaire d'Histocompatibilité) de classe II ainsi que des récepteurs de l'IFN- $\gamma$  (Kasper *et al.*, 2004).

### **5.1.3. Activation des macrophages et des polynucléaires neutrophiles**

Chez la souris, l'activation des M $\Phi$  nécessite la présence de co-sigaux tels que les LPS (LipoPolySaccharides) ou le TNF- $\alpha$ , pour déclencher l'activité cytotoxique contre *T. gondii*

(Sibley *et al.*, 1993). Les MΦ et les PMNs stimulés exercent une activité anti-microbienne par divers mécanismes effecteurs : a) mécanismes oxydatifs (Hughes, 1988) ; b) mécanismes non-oxydatifs, caractérisés principalement par la production de NO (Denkers *et al.*, 2004) et l'induction, par IFN- $\gamma$ , de l'IDO (Indoleamine 2,3-DiOxygénase) dégradant le tryptophane nécessaire à la croissance du parasite (Schluter *et al.*, 1999). Par ailleurs, les MΦ synthétisent également de l'IL-10 permettant de contrôler la réponse inflammatoire en agissant sur les DCs.

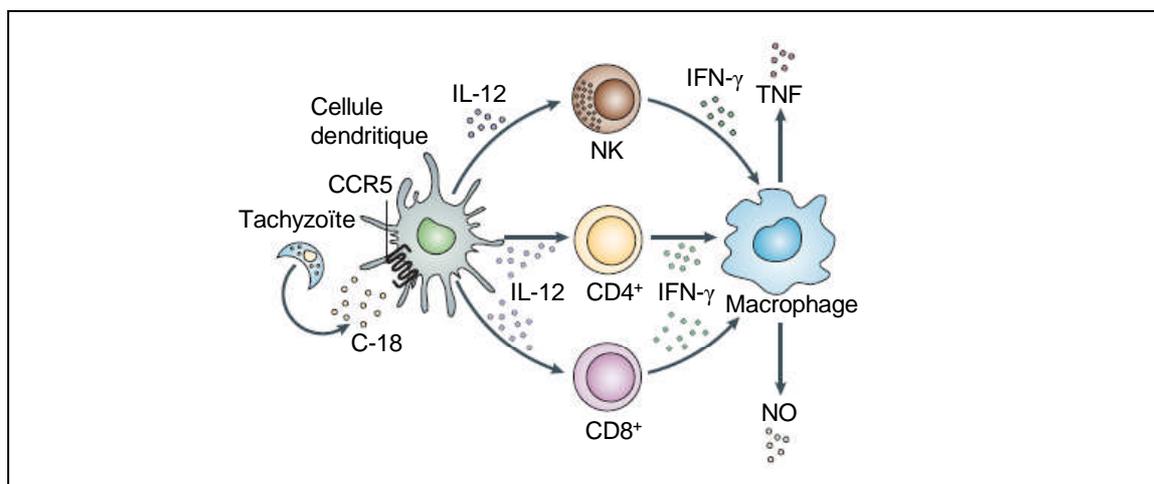


**Figure 8.** Réponse immunitaire intestinale innée à *T. gondii*. RO\* : radicaux oxygénés.

#### 5.1.4. Activation des cellules dendritiques - Rôle de l'IL-12

L'IL-12 joue un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse innée lors d'une infection par *T. gondii* et plus particulièrement dans l'induction de la synthèse d'IFN- $\gamma$ , comme le montre la sensibilité à l'infection de souris déficientes en IL-12 (Gazzinelli *et al.*, 1994). Au cours d'une infection par *T. gondii*, les DCs représentent la source majeure de production d'IL-12 *in vivo* et une étude dans un modèle murin a montré que les DCs spléniques produisent cette cytokine en absence de signaux co-stimulateurs, montrant ainsi que les DCs peuvent activer le système immunitaire par la reconnaissance de molécules parasitaires ou

lorsqu'ils sont eux-mêmes infectés par le parasite (Reis e Sousa *et al.*, 1997). Des études *in vitro* ont montré que les DCs spléniques stimulés par l'extrait STAg produisent significativement plus d'IL-12 que si elles sont préalablement exposées aux LPS. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette réponse ne sont pas entièrement connus. Une des hypothèses actuelle serait que le récepteur CCR5 (CC-Chemokine Receptor 5) posséderait une fonction importante dans l'induction de la production d'IL-12 après stimulation par l'extrait STAg (Aliberti *et al.*, 2000). La pertinence biologique de l'intervention inhabituelle d'un récepteur à chimiokine dans la reconnaissance des DCs est confirmée par des observations réalisées chez des animaux déficients pour ce récepteur, montrant une diminution de la production d'IL-12 (Aliberti *et al.*, 2000). Une étude approfondie concernant l'activation du récepteur CCR5 présent à la surface cellulaire des DCs a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de la protéine C-18 (Cyclophilin-18) sécrétée par *T. gondii*. En effet, C-18 est une polyI-isomérase capable de se lier au récepteur CCR5 avec des affinités comparables à celle de son ligand endogène, le CCL4 (CC-Chemokine Ligand 4) entraînant ainsi une synthèse d'IL-12 (**Figure 9**) (Aliberti *et al.*, 2003).



**Figure 9.** Phase d'initiation de la réponse innée à *T. gondii*. D'après Aliberti *et al.*, 2003.

Les bases moléculaires de l'activation du gène de l'IL-12 ont été largement étudiées. Malgré cela, les facteurs de transcription directement impliqués dans l'induction du gène de l'IL-12 durant une infection *in vivo* par *T. gondii* ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant des études ont montré que la MAP kinase p38 est nécessaire dans la production d'IL-12 par les MΦ après stimulation par l'extrait STAg (Mason *et al.*, 2004). Par ailleurs, des souris déficientes pour le facteur IRF8 (IFN-Regulatory Factor 8), un facteur de transcription inductible de l'IFN-γ, ne développent pas de résistance face à l'infection par *T.*

*gondii*. Cette observation pourrait directement impliquer IRF8 dans l'expression du gène de l'IL-12. En effet, d'autres études ont montré que ces souris présentent un défaut de production d'IL-12 et de maturation des DCs impliquées dans la production d'IL-12 (Aliberti *et al.*, 2003).

#### 5.1.5. Autres cellules immunitaires

Les cellules NK activées notamment par la voie de signalisation de STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) (Cai *et al.*, 2000) et stimulées par l'IL-12, l'IL-15 et le TNF- $\alpha$  (Gazzinelli *et al.*, 1993), produisent de l'IFN- $\gamma$  qui augmente l'activité anti-microbienne des M $\Phi$ , des DCs et des IECs. Ce rôle essentiel a pu être mis en évidence dans des modèles *in vivo* de souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) chez lesquelles la résistance à l'infection à *T. gondii* est liée à la production d'IFN- $\gamma$  qui, en l'absence de lymphocytes fonctionnels LTCD4<sup>+</sup> et LTCD8<sup>+</sup>, provient des cellules NK (Sher *et al.*, 1993).

Les IELs (Lymphocytes Intra-Epithéiaux) exercent une activité cytotoxique vis-à-vis des IECs infectées et produisent du TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor-beta) permettant de limiter les phénomènes immunopathologiques liés à l'IFN- $\gamma$ .

Les LT $\gamma\delta$  présentent également une activité cytotoxique *in vitro* contre les cellules infectées par *T. gondii* indépendante de la présentation de l'antigène par le CMH, et sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$  (Subauste *et al.*, 1995). Une augmentation de cette population cellulaire est retrouvée chez l'homme au cours de l'infection par *T. gondii* mais également dans la rate de souris infectées par voie intra-péritonéale (Hisaeda *et al.*, 1995). En raison de leur préférence de localisation pour l'intestin, ces cellules pourraient représenter une composante essentielle de la réponse immunitaire locale intestinale chez l'homme (Lepage *et al.*, 1998) bien que leur rôle demeure secondaire chez la souris (Sayles *et al.*, 1995).

Les neutrophiles et, très probablement les éosinophiles, ainsi que les mastocytes interviennent rapidement au site de l'infection et sont impliqués dans l'installation précoce de la réponse immunitaire non spécifique par l'intermédiaire de la production d'IL-12 et de divers facteurs pro-inflammatoires (Bliss *et al.*, 2001).

Les plaquettes semblent aussi pouvoir exercer une activité cytotoxique vis-à-vis de *T. gondii*, indépendante des anticorps spécifiques (Chumpitazi *et al.*, 1998).

Enfin, les cellules non-hématopoïétiques (fibroblastes, cellules endothéliales,...) sont capables de réduire la prolifération du parasite par des mécanismes dépendants du fer, de l'iNOS (Inductible Nitric Oxyde Synthase), de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  (Yap & Sher, 1999).

## 5.2. Réponse adaptative

La mise en place de cette réponse nécessite la présentation de l'antigène par les MΦ et les DCs, ces dernières pouvant capturer directement des antigènes de *T. gondii* à l'intérieur de la lumière intestinale par l'élongation de leur dendrites à travers les jonctions serrées. Le mécanisme de présentation requiert la présentation de l'antigène au TCR (T Cell antigen Receptor) des LT ainsi que l'interaction du récepteur CD40 avec son ligand CD40L. L'immunité cellulaire est la composante majeure de la réaction adaptative de l'hôte lors d'une infection par *T. gondii*. En effet, la réponse humorale est faiblement activée par ce pathogène à développement intracellulaire même si elle demeure l'élément-clé du diagnostic de la toxoplasmose chez l'homme.

### 5.2.1. Réponse de type Th1 et IFN- $\gamma$

Les LTCD4<sup>+</sup> sont nécessaires au développement de la résistance face à l'infection par *T. gondii*. Cette résistance est étroitement liée à une réponse cellulaire de type Th1 favorisée par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 produits après activation des NK et des MΦ (Suzuki *et al.*, 1988). Chez la souris, les LTCD4<sup>+</sup> sont subdivisés en deux populations : Th1 et Th2. Cette distinction est basée sur leur profil cytokinique après stimulation telle que l'a rapporté Mosmann en 1986 chez la souris (Mosmann *et al.*, 1986). Les cellules de type Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  tandis que les cellules de type Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10.

Des études ont montré que le contrôle de l'infection à *T. gondii* est le résultat d'une action synergique entre LTCD4<sup>+</sup> et LTCD8<sup>+</sup> (Gazzinelli *et al.*, 1991). Les LTCD8<sup>+</sup>, activés majoritairement par les protéines de surface du parasite mais aussi par l'IL-2 sécrétée par les LTCD4<sup>+</sup>, exercent une activité cytotoxique médiée par la production d'IFN- $\gamma$ . Cette activité est limitée à la reconnaissance du CMH de classe I. Les LTCD8<sup>+</sup> jouent ainsi un rôle essentiel dans la résistance à l'infection pendant la phase aiguë chez l'homme et la souris, et ils participent également au maintien d'une résistance pendant la phase chronique (Gazzinelli *et al.*, 1992).

La mise en place d'une mémoire immunitaire par les LT lors de l'infection par *T. gondii* chez l'homme est un fait établi. En effet, la primo-infection d'une femme permet la protection de son fœtus en cas de réinfection lors d'une grossesse. Il est probable que la persistance de la mémoire immunitaire portée par les LT soit assurée par la rupture régulière des kystes intracellulaires. Cette mémoire immunitaire utilise les voies de signalisation intracellulaire impliquant le NF- $\kappa$ B. Ces voies sont activées par les protéines de surface ou des granules

denses du parasite (Prigione *et al.*, 2000) ainsi que par le biais des récepteurs lymphocytaires CD28 et des récepteurs dendritiques B7-1 (appelé encore CD80) et B7-2 (Villegas *et al.*, 1999). Par ailleurs, une mémoire immunitaire portée par les LB induit la synthèse d'anticorps anti-*T. gondii* résiduels durant toute la vie de l'hôte.

### 5.2.2. Réponse de type Th2 et prévention des phénomènes immuno-pathologiques

Les effets de la réponse inflammatoire dépendante de l'IFN- $\gamma$  peuvent être délétères pour l'hôte. Les pathologies inflammatoires comme l'arthrite ou la maladie de Crohn, peuvent par exemple induire des réponses de type Th1 incontrôlées pouvant causer de graves lésions. Afin de prévenir de tels effets, une réponse immunitaire de type Th2 anti-inflammatoire est mise en place.

#### 5.2.2.1. IL-10

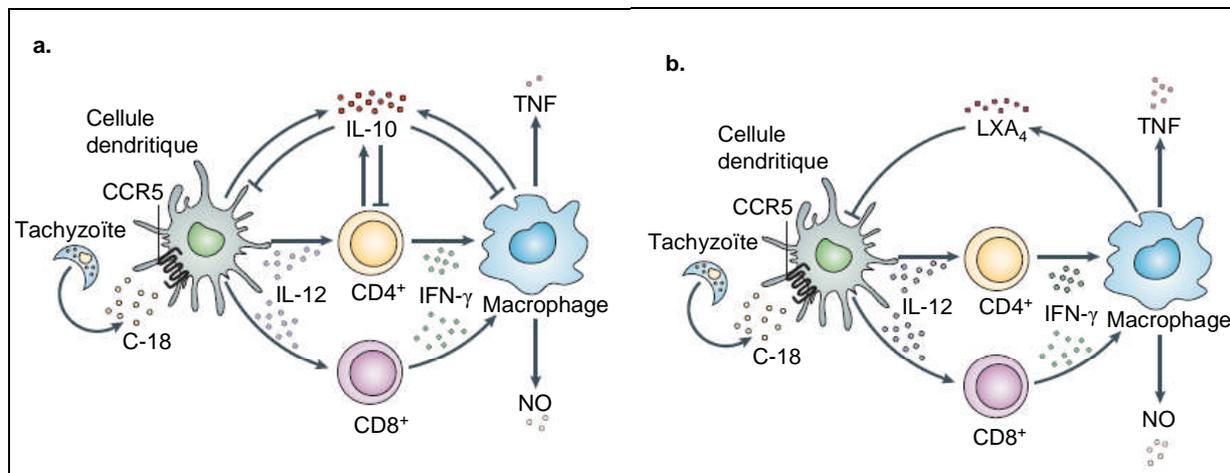
L'IL-10 possède une activité anti-inflammatoire dans de nombreuses pathologies associées à une forte production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-1 ou de TNF- $\alpha$  (Van de Loo & Van den Berg, 2002) et est produite notamment par le placenta murin. Cette cytokine est utilisée par les pathogènes pour inhiber la réponse immunitaire inflammatoire. Des virus tels que le virus Epstein-Barr code une protéine virale homologue de l'IL-10 qui peut induire les mêmes voies de signalisation que la cytokine endogène entraînant une inactivation des voies anti-microbiennes dépendantes de l'IFN- $\gamma$ , une inhibition du processus de présentation de l'antigène par les CPA et une inhibition de la production de cytokines à activité cytotoxique synthétisées par les LT (Salek-Ardakani *et al.*, 2002). D'autres virus, comme les poxvirus, possèdent des gènes codant des homologues du récepteur de l'IL-10. Les cellules exprimant de tels récepteurs sont réfractaires aux signaux induits par le récepteur de l'IFN- $\gamma$  induisant notamment une cytotoxicité (Haig, 1998).

Lors d'encéphalite chronique toxoplasmique, la neutralisation de l'IL-10 conduit à une augmentation de l'infiltration leucocytaire dans le système nerveux central, indiquant un rôle de cette cytokine dans le contrôle de l'inflammation lors d'une infection à *T. gondii*. Des souris invalidées pour l'IL-10 ne sont pas capables de contrôler la réponse pro-inflammatoire et succombent à l'infection à *T. gondii* très tôt au cours de la phase aiguë. Elles présentent des infiltrations leucocytaires sévères et des nécroses tissulaires du foie et de l'intestin, ces phénomènes étant pour la plupart le résultat d'une production incontrôlée d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Suzuki *et al.*, 2000). L'induction d'IL-10 par *T. gondii* pourrait être un des mécanismes d'échappement du parasite à la réponse immune de son hôte (**Figure 10a**).

Cependant, l'implication directe de l'IL-10 dans la virulence de *T. gondii* ainsi que son rôle dans la persistance du parasite est discutée (Wille *et al.*, 2001).

### 5.2.2.2. Lipoxine A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>)

Les lipoxines possèdent des propriétés anti-inflammatoires dans l'arthrite, les néphrites et autres pathologies inflammatoires. Leurs actions incluent l'inhibition des fonctions leucotriènes, des fonctions des cellules NK, de la migration leucocytaire, de la production de TNF- $\alpha$  induit par les chimiokines, de la translocation de NF- $\kappa$ B et de l'expression de récepteurs aux chimiokines et de molécules d'adhésion (Ohira *et al.*, 2004). Pour assurer de telles fonctions, ces agents se fixent sur deux récepteurs principaux : le récepteur à la lipoxine A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>R ou FPRL1) et le récepteur nucléaire AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Maddox *et al.*, 1997). Une étude réalisée chez des souris déficientes en IL-10 et infectées par *T. gondii* a montré l'acquisition d'une protection conférée par l'injection de l'extrait STAg, 24 heures avant l'infection. Ce traitement est associé à une diminution de la production d'IL-12 et de CCR5 par les DCs (Reis e Sousa *et al.*, 1999). L'injection de STAg permet dans ce cas la synthèse de LXA<sub>4</sub> inhibant la migration des DCs et la production d'IL-12 *in vivo* et *in vitro*, phénomène appelé "DCs paralysis" (**Figure 10b**).



**Figure 10.** Contrôle de la réponse pro-inflammatoire durant l'infection à *T. gondii*. **a.** Contrôle des effets cytotoxiques par la production d'IL-10 durant la phase aiguë. **b.** Contrôle de la réponse inflammatoire par la synthèse de LPA<sub>4</sub> aux sites où persiste le parasite lors de la phase chronique de l'infection. C-18 : cyclophilin-18.

## 5.3. Phase chronique - Persistance du parasite

Bien que les mécanismes anti-microbiens induits par l'IFN- $\gamma$  soient actifs, ils ne sont pas totalement efficaces. En effet, des parasites échappent au contrôle immunitaire et

persistent chez l'hôte. Il existe deux mécanismes principaux proposés pour expliquer l'évasion du parasite à la réponse immunitaire durant la phase chronique :

(1) Les parasites deviendraient moins sensibles à l'activité anti-microbienne de l'hôte ou induiraient des facteurs immunosuppresseurs qui atténueraient l'activité des effecteurs de la réponse immunitaire notamment la production de médiateurs pro-inflammatoires. La première hypothèse se base sur l'apparition d'un nombre croissant de parasites échappant à la réponse immunitaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ou d'enzymes cytoplasmiques capables d'inactiver ou de neutraliser les molécules effectrices de la réponse immunitaire (protéines du complément, superoxydes ou NO) (Candolfi *et al.*, 1994). En effet, la production d'enzymes oxydo-réductrices comme les peroxyrédoxines par *T. gondii* suggère que ces mécanismes pourraient contribuer à la persistance du parasite chez l'hôte (Son *et al.*, 2001).

(2) L'inhibition de la migration des cellules effectrices ou de leur activation *in situ* par l'expression de facteurs modulateurs ou anti-inflammatoires d'origine parasitaire, qui favoriserait ainsi l'échappement de *T. gondii* et le développement de la phase chronique.

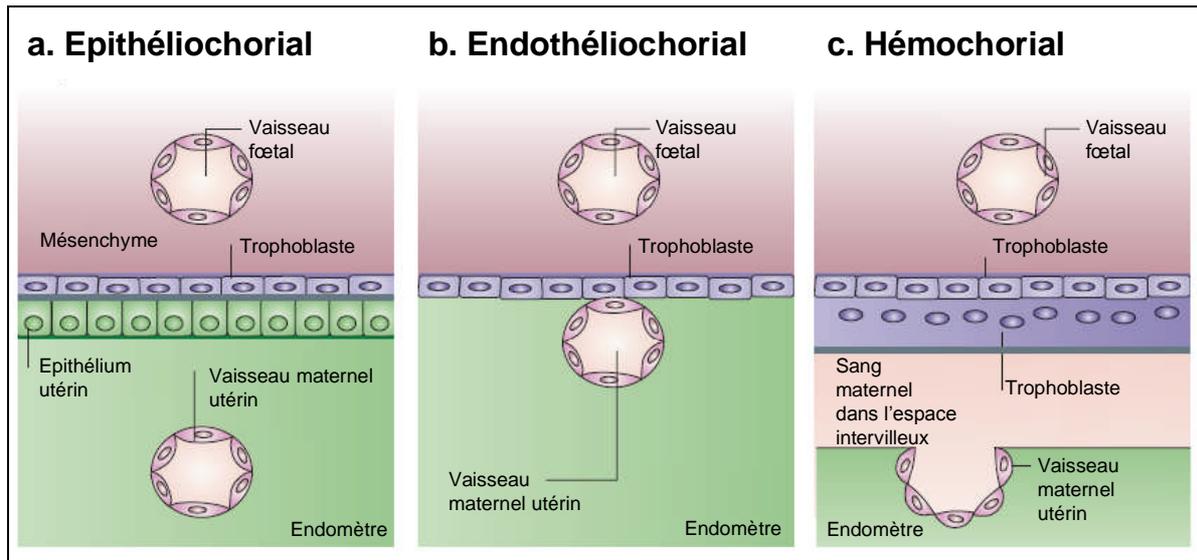
## GESTATION

L'état d'une femelle qui porte son (ses) petit(s) depuis l'implantation jusqu'à la parturition (accouchement, mise bas) s'appelle la gestation. L'établissement de la gestation résulte d'interactions complexes entre l'embryon et l'environnement maternel. Les structures embryonnaires permettent d'attacher l'embryon à l'utérus (implantation) et de former les connexions vasculaires nécessaires au transport des nutriments (placentation). Le placenta ainsi formé réoriente les fonctions immunes, endocrines et métaboliques de la mère au profit de l'embryon. Ces activités complexes sont sensibles à des perturbations comme le montre la fréquence élevée de mortalité embryonnaire précoce et les pathologies de la gestation chez la femme. Par exemple, une infection virale, bactérienne ou parasitaire peut entraîner un arrêt de la gestation (avortement spontané) ou des lésions du placenta et une infection congénitale.

L'implantation ne peut avoir lieu que si l'endomètre utérin est préalablement préparé par l'action des oestrogènes puis de la progestérone. Il existe plusieurs types d'implantation : centrale où l'endomètre utérin est peu transformé (ruminants), excentrée où l'endomètre utérin est en dentelle (souris) et interstitielle où l'implantation a lieu dans l'épaisseur de l'endomètre utérin (Homme). Deux types de mammifères se distinguent : ceux pour lesquels l'ovaire est indispensable jusqu'au terme de la gestation (souris), et ceux pour lesquels l'ovaire n'est plus nécessaire car relayé par le placenta (Homme). Le placenta présente des variations de structures majeures en fonction des différentes espèces de mammifères. Il existe 3 types de placenta caractérisés par le nombre de couches cellulaires entre les circulations fœtales et maternelles. Les cellules trophoblastiques constituent toujours la couche fœtale la plus externe qui recouvre le mésenchyme et les vaisseaux sanguins fœtaux. Le placenta de type épitheliochorial (équidés et porcins) se définit par une apposition directe (adhésion voire même fusion) des trophoblastes avec la surface de l'épithélium utérin maternel. Les trophoblastes n'envahissent pas le mésenchyme utérin comme dans les autres types de placentation. Le type endotheliochorial (chat, chien) est caractérisé par la migration des cellules trophoblastiques afin d'être en contact direct avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins maternels. Le type hémochorial retrouvé chez les rongeurs, les primates et l'Homme correspond à la forme la plus invasive de placentation. Les trophoblastes s'infiltrent à travers les vaisseaux maternels afin d'arriver en contact direct avec la circulation sanguine.

Ils perturbent directement la couche endothéliale utérine et dans certains cas, le muscle des artères utérines (**Figure 11**).

L'interface d'échange materno-fœtal diffère selon le type de placenta. Concernant le placenta de type hémochorial, cette interface mère/fœtus peut être constituée d'une seule couche cellulaire trophoblastique correspondant au sous-type hémomonochorial (Homme), de 2 couches cellulaires trophoblastiques correspondant au sous-type hémodichorial (lapin), ou de 3 couches trophoblastiques correspondant au sous-type hémotrichorial (souris).



**Figure 11.** Principaux types de placentation et relations entre les cellules fœtales trophoblastiques et le sang maternel. Adaptée de Moffett & Loke, 2006.

## 1. GESTATION ET DEVELOPPEMENT FŒTAL CHEZ LA SOURIS

La gestation murine est constituée d'une suite d'évènements définis dans le temps dont les deux principaux sont l'implantation et la formation du placenta. Une excellente revue de la littérature sur ce sujet a déjà été réalisé par Mjihdi en 2005 (Mjihdi, 2005) (Tableau 8).

**Tableau 8.** Etapes majeures du développement chez la souris. D'après Cross *et al.*, 1994.

Jour de gestation	Evènements
3,5	Formation du blastocyste
4 à 4,5	Activation du blastocyste
4,5 à 6	Implantation
<b>6 à 8</b>	<b>Formation du sac vitellin</b>
<b>9 à 10</b>	<b>Développement du placenta</b>
8 à 18	Développement de la vascularisation foetale
20 à 21	Mise bas

### 1.1. Système reproducteur

L'utérus de la souris, à la différence de celui de la femme, est constitué de deux cornes qui s'étendent des trompes de Fallope jusqu'à la partie dorsale de la vessie. L'utérus est constitué de trois couches superposées. Ainsi, de la lumière de l'organe vers l'extérieur, on distingue l'endomètre contenant de nombreuses glandes utérines, le myomètre constitué de deux couches musculaires lisses (une longitudinale externe et une circulaire interne) et la séreuse (Cook, 1983).

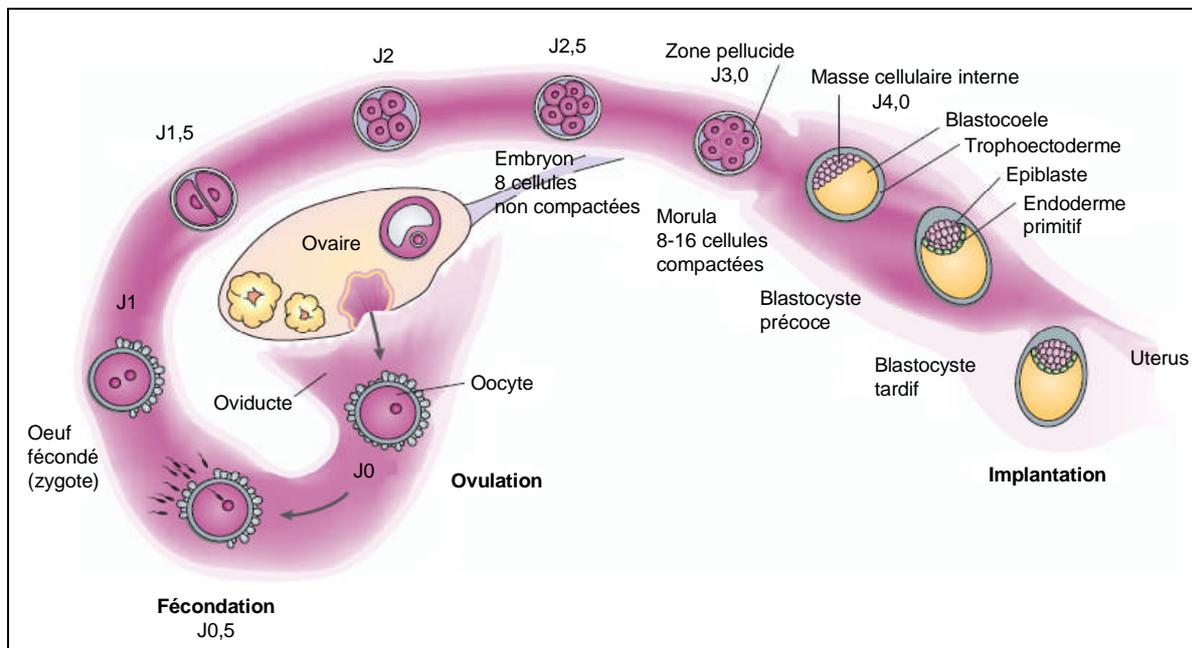
### 1.2. Cycle ovarien et accouplement

L'intervalle entre deux ovulations successives représente un cycle ovarien complet. L'ovulation est précédée par une période œstrogénique (phase folliculaire) suivie d'une période progesteronique (phase lutéale). La mise au contact d'une souris mâle avec une souris femelle, l'initiation immédiate d'un cycle ovarien d'une durée moyenne de 4 jours a lieu, provoquant ainsi un œstrus (Whittingham & Wood, 1983) durant lequel les ovules sont prêts pour la fécondation. Durant la gestation chez la souris, le corps jaune contrôlé par la mPRL (ou prolactine et présentant deux pics de production par jour) produit la progestérone (Strauss *et al.*, 1996). La mPRL est également induite par l'accouplement et constitue l'hormone lutéotrophique prédominante au cours des 8-9 premiers jours de gestation.

### 1.3. Implantation

#### 1.3.1. Phase pré-implantatoire du développement embryonnaire

Après fécondation dans l'oviducte, l'œuf se divise par segmentation (série de divisions mitotiques en succession rapide) jusqu'à former la morula. A ce stade, l'embryon entre dans la lumière de l'utérus et se transforme en blastocyste contenant une cavité (appelé blastocœle) et composé de deux populations cellulaires distinctes, la masse cellulaire interne (dont dérivera ultérieurement l'embryon proprement dit) et le trophoectoderme (précurseur des trophoblastes) constituant un véritable épithélium qui assurera l'interaction avec l'épithélium utérin. Avant l'implantation, le blastocyste s'échappe de sa "coquille externe" (la zone pellucide) et se différencie pour donner naissance à d'autres types cellulaires, l'épiblaste et l'endoderme primitif (**Figure 12**) (Wang & Dey, 2006).



**Figure 12.** Développement embryonnaire pré-implantatoire et implantation chez la souris. Adaptée de Wang & Dey, 2006. J : jour.

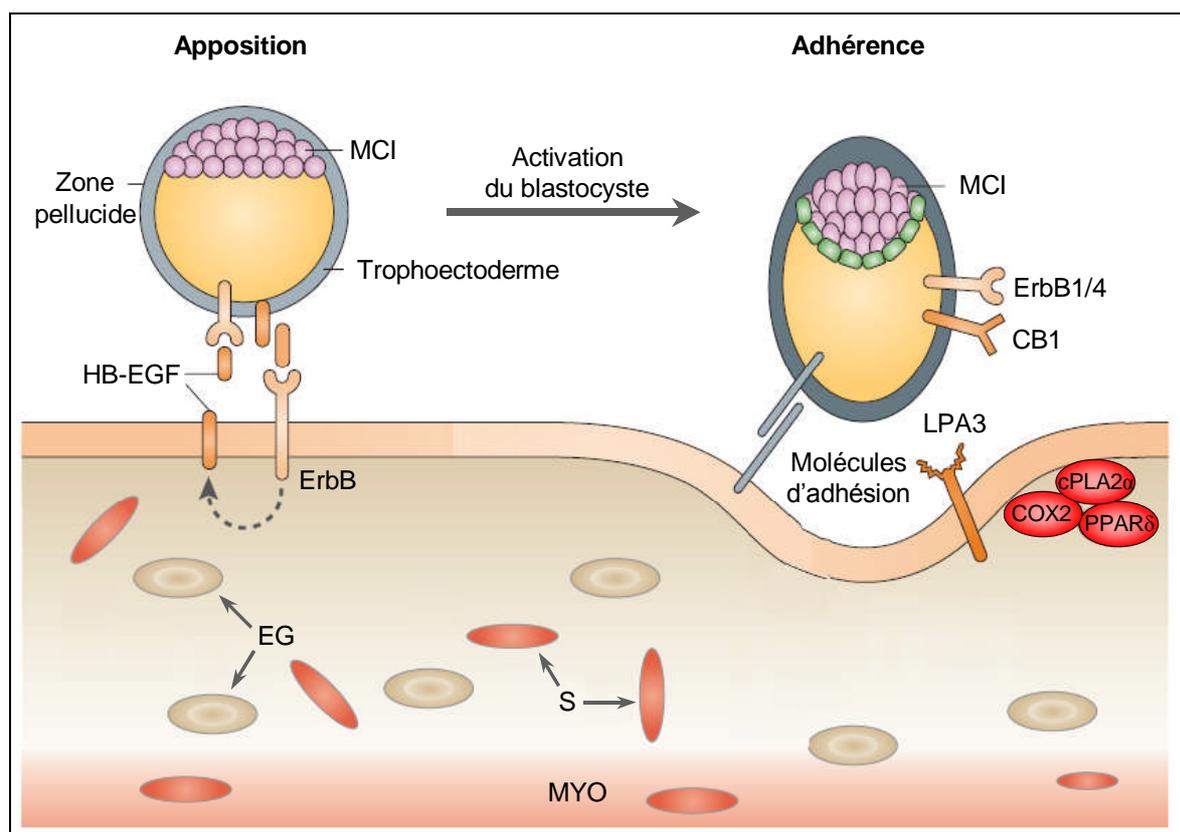
#### 1.3.2. Mécanismes moléculaires de l'implantation de l'embryon

L'implantation correspond à la fixation du blastocyste à la paroi de l'utérus au cours du 4<sup>ème</sup> jour de gestation. Physiologiquement, c'est le début des interactions entre la mère et le fœtus. Trois phases se succèdent au cours de l'implantation : l'apposition, l'adhérence (ou pénétration) et enfin l'invasion. L'implantation, d'une durée de 24 heures, donne naissance au stade "d'œuf cylindre". Une prolifération intense au site d'attachement va créer une chambre d'implantation (ou chambre utérine implantatoire) dans laquelle l'embryon va se développer.

L'implantation nécessite une profonde modification de l'épithélium utérin et est accompagnée par l'infiltration dans la décidua d'un grand nombre de cellules uNK (NK utérines) de MΦ, et d'un nombre plus restreint de LT. Cette infiltration de cellules immunitaires implique une réaction inflammatoire essentielle à l'expression de molécules d'adhésion dans le placenta et la décidua (Wood *et al.*, 1997). Les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ainsi que les MMPs (métalloprotéinases) sont secrétées par les cellules endométriales de la matrice utérine et les leucocytes déciduaux. Le pic de production utérine d'IL-1 (4<sup>ème</sup> jour de la gestation) correspond à l'implantation. L'importance de l'IL-11 dans ce processus a également été clairement démontrée (Robb *et al.*, 1998; Sharkey *et al.*, 1999).

Le rôle essentiel de certains gènes dans les mécanismes de l'implantation a été démontré par des techniques d'inactivation génique : l'homeobox Hoxa-10 (famille de gènes de facteurs de transcription), ceux de la famille des EGF (Epidermal Growth Factor), celui codant la protéine LIF (Leucocyte Implantation Factor), COX-2 (cyclooxygénase-2) (Aplin, 2000; Benson *et al.*, 1996; Dinchuk *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1992) ou encore le ligand héparinique HB-EGF (Heparin-Binding EGF like Growth Factor) (Das *et al.*, 1994). Cependant, le mode d'action des protéines codées par ces gènes n'a pas encore clairement été établi.

Certains mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du blastocyste permettant le passage de la phase d'apposition à celle d'adhérence sont en revanche bien décrits (**Figure 13**). Par exemple, la protéine LIF, produite sous le contrôle de la progestérone (P4) et de l'œstrogène (E2), est essentielle à la préparation de l'utérus étant requise dans l'activation du blastocyste (Kimber, 2005; Stewart *et al.*, 1992). De même, l'expression utérine de la protéine HB-EGF, reconnue par l'HSPG (Heparin Sulfate ProteoGlycan) et les récepteurs de la famille des facteurs de croissance EGF (ErbBs dont ErbB1/4) présents à la surface du blastocyste, sont nécessaires à l'attachement du blastocyste à l'endomètre utérin et à l'expression de la COX-2 (Paria *et al.*, 2000). La production de COX-2 induit la synthèse utérine des prostaglandines, au niveau du site d'apposition initiant le processus d'implantation, *via* la voie de signalisation impliquant cPLA<sub>2 $\alpha$</sub>  (Cytosolic PhosphoLipase A<sub>2 $\alpha$</sub> ), (Fazleabas *et al.*, 2004; Paria *et al.*, 2000). Les prostaglandines peuvent également activer certains gènes tels que ceux codant pour des facteurs de croissance ou bien ceux codant des molécules d'adhésion nécessaires à l'implantation (comme LPA3 ou LysoPhosphatidic-Acid receptor-3), par l'interaction avec les récepteurs hormonaux nucléaires PPARs/RXR (Peroxisome Proliferation-Activated Receptors/Retinoïde X Receptor), (Lim *et al.*, 1999).



**Figure 13.** Acteurs participant à l'implantation embryonnaire et voies de signalisation impliquées dans l'apposition et l'adhérence du blastocyste. Adaptée de Wang & Dey, 2006. S : Vaisseaux sanguins, EG : Epithélium Granulaire, MYO : Myomètre, MCI : Masse Cellulaire Interne.

### 1.3.3. Réponse maternelle à l'implantation (décidualisation)

L'essentiel de la décidualisation aboutissant à la formation de la d ciduala entourant le f etus est constitué par la prolifération et la différenciation des cellules stromales utérines ainsi que la migration, la différenciation et l'activation d'un certain nombre de cellules d'origine lymphocytaire (Tarachand, 1986). Une fois formée, la d ciduala joue un rôle dans le transfert des nutriments et limite l'invasion par les trophoblastes.

La décidualisation implique également par une apoptose de l'épithélium utérin (Joswig *et al.*, 2003), un recrutement de certaines populations de cellules immunitaires et une néo-vascularisation de la d ciduala (Carson *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 1994). Chez la souris, ce processus débute au pôle anti-mésométrial de la chambre utérine implantatoire, correspondant à l'endroit où le blastocyste s'implante. Une couche dense et non vascularisée de cellules (zone d ciduala primaire) se forme, suivie d'une couche adjacente épaisse et vascularisée (zone d ciduala secondaire) qui se met en place au 6<sup> me</sup> jour de gestation.

Deux jours après la formation de la zone d ciduala primaire anti-mésométriale, la d ciduala mésométriale se forme du côté opposé. L'embryon croît rapidement dans la partie

anti-mésométriale, où les cellules de la décidua disparaissent par apoptose. Les cellules trophoblastiques géantes primaires envahissent les capillaires maternels dans cette même zone. Une partie de la décidua mésométriale (*decidua basalis*) va contribuer à la formation du placenta.

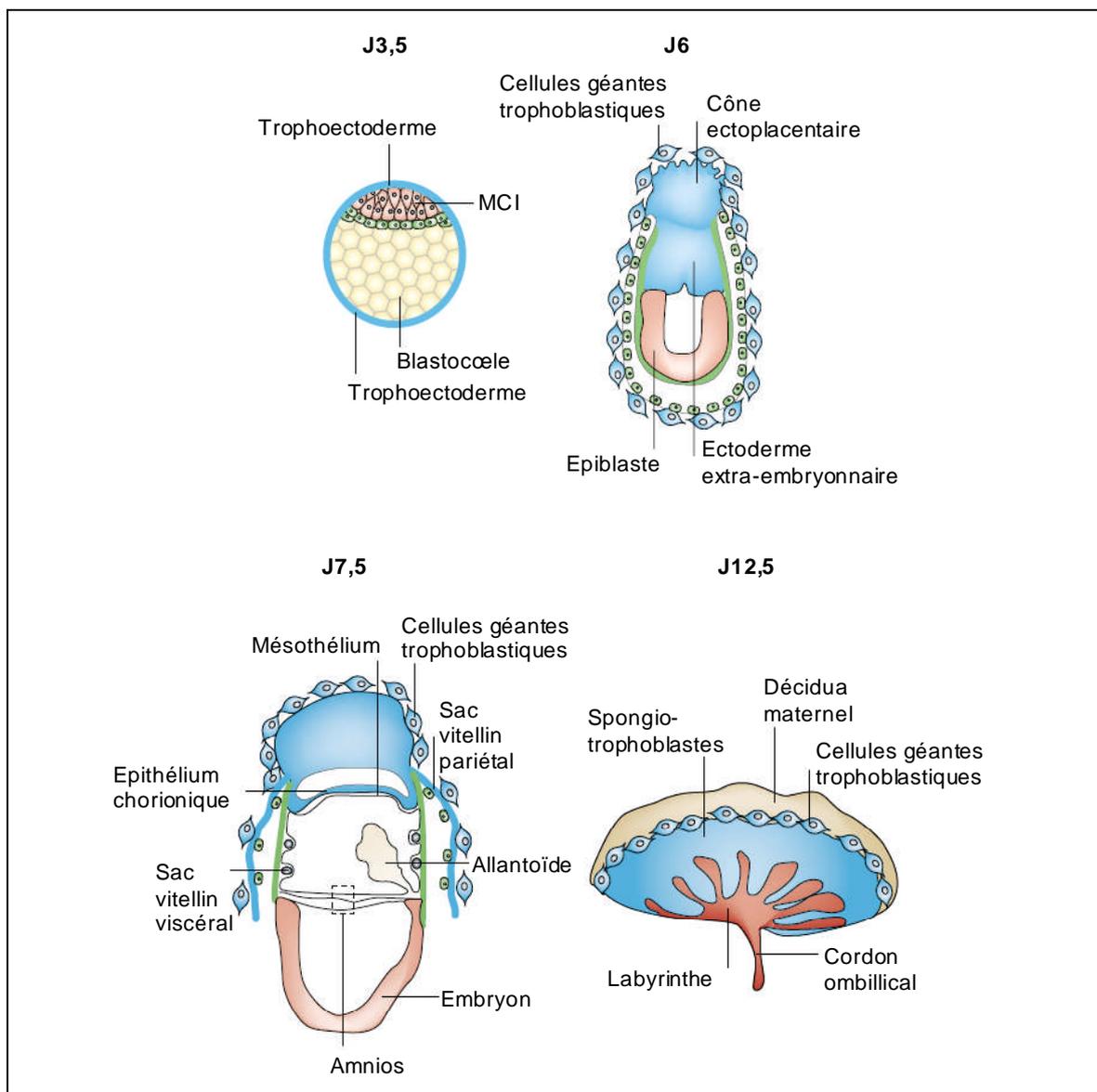
#### **1.4. Formation et rôle du placenta (placentation)**

Chez les rongeurs et les primates dont l'Homme, la destruction de l'endomètre utérin et des vaisseaux maternels par les trophoblastes entraîne la formation du placenta hémochorial où les trophoblastes établissent un contact direct avec le sang maternel.

##### ***1.4.1. Différenciation et migration des cellules trophoblastiques***

La couche trophoblastique appelée trophoectoderme du blastocyste constitue le premier type cellulaire à se différencier dans l'embryon (Rossant & Cross, 2001) (**Figure 14**). L'analyse des différentes lignées cellulaires embryonnaires au jour 3,5 du développement a permis de distinguer deux lignées cellulaires : l'épithélium trophoectodermique externe et spécialisé qui "pompe" le fluide interne du blastocyste pour former la cavité blastocœlique, et la MCI (Masse Cellulaire Interne) qui se situe à un côté de cette cavité. C'est autour de la période d'implantation, au jour 4,5 du développement embryonnaire, qu'a lieu la formation de différents types de cellules trophoblastiques. En effet, le trophoectoderme recouvrant la MCI continue à proliférer et induit la formation de l'ectoderme extra-embryonnaire et du cône ectoplacentaire de l'embryon implanté (Copp, 1979). Les cellules du trophoectoderme les plus éloignées de la MCI stoppent leur division mais continuent à répliquer leur ADN et forment alors les cellules géantes trophoblastiques. Au niveau de l'embryon, des cellules encore plus grandes se forment à partir des régions externes du cône ectoplacentaire et entourent le conceptus entier. L'ectoderme extra-embryonnaire s'étend pour former l'épithélium chorionique, qui est entouré d'une fine couche de cellules mésothéliales. L'allantoïde qui résulte du mésoderme situé dans la partie postérieure de l'embryon entre en contact avec le chorion aux alentours du jour 8,5 du développement. Cet événement se nomme la fusion chorioallantoïde, bien qu'aucune fusion réelle n'ait lieu. Quelques heures après la fusion chorioallantoïde, des plis apparaissent dans le chorion qui marquent l'emplacement où les vaisseaux sanguins fœto-placentaires se développent dans l'allantoïde afin de produire des composants fœtaux du réseau vasculaire placentaire. Les trophoblastes, avec leurs vaisseaux fœtaux sanguins associés, réalisent des embranchements villositaires importants créant une structure en masse emballée appelée le labyrinthe. Coïncidant avec le

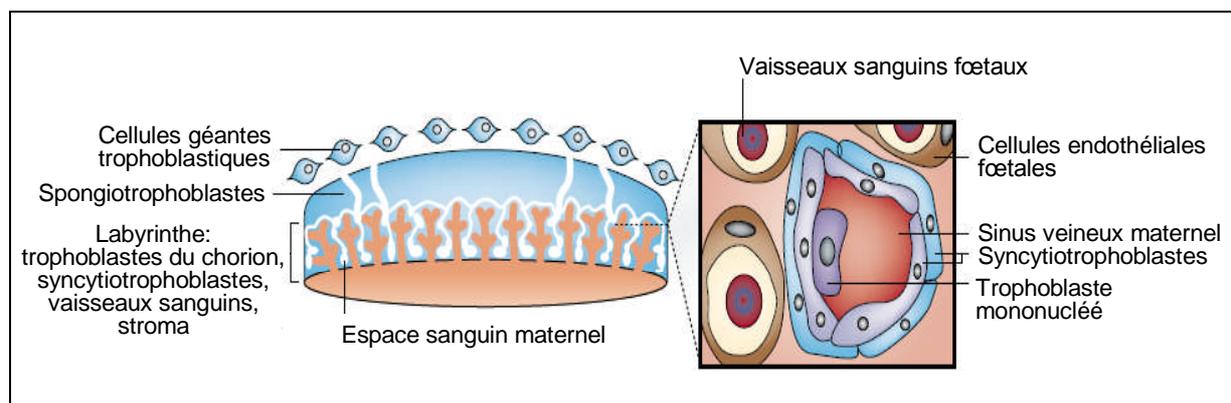
début du changement morphologique qui correspond au processus d'embranchement, les trophoblastes chorioniques commencent à se différencier en diverses couches cellulaires trophoblastiques du labyrinthe. Chez la souris, il existe deux couches de syncytiotrophoblastes qui sont en contact direct avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins fœtaux.



**Figure 14.** Développement placentaire chez la souris. Le développement précoce de l'embryon de souris de J3,5 à J12,5 montre les origines des lignées extra-embryonnaires et les composants du placenta. Adaptée de Rossant & Cross, 2001. MCI : Masse Cellulaire Interne.

Tandis que le labyrinthe se développe, il est soutenu par une couche compacte de cellules non-syncytiales situées entre le labyrinthe et les cellules géantes externes appelées spongio-trophoblastes. En l'absence d'analyse directe de lignée cellulaire, des études histologiques et de continuité d'expression de marqueur génique ont supposé que le

spongiotrophoblaste dérive en grande partie des cellules du cône ectoplacentaire. Le flux sanguin maternel traverse le spongiotrophoblaste par l'intermédiaire des grands sinus artériels centraux dans lesquels les cellules endothéliales maternelles sont remplacées par les cellules trophoblastiques. Le sang maternel pénètre par la suite dans les nombreux petits espaces du labyrinthe permettant ainsi aux trophoblastes vilieux d'y "baigner" directement facilitant les échanges entre les deux systèmes sanguins (**Figure 15**).



**Figure 15.** Structure du placenta de souris (hémotrichorial). L'encart détaille l'interface materno-fœtale du labyrinthe. Adaptée de Rossant & Cross, 2001

#### 1.4.2. Contrôle de la placentation – Rôles des cellules uNK

La phase initiale de l'implantation est accompagnée d'une infiltration d'une population particulière de cellules NK dans la décidua, les cellules uNK mais aussi d'un grand nombre de MΦ et d'un nombre plus restreint de LT (Wood *et al.*, 1997). Les uNK, représentent 70 % des leucocytes infiltrés de la décidua et possèdent un phénotype particulier différent des cellules NK sanguines, caractérisé chez l'homme par une expression accrue du marqueur CD56 (appelé CD56<sup>bright</sup>) et par l'absence du marqueur CD16 (CD16<sup>-</sup>).

Chez la souris, les cellules uNK immatures apparaissent petites, agranulaires et sont caractérisées par les marqueurs LY49G2 (Lectin-related NK cell receptor), LGL-1 (Late Gestation Lung-1) (Mason *et al.*, 1995) et DBA-lectin (*Dolichos biflores*-lectin) (Paffaro *et al.*, 2003). Lors de la phase précoce de la décidualisation, elles prolifèrent rapidement dans la zone déciduale (face mésométriale) transitoire d'épaississement du mur utérin qui entoure les ramifications des vaisseaux sanguins maternels entrants de l'utérus. Cette structure, présente entre les jours 8 et 14 de la gestation est la MLAp (Mesometrial Lymphoid Agregate of pregnancy) ou triangle mésométrial. Lors de leur maturation, les cellules uNK acquièrent de nombreux granules sécrétoires particulièrement riches en perforines, sérines estérases, mucine Muc-1 (Croy *et al.*, 1997) et autres enzymes telles que des phosphatases, aryl sulfatases, amino-peptidases et β-glucuronidases (Parr *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1991), qui leur

confèrent une grande taille (de 40  $\mu\text{m}$  à plus de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre). Par ailleurs, les marqueurs phénotypiques varient lors de leur maturation avec la perte de Ly49G2, des  $\alpha$ -intégrines 1, 3 et 6 et le gain de l'asialo-GM1 (Kiso *et al.*, 1994; Parr *et al.*, 1990). Les cellules uNK matures se retrouvent dans les segments décidualisés de la *decidua basalis* où elles vont rapidement entrer en sénescence pour disparaître progressivement par apoptose à partir du milieu de la gestation jusqu'à disparaître complètement au terme de la gestation. Leur présence coïncide donc avec la période d'invasion trophoblastique.

Des fonctions endocrines, incluant la synthèse de relaxine et de lactogène placentaire, seraient attribuées à ces cellules mais n'ont pas été démontrées à l'heure actuelle. En revanche, la sécrétion par les cellules uNK de nombreuses cytokines dont le CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1), le GM-CSF, l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$  et le LIF, de facteurs angiogéniques tels que le PGF (Placental Growth Factor), le VEGF-C (Vascular Endothelium Growth Factor-C) et l'Ang-2 (angiopoïétine-2) ainsi que la calcycline, un stimulant de l'expression de mPL2 (Placental Lactogen 2), est démontrée (Ashkar & Croy, 1999; Trundley & Moffett, 2004).

Les cellules uNK représentent les cellules effectrices du déclenchement de la modification des artères spiralées. En effet, chez des souris déficientes en cellules NK et uNK telles que les souris Tge26, les souris déficientes pour les chaînes  $\gamma$  des récepteurs de cytokines ( $\gamma\text{c}$ )<sup>-/-</sup> seules ou en combinaison avec la déficience recombinaison-activating gene 2 Rag2<sup>-/-</sup> appelées ( $\gamma\text{c}$ )<sup>-/-</sup>(Rag2)<sup>-/-</sup> ou encore les souris déficiente en IL-15 (IL-15<sup>-/-</sup>), les artères alimentant le placenta, connues sous le nom d'artères spiralées, conservent les mêmes propriétés que celles de souris non gestantes. De plus, le transfert de moelle osseuse issues de souris SCID reconstituant uniquement la lignée de cellules uNK, chez des souris gestantes déficientes en cellules NK et uNK, permet de restaurer les propriétés des artères spiralées (Guimond *et al.*, 1998).

### **1.4.3. Rôles du placenta**

Le placenta possède de nombreuses fonctions d'échange entre les environnements maternel et fœtal. Il assure la nutrition et la respiration du fœtus nécessaires à son développement (nutriments, ions, oxygène), ainsi que l'élimination des déchets de son métabolisme (urée, dioxyde de carbone).

Le placenta joue également un rôle protecteur de l'allogreffe fœtale et remplit un rôle endocrinien fondamental. Des lactogènes placentaires sont des hormones lutéotrophiques qui régulent et maintiennent la production de la progestérone au cours de la gestation (Galosy &

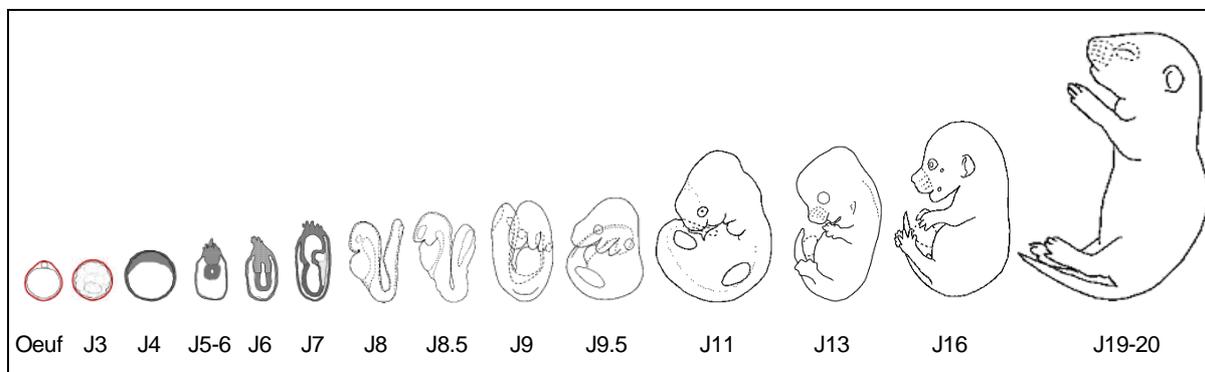
Talamantes, 1995). La production des lactogènes placentaires prend le relais de la production de la prolactine hypophysaire et l'hypophysectomie après le 11<sup>ème</sup> jour de gestation ne provoque pas la fin de la gestation chez la souris (Strauss *et al.*, 1996). L'hormone mPL1 (Placental Lactogen-1), détectée dans la circulation maternelle, est produite par les cellules géantes trophoblastiques. Sa concentration (de 50 ng/mL à 10 µg/mL) présente un pic au 10<sup>ème</sup> jour de gestation et diminue après le 11<sup>ème</sup> jour (Galosy & Talamantes, 1995; Ogren *et al.*, 1989). La concentration de mPL2 croît rapidement jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour (comparable à celle du mPL1) (Ogren *et al.*, 1989) mais reste élevé jusqu'à la fin de la gestation.

Enfin, les trophoblastes sont capables de produire une variété de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1) qui jouent un rôle très important dans la physiologie et la réponse immunologique de la mère (Petraglia *et al.*, 1998). De plus, ils expriment un certain nombre de récepteurs pour la matrice extracellulaire et possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader celle-ci. En effet, les trophoblastes produisent les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, qui dégradent le collagène IV afin de pénétrer la membrane basale (Isaka *et al.*, 2003) favorisant ainsi l'invasion du myomètre (Alexander *et al.*, 1996; Cross *et al.*, 1994).

### **1.5. Développement embryonnaire**

Au 5-6<sup>ème</sup> jour, le trophoectoderme prolifère rapidement, donnant naissance au cône ectoplacentaire et à l'ectoderme extra-embryonnaire. Les cellules de l'ectoderme embryonnaire et l'endoderme primitif prolifèrent également formant le sac vitellin. Au 6<sup>ème</sup> jour, se forme la membrane de Reichert (matériel acellulaire sécrété par les cellules pariétales) qui forme une barrière continue entre la cavité embryonnaire du sac vitellin et le sang maternel dans le sinus subjacent. Les cellules trophoblastiques s'étant transformées en cellules géantes, elles continuent d'envahir le tissu maternel. Une cavité (la cavité amniotique) se creuse dans la masse embryonnaire puis dans la masse extra-embryonnaire. Le 7<sup>ème</sup> jour, correspond à la formation de l'annios, du mésoderme et du sac vitellin. Au 8-8,5<sup>ème</sup> jour, une protubérance du mésoderme, l'allantoïde, croît en direction du cône ectoplacentaire. Les premiers somites apparaissent au 8<sup>ème</sup> jour. Il s'agit de segments mésodermiques du corps de l'embryon qui contribuent à la formation des muscles squelettiques, des vertèbres, du derme et de la peau. Au 8,5<sup>ème</sup> jour, l'embryon commence à se replier sur lui-même longitudinalement et latéralement jusqu'au stade 14-15 somites. A ce moment l'apparition des ébauches du foie et de la thyroïde sont observées. Au 9<sup>ème</sup> jour, à mesure que la gouttière neurale se creuse, la partie supérieure des replis se rapproche et fusionne pour constituer le tube neural. La fermeture du tube neural au niveau du cerveau de la souris n'est complète

qu'au stade 15-19 somites. Pendant ce temps, les ébauches des membres inférieurs et supérieurs apparaissent et le cœur commence à battre. Jusqu'à la naissance, qui a lieu aux alentours du 20<sup>ème</sup> jour, les différents systèmes continuent à se développer : rudiment du poumon au 9<sup>ème</sup> jour, crêtes génitales au 11<sup>ème</sup> jour, thymus, ... (**Figure 16**).



**Figure 16.** Développement embryonnaire chez la souris. J : jour de gestation.

### 1.6. Mise bas

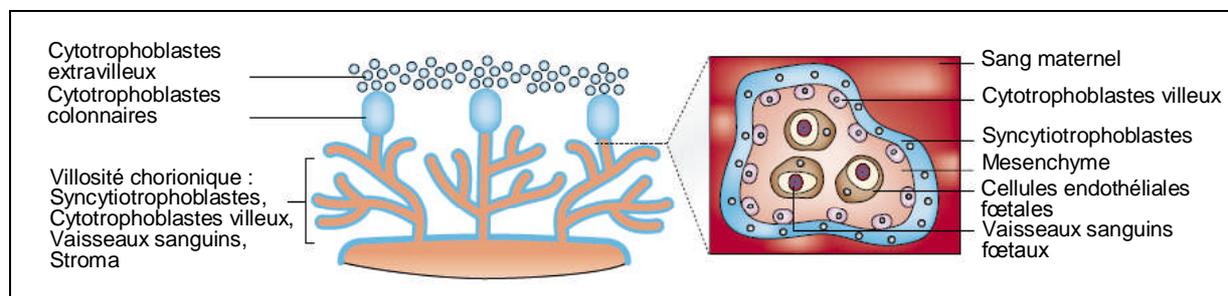
Chez la souris, la mise bas ou parturition désigne l'ensemble des événements mécaniques et physiologiques qui ont pour conséquence l'expulsion du (ou des) fœtus et des annexes embryonnaires hors des voies génitales femelles au terme de la gestation. Avant le début de la mise bas, le fœtus est enveloppé dans ses membranes au sein de l'utérus et retenu par l'occlusion du col utérin. L'expulsion du fœtus requiert deux modifications physiologiques : i) des contractions coordonnées du myomètre, et ii) un ramollissement du col utérin afin de réduire la résistance à la sortie du nouveau-né. Des hormones, les prostaglandines et l'ocytocine, sont directement impliquées dans la régulation de la contractibilité du myomètre. Plusieurs cytokines régulent la préparation, l'initiation et la progression de la mise bas chez les mammifères. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  agissent sur les enzymes principales, dont la cyclooxygénase, impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines. Ces cytokines peuvent également affecter l'activité des prostaglandines en régulant l'expression de leurs récepteurs intra-utérins (Hansen *et al.*, 1999; Keelan *et al.*, 2003). Les récepteurs lymphocytaires à la progestérone et les taux circulants de PIBF (Progestérone Induced Blocking Factor), un facteur progestérone-dépendant, qui inhibent la production de TNF- $\alpha$ , chutent brutalement au début de la mise bas suite à la diminution de la progestérone (Chaouat, 1994; Yellon *et al.*, 2003). Parallèlement, les taux d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  circulants augmentent. Il a été montré que l'injection de TNF- $\alpha$  près du terme, peut induire un travail précoce, avec mise bas de nouveaux-nés vivants (Chaouat, 1994; Yellon *et al.*, 2003), alors qu'en milieu de gestation elle provoque des

avortements. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 chez la souris et de nombreuses autres espèces (Chwalisz *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 1991).

## 2. MECANISMES IMMUNOLOGIQUES PERMETTANT LA TOLERANCE DU MASSIF FŒTO-PLACENTAIRE

Le fœtus est porteur de caractères d'hérédité paternel étrangers à l'organisme maternel. L'expression des allo-antigènes du CMH paternel au cours du développement fœtal devrait donc entraîner un rejet du fœtus. Cependant, une tolérance se développe entre les cellules maternelles et fœtales (Raghupathy, 1997; Wegmann *et al.*, 1993) permettant le développement du fœtus (pour revue voir Thellin & Heinen, 2003; Thellin *et al.*, 2000).

Ces mécanismes moléculaires souvent étudiés dans des modèles murins, sont très probablement applicables à l'espèce humaine. Durant la gestation humaine le fœtus, baignant dans le liquide amniotique, n'est pas en contact direct avec les tissus maternels. Seuls les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes extravilleux sont en contact direct et continu avec des cellules d'origine maternelle (**Figure 17**).



**Figure 17.** Structure du placenta humain (haemo-monochorial). L'encart détaille l'interface materno-fœtale d'une villosité chorionique. Adapté de Rossant & Cross, 2001.

Les différents types cellulaires trophoblastiques, dépourvus de molécules HLA (Human Leucocytes Antigens) de classe II, sont caractérisés par une distribution unique des molécules HLA de classe I.

Les cytotrophoblastes extravilleux, invasifs et prolifératifs, contrairement à la plupart des cellules somatiques de l'organisme, n'expriment pas les molécules classiques très polymorphes HLA-A et HLA-B (Le Bouteiller & Pröll, 2001). À l'inverse, ils expriment les molécules relativement peu polymorphes HLA-C, ainsi que les molécules HLA de classe I non classiques, non polymorphes, HLA-G (également sous forme soluble sHLA-G), HLA-E

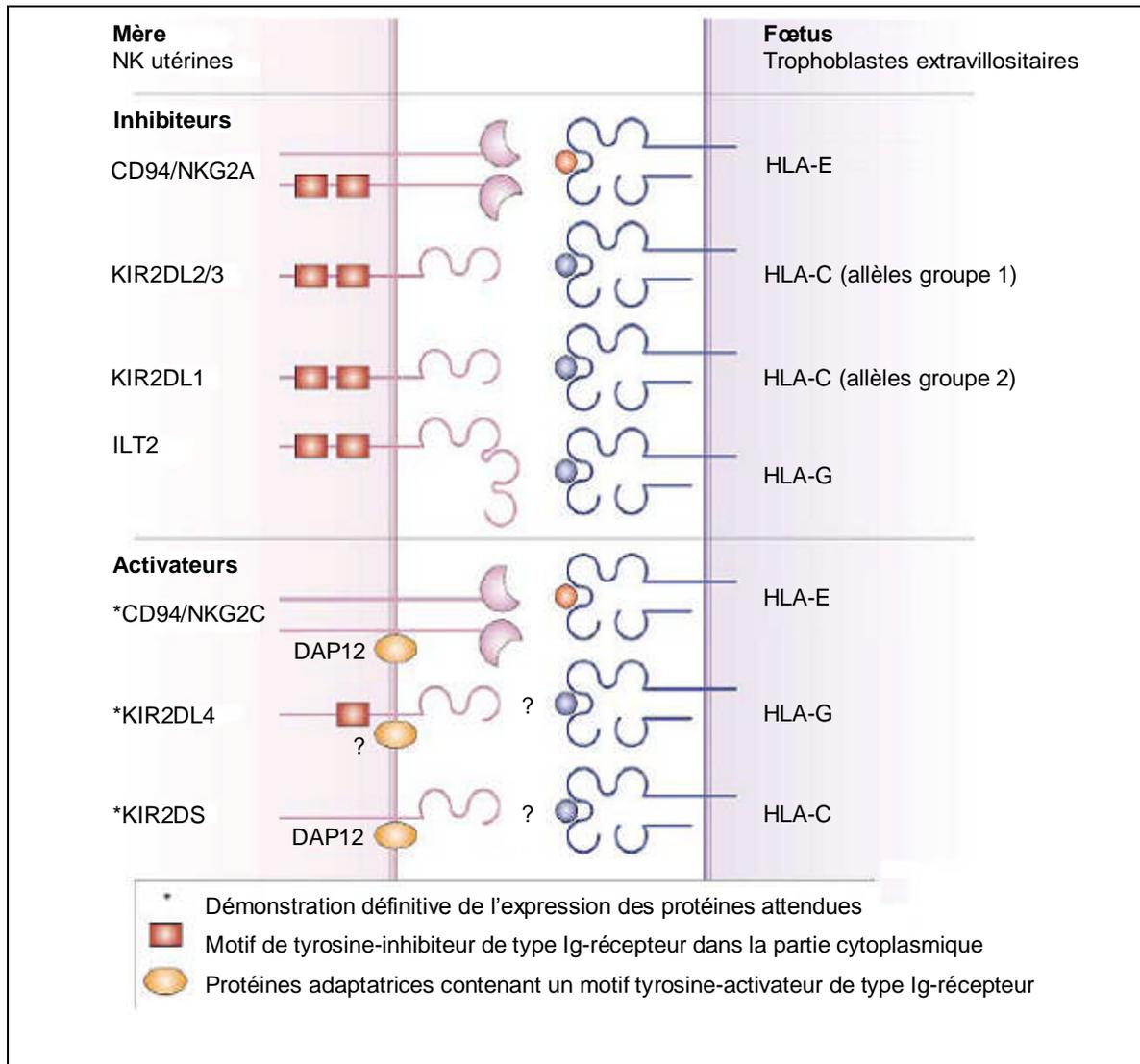
et HLA-F. Quant aux syncytiotrophoblastes, ils sont dépourvus de toute expression membranaire de molécules HLA de classe I bien que plusieurs groupes aient cependant montré la production sHLA-G dans le surnageant de culture primaire (Morales *et al.*, 2003), même si cela est controversé (Blaschitz *et al.*, 2005a; Blaschitz *et al.*, 2005b).

Lors de la grossesse, les différents types de cellules trophoblastiques, sont donc théoriquement les cibles potentielles des effecteurs humoraux et cellulaires de la réponse immunitaire de la mère. Le fœtus doit ainsi faire face à trois types de menaces potentielles provenant de la mère, et spécifiquement dirigées contre des antigènes paternels : les anticorps cytotoxiques fixant le complément, les LTCD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les cellules NK et uNK. En fait, le fœtus, en l'absence de toute pathologie ou infection, parvient à déjouer ces différentes menaces par la mise en place de mécanismes moléculaires protecteurs, spécifiques et transitoires.

## **2.1. Reconnaissance des antigènes d'histocompatibilité trophoblastiques par les cellules uNK**

Les fonctions effectrices des cellules NK sont déclenchées par l'interaction des récepteurs membranaires activateurs avec leurs ligands spécifiques exprimés à la surface des cellules-cibles. Ces fonctions sont contrôlées par des récepteurs inhibiteurs qui préviennent ainsi toute réaction anormale dirigée contre des molécules du soi.

Les cellules uNK expriment une grande variété de récepteurs, dont certains ligands sont connus et exprimés sur les cellules trophoblastiques (HLA-E, HLA-G, HLA-C) avec lesquelles ils entrent en contact (Loke & King, 2000; Rouas-Freiss *et al.*, 1997). C'est le cas des récepteurs CD94/NKG2A (inhibiteur) et CD94/NKG2C (activateur), qui reconnaissent HLA-E (King *et al.*, 2000), des récepteurs ILT2 (Immunoglobulin-Like Transcript 2) et KIR2DL4 (ayant des propriétés activatrices et inhibitrices), reconnus par les formes solubles ou membranaires de HLA-G (Chang *et al.*, 2002), et les récepteurs KIRs (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor, formes activatrices ou inhibitrices) reconnaissant les molécules HLA-C (Arnaiz-Villena *et al.*, 2001). D'autres récepteurs activateurs (NKG2D, NKp30, NKp46) sont également exprimés à la surface des cellules uNK, mais leurs ligands spécifiques ne sont pas encore connus (**Figure 18**).



**Figure 18.** Différentes reconnaissances du système HLA entre la mère et les trophoblastes extravillositaires fœtaux. DAP12 est une protéine adaptatrice induisant le signal activateur. Adaptée de Moffett-King, 2002.

Par ailleurs, les cellules trophoblastiques sont résistantes à la lyse cellulaire par les cellules uNK mais également par des cellules NK du sang périphérique (Avril *et al.*, 1999). L'absence de lyse des cellules trophoblastiques par les cellules uNK pourrait s'expliquer par une forte production, au cours du premier trimestre de gestation, de la forme active de la molécule XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) (Straszewski-Chavez *et al.*, 2004) : ce puissant inhibiteur des caspases bloque la cascade apoptotique médiée par Fas des cellules trophoblastiques. Quant à l'absence de lyse des cellules trophoblastiques par les cellules NK du sang périphérique, elle pourrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes au niveau de l'interface syncytiotrophoblaste/espace intervilloux sanguin maternel.

## **2.2. Inhibition de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) dirigée contre les trophoblastes**

Trois mécanismes principaux permettent aux trophoblastes d'échapper à la lyse médiée par les anticorps maternels cytotoxiques dirigés contre des molécules HLA de classe I. i) Les cellules trophoblastiques n'expriment pas de molécule HLA de classe II. En l'absence d'expression, la stimulation des LB, ainsi que celle des LTCD4<sup>+</sup> (qui stimulent les LB *via* la sécrétion des IL-4, IL-5 et IL-10). ii) Par ailleurs, le placenta humain résiste à la lyse par les anticorps cytotoxiques maternels en inhibant l'activation du complément par des molécules régulatrices. C'est ainsi qu'ont été décrites MCPs (Membrane Cofactor Proteins), qui s'opposent à la fixation du complément sur les immunoglobulines, et le DAF (Decay Accelerating Factor), qui favorise son inactivation (Morgan & Holmes, 2000; Thellin *et al.*, 2000). Certains avortements précoces pourraient être dus à des défauts d'expression de telles protéines régulatrices du complément. Chez la souris, l'inactivation de la protéine CRRY (Complement Receptor Regulated Gene Y), qui régule les composants C3 et C4 de la cascade du complément, entraîne 100 % d'avortements, en raison d'un dépôt de C3 sur les cellules trophoblastiques invasives et de l'inflammation placentaire qui en résulte (Xu *et al.*, 2000). iii) Enfin, les LB sont partiellement délétés durant la gestation. Par ailleurs, chez la souris (et le rat) « productrices » d'anticorps maternels anti-paternels, la réponse est essentiellement formée d'anticorps de type IgG1 ne fixant pas le complément (Bell & Billington, 1983), ces souris sont dotées en conséquence de propriétés protectrices et « facilitantes » (Voisin, 1974).

## **2.3. Inhibition de l'activité des LTCD8<sup>+</sup>**

Les cellules trophoblastiques n'expriment pas les molécules les plus polymorphes HLA-A et HLA-B (Le Bouteiller, 2001) qui sont, comme les molécules HLA de classe II, connues pour initier la reconnaissance des allogreffes par l'hôte, et donc leur rejet. Bien que les molécules HLA-C soient exprimées faiblement à la surface des cellules des trophoblastes, les LTCD8<sup>+</sup> spécifiques de HLA-C sont rarement observées après transplantation. Toutefois, la situation n'est pas la même chez la souris et le rat, où les molécules H-2 K, D, et L, ou RT1a sont exprimées par les spongiotrophoblastes. C'est dans ce cadre (et vis-à-vis de HLA-C chez la femme) qu'intervient la sécrétion locale de molécules immuno-suppressives (sHLA-G, TGF- $\beta$ , PIBF, l'IDO et FasL), retrouvées à l'interface materno-fœtale permettant de contrôler l'activité des LT, mais également des cellules NK. L'administration d'anticorps anti-TGF- $\beta$  à des souris inhibe l'implantation embryonnaire (Slager *et al.*, 1993). Le PIBF,

qui induit la sécrétion de cytokines de type Th2 est une protéine anti-abortive dont l'absence semble être un facteur d'avortements spontanés précoces (Szekeres-Bartho *et al.*, 2001). Enfin, il se développe durant la gestation un état de tolérance transitoire et réversible des LT spécifiques des antigènes trophoblastiques, présents au niveau de la *decidua basalis*. Une étude effectuée chez la souris démontre que des LT spécifiques des antigènes fœtaux diminuent en nombre pendant la gestation, ce qui suggère qu'une délétion clonale spécifique pourrait être un des mécanismes de tolérance (Jiang & Vacchio, 1998).

### **2.3.1. sHLA-G**

Les molécules sHLA-G, sécrétées à la fois par les cytotrophoblastes extravilloux et les syncytiotrophoblastes, induisent l'apoptose des cellules LTCD8<sup>+</sup> activées en se fixant spécifiquement sur la molécule CD8, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de LTCD8<sup>+</sup> au niveau de la *decidua basalis* (Bouteiller, 2002).

### **2.3.2. IDO**

L'expression par certains MΦ de l'IDO, qui catabolise le tryptophane en réponse à l'IFN- $\gamma$ , induit une déplétion rapide du tryptophane et l'inhibition de l'activation et de la prolifération des LT. Ce mécanisme a été étudié sur des souris gestantes exposées au 1-méthyl-tryptophane, un inhibiteur pharmacologique de l'enzyme IDO, qui présentent de nombreux avortements (Baban *et al.*, 2004). Cette enzyme est également exprimée et sécrétée par les syncytiotrophoblastes en contact avec le sang maternel de l'espace intervilloux.

### **2.3.3. Interactions Fas/FasL**

L'apoptose, mécanisme-clé dans la régulation de la réponse immune, joue un rôle dans le développement placentaire (Chan *et al.*, 1999). Le FasL (ou CD95L) est une protéine trimérique transmembranaire de type II, appartenant à la famille des récepteurs du TNF- $\alpha$ , qui induit l'apoptose des cellules exprimant Fas (ou CD95) (Ashkenazi & Dixit, 1998). En effet, Fas, molécule monomérique qui se trimérise quand elle se lie à son ligand, induit l'activation de voies de signalisation à travers son récepteur de mort "death domain" entraînant l'apoptose de la cellule (Nagata & Golstein, 1995). Chez des souris déficientes en FasL, normalement exprimé par les trophoblastes, la gestation est associée à une nécrose au niveau de l'interface materno-fœtale, qui entraîne une résorption fœtale (Hunt *et al.*, 1997). Ces résultats sont néanmoins controversés par d'autres études menées sur des souris déficientes pour Fas/FasL qui présente une gestation normale. Un lien avec les molécules sHLA-G a été établi, en effet

cette molécule induit la production de FasL soluble par les LTCD8<sup>+</sup> activés, induisant leur apoptose par fixation sur les molécules Fas membranaires (Contini *et al.*, 2003).

## **2.4. Orientation Th2 et limitation de la production d'IFN- $\gamma$ et de TNF- $\alpha$**

Chez la souris, le succès de la gestation semble être associé à un profil de sécrétion cytokinique placentaire et systémique de type Th2 (Wegmann *et al.*, 1993). En effet, les réponses de type Th1 et particulièrement l'activité de cellules NK sont inhibées au cours de la gestation, alors que les réponses humorales sont amplifiées, suggérant une prédominance de sécrétion de cytokines de type Th2 (Chaouat *et al.*, 2004). Une étude a montré la sécrétion placentaire et surtout systémique d'IL-4 et d'IL-10 (cytokines de type Th2) au cours de la gestation chez la souris (Lin *et al.*, 1993). D'autres études ont observé que les résorptions fœtales semblaient liées à un profil cytokinique de type Th1, avec sécrétion d'IFN- $\gamma$  ou de TNF- $\alpha$  (Christiansen *et al.*, 2006; Hill, 1992) et que l'injection d'IL-10, cytokine de type Th2, permettait de diminuer la proportion d'avortements dans des modèles murins à fort taux de résorption fœtale (Chaouat *et al.*, 1995a). Néanmoins, là encore, il faut souligner que l'invalidation des cytokines Th2 majeures, dont l'IL-10, chez la souris n'affecte pas la grossesse (Fallon *et al.*, 2002).

### **2.4.1. Rôle de la progestérone et de la PGE<sub>2</sub>**

Les hormones jouent un rôle important dans l'immunorégulation au cours de la gestation. La progestérone P4, hormone indispensable à toute gestation chez les mammifères, favorise la production des cytokines de type Th2 (Krzysiek & Turowski, 1996). Parallèlement à son activité anti-inflammatoire, la P4 est aussi capable d'inhiber la fonction phagocytaire des M $\Phi$  utérins. A forte concentration, elle peut également bloquer l'activation et la prolifération des LTCD4<sup>+</sup> induites par l'IL-1 (Chaouat *et al.*, 1995b) et, à plus faible concentration, provoquer la libération par les lymphocytes de deux facteurs immunosuppresseurs, la protéine TJ6 (Beaman *et al.*, 1996) et le PIBF (Szekeres-Bartho *et al.*, 1989). Ce dernier semble agir en bloquant la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules cytotoxiques (LT, NK). De plus, la P4 exerce une action immunosuppressive synergique avec la prostaglandine E (PGE<sub>2</sub>) (Chaouat, 1995c), qui présente une activité immunosuppressive propre en inhibant, d'une part, la prolifération des LTCD4<sup>+</sup> et leur sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), et, d'autre part, en réduisant, comme le TGF- $\beta$ , l'expression des récepteurs de l'IL-2 sur les LT activés (Vinatier *et al.*, 1993). Par ailleurs, la

PGE<sub>2</sub> inhibe la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigènes, diminue la production d'IL-6 et stimule fortement celle de l'IL-10 (Van der Pouw Kraan *et al.*, 1995).

#### **2.4.2. Rôle de l'IL-10**

L'IL-10 est produite par les cellules épithéliales, les leucocytes de l'endomètre et par les cellules trophoblastiques (Lin *et al.*, 1993). La production placentaire de cette cytokine augmente à partir du 4<sup>ème</sup> jour jusqu'à la moitié de la gestation puis diminue jusqu'au terme (Chaouat *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1993). Cette production inhibe l'activation des lymphocytes ainsi que la production des cytokines de type Th1 potentiellement toxiques pour le fœtus. Chaouat *et al.* ont montré que l'IL-10 contribue à la protection du fœtus dans un modèle de résorption murine (accouplement de souris CBA/J avec des souris DBA/2) dans lequel l'injection d'IL-10 recombinante diminue le taux de résorptions fœtales (Chaouat *et al.*, 1995a). L'IL-10 induisant l'expression d'HLA-G par les trophoblastes inhiberait les fonctions lytiques des cellules uNK (Moreau *et al.*, 1999).

#### **2.4.3. Rôle du TNF- $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$  agit *via* deux récepteurs, le TNF-RI et le TNF-RII. Après leur liaison aux récepteurs, les membres de la superfamille du TNF- $\alpha$  jouent un rôle dans l'apoptose, la différenciation ou la prolifération cellulaire (Aggarwal, 2003).

Le TNF- $\alpha$  a une fonction importante dans la régulation du développement embryonnaire. Celle-ci a été découverte lors du clonage des gènes impliqués dans le syndrome de la dysplasie ectodermale. Cette maladie génétique, observée chez l'homme et la souris, est caractérisée par la perte de cheveux et de dents, due à une mutation de la protéine EDA (Ectodermal DysplAsin) membre de la famille de TNF- $\alpha$ . En effet, l'interaction de EDA avec son récepteur dans l'ectoderme régule l'initiation de la formation des cheveux et des dents (Thesleff & Mikkola, 2002). Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  a aussi été impliqué dans d'autres pathologies embryonnaires en activant l'apoptose (Toder *et al.*, 2003). D'importantes anomalies structurales sont souvent précédées par une apoptose excessive dans les structures de l'embryon (Mirkes *et al.*, 2001). Une des fonctions possibles du TNF- $\alpha$  serait d'empêcher la naissance de nouveaux-nés présentant des anomalies structurales (Clark *et al.*, 2002; Pampfer, 2001). Le TNF- $\alpha$  semblerait augmenter les signaux de mort pour éliminer l'embryon présentant des dommages trop importants.

Cependant, une expression inappropriée peut s'avérer délétère (Aggarwal, 2003). Bien que le TNF- $\alpha$  soit impliqué dans la croissance du blastocyste et dans son implantation

(Argiles *et al.*, 1997), ainsi que dans la croissance et les fonctions du placenta (Monzon-Bordonaba *et al.*, 2002), un excès de production peut être néfaste à la survie de l'embryon (Savion *et al.*, 2002). En début de gestation, cet excès induit un échec d'implantation, et plus tardivement, un retard de croissance fœtale, une rupture des membranes ou une naissance prématurée (Menon *et al.*, 2002). Il a été observé chez la souris que l'augmentation de production de TNF- $\alpha$  induite par l'injection de LPS induit des thromboses et la contraction du muscle lisse utérin (Gendron *et al.*, 1990). D'autres études ont montré que le TNF- $\alpha$  augmente les taux d'avortements spontanés chez la souris (Clark *et al.*, 1999).

#### **2.4.4. Rôle de l'IFN- $\gamma$**

Comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  est produit dans le placenta (Bowen *et al.*, 2002). A dose physiologique, il est nécessaire pour obtenir une vascularisation locale optimale de l'interface materno-fœtale (Ashkar & Croy, 1999) mais à trop forte concentration, il devient néfaste pour la gestation. En effet, l'administration exogène d'IFN- $\gamma$  induit des résorptions au cours de la gestation et provoque une diminution du poids des fœtus (retard de croissance). Par ailleurs, l'IFN- $\gamma$  induit l'expression des molécules CMH I et II au niveau des LT de l'utérus et de la décidua amplifiant les fonctions effectrices de celles-ci vis à vis des antigènes fœtaux. L'IFN- $\gamma$  est également produit par les cellules uNK activées (Ain *et al.*, 2003) et la déplétion de ces cellules diminue le taux de résorptions de 50% obtenus dans le modèle d'avortement CBA/J x DBA/2 (Clark *et al.*, 1998).

### **2.5. Rôle des autres cytokines**

Les cytokines telles que l'IL-1, l'IL-3, le TGF- $\beta$ , LIF, CSF-1, le GM-CSF (et l'IFN-tau qui n'existe que chez les ruminants) jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien de la gestation (Martal *et al.*, 1997). Le TGF- $\beta$ 2, produit par de nombreuses cellules dont les LT $\gamma\delta$  des souris gestantes (Ando *et al.*, 1998), exerce des propriétés immunosuppressives dans la prévention du rejet de l'embryon aussi bien chez la souris que chez l'homme (Clark *et al.*, 1996). Il inhibe en effet la production des LTCD8<sup>+</sup> maternels en diminuant l'expression du récepteur à l'IL-2, nécessaire à leur prolifération et à leur activation (Lawrence, 1996). Il inhibe également l'activité des cellules NK (Irving & Lala, 1995).

Chez la souris, l'implantation induit une réaction inflammatoire avec une production utérine d'IL-1 et de TNF- $\alpha$ . La production maximale d'IL-1 coïncide avec le pic d'œstrogènes aux jours 4-5. L'IL-1 semble nécessaire pour induire la production de LIF et de COX-2 au site d'implantation, améliorant ainsi la perméabilité vasculaire durant cette phase. Le blocage

des récepteurs de l'IL-1 empêche l'implantation du blastocyste par un effet direct sur l'épithélium de l'endomètre (Simon *et al.*, 1998). L'IL-3 stimule la prolifération trophoblastique et la croissance de l'unité fœto-placentaire et diminue le taux de résorption fœtale dans le modèle CBA/J x DBA/2 (Chaouat *et al.*, 1990). L'IL-11 est essentielle à la reproduction de la souris. En effet, le blocage de son récepteur empêche l'implantation (Robb *et al.*, 1998). Le GM-CSF est présent dès les premiers stades de la décidualisation puis dans l'utérus pré-implantatoire et possède un rôle trophique important sur la croissance des trophoblastes (Pollard *et al.*, 1991). Enfin, le CSF-1, facteur de croissance trophoblastique, est sécrété fortement dans le stroma utérin chez la femme comme chez l'animal (Herrler *et al.*, 2003) mais son rôle n'est pas encore clairement défini.

### **3. INFECTION MATERNELLE ET GESTATION**

Une infection pendant la gestation représente une situation physiopathologique particulièrement complexe dans laquelle l'agent pathogène, en dehors de son action sur l'organisme maternel, peut entraîner soit un arrêt de la gestation, soit des lésions du placenta et se développer secondairement chez le fœtus. Les infections par des virus, des bactéries ou des parasites sont susceptibles de limiter la capacité de reproduction de plusieurs façons, i) en limitant la fertilité de l'hôte, ii) en altérant l'état général de la mère, iii) en stimulant la production de cytokines abortogènes, iv) en perturbant le développement placentaire et les échanges materno-fœtaux et v) en provoquant des infections congénitales.

#### **3.1. Limitation de la fertilité**

Chez la souris, l'infection par *T. gondii* peut provoquer une limitation de la fertilité, caractérisée par l'arrêt du cycle normal d'œstrus, l'atrophie des ovaires, l'altération du développement folliculaire et l'absence de formation du corps jaune (indiquant une absence d'ovulation) (Stahl *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'infection par *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoaire responsable de la maladie de Chagas, induit également une importante réduction de la fécondité chez la souris, phénomène associé à une inhibition du développement embryonnaire pré-implantatoire (Mjihdi *et al.*, 2002 ; Id Boukter *et al.*, 2006).

### **3.2. Altération de l'état général de la mère**

Une infection maternelle peut affecter le fœtus indirectement en diminuant l'état de santé maternel. La fièvre et l'anémie maternelles sont des facteurs habituellement associés à des retards de croissance intra-utérins ou à une mortalité fœtale. C'est le cas lors d'une infection par *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) susceptible de développer des accès palustres fébriles plus ou moins sévères et une anémie chez la mère (Steketee *et al.*, 2001). Il a par ailleurs été montré que l'exposition *in utero* à de brèves hyperthermies pendant des phases critiques de la différenciation neuronale peut interférer avec la production et la migration des cellules-précurseurs neuronales, entraînant l'apparition d'anomalies dans le développement du cerveau fœtal (Hinoue *et al.*, 2001).

### **3.3. Modification de l'environnement cytokinique associé à la gestation**

Lors d'une infection au cours de la gestation, les mécanismes de défense immunitaire doivent être activés afin de maintenir de façon spécifique le contrôle de l'infection tout en inhibant le déclenchement d'effets secondaires éventuellement délétères pour le fœtus. Un modèle d'infection murine par *Leishmania major* (*L. major*) a permis de montrer que la production de cytokines Th1, lors d'une infection maternelle, perturbe l'équilibre cytokinique placentaire nécessaire au bon déroulement de la gestation. En effet, l'infection par *L. major* provoque une augmentation significative du nombre de résorptions fœtales associée à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  et une diminution d'IL-4 et d'IL-10 placentaires (Krishnan *et al.*, 1996).

A l'inverse, l'environnement Th2 physiologique de l'unité fœto-placentaire semble favorable à la multiplication de micro-organismes intracellulaires (normalement contrôlée par une réponse Th1). La multiplication de ceux-ci dans les unités fœto-placentaires pourrait favoriser leur transmission au fœtus et contribuer à augmenter l'incidence des infections congénitales. La balance extrêmement délicate et complexe de plusieurs cytokines requises pour l'établissement et le maintien de la gestation peut être perturbée localement ou au niveau systémique en cas d'infection maternelle et peut entraîner un retard de croissance fœtale ou un avortement (Entrican, 2002).

### **3.4. Perturbation du développement placentaire et des échanges materno-fœtaux**

L'infection par *P. falciparum* est un exemple représentatif des profondes altérations des échanges materno-fœtaux transplacentaires pouvant avoir lieu lors de la gestation. En effet, cette infection peut entraîner la mort du fœtus (estimée à 3-8 %) ou un accouchement prématuré (Steketee *et al.*, 2001). Les mères infectées présentent des parasitémies placentaires très élevées. L'observation de l'adhérence des érythrocytes infectés et de leur séquestration dans les espaces intervillositaires de la face maternelle du placenta a suggéré l'existence, sur les syncytiotrophoblastes, de récepteurs fixant sélectivement ces globules rouges parasités (Fried & Duffy, 1996). Ces derniers expriment un phénotype d'adhérence caractérisé par la présence des ligands de la CSA (Chondroïtine Sulfate A), du CD36 et de l'ICAM-1 à leur surface membranaire (Beeson *et al.*, 1999; Maubert *et al.*, 2000). De plus, ils expriment à leur surface des variants antigéniques de la famille des PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) se liant, entre autres, à la CSA placentaire (Scherf *et al.*, 2001). Ainsi, l'inflammation placentaire qui résulte de cette séquestration de cellules infectées semble corrélée à l'hypotrophie fœtale, conséquence probable de la modification des échanges transplacentaires de nutriments et d'oxygène (Brabin *et al.*, 2004).

Les bactéries sont également capables d'induire un avortement en perturbant le développement placentaire et les échanges materno-fœtaux. En effet, les souris infectées par la bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes*, présentent des anomalies histologiques placentaires (Abram *et al.*, 2003) dont le rôle dans le processus abortif reste encore à démontrer. Les souris infectées par la bactérie à Gram négatif *Bartonella birtlesii* présentent quant à elles des retards de croissance intra-utérin et des résorptions fœtales associés à des lésions vasculaires au niveau du placenta, pouvant également perturber les échanges materno-fœtaux (Boulouis *et al.*, 2001). Enfin, l'infection des ovins pendant la gestation par la bactérie à Gram négatif *Chlamydia abortus* provoque des avortements associés à la multiplication des micro-organismes dans le chorion placentaire, site de production hormonale responsable du maintien de la gestation (Buxton *et al.*, 2002).

# Objectifs

La toxoplasmose congénitale dont l'incidence annuelle en France a été estimée entre un à deux nouveaux-nés pour 1000 naissances pose un réel problème de santé publique. La fréquence de transmission materno-fœtale est considérée comme proportionnelle à la taille du placenta au cours de la grossesse, alors que la sévérité des lésions est liée à l'âge du fœtus au moment de l'infection maternelle (Ambroise-Thomas & Pelloux, 1993). En effet, pendant le premier trimestre de la grossesse, le risque de transmission materno-fœtale est faible, cependant, ces fœtus contaminés sont exposés à des lésions graves (Dunn *et al.*, 1999) entraînant le plus souvent un avortement spontané. Pendant le deuxième trimestre, le risque de transmission s'élève, la barrière placentaire étant moins efficace, et les lésions demeurent importantes. Au cours du troisième trimestre, la probabilité de transmission materno-fœtale est importante et l'enfant est souvent asymptomatique à la naissance. Les informations disponibles sur les relations materno-fœtales dans l'infection par *T. gondii* découlent à la fois des études réalisées lors d'infections congénitales chez l'Homme et des travaux menés dans l'infection expérimentale murine. De nombreux travaux ont étudié les mécanismes du passage transplacentaire de *T. gondii* mais aucune donnée n'est actuellement disponible sur les mécanismes abortifs ayant lieu lors d'une infection précoce.

L'objectif de ce travail a été de caractériser, dans un modèle murin, les mécanismes du processus abortif lors d'une infection par *T. gondii* au cours de la phase précoce de la gestation. Ce modèle permettra de montrer d'une part que l'infection par *T. gondii* induit un avortement chez la souris puis d'autre part d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de ce processus. Les deux hypothèses principales postulées sont : i) les mécanismes abortifs apparaissent suite à une prolifération de *T. gondii* à l'interface materno-fœtale et induisent la destruction du fœtus par une action lytique ou ii) les mécanismes abortifs font suite à la mise en place de la réponse inflammatoire notamment par le biais de l'IFN- $\gamma$ , cytokine connue pour être abortogène dans des conditions non-infectieuses (Vassiliadis *et al.*, 1994).

# Matériel et Méthodes

**Matériel et  
Méthodes**

## 1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### 1.1. Souris

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les recommandations du Guide Conseil de la Recherche Nationale pour l'Utilisation et la Production des Animaux avec l'autorisation (n°6740 délivrée le 07/01/2000) du ministère de l'agriculture. Des souris Swiss Webster (centre d'élevage. R. Janvier, Le Genet-Saint-Isle, France) non congéniques ainsi que des souris congéniques sv129 (don de Mme M. Freudenberg, Max Planck Institute for Immunology, Freiburg, Allemagne), sauvages ou invalidées pour le gène codant le récepteur à l'IFN- $\gamma$ , désignées dans ce cas IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, âgées de 8 à 12 semaines, sont élevées dans des conditions standardisées (22°C, 60 % d'humidité relative, cycle jour/nuit de 12 h) avec un accès libre à l'eau et à un régime alimentaire contrôlé (Harlan, Gannat, France). Les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> sont placées dans une armoire stérile, l'ensemble du matériel (nourriture, eau) est stérilisé et leur manipulation s'effectue sous hotte à flux laminaire (PSM de type 2).

### 1.2. Génotypage des souris

Pour les expériences sur les souris sv129 sauvages et invalidées, un génotypage est effectué sur les parents ainsi que sur les générations F1. Ce génotypage est réalisé après l'extraction d'ADN sur membrane renfermant un gel de silice par le système QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit isolation (Qiagen SA, Courtabœuf, France) à partir d'un prélèvement de queue selon les recommandations du fournisseur. Une étape de digestion par la protéinase K pendant une nuit à 56°C est effectuée avant d'entreprendre l'extraction. L'ADN extrait est élué dans 200  $\mu$ L de tampon d'éluion AE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 9, Qiagen) et conservé à -20°C jusqu'à la réaction de PCR (polymerase chain Reaction). Les amorces utilisées sont IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> sens (5'-CCCATTTAGATCCTACATACGAAACATACGG-3') et IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> antisens (5'-TTTCTGTCATCATGGAAAGGAGGGATACAG-3') et neomycin sens (5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3') et neomycin antisens (5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'). Le mélange réactionnel, d'un volume de 50  $\mu$ L, contient 1  $\mu$ L d'ADN à tester, 5  $\mu$ L de PCR Buffer 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl à pH 9, Qiagen), 1,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 200  $\mu$ M d'un mélange équimolaire des quatre dNTPs (Invitrogen), 1,25 U (Unités) de Hot Start *Taq* Polymérase (Qiagen), 2  $\mu$ M de chaque amorce et de l'eau ultra pure q.s.p. 50  $\mu$ L. Un témoin d'ADN extrait de souris sv129 sauvage, est intégré dans chaque série. Les cycles d'amplification sont effectués dans un thermocycleur

(Perkin Elmer 2400). La révélation est faite par électrophorèse en gel d'agarose à 2 %. La présence de l'amplicon est visualisée après coloration au BET (bromure d'éthidium). Les tailles des fragments IFN- $\gamma$ R et néomycine amplifiés sont respectivement de 290 et 700 pb (paires de bases).

### **1.3. Souches de *T. gondii***

La souche avirulente ME49 (type II) de *T. gondii* est utilisée pour l'infection. Les kystes de *T. gondii* sont obtenus à partir de cerveaux de souris Swiss infectées 2 mois auparavant par voie orale avec 20 kystes de ME49. Les souris sont euthanasiées par inhalation d'isoflurane (Forène<sup>®</sup>, Abbott, Rungis, France) et les cerveaux sont prélevés dans 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline, NaCl 0,138 M et KCl 0,0027 M pH 7,4, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) puis broyés (Ultra-turrax mixer T25, Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne). 20  $\mu$ L sont déposés sur lame et les kystes sont comptés.

Les tachyzoïtes de la souche RH sont obtenus par passages successifs de  $10^6$  tachyzoïtes injectés par voie intra-péritonéale à des souris Swiss. Les souris sont euthanasiées 4 jours plus tard par inhalation d'isoflurane. Le liquide d'ascite est récupéré par ponction et lavage de la cavité péritonéale avec 5 mL de PBS stérile puis filtré sur membrane en polycarbonate de porosité 3  $\mu$ m (Nucleopore<sup>®</sup>, Whatman) afin d'éliminer les débris et les cellules de souris.

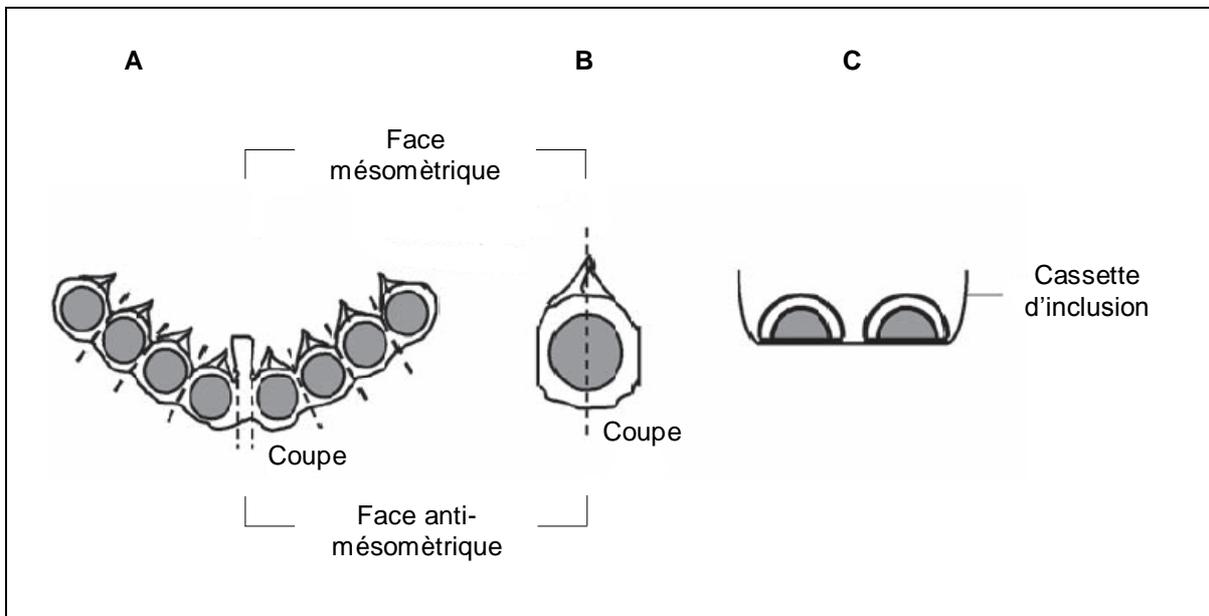
### **1.4. Mise en reproduction et infection**

Une synchronisation de l'œstrus des souris femelles (2 par cage) est obtenue après leur contact durant 48 h avec une litière imprégnée des odeurs d'une souris mâle. Les femelles et les mâles sont mis en contact une nuit. Le lendemain matin, considéré comme le jour 1 de la gestation (J1), les femelles sont séparées et infectées par voie orale avec 10 kystes de ME49 dilués dans 100  $\mu$ L de PBS. Un groupe contrôle recevant 100  $\mu$ L d'un broyat de cerveau non infecté est réalisé pour chaque expérience. Les prélèvements sont effectués à différents jours de gestation (J8, J9, J10 et J16) après euthanasie des animaux par inhalation d'isoflurane. Les souris gestantes et leur cornes utérines sont analysées macroscopiquement. Un prélèvement sanguin et un prélèvement des deux cornes utérines sont réalisés.

## 2. ANALYSES HISTOLOGIQUES DES UNITES FŒTO-PLACENTAIRES

### 2.1. Préparation des coupes

Les unités fœto-placentaires destinées à l'analyse histologique, conservées dans du paraformaldéhyde à 4 %, sont micro-disséquées sous loupe binoculaire afin de les couper dans un plan sagittal de l'embryon passant par le milieu de l'unité (**Figure 19**). Les 2 demi-unités sont alors déshydratées par bains successifs d'éthanol de concentration croissante (de 70° à 95°) puis de toluène. Les échantillons sont inclus dans la paraffine et des coupes fines (5 µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les coupes sont déposées sur des lames Super Frost (Dako, Trappes, France), recouvertes d'eau et séchées quelques minutes sur une plaque chauffante à 45°C. Elles sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 24 h (heures) puis stockées à température ambiante.



**Figure 19.** Protocole de préparation des coupes blanches. Représentation schématique montrant la séparation des sites d'implantation (A), plan de coupe sagittal de l'embryon passant par le milieu de l'unité (B) et leur position lors de l'inclusion dans la paraffine (C). Adaptée de Croy & Xie, 2006.

### 2.2. Déparaffinage

Les coupes subissent tout d'abord une étape de déparaffinage afin de pouvoir réaliser les différents marquages. Ce déparaffinage comprend une étape de dissolution de la paraffine par incubation des lames dans 2 bains successifs de 10 min (minutes) dans le xylène, puis une étape de réhydratation progressive des échantillons dans des bains successifs d'éthanol à concentration décroissante : 2 bains d'éthanol absolu de 5 min, 1 bain d'éthanol 95° de 5 min, 1 bain d'éthanol 75° de 5 min et 1 bain d'éthanol 50° de 5 min.

### 2.3. Coloration hémalum-éosine

La coloration hémalum-éosine permet une analyse histologique de l'unité fœto-placentaire et permet la quantification de la dilatation des artères spiralées par la mesure du diamètre total de l'artère sur le diamètre de sa lumière. Après déparaffinage, les lames sont colorées avec une solution d'hématoxyline de Mayer (Sigma-Aldrich) pendant 2 à 3 min. Après un bref rinçage à l'eau, elles sont colorées avec une solution de fuschsine Ponceau (Sigma-Aldrich) pendant 5 à 10 min puis rincées à l'eau. Les lames sont plongées dans un bain d'acide phosphomolybdique (Sigma-Aldrich) à 1 % pendant 10 min, laissées à la lumière du jour pendant 2 min puis rincées à l'eau avant d'être plongées dans de l'eau pendant 2 min puis montées avec une solution de gélatine glycinée.

### 2.4. Marquage anti-*T. gondii*

Ce marquage est réalisé afin de mettre en évidence la présence du parasite dans les unités fœto-placentaires. Après déparaffinage les coupes sont perméabilisées dans un bain de tampon citrate 0.1 M chauffé au micro-ondes 2 fois 5 min à 360 W. Après un lavage dans du PBS, les sites aspécifiques sont bloqués pendant 30 min à température ambiante avec une solution de PBS, contenant 20 % de SVFI (Sérum de Veau Fœtal Inactivé, Invitrogen) et 10 % de sérum de chèvre (Sigma). Après 3 lavages de 5 min avec du PBS, les peroxydases endogènes sont inhibées avec une solution peroxydase blocking (Dako) 15 min à température ambiante. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, une étape de blocage des biotines endogènes est également effectuée par l'utilisation du système avidin/biotin blocking kit (Vectorlabs, Paris, France) 15 min à température ambiante puis les lames sont lavées 3 fois 5 min dans du PBS. Le marquage des parasites est réalisé par une incubation d'une nuit à 4°C avec un sérum polyclonal de lapin anti-*T. gondii* (Abd Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans du PBS contenant 1 % de BSA (Bovine Serum Albumine) et 10 % de sérum de chèvre. Après 3 lavages de 5 min avec du PBS, les lames sont incubées 1 h à température ambiante avec le conjugué correspondant à des IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplées à la biotine dilué au 1/250<sup>ème</sup> (Jackson Immunoresearch, Montluçon, France) dans du PBS contenant 1 % de BSA et 10 % de sérum de chèvre. La détection est réalisée par incubation 30 min à température ambiante avec de la streptavidine couplée à l'HRP (Horse radish peroxidase, Dako) diluée au 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS, 1 % de BSA pendant. Après rinçage 5 min dans du PBS, la révélation par une solution de Diaminobenzidine (DAB, Dako) pendant 2 à 3 min à température ambiante est réalisée et suivie 3 lavages de 5 min dans du

PBS. Une étape de contre-coloration de 10 sec (secondes) dans une solution d'hématoxyline de Harris (Sigma) est réalisée, les lames sont rincées à l'eau puis montées dans une solution de gélatine glycéinée.

## **2.5. Marquage anti-Bax**

Les coupes déparaffinées sont traitées comme précédemment décrit pour le marquage anti-*T.gondii* : perméabilisation, blocage des sites spécifiques et inhibition des peroxydases et biotines endogènes. Le marquage de la protéine Bax est réalisé en incubant les coupes 1 nuit à 4°C avec un sérum polyclonal de lapin anti-Bax (Sigma) dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS contenant 1 % de BSA et 10 % de sérum de chèvre. Après 3 lavages de 5 min avec du PBS, les lames sont incubées 1 h à température ambiante avec le conjugué : IgG de chèvre anti-IgG de lapin couplées à la biotine diluées au 1/250<sup>ème</sup> (Jackson Immunoresearch, Montluçon, France) dans du PBS contenant 1 % de BSA et 10 % de sérum de chèvre. La détection par de la streptavidine couplée à l'HRP (Dako) diluée au 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS, 1 % de BSA est réalisée en incubant les lames pendant 30 min à température ambiante. Après rinçage 5 min dans du PBS, la révélation est réalisée par l'incubation de 2 à 3 min à température ambiante d'une solution de DAB (Dako), suivie 3 lavages de 5 min avec du PBS. Une contre-coloration par une solution d'hématoxyline de Harris (Sigma) est réalisée pendant 10 sec, les lames sont rincées à l'eau puis montées dans une solution de gélatine glycéinée.

## **2.6. Marquage et comptage des cellules uNK**

### **2.6.1. Marquage PAS (peroxid acid Schiff)**

Cette coloration permet de mettre en évidence les granulations des cellules uNK. En effet, l'oxydation des polysaccharides par l'acide periodique libère des groupements aldéhydes qui sont alors révélés par le réactif de Schiff (Sigma). Après déparaffinage, les lames sont plongées dans un bain d'acide periodique (Sigma) à 1 % pendant 10 min à température ambiante puis rincées 3 fois à l'eau courante. Après une coloration par le réactif de Schiff pendant 30 min à température ambiante et suivie d'un rinçage à l'eau courante, une contre-coloration par une solution d'hématoxyline de Harris (Sigma) est réalisée pendant 10 sec. Les lames sont rincées 5 min à l'eau et montées avec une solution de gélatine glycéinée.

### **2.6.2. Marquage DBA-lectin-FITC**

La DBA-lectin possède une très haute affinité avec les glyco-conjugués contenant des groupements N-acétyl D-galactosamine en position terminale et réagit spécifiquement avec la membrane plasmique et la membrane des granules intracellulaires des cellules uNK chez la souris (Paffaro *et al.*, 2003). Après déparaffinage des lames et équilibration 5 min dans du PBS, les sites aspécifiques sont bloqués avec une solution de PBS, 1 % de BSA durant 30 min à température ambiante. Après 3 lavages successifs de 5 min dans du PBS, les lames sont incubées 1 h 30 min en chambre humide à 37°C avec une solution de DBA-lectin (Sigma) couplée à la FITC (Fluorescéine-Iso-Thio-Cyanate), diluée au 1/50<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée. Après un dernier lavage de 5 min avec du PBS, les lames sont montées dans une solution de Mowiol (Calbiochem, Nottingham, Angleterre) pour la lecture au microscope à épifluorescence.

### **2.6.3. Comptage des cellules uNK**

Le comptage des cellules uNK s'effectue sur les coupes colorées au PAS en utilisant une grille micrométrique de 1 mm<sup>2</sup> placée sur l'oculaire d'un microscope. Le comptage est effectué à un grossissement de 400x.

## **2.7. Marquage TUNEL**

La réaction de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling) utilise la terminal Deoxynucleotidyl Transferase ou TdT, enzyme qui se lie aux fragments terminaux d'ADN générés en réponse à des signaux apoptotiques et catalyse la réaction entre les déoxy nucléotides et la biotine permettant à ces derniers d'être marqués. Ce marquage est effectué à l'aide du système TdT-FragEL<sup>TM</sup> DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem) selon les recommandations du fournisseur. Ces fragments sont alors détectés par la streptavidine couplée à l'HRP et révélés par la DAB. Une contre-coloration utilisant le protocole de marquage PAS est réalisée dans un second temps permettant de localiser également les cellules uNK.

### 3. MESURE DE LA PARASITEMIE SANGUINE ET FŒTO-PLACENTAIRE

#### 3.1. Extraction d'ADN à partir du sang et des unités fœto-placentaires

L'extraction est réalisée à partir de 500 µL de sang total ou d'une unité fœto-placentaire isolée conservée dans du PBS. L'extraction diffère selon le type d'échantillon. Le sang est broyé (24000 tr/min, 1 min) puis centrifugé 3 min à 13000 g. Les globules rouges sont lysés avec 1 mL de tampon de lyse de globules rouges (Tris-HCL 10 mM pH 7,5, sucrose 0,32 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Triton X100 1 %) puis centrifugés 3 min à 13000 g. L'extraction est réalisée sur 200 µL du surnageant. Les unités fœto-placentaires sont isolées, disséquées et séparées du muscle utérin puis broyées séparément (24000 tr/min, 1 min) dans un tampon de lyse fourni par le système QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen). L'ADN est extrait avec ce système selon les recommandations du fabricant et est élué dans 200 µL de tampon d'éluion AE par une centrifugation (6000 g, 1 min) et conservé à -20°C.

#### 3.2. Extraction de l'ADN de la souche RH de *T. gondii* et constitution de la gamme de référence

Les tachyzoïtes sont lavés avec du PBS stérile et centrifugés à 200 g pendant 20 min. Le nombre de tachyzoïtes est déterminé par comptage sur une cellule de numération de Neubauer (Hycor Biomedicals, Kassel, Allemagne) et la concentration est ajustée à 10<sup>5</sup> tachyzoïtes/µL. L'ADN de 10<sup>7</sup> tachyzoïtes est purifié sur le système QIAamp DNA mini kit<sup>®</sup> (Qiagen) puis élué avec 100 µL de tampon d'éluion AE. L'ADN est quantifié par la mesure de l'absorbance en spectrophotométrie à 260 nm et sa pureté est estimée par le rapport des absorbances à 260 nm sur 280 nm. La gamme de référence est alors constituée à partir de cet éluat d'ADN. Une première dilution dans du tampon AE ramène la concentration à 17500 tachyzoïtes pour 5 µL puis des dilutions en série sont réalisées de 10 en 10 dans le même tampon de façon à obtenir les points de gamme 1750 ; 175 ; 17,5 ; 10 ; 5 ; 1 et 0,5 tachyzoïte(s) pour 5 µL (volume d'échantillon par tube capillaire).

#### 3.3. PCR conventionnelle

L'amplification du fragment répété d'ADN AF146527 utilise les amorces : Tox4 5'-CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' et Tox5 5'-TGCAGACACAGTGCATCTGGA TTC-3' (Homan *et al.*, 2000). Le volume réactionnel de 50 µL contient 10 µL d'ADN purifié, 5 µL de PCR Buffer 10x (Qiagen), 200 µM de dNTP (Invitrogen), 1,25 U de Hot Start *Taq*

Polymérase (Qiagen), 2  $\mu$ M de chaque amorce, 1,5  $\mu$ M de  $MgCl_2$ , et de l'eau stérile q.s.p. 50  $\mu$ L. L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (Perkin Elmer 2400) et comprend une dénaturation initiale avec activation de la polymérase pendant 15 min à 95°C suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 30 sec à 58,8°C, élongation 30 sec à 72°C) et d'une élongation terminale de 5 min à 72°C. La présence de l'amplicon (528 pb) est visualisée après coloration au BET après électrophorèse en gel d'agarose 2 %.

### 3.4. PCR quantitative en temps réel

La mesure de la parasitémie est effectuée par quantification de l'ADN par PCR quantitative en temps réel (LightCycler<sup>®</sup>, Roche, Meylan, France) selon la méthode décrite par Reischl (Reischl *et al.*, 2003). Le mélange réactionnel (20  $\mu$ L) est composé de 5  $\mu$ L de l'ADN purifié à tester, de 0,5  $\mu$ M final de chacune des amorces sens (Tox-9 : 5'-AGGAGAGATATCAGGACTGTAG-3') et antisens (Tox-11 : 5'-GCGTCGTCTCGTCTA GATCG-3'), de 0,25  $\mu$ M de chacune des sondes d'hybridation marquées à la fluorescéine (Tox-HP-1 : 5'-GAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTT-[FL]-3') ou au rouge 640 (Tox-HP-2 : 5'-[Red 640]-CCGGCTTGGCTGCTTTTCCTG-Phosphate-3'), de 2  $\mu$ L de tampon 10x du système LightCycler<sup>®</sup> FastStart<sup>®</sup> Master Hybridization Probes (Roche), de 4 mM de  $MgCl_2$ , d'1 U d'UDG (Uracil-DNA Glycosylase, Roche) et d'eau Ultra Pure q.s.p. 20  $\mu$ L. Ce mélange réactionnel est déposé dans un tube capillaire en verre puis soumis à l'amplification quantitative. La quantification est rendue possible par la comparaison du signal obtenu pour les échantillons à tester avec la gamme de référence. Le programme d'amplification de PCR quantitative est composé d'une étape d'action de l'UDG (élimination des éventuelles contaminations par transfert) pendant 1 min à température ambiante, d'une activation de la Taq ADN polymérase de 10 min à 95°C et de 50 cycles de 10 sec à 95°C ; 20 sec à 58°C et 20 sec à 72°C.

La mesure de la fluorescence à 640 nm se fait à la fin de l'hybridation des amorces et des sondes ; les rampes de température sont réglées à 20°C/sec. L'analyse quantitative des données de fluorescence se fait de façon standard dans le canal de fluorescence F2/F1 ou F2/backF1 avec un paramétrage "maximum de la dérivée seconde" et un ajustement arithmétique de la ligne de base. Une courbe de fusion est réalisée de façon à vérifier qu'un seul fragment d'ADN dont la température de fusion est attendue à 65°C soit amplifié. Le programme de cette étape est 20 sec à 95°C puis 20 sec à 45°C (rampes de température à 20°C/sec) puis la température est portée à 95°C par paliers de 0,2°C/sec et une mesure continue de la fluorescence à 640 nm est effectuée.

## **4. DOSAGE SÉRIQUE ET PLACENTAIRE DE L'IFN- $\gamma$ , DU TNF- $\alpha$ , DE L'IL-4, DE L'IL-6 ET DE L-IL-10**

### **4.1. Obtention des échantillons**

Les sérums sont obtenus par centrifugation du sang total 5 min à 3000 g. Les unités fœto-placentaires destinées à cette analyse sont récupérées dans 1 mL de PBS contenant 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) et broyées à 24000 tr/min (1 min) et lysées par sonication (2 pulses/sec, 1 min, 60W, sur glace) (Vibra Cell<sup>®</sup>, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les surnageants sont récupérés après 2 centrifugations successives (13000 g, 20 min, 4°C) et conservés à -20°C.

### **4.2. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

La quantification d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-10 est effectuée dans les sérums et dans les unités fœto-placentaires des souris gestantes contrôles et infectées à l'aide des systèmes immunoenzymatiques OptEIA<sup>TM</sup> mouse ELISA (Pharmingen, Le Pont de Claix, France) (**Tableau 9**). La sensibilisation des plaques de microtitration (Maxisorp<sup>®</sup>, Nunc) de 96 puits à fond plat s'effectue sur une nuit à 4°C avec 100  $\mu$ L/puits d'anticorps monoclonal dans un tampon carbonate bicarbonate 0,1 M pH 9,5 ou phosphate 0,2 M pH 6,5 selon la cytokine à doser. Après 3 lavages avec du PBST (PBS-Tween 20 à 0,05 %), les sites de liaison non spécifiques sont bloqués 1 h à 37°C avec 200  $\mu$ L/puits de PBS-SVFI (PBS contenant 10 % SVFI) puis les plaques sont lavées 3 fois avec du PBST. Les échantillons sont déposés (100  $\mu$ L) en triplicate à la dilution appropriée afin d'évaluer la répétabilité. Dans un même temps, une gamme étalon est réalisée en duplicate par dilution en série de la cytokine recombinante correspondante. Après 2 h d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées 5 fois avec du PBST. La détection est effectuée par 1 h d'incubation à température ambiante de 100  $\mu$ L/puits d'une solution contenant le conjugué biotinylé dilué dans du PBS-SVFI et l'avidine peroxydase diluée au 1/250<sup>ème</sup> dans la solution de conjugué dilué. Après 7 lavages avec du PBST, la révélation est réalisée avec 100  $\mu$ L/puits de substrat, le TétraMéthylBenzidine (TMB, KenEnTec diagnostics, Copenhague, Danemark), incubés 10 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par l'addition de 50  $\mu$ L/puits d'acide sulfurique 2 N. La mesure de la réaction est réalisée à 450 nm et le logiciel RMS (Laboratoire Dynatech, Saint Cloud, France) permet de tracer la courbe standard et de calculer les concentrations des différentes cytokines.

**Tableau 9.** Caractéristiques des ELISA réalisés.

Cytokines dosées	Tampon de sensibilisation	Dilution des échantillons		Unités	Gamme étalon (en pg/mL)	Dilution du conjugué
		Sérum	FP			
IFN- $\gamma$	Carbonate	1/100 <sup>e</sup>	1/10 <sup>e</sup>	1/10 <sup>e</sup>	2000 à 31.3	1/500 <sup>e</sup>
TNF- $\alpha$	Phosphate	1/10 <sup>e</sup>	1/10 <sup>e</sup>	1/10 <sup>e</sup>	1000 à 15.6	1/500 <sup>e</sup>
IL-4	Carbonate	Pur	Pur	Pur	500 à 7.8	1/250 <sup>e</sup>
IL-6	Carbonate	Pur	Pur	Pur	1000 à 15.6	1/250 <sup>e</sup>
IL-10	Phosphate	Pur	Pur	Pur	2000 à 31.3	1/250 <sup>e</sup>

FP : Fœto-placentaire.

## 5. WESTERN BLOT

### 5.1. Extraction et dosage protéique

Les cornes utérines de souris Swiss récupérées dans une solution de PBS contenant 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) sont disséquées afin d'isoler les unités fœtaux-placentaires du muscle utérin. Quatre unités fœto-placentaires sont traitées selon le protocole du paragraphe 4.1. afin d'obtenir un extrait protéique. La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

### 5.2. Electrophorèse

Un gel d'électrophorèse à 10 % d'acrylamide est utilisé pour analyser les extraits protéiques dans des conditions dénaturantes (0,1 % de SDS, Sodium Dodecyl Sulfate). 25  $\mu$ L d'extrait protéique (correspondant à 50  $\mu$ g de protéines totales) sont mélangés à 5  $\mu$ L de tampon de dissociation (Laemmli et  $\beta$  mercapto-éthanol) et incubés 5 min à 100°C. Les 30  $\mu$ L sont déposés dans les puits ainsi que 8  $\mu$ L d'un marqueur de masses moléculaires protéiques (Precision Plus Standards, BioRad, Marnes la Coquette, France). La migration a lieu en tampon Tris base 0,25 M Glycine 2 M et SDS 0,1 % pendant 45 min à 200 V (système Mini-PROTEAN 3, BioRad).

### 5.3. Immunoblot

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham) préincubée dans du tampon de transfert (Towbin *et al.*, 1979). La révélation des protéines se fait par incubations séquentielles avec une solution de saturation (PBS contenant 5 % lait écrémé en poudre) pendant une nuit sous agitation à 4°C, des anticorps primaires dilués dans du PBS, 0.1 % de lait pendant 2 h sous agitation à température ambiante, des anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués dans du PBST, 0,1 % de lait pendant 1 h sous agitation à température ambiante (**Tableau 10**). Ces étapes sont séparées par des séquences de 3 lavages de 10 min avec du PBST. La révélation est faite en autoradiographie par l'ajout du substrat chimioluminescent (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) pendant 5 min puis mise en contact avec un film photographique (BioMax Light Film, Kodak, Chalon sur Saône, France). Après 10 min d'exposition à température ambiante, le film est développé pendant 1 min dans du révélateur dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée (X ray developer LX24, Kodak), rincé à l'eau pendant 20 sec et fixé pendant 1 min dans du fixateur dilué au 5<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée (X ray fixer AL24, Kodak). Après un rinçage final de 5 min dans de l'eau, le film est séché à l'air libre.

**Tableau 10.** Anticorps primaires et secondaires utilisés.

Protéines à révéler (poids en kDa)	Anticorps primaires				Dilution utilisée
$\beta$ -actine (42 kDa)	Monoclonal anti- $\beta$ -actine Sigma	de	souris	(IgG2a), AC-74),	1/5000 <sup>e</sup>
Bax (23 kDa)	IgG de lapin anti-Bax, Sigma				1/1000 <sup>e</sup>
Bcl2 (26 kDa)	Monoclonal anti-Bcl-2 Santa-Cruz, Heidelberg, Allemagne	de	souris	(IgG1), C-2),	1/1000 <sup>e</sup>
p53 (53 kDa)	Monoclonal anti-p53 Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France	de	souris	(IgG2a), DO-1),	1/200 <sup>e</sup>
Anticorps primaires	Anticorps secondaires				Dilution utilisée
Anti-IgG de souris	Anti-IgG Beckman, Roissy, France	de	souris	couplé à l'HRP	1/10000 <sup>e</sup>
Anti-IgG de lapin	Anti-IgG Jackson Immunoresearch	de	lapin	couplé à l'HRP	1/25000 <sup>e</sup>

#### 5.4. Analyses informatiques

L'intensité des bandes obtenues est quantifiée en la rapportant à celle de la  $\beta$ -actine correspondante avec le logiciel Scion Imaging software (Scion Corporation, Maryland, USA).

### 6. RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (rtqPCR)

#### 6.1. Extraction

Les unités fœto-placentaires destinées à cette analyse et conservées dans du RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) sont micro-disséquées sous loupe binoculaire afin de les séparer du muscle utérin. L'ARN de 2 unités fœto-placentaires broyées à 24000 tr/min (1 min) est extrait et purifié en utilisant le système sur colonnes RNeasy RNA Mini Kit™ (Qiagen) selon les recommandations du fabricant, puis élué dans 30  $\mu$ L de tampon RNeasy Lysis Buffer et quantifié au spectrophotomètre.

#### 6.2. Réaction de transcription reverse

L'ARN de chaque échantillon obtenu est reverse transcrit en ADNc (ADN complémentaire) par l'utilisation de la Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MuLV) reverse transcriptase du système First Strand cDNA Synthesis kit (Amersham, Orsay, France). L'ARN subit tout d'abord une dénaturation de sa structure tertiaire à 65°C pendant 10 min puis est reverse transcrit à 37°C pendant 1 h, selon les recommandations du fournisseur, dans un mélange réactionnel contenant 2  $\mu$ g d'ARN, 1  $\mu$ L de Bulk first-strand cDNA reaction Mix, 6 mM de DTT, 5  $\mu$ g d'amorce Not I-d(T)<sub>18</sub> bifonctionnel primer et de l'eau Rnase-free q.s.p. 33  $\mu$ L.

#### 6.3. PCR quantitative

La production des ARNm (ARN messagers) est déterminée par la quantification des ADNc correspondants par PCR quantitative en temps réel (LightCycler). Brièvement, le mélange réactionnel contient 2  $\mu$ L de l'ADNc à tester, 0,5  $\mu$ M final de chacune des amorces sens et antisens (**Tableau 11**), 2  $\mu$ L de mélange réactionnel LightCycler® FastStart® DNA Master SYBR Green I contenant la *Taq* et son tampon associé, les dNTP ainsi que le SYBR Green I (Roche Applied Science), 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, eau ultra purifiée autoclavée q.s.p. 20  $\mu$ L. Les 20  $\mu$ L de ce mélange sont déposés dans un tube capillaire en verre puis soumis à amplification quantitative. La quantification est obtenue en comparant le signal obtenu pour

les échantillons à tester avec une gamme de référence. Les gammes des différentes cibles sont établies à partir de l'amplification de l'ADNc-cible en PCR conventionnelle. L'amplicon est purifié à partir du gel d'agarose 2 % par le système sur colonne High Pure PCR Product Purification (Roche Applied Science, Neuilly sur Seine, France) et élué dans 100 µL de tampon d'éluion fourni, avant d'être quantifié au spectrophotomètre. Cet éluat est dilué de 10 en 10 de façon à obtenir les points de gamme de  $10^{11}$  à  $10^2$  copies/µL par tube capillaire de la gamme. Le programme d'amplification de PCR quantitative pour les gammes et les dosages des échantillons est le suivant : 10 min à 95°C (activation de la *Taq* ADN polymérase) ; 40 cycles de 10 sec à 95°C ; 20 sec à la température d'hybridation (**Tableau 11**) et 20 sec à 72°C. Une mesure de la fluorescence à 640 nm se fait à la fin de l'hybridation des amorces. L'analyse quantitative des données de fluorescence se fait de façon standard dans le canal de fluorescence F2/F1 ou F2/backF1 avec un paramétrage "maximum de la dérivée seconde" et un ajustement arithmétique de la ligne de base. Une courbe de fusion est réalisée afin de vérifier qu'un seul fragment d'ADN dont la température de fusion est attendue soit amplifié (**Tableau 11**). Le programme de cette étape est 20 sec à 95°C puis 20 sec à 45°C (rampes de température à 20°C/sec) puis la température est portée à 95°C par paliers de 0,2°C/sec et une mesure continue de la fluorescence à 640 nm.

**Tableau 11.** Séquences des amorces et caractéristiques des rtqPCR réalisé selon la cible quantifiée.

Cibles	Amorces	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation	Temps d'élongation	Température de fusion
β-actine	5'-TCTGGCACCACACCTTCTA-3'	19 0 pb	55°C	8 sec	88°C
	5'-AGGCATACAGGGACAGCAC-3'				
FN-γ	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'	22 5 pb	60°C	10 sec	87°C
	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'				
L-15	5'-CAGCACTCTGTCTTCTAACAAGAA-3'	81 pb	55°C	4 sec	82°C
	5'-TCTGTGAAGGTTTTCTCCTCC-3'				
EGF	5'-TTACTGCTGTACCTCCACCA-3'	18 9 pb	55°C	8 sec	87.5°C
	5'-ACAGGACGGCTTGAAGATGTA-3'				

## 7. METHODES STATISTIQUES

Les calculs statistiques sont réalisés au moyen du logiciel INSTAT (Graphpad software, San Diego, CA). Un test de Fischer est utilisé afin de comparer les pourcentages de souris gestantes et de résorptions entre les différents groupes de souris. Un test t de Student est employé pour comparer toutes les autres données (dilatation des artères spiralées, nombre de cellules uNK, parasitémie, production sérique et placentaire des cytokines, des transcrits quantifiés par rtqPCR, des protéines révélées par Western Blot). Les valeurs de  $p$  inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

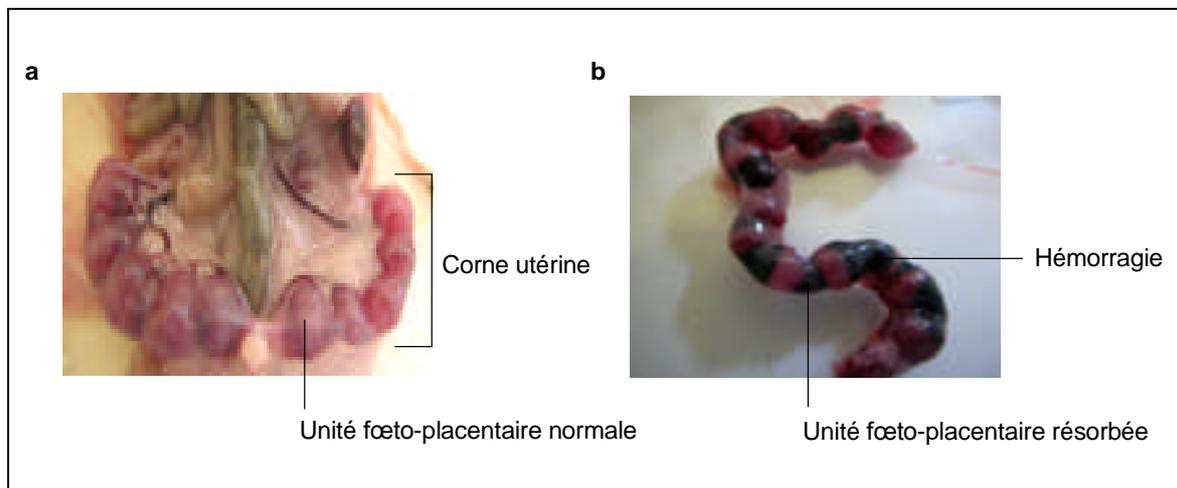
# Résultats

## **Résultats**

## 1. MECANISMES ABORTIFS INDUITS PAR L'INFECTION A *T. GONDII*

### 1.1. Apparition de résorptions chez la souris Swiss infectée

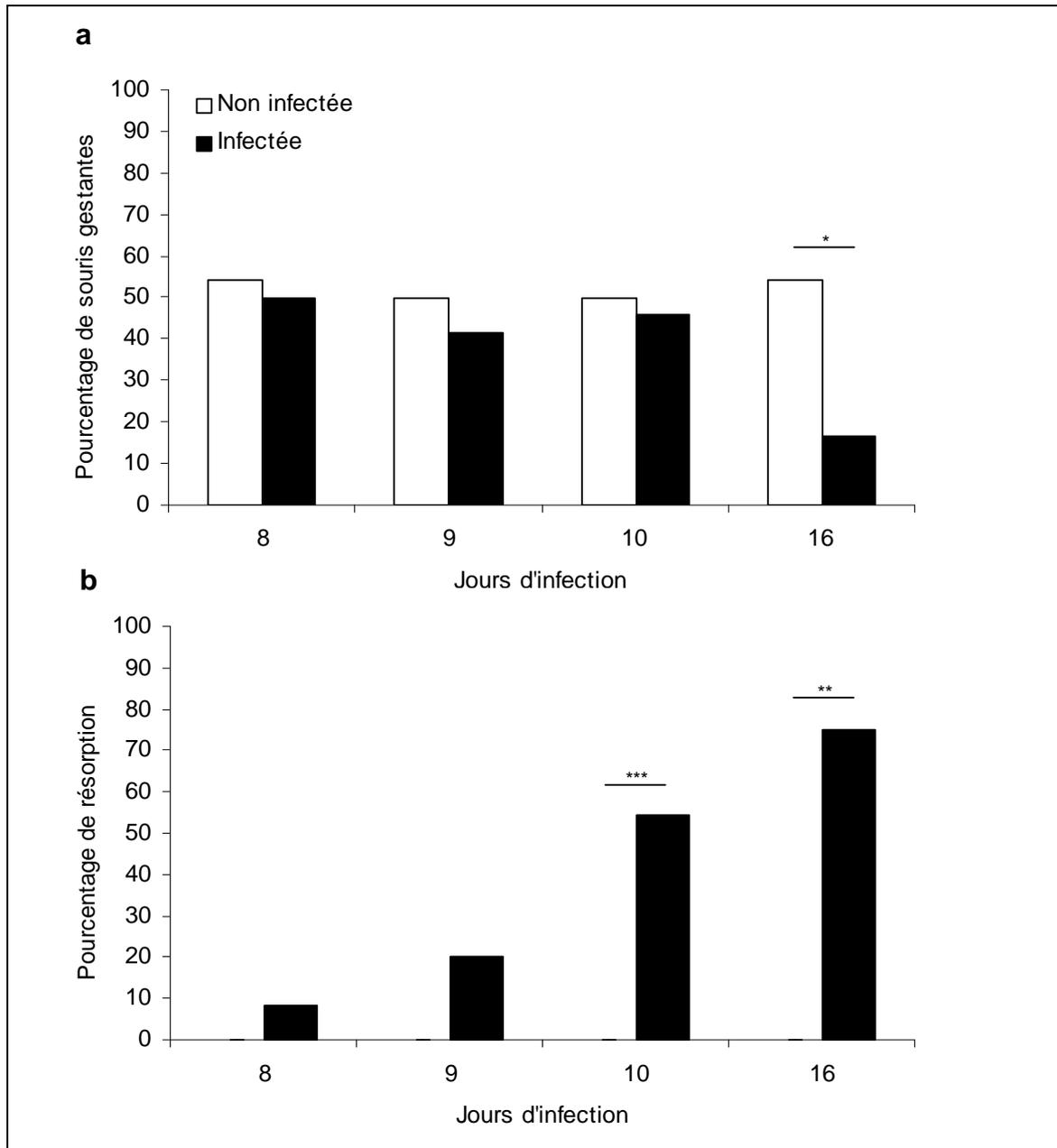
L'implication de *T. gondii* dans les avortements précoces n'est plus à démontrer cependant les phénomènes intervenant dans cette mort *in utero* restent encore très peu étudiés. Pour explorer les mécanismes impliqués dans ces avortements spontanés, nous avons tout d'abord développé un modèle d'infection précoce au cours de la gestation chez des souris Swiss (SW) non congéniques infectées par voie orale avec 10 kystes de la souche ME49 (type II) de *T. gondii* afin d'induire un mécanisme abortif caractérisé par l'observation d'unités fœto-placentaires résorbées, les résorptions étant définies par la présence d'hémorragies et la diminution de la taille des unités (**Figure 20**).



**Figure 20.** Cornes utérines de souris non infectée (a) et infectée par *T. gondii* (b). L'infection induit des résorptions, processus abortif chez la souris.

Les analyses sont effectuées à J8, J9, J10 et J16 de gestation sur 24 souris par groupe (infecté et non infecté). Les résultats correspondent à une expérience représentative pour chaque temps d'analyse, le nombre d'expériences réalisées étant de 2 pour J9 et J16, 4 pour J8 et 6 pour J10. L'infection ne modifie ni le nombre de fœtus (résultats non montrés) ni le pourcentage de gestation à J8, J9 et J10 (**Figure 21a**). En revanche, nous observons une diminution significative à J16 du pourcentage de souris gestantes dans le groupe infecté (16,6 % vs 54,1 %,  $p < 0,05$ ) de même qu'une diminution significative du nombre de fœtus ( $14,4 \pm 0,4$  vs  $10,5 \pm 0,8$ ,  $p < 0,05$ ). En l'absence d'infection, aucune résorption n'est observée quel que soit le temps d'analyse. Nous observons lors de l'infection des résorptions dès J8 (8,3 %). Ce pourcentage de résorption, correspondant au nombre de souris présentant

des unités fœto-placentaires résorbées, augmente avec le temps (20 % à J9, 54,5 % à J10) pour atteindre 75 % à J16 (**Figure 21b**).



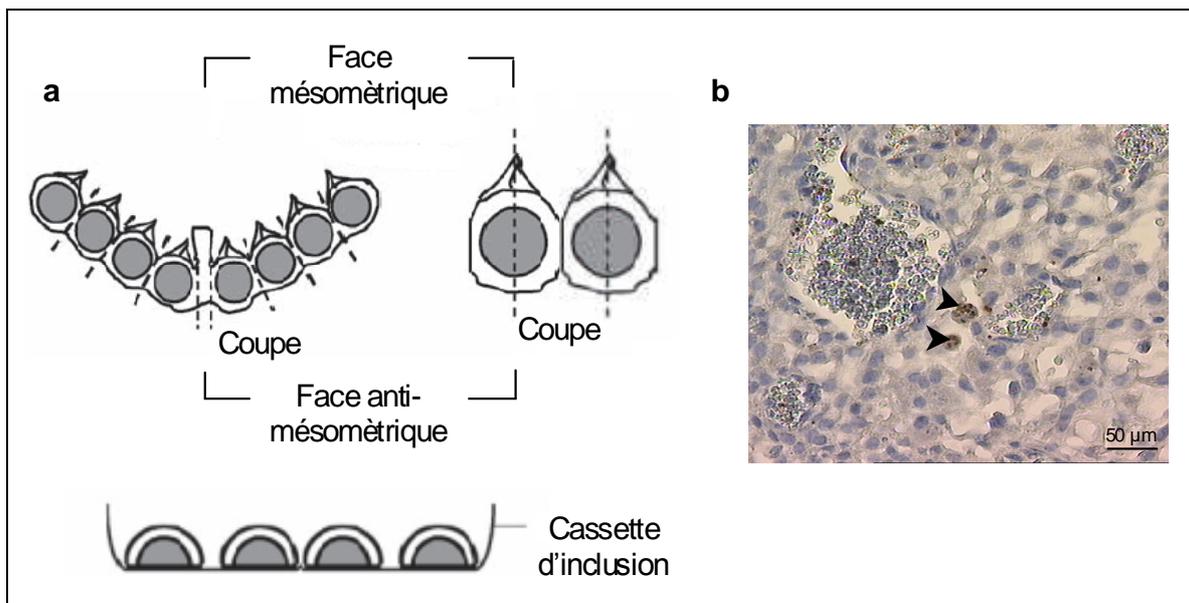
**Figure 21.** Pourcentage de souris gestantes (**a**) et de résorptions (**b**) entre les groupes non infecté et infecté à différents temps de gestation. Une différence du pourcentage de souris gestantes est observée à J16 de gestation entre les groupes de souris infectées et non infectées. Les résorptions sont observées à partir de J8 chez les souris infectées et le pourcentage de ces résorption augmente en fonction du temps de gestation. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ .

Ces résultats indiquent que l'infection par *T. gondii* n'a pas d'effet sur les mécanismes d'implantation embryonnaire mais qu'elle induit des processus abortifs apparaissant secondairement. Par ailleurs, la diminution du pourcentage de souris gestantes observée à J16 est probablement liée aux résorptions observées aux temps antérieurs. Dans la suite de notre

travail, nous avons centré nos analyses à J10 en raison de la forte augmentation de près de 50 % des résorptions observées entre J9 et J10.

### 1.2. Faible charge parasitaire dans les unités fœto-placentaires

Une analyse quantitative par PCR du nombre de parasites, réalisée à partir de 7 souris et sur 4 unités fœto-placentaires par souris, permet de détecter l'ADN de *T. gondii* à partir de J10 à une concentration équivalente à 8 parasites/mg de tissu placentaire. Un marquage immunohistochimique du parasite réalisé à J10 à partir de 2 souris, 4 unités fœto-placentaire par souris étant analysées à l'aide de 2 coupes par unité (**Figure 22a**), confirme le faible nombre de parasites. En effet, nous n'observons ni prolifération massive du parasite, ni foyers de nécrose au sein des unités fœto-placentaires présentant des résorptions (**Figure 22b**). La recherche du parasite par ces deux techniques met en évidence une faible charge parasitaire associée aux résorptions.

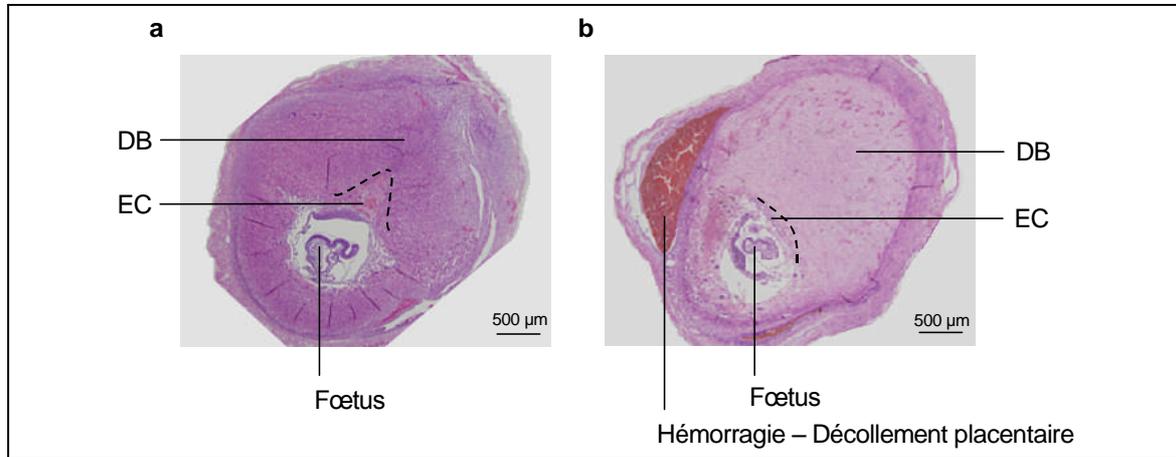


**Figure 22.** Méthode d'obtention des coupes blanches (a) et marquage utérin de *T. gondii* à J10 d'infection (b). (a) Chaque coupe préparée contient deux unités fœto-placentaires issues de la même souris coupées dans le plan sagittal. (b) Le parasite est détecté en faible quantité dans la *decidua basalis* des souris infectées et ne provoque aucune atteinte suite à sa prolifération. Les flèches montrent 2 cellules infectées.

### 1.3. Présence d'hémorragies et de décollements placentaires dans les unités fœto-placentaires infectées

L'analyse histologique réalisée à J10 à partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun), sur 2 unités fœto-placentaires par souris pour lesquelles 4 coupes par unité sont colorées à l'hémalun-éosine, montre la présence de décollements placentaires

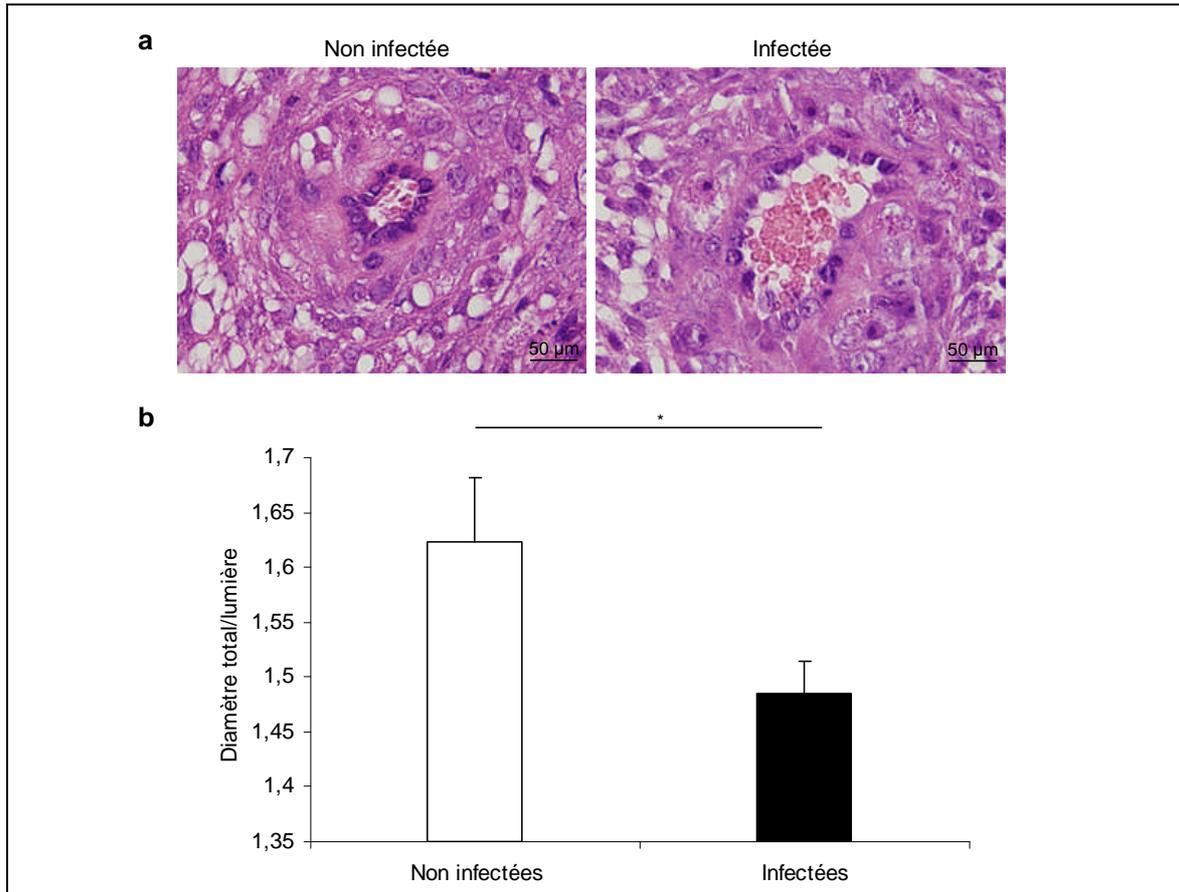
accompagnés d'hémorragies au sein des unités infectées et résorbées. Nous observons également une hypocellularité de la *decidua basalis* et un développement peu important du cône ectoplacentaire. Ces anomalies ne sont pas retrouvées chez les souris non infectées (**Figure 23**).



**Figure 23.** Unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b) colorées à l'hémalun-éosine. L'infection par *T. gondii* induit l'apparition d'hémorragies associées à des décollements placentaires ainsi qu'une hypocellularité de la *decidua basalis* et la réduction du cône ectoplacentaire. DB : *decidua basalis*, EC : Cône ectoplacentaire.

#### 1.4. Dilatation des artères spiralées dans les unités fœto-placentaires infectées

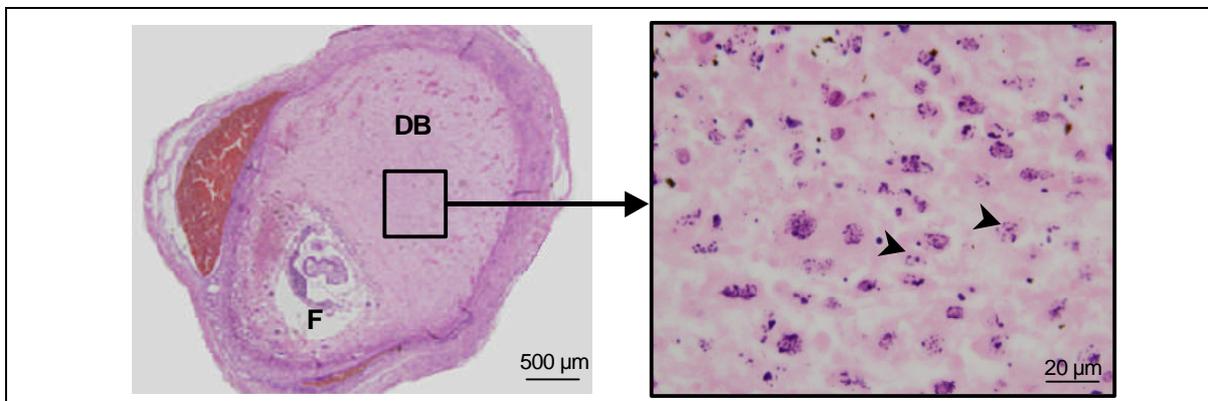
L'observation d'hémorragies au cours de l'infection nous a conduit à étudier plus particulièrement les artères spiralées utérines correspondant aux connexions vasculaires principales des unités fœto-placentaires. La mesure de la dilatation des artères a été réalisée à J10 à partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun), de 2 unités fœto-placentaires par souris pour lesquelles ont été colorées à l'hémalun-éosine 4 coupes par unité. La mesure est effectuée sur 10 artères spiralées par coupe (**Figure 24a**). Nos résultats montrent une dilatation significative (diminution du diamètre total / diamètre de la lumière,  $p < 0,05$ ) des artères spiralées des souris infectées ( $1,62 \pm 0,06$ ) par rapport aux souris non infectées ( $1,49 \pm 0,03$ ) (**Figure 24b**). Ces résultats montrent que l'infection par *T. gondii* s'accompagne d'une vasodilatation des artères spiralées au cours des phénomènes de résorptions observés.



**Figure 24.** Artères spiralées colorées à l'hémalum-éosine à J10 (a) et mesure de leur dilatation (b). L'infection par *T. gondii* induit une vasodilatation des artères spiralées utérines. \* :  $p < 0,05$ .

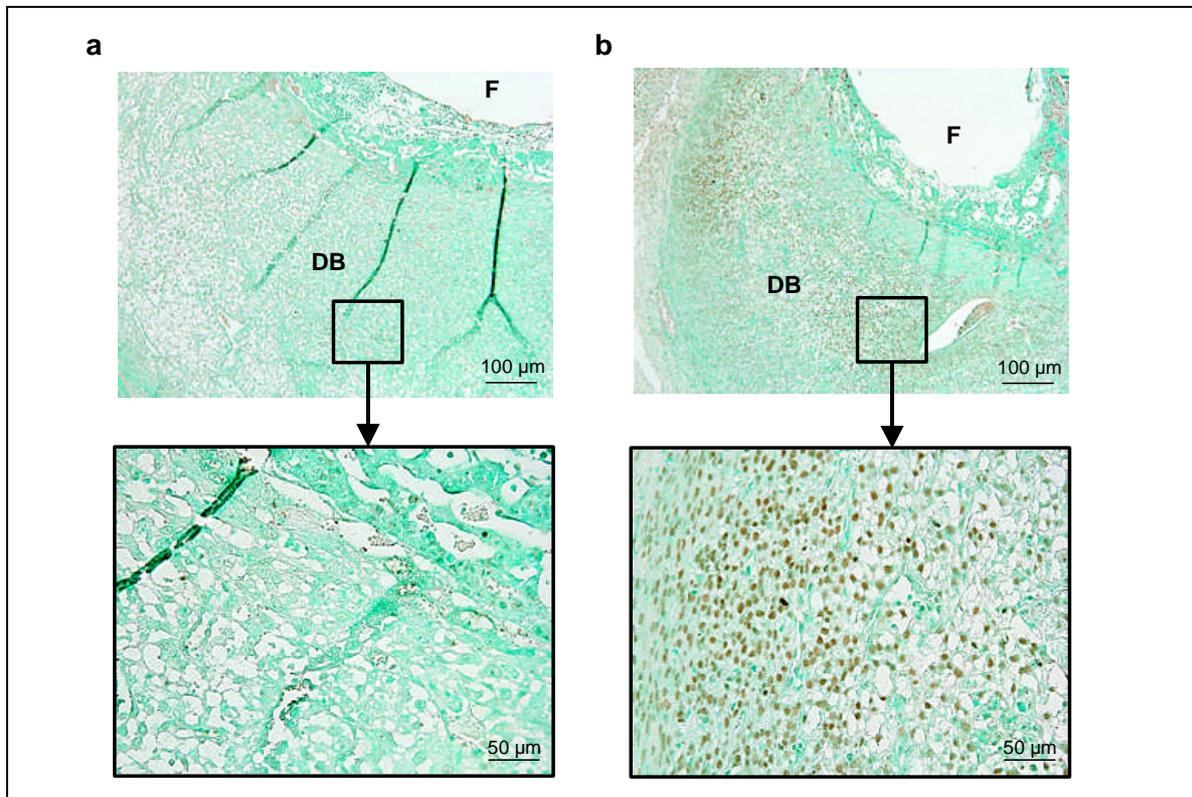
### 1.5. Apoptose des cellules placentaires et implication de la voie mitochondriale

L'analyse histologique à J10 des coupes colorées à l'hémalum-éosine met en évidence la présence de nombreuses cellules de la *decidua basalis* présentant une fragmentation nucléaire évoquant un mécanisme apoptotique chez les souris infectées (**Figure 25**).



**Figure 25.** Unité fœto-placentaire infectée colorée à l'hémalum-éosine et grossissement permettant d'observer la fragmentation nucléaire localisée dans la *decidua basalis*. Les flèches noires mettent en évidence deux cellules présentant une fragmentation nucléaire. F : fœtus, DB : *decidua basalis*.

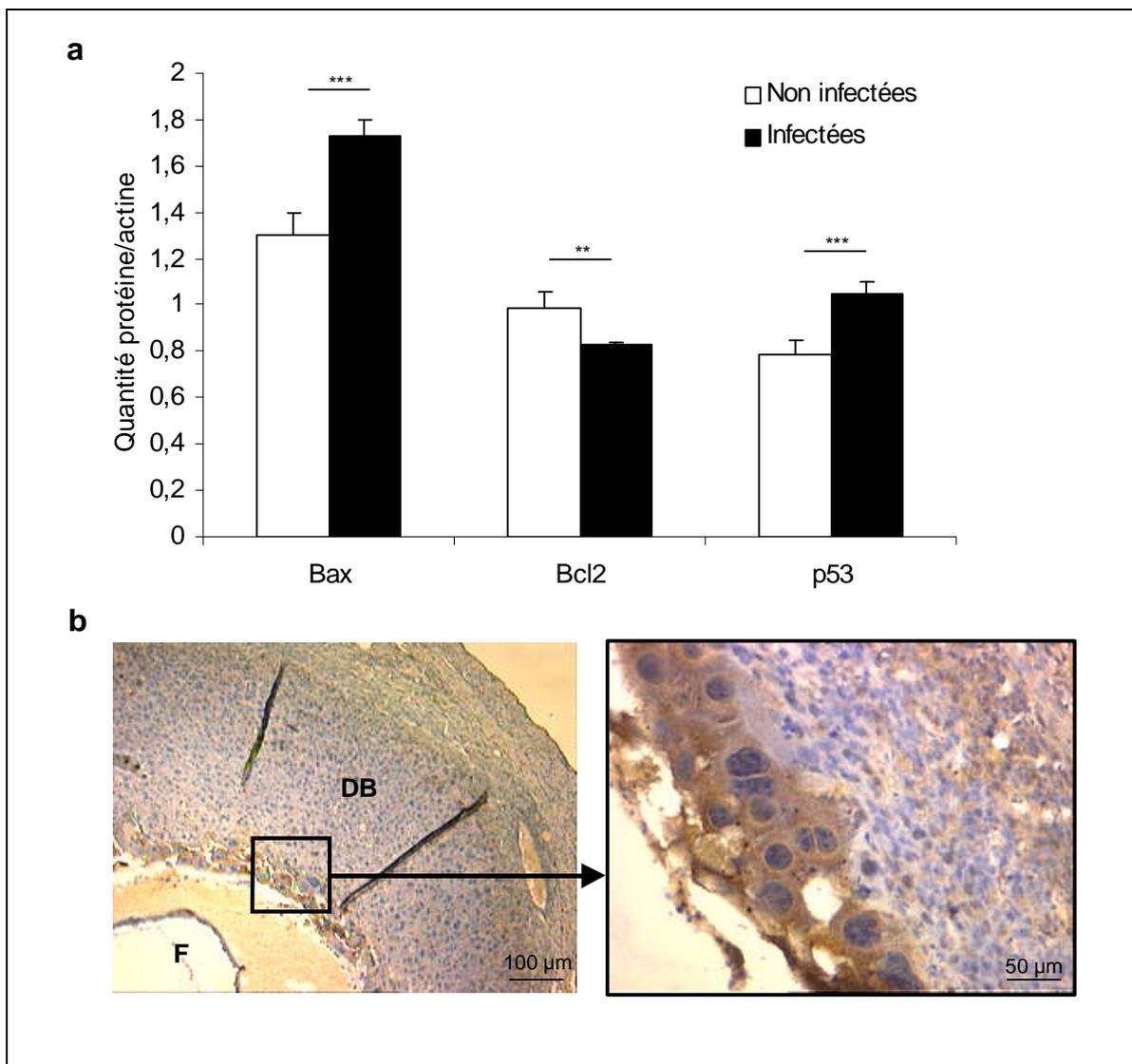
Pour confirmer ces observations, nous avons réalisé un marquage TUNEL des cellules apoptotiques. Ce marquage, effectué à J8 et J10 à partir de 4 souris par groupe (constitué de 24 souris chacun), de 2 unités fœto-placentaires par souris pour lesquelles 4 coupes par unité ont été colorées, ne permet pas d'observer de cellules apoptotiques à J8 chez les souris infectées et non infectées (résultats non montrés). En revanche, nous notons à J10 la présence d'un nombre important de cellules placentaires apoptotiques dans la *decidua basalis* mais également dans le placenta en formation au sein des unités infectées et résorbées, apoptose qui n'est pas retrouvée chez les souris non infectées à ce temps d'analyse. Ces cellules correspondent notamment aux cellules géantes, aux trophoblastes du cône ectoplacentaire et aux cellules uNK. De nombreux autres types cellulaires indéterminés de la *decidua basalis* sont également marqués (**Figure 26**).



**Figure 26.** Marquage TUNEL à J10 des unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b). L'infection par *T. gondii* induit une apoptose des cellules placentaires notamment des cellules de la *decidua basalis* (uNK) mais également les cellules trophoblastiques géantes et du cône ectoplacentaire dans les unités fœto-placentaires résorbées. F : fœtus, DB : *decidua basalis*.

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose placentaire observée chez les souris infectées, nous avons quantifié à J8 et J10 l'expression placentaire des protéines Bax pro-apoptotique, Bcl2 anti-apoptotique et p53, modulateur de l'apoptose, par Western Blot à partir de 3 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun) et 6

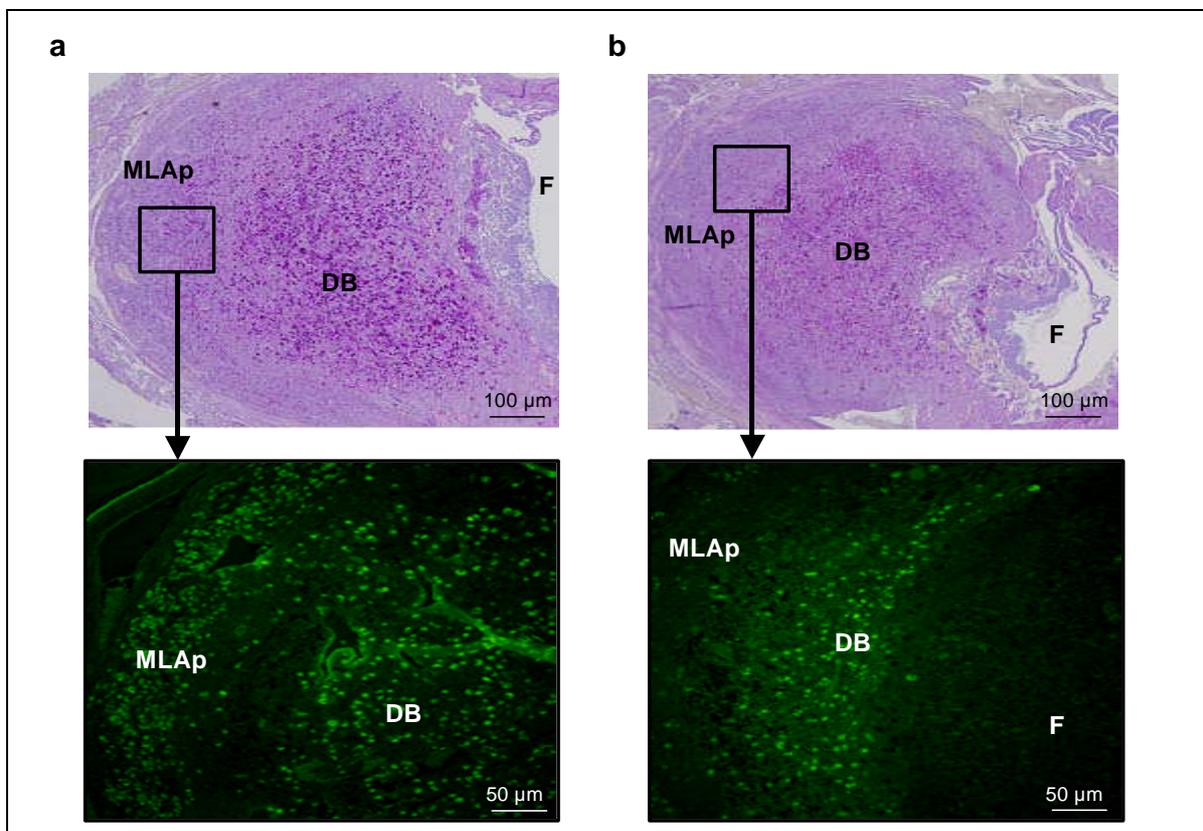
unités fœto-placentaires par souris (**Figure 27a**). Cette analyse ne montre aucune différence à J10 entre les souris infectées et non infectées (résultats non montrés). En revanche, nous mettons en évidence à J8 une augmentation significative de 39,3 % ( $p < 0,005$ ) et de 33,3% ( $p < 0,001$ ) de l'expression de la protéine Bax et p53 respectivement dans les unités fœto-placentaires infectées par rapport au témoin ainsi qu'une diminution significative de 27,3 % de l'expression de la protéine Bcl2 ( $p < 0,05$ ). L'apoptose observée par immunohistochimie à J10 lors de l'infection est en partie induite par une dérégulation de la voie mitochondriale. Parallèlement, nous avons réalisé un marquage de la protéine Bax afin de déterminer les types cellulaires subissant ces dérégulations. Nos résultats mettent en évidence la production de cette protéine notamment par les cellules géantes trophoblastiques (**Figure 27b**).



**Figure 27.** Quantification de l'expression placentaire à J10 des protéines Bax, p53 et Bcl2 (**a**) et marquage de la protéine Bax dans les unités fœto-placentaires infectées (**b**). L'infection par *T. gondii* induit une augmentation des protéines Bax et p53 ainsi qu'une diminution de l'expression de la protéine Bcl2 dans les unités fœto-placentaires résorbées. La sur-expression de Bax est notamment observée dans les cellules trophoblastiques géantes. \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,005$ .

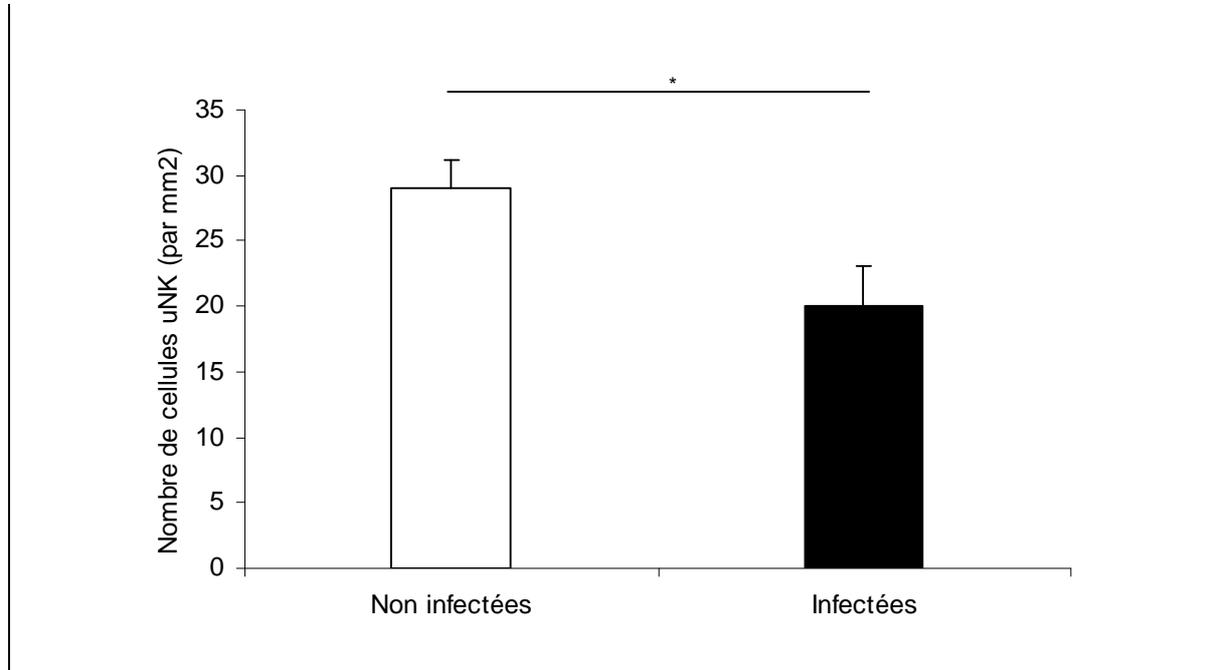
### 1.6. Diminution du nombre de cellules uNK dans les unités infectées

Les cellules uNK ayant un rôle majeur dans les modifications des artères spiralées lors d'une gestation, nous avons étudié leur présence par un marquage au PAS (**Figure 28a**) pour les cellules uNK matures granulaires de la *decidua basalis* (permettant également d'effectuer une quantification de la densité de ces cellules par mm<sup>2</sup>) ainsi qu'un marquage à la DBA-lectin (**Figure 28b**) pour les cellules uNK immatures agranulaires localisées dans la MLAp. Ces analyses ont été réalisées à J8 et J10 partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun), de 2 unités fœto-placentaires par souris sur lesquelles 4 coupes par unité ont été réalisées. Nous n'observons aucune modification à J8 du nombre de cellules uNK entre les 2 groupes (résultats non montrés).



**Figure 28.** Marquages PAS et DBA-lectin des cellules uNK à J10 à partir d'unités fœto-placentaires non infectées (a) et infectées (b). L'encart correspond à un marquage à la DBA-lectin permettant de visualiser les cellules uNK immatures de la Mesometrial Lymphoid Aggregates of pregnancy (MLAp). F : fœtus, DB : *decidua basalis*.

En revanche, nous observons à J10 une diminution significative du nombre de cellules uNK dans les unités fœto-placentaires infectées ( $20 \pm 3$  uNK/mm<sup>2</sup>) par rapport aux non infectées ( $29 \pm 2$  uNK/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ) à la fois dans la *decidua basalis* (**Figure 29**) mais également au niveau de la Mesometrial Lymphoid Aggregates of pregnancy (MLAp).



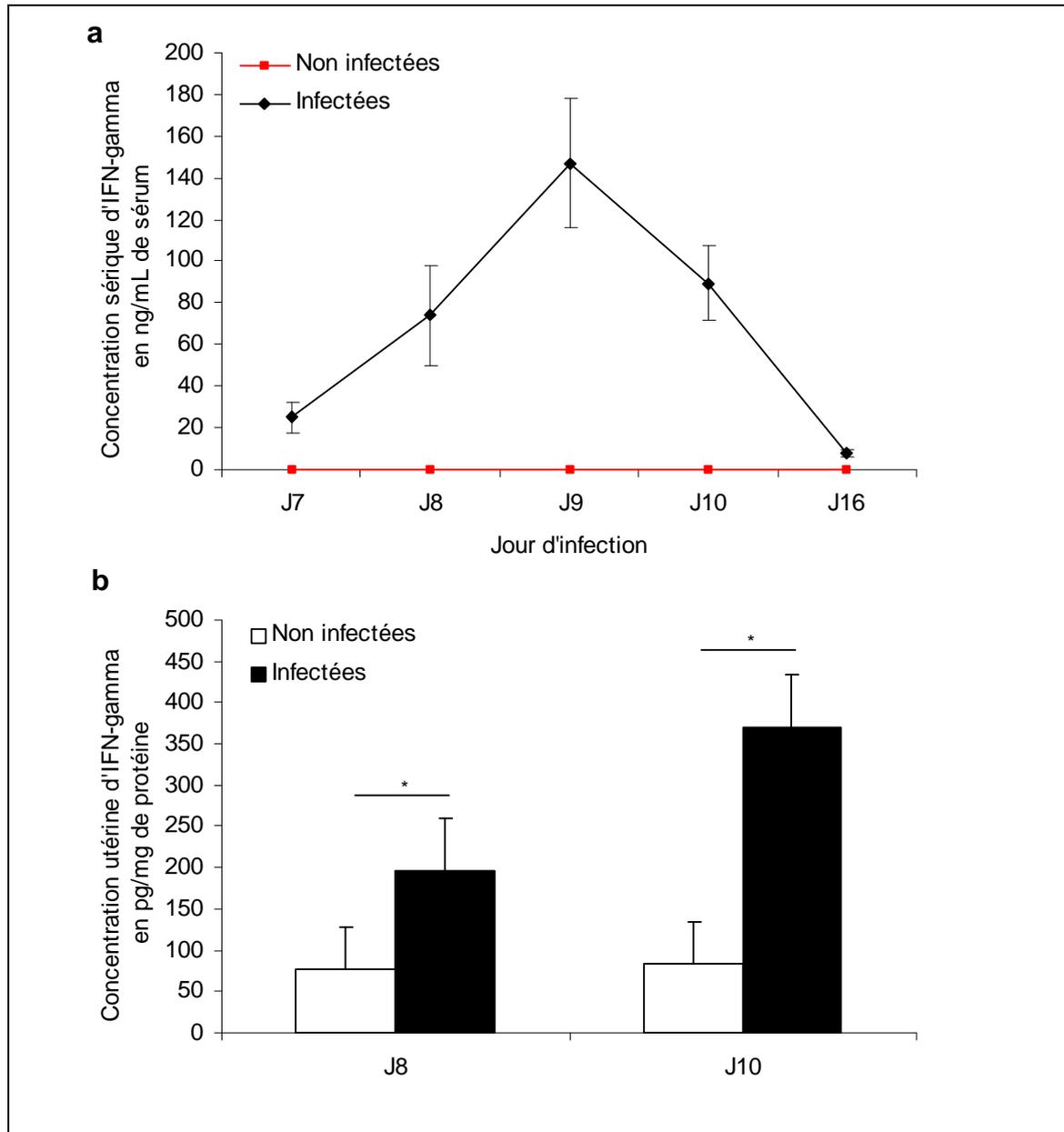
**Figure 29.** Quantification du nombre de cellules uNK matures de la *decidua basalis* à partir d'une coloration hémalun-éosine. L'infection par *T. gondii* induit une diminution significative du nombre de cellules uNK. \* :  $p < 0,05$ .

## 1.7. Analyse de la réponse de type Th1 maternelle et fœto-placentaire lors de l'infection

### 1.7.1. L'IFN- $\gamma$ : cytokine Th1 majeure produite lors de l'infection

L'IFN- $\gamma$  joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire protectrice anti-*T. gondii*. Cependant, la production de cette cytokine et du TNF- $\alpha$  au niveau placentaire semble impliquée dans les mécanismes de résorptions non infectieuses chez la souris. De plus, une réponse immunitaire de type Th2 placentaire est nécessaire au maintien de la gestation. Nous avons exploré les réponses Th1 et Th2 dans le sang maternel et dans les unités fœto-placentaires de 8 souris par groupe (constitué de 24 souris chacun) par un dosage ELISA des cytokines de type Th1 (IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) et de type Th2 (IL-4 et IL-10). Les dosages ont été réalisés dans 2 expériences pour l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- $\alpha$  et 4 expériences pour l'IFN- $\gamma$ . Les résultats présentés correspondent à ceux d'une expérience représentative. Nos résultats n'ont pas montré de différence significative de production d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10 et

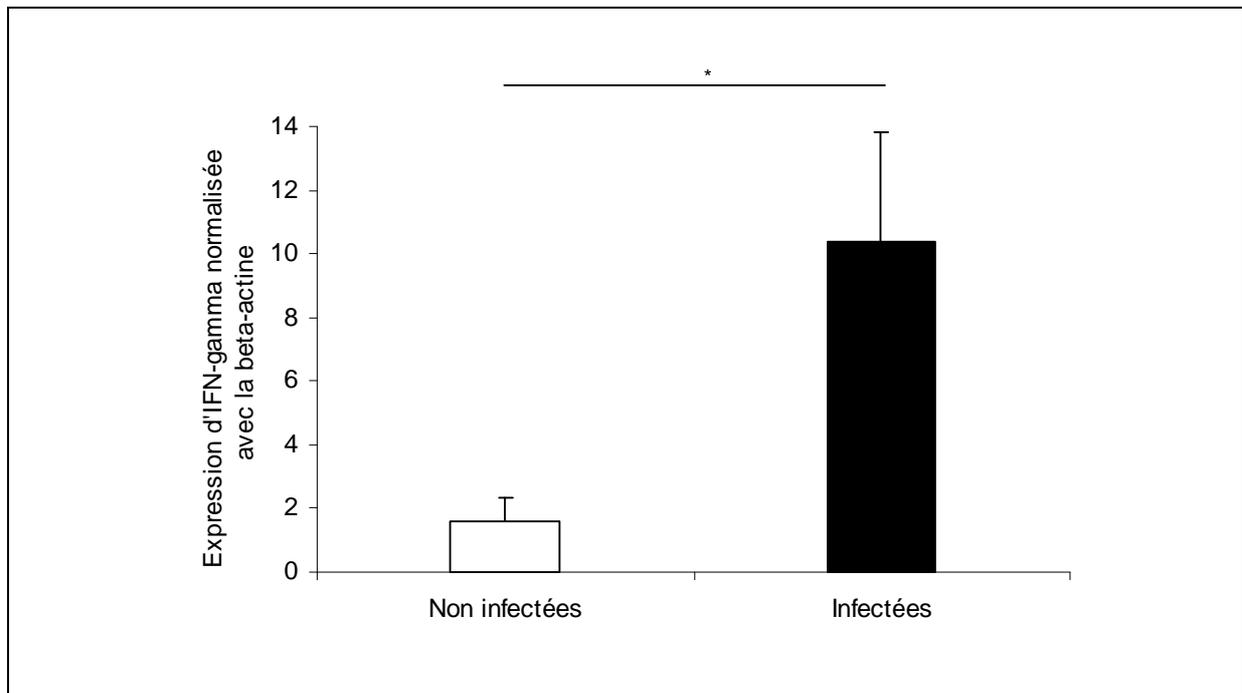
de TNF- $\alpha$  à J8 et J10 entre les groupes de souris infectées et non infectées. En revanche, nous observons lors de l'infection une augmentation significative à partir de J7 de la production sérique d'IFN- $\gamma$  avec un pic de production à J9 ( $147 \pm 31$  ng/mL) (**Figure 30a**) ainsi qu'une augmentation significative utérine à partir de J8 ( $196 \pm 35$  vs  $77 \pm 27$  pg/mg de protéine,  $p < 0,05$ ) avec un pic à J10 ( $371 \pm 63$  vs  $84 \pm 51$  pg/mg de protéine,  $p < 0,05$ ) (**Figure 30b**).



**Figure 30.** Cinétique de production sérique et utérine de l'IFN- $\gamma$ . L'infection par *T. gondii* induit une production sérique d'IFN- $\gamma$  dont le pic se situe à J9 ainsi qu'une augmentation de la concentration utérine. \* :  $p < 0,05$ .

### 1.7.2. Production utérine des ARNm codant l'IFN- $\gamma$

Le dosage de l'ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  par RT-PCR quantitative à J10 réalisé à partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun) et sur 2 unités fœto-placentaires par souris montre une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'expression de ce messager au cours de l'infection dans les unités fœto-placentaires infectées ( $1,6 \pm 0,75$ ) par rapport aux non infectées ( $10,4 \pm 3,38$ ) (**Figure 31**).



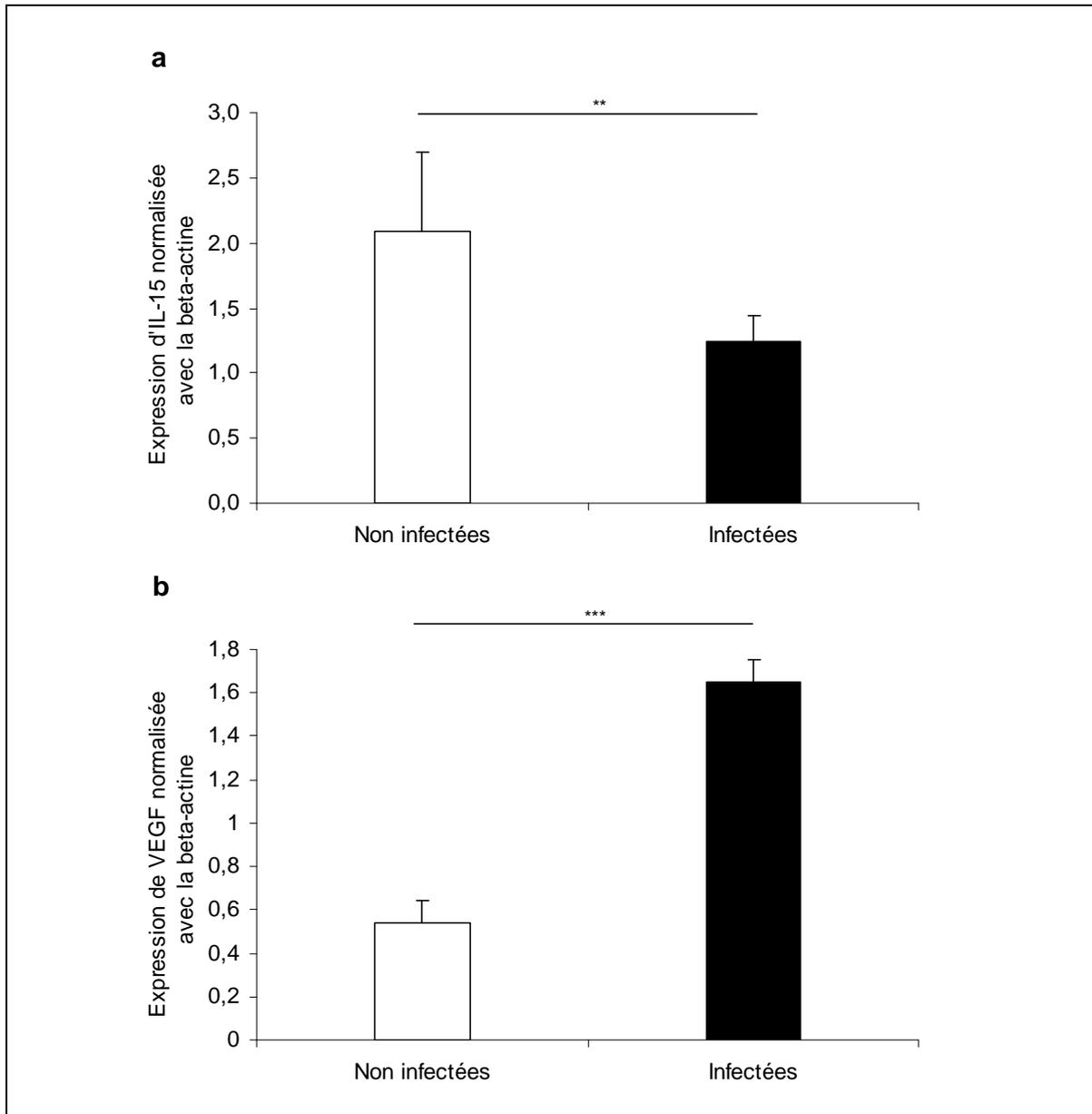
**Figure 31.** Production utérine à J10 des ARNm codant l'IFN- $\gamma$ . L'infection par *T. gondii* induit une augmentation de la synthèse des ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  dans les unités fœto-placentaires résorbés. \* :  $p < 0,05$ .

### 1.7.3. Production placentaire d'IL-15 et du VEGF

Nos premiers résultats ont montré une diminution du nombre de cellules uNK matures au sein des unités fœto-placentaires résorbées. Il est établi que la différenciation de ces cellules est sous le contrôle de l'IL-15 produite au niveau utérin par les cellules stromales et les M $\Phi$ . Nous avons donc étudié l'expression des ARNm codant pour l'IL-15 par un dosage par RT-PCR quantitative à J10 réalisé à partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun) et sur 2 unités fœto-placentaires par souris. Nos résultats montrent une diminution significative des transcrits de l'IL-15 au cours de l'infection ( $2,09 \pm 0,6$  vs  $1,24 \pm 0,2$ ,  $p < 0,01$ ) (**Figure 32a**).

De plus, nos premiers résultats ont mis en évidence l'apparition d'hémorragies placentaires lors de l'infection. Les cellules uNK, avec les trophoblastes, représentent la source principale de VEGF utérin, facteur de croissance qui joue un rôle majeur dans les

processus de néo-vascularisation utérine essentiels au maintien de la gestation. Nous avons donc étudié l'expression utérine des ARNm codant pour le VEGF par un dosage à J10 réalisé sur les mêmes prélèvements que précédemment. Nous avons mis en évidence une augmentation significative ( $p < 0,005$ ) des ARNm codant pour le VEGF dans les unités fœto-placentaires infectées ( $5,4 \pm 0,1$ ) par rapport aux non infectées ( $1,65 \pm 0,1$ ) (**Figure 32b**).



**Figure 32.** Production utérine à J10 des ARNm codant l'IL-15 (a) et le VEGF (b). L'infection par *T. gondii* induit une diminution de la synthèse utérine des ARNm codant pour l'IL-15 ainsi qu'une augmentation de la production utérine des ARNm codant pour le VEGF. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,005$ .

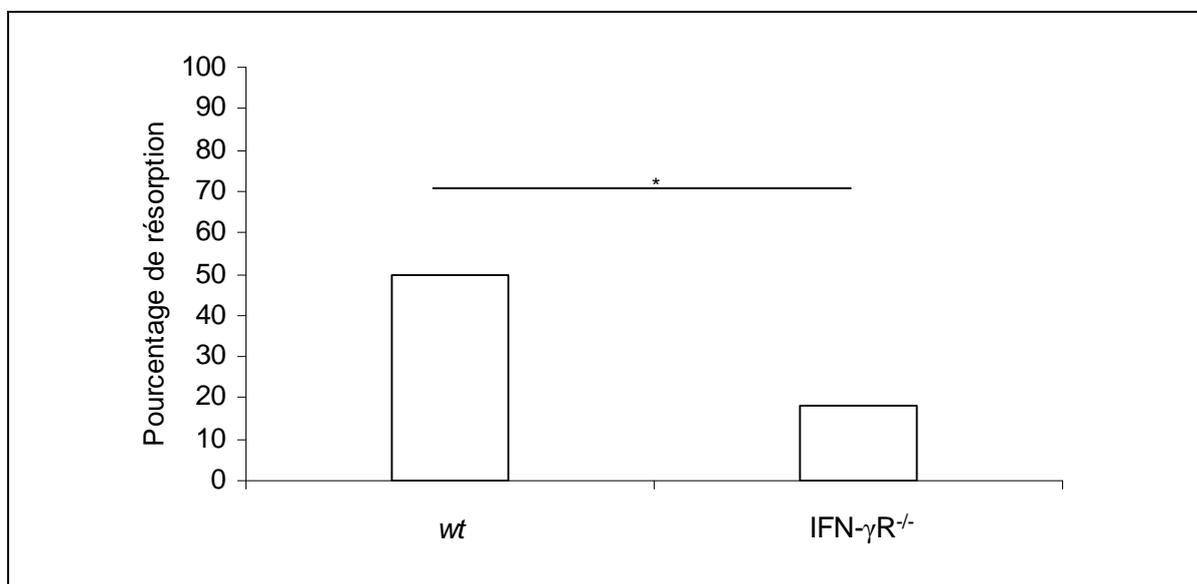
L'ensemble des résultats obtenus dans notre modèle Swiss d'infection précoce indique que *T. gondii* induit des résorptions par une action indirecte dont les mécanismes pourraient impliquer différents acteurs. D'une part, nous avons pu observer lors de l'infection une dérégulation des processus vasculaires à la fois par l'observation d'hémorragies dans les unités fœto-placentaires résorbées mais également par la dilatation des artères spiralées et l'augmentation de production de VEGF. De plus, nous avons mis en évidence une apoptose massive des cellules utérines, apoptose qui est accompagnée d'une diminution du nombre de cellules uNK mais également d'une diminution du cône ectoplacentaire, correspondant au futur placenta. Tous ces phénomènes étant associés à une forte réponse inflammatoire induite par l'infection et en particulier une production sérique et utérine d'IFN- $\gamma$ .

## 2. ROLE DE L'IFN- $\gamma$ DANS LES PROCESSUS ABORTIFS INDUITS LORS DE L'INFECTION PAR *T. GONDII*

Pour confirmer le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les mécanismes abortifs observés au cours de l'infection précoce par *T. gondii*, nous avons effectué le même travail que précédemment dans un modèle de souris sv129 invalidées pour le récepteur codant par l'IFN- $\gamma$  (souris nommées IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>).

### 2.1. Diminution du pourcentage de résorptions chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées

Les analyses sont effectuées à J10 de gestation sur 24 souris par groupe, 4 groupes étant analysés : souris sv129 sauvages (*wt*) infectées et non infectées et souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées et non infectées. Les résultats correspondent à une expérience représentative sur 3 expériences réalisées. Les souris non infectées ne présentent pas de résorption tout comme observé chez les souris Swiss. L'infection par *T. gondii* dans ce modèle induit 55,7 % de résorption à J10 chez les souris sv129 *wt*. Ce pourcentage diminue significativement chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées (27,3 %,  $p < 0,05$ ) (**Figure 33**) et mettent en évidence le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les résorptions observées.



**Figure 33.** Pourcentage de résorptions à J10 dans le modèle de souris sv129. L'infection par *T. gondii* induit des résorptions chez les souris sv129 sauvages dont le pourcentage est significativement diminué chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>. \* :  $p < 0,05$ .

## 2.2. Augmentation de la charge parasitaire maternelle et utérine chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées

Nous observons à J10 une augmentation significative de la charge parasitaire par PCR quantitative chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *wt* infectées. Le nombre de parasites est multiplié par 88 dans le sang maternel et par 36 dans les unités fœto-placentaires ( $p < 0,05$ ) (**Tableau 11**). Ces résultats confirment que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle essentiel dans le contrôle de la réplication du parasite. Toutefois, les mécanismes de résorption sont indépendants de la prolifération utérine de *T. gondii*.

**Tableau 12.** Quantification sérique et placentaire de *T. gondii* chez les souris sv129. \* :  $p < 0,05$ . *wt* : souris sauvages. n : nombre d'échantillon étudié.

	Charge parasitaire	
	Sérique (/mL de sang)	Placentaire (/mg de tissu)
<i>wt</i>	312 ± 50 (n = 6)	2 ± 0.4 (n = 18)
IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup>	27462 ± 5568* (n = 14)	72 ± 21* (n = 28)

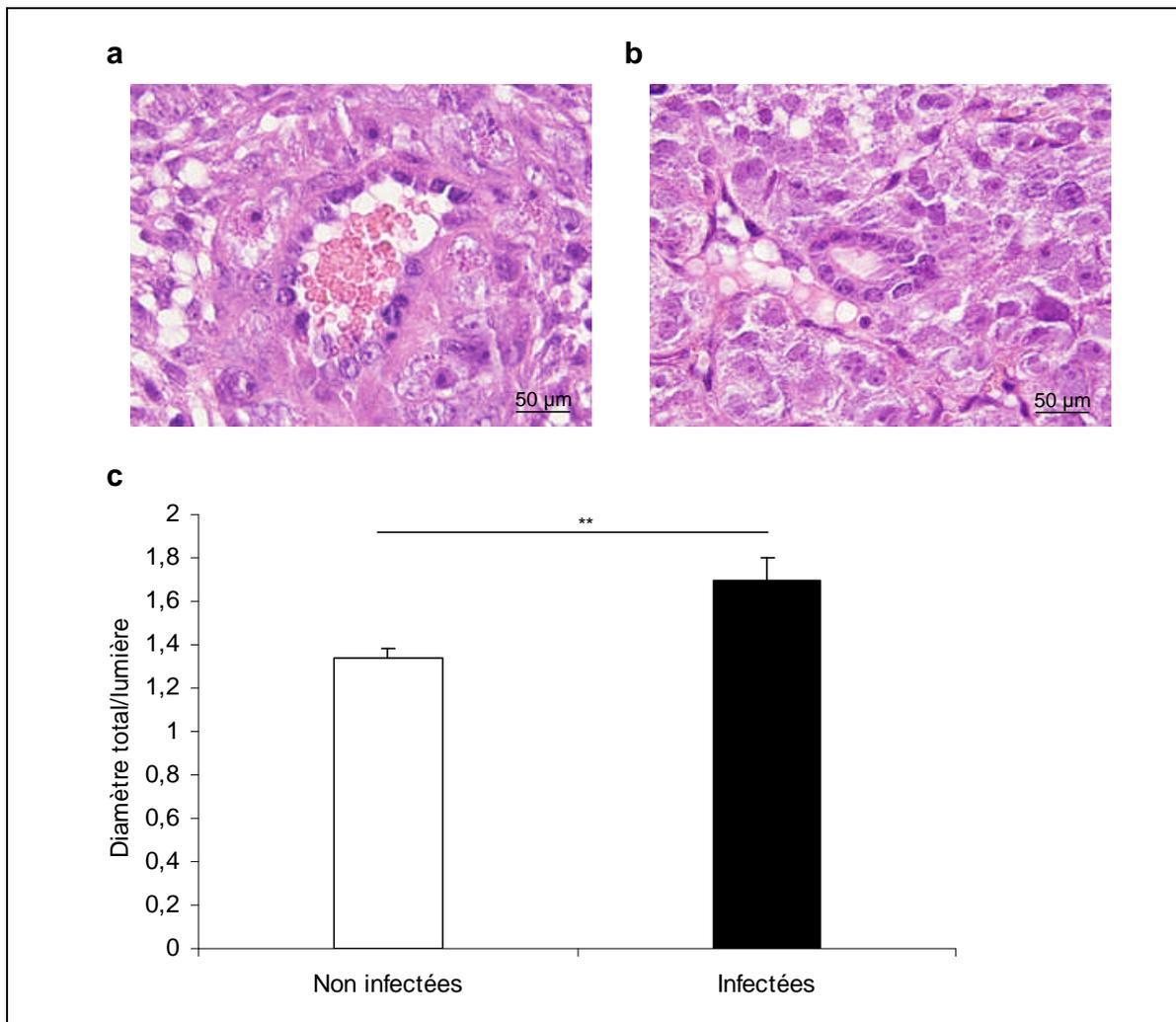
Les résultats obtenus concernant les souris sv129 *wt* étant comparables à ceux obtenus chez les souris non congéniques Swiss, la suite de notre travail s'est focalisé sur les mécanismes de résorption et le rôle de l'IFN- $\gamma$  par la comparaison des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées et non infectées.

## 2.3. Absence d'hémorragies et de décollements placentaires chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées

L'infection par *T. gondii* des souris Swiss a montré l'apparition d'hémorragies associées à des décollements placentaires ainsi qu'une très nette diminution du cône ectoplacentaire dans les unités fœto-placentaires résorbées, correspondant à une inhibition de la formation du placenta, est observée. En revanche, cette analyse histologique par coloration hémalum-éosine réalisée sur des unités fœto-placentaires de souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées ne montre ni hémorragies ni décollements placentaires, ni diminution du cône ectoplacentaire. L'IFN- $\gamma$  produit en réponse à l'infection par *T. gondii* joue donc un rôle dans la mise en place des processus hémorragiques et dans l'inhibition du développement placentaire.

## 2.4. Absence de la dilatation des artères spiralées chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées

Les unités fœto-placentaires résorbées chez les souris Swiss infectées présentaient une vasodilatation des artères spiralées utérines que l'on suppose à l'origine des anomalies vasculaires observées. L'absence d'hémorragies chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées s'accompagne d'une morphologie différente des artères spiralées par rapport aux souris Swiss (**Figure 34a et 34b**). En effet, la paroi musculaire de ces artères chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> est plus épaisse que celle des souris Swiss.



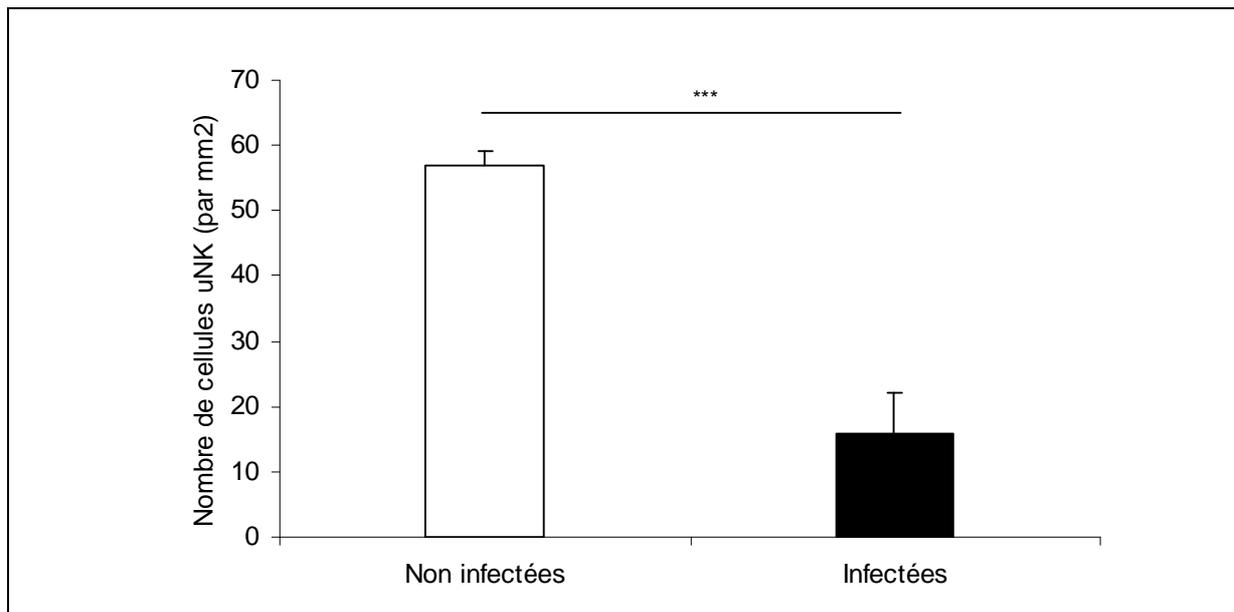
**Figure 34.** Artères spiralées colorées à l'hémalun-éosine à J10 d'une souris Swiss (a) et d'une souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> (b) et mesure de la dilatation des artères entre souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées et non infectées (c). L'infection par *T. gondii* chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> induit une vasoconstriction significative des artères spiralées. \*\*:  $p < 0,01$ .

De plus, la mesure de la dilatation des artères spiralées réalisée à partir de 4 souris gestantes par groupe (constitué de 24 souris chacun), de 2 unités fœto-placentaires par souris à partir desquelles 4 coupes par unité ont été colorées à l'hémalun-éosine et sur lesquelles 10

artères spiralées par coupes ont été mesurées, montre une vasoconstriction des artères spiralées chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  ( $1,624 \pm 0,06$ ) par rapport aux souris non infectées ( $1,485 \pm 0,03$ ) (**Figure 34c**). Ces résultats montrent l'implication de l' $\text{IFN-}\gamma$  à la fois dans les modifications des artères spiralées en dehors du contexte infectieux ainsi que lors de l'infection par *T. gondii*.

## 2.5. Diminution du nombre de cellules uNK dans les unités fœto-placentaires chez les souris $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ infectées

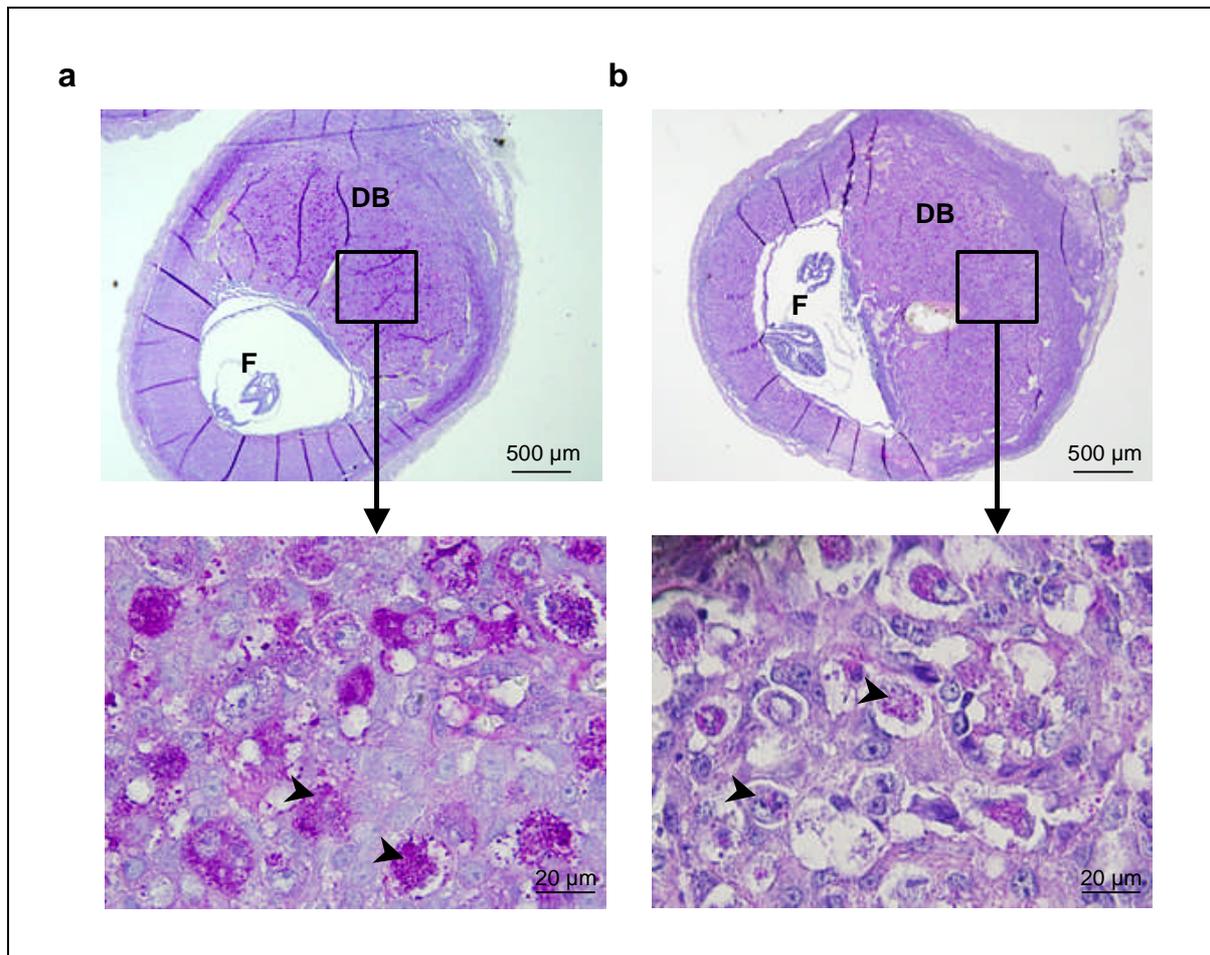
Nous avons observé à J10 une diminution du nombre de cellules uNK dans les unités fœto-placentaires des souris Swiss infectées et résorbées. L'analyse de ces cellules chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  réalisée à partir de 4 souris par groupe, de 2 unités fœto-placentaires par souris et sur 4 coupes par unité, montrent également une diminution significative du nombre de cellules uNK à J10 dans les unités fœto-placentaires infectées ( $16 \pm 6 \text{ uNK/mm}^2$ ), par rapport aux unités non infectées ( $57 \pm 2 \text{ uNK/mm}^2$ ,  $p < 0,05$ ) dans la *decidua basalis* (**Figure 35**).



**Figure 35.** Quantification à J10 du nombre de cellules uNK matures dans la *decidua basalis* chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  infectées et non infectées. L'infection par *T. gondii* chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  induit une diminution significative du nombre de cellules uNK matures. \*\*\* :  $p < 0,005$ .

La diminution du nombre de cellules uNK est deux fois plus importante que celle observée dans le modèle Swiss. Ce résultat suggère que l' $\text{IFN-}\gamma$  ne joue pas un rôle essentiel dans la diminution du nombre de cellule uNK et que la diminution de ces cellules n'est probablement pas impliquée dans les mécanismes de résorptions observés.

Par ailleurs, la morphologie des cellules uNK matures marquées par coloration PAS chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  est différente de celle observée chez les souris *sv129 wt* et les souris Swiss (**Figure 36a**). En effet, une diminution de la taille de ces cellules ainsi que du nombre de granules intra-cytoplasmiques est observés chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  (**Figure 36b**). L'IFN- $\gamma$  pourrait donc avoir une action dans le processus de maturation de ces cellules.



**Figure 36.** Unités foeto-placentaires d'une souris Swiss (a) et  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  (b) colorées au PAS à J10. La morphologie des cellules uNK varie chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  par rapport aux souris Swiss. Elles possèdent une taille réduite ainsi qu'un nombre limité de granules intra-cytoplasmiques. La morphologie des cellules des souris *wt* est identique à celle des souris Swiss. F : fœtus, DB : *decidua basalis*

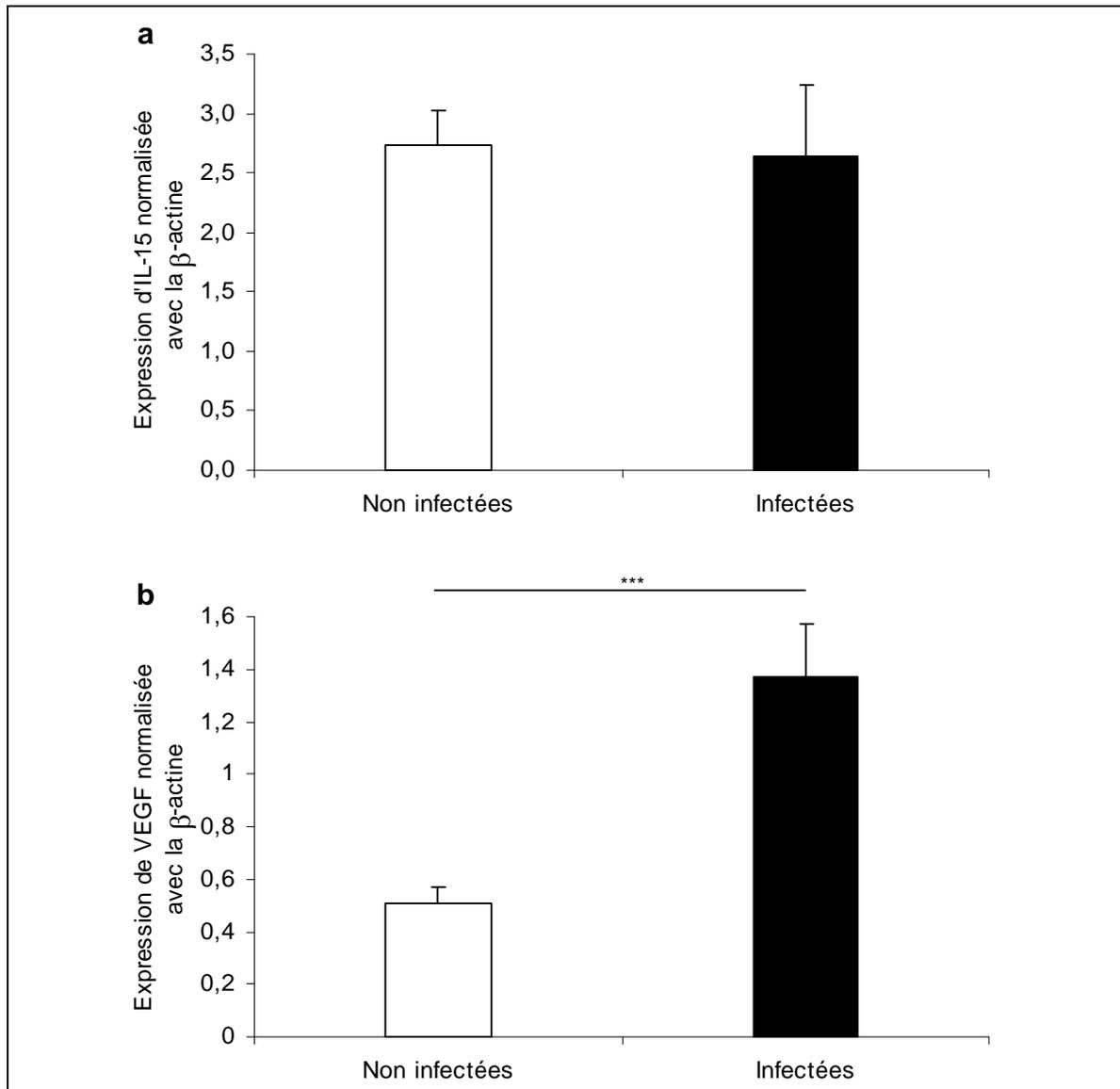
## 2.6. Absence d'apoptose dans les unités foeto-placentaires des souris $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ infectées

Nous avons observé, dans le modèle de souris Swiss, une apoptose des cellules placentaires lors de l'infection dans les unités résorbées. Afin d'étudier l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans la mise en place de ce phénomène, nous avons effectué un marquage TUNEL chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  à partir de 4 souris par groupe, de 2 unités foeto-placentaires par

souris et sur 4 coupes par unité. Nos résultats ne montrent aucune cellule apoptotique à J10 entre les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  non infectées et infectées (résultats non montrés). L'IFN- $\gamma$  semblerait être un des acteurs principal impliqué dans l'apoptose des cellules utérines lors de l'infection observée chez les souris Swiss et cette apoptose, être un des mécanismes mis en jeu lors des résorptions.

### **2.7. Rétablissement de la production des ARNm placentaires codant l'IL-15 chez les souris $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$**

Nos résultats dans le modèle de souris Swiss ont montré à J10 une diminution significative du nombre d'ARNm codant pour l'IL-15 ainsi qu'une augmentation significative des ARNm codant le VEGF. Nous avons quantifié, par RT-PCR quantitative, à partir de 4 souris par groupe et sur 2 unités fœto-placentaires par souris, la production de ces messagers chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$ . Nos résultats montrent d'une part, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la quantité d'ARNm codant le VEGF chez les souris infectées ( $0,051 \pm 0,06$ ) par rapport aux souris non infectées ( $0,136 \pm 0,2$ ) (**Figure 37a**) et d'autre part aucune différence significative de production des ARNm codant l'IL-15 entre les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  infectées et non infectées (**Figure 37b**). Nos résultats montrent que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-15 mais pas dans celle du VEGF et que la diminution de la production d'IL-15 semble intervenir dans les mécanismes de résorption observées chez les souris Swiss.



**Figure 37.** Production utérine à J10 chez les souris  $\text{IFN-}\gamma\text{R}^{-/-}$  des ARNm codant le VEGF (a) et l'IL-15 (b). L'infection par *T. gondii* chez ces souris n'induit pas de variation de synthèse des ARNm codant pour l'IL-15. En revanche, nous observons une augmentation significative de la production des transcrits codant pour le VEGF. \*\*\* :  $p < 0,005$ .

# Discussion

## **Discussion**

### Mise en place d'un modèle infectieux d'avortement induit par *T. gondii*

Ce travail, réalisé dans le cadre d'une infection par *T. gondii*, avait pour objectif d'étudier les mécanismes à l'origine des avortements spontanés observés lors de cette infection.

Deux modèles murins ont été analysés dans ce travail et leur choix a été orienté en grande partie par les mécanismes physiopathologiques de la toxoplasmose. Le premier modèle d'infection abortive que nous avons établi devait répondre à plusieurs exigences : i) l'emploi de souris non congéniques Swiss afin de minimiser l'influence du fond génétique de la souris sur les effets observés avec comme corollaire une grande variabilité inter-individuelle rendant les résultats plus difficiles à interpréter, ii) l'utilisation d'une souche avirulente (type II) correspondant au type le plus fréquemment retrouvé lors de toxoplasmose congénitale humaine (Ajzenberg *et al.*, 2002) et entraînant un minimum de conséquences sur la santé maternelle. En effet, il a été observé que l'altération de l'état de la mère lors de l'infection par *P. falciparum* entraîne une fièvre et une anémie à l'origine de retards de croissance intra-utérins voire d'une mortalité fœtale (Steketee *et al.*, 2001), iii) l'infection par *T. gondii* est réalisée au cours de la première semaine de gestation (J1) afin de ne pas interférer sur l'œstrus. En effet, une étude réalisée sur un modèle murin infecté par *T. gondii* avant accouplement a montré que l'infection est caractérisée par l'arrêt du cycle normal d'œstrus, l'atrophie des ovaires, l'altération du développement folliculaire et l'absence de formation du corps jaune (indiquant une absence d'ovulation) (Stahl *et al.*, 1994). De plus, une infection plus tardive ne s'accompagne pas d'avortement comme cela a pu être montré dans l'étude d'Abou-Bacar *et al.* Après infection par *T. gondii* au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de gestation, il n'observe que des atteintes fœtales (Abou-Bacar *et al.*, 2004). Enfin, dans notre modèle, l'infection a été réalisée par voie orale, voie la plus communément impliquée dans la contamination humaine d'origine alimentaire.

L'ensemble de ces critères permet de se rapprocher au mieux des avortements spontanés ayant lieu lors d'infections toxoplasmiques survenant au cours du premier trimestre chez la femme enceinte. Le choix du second modèle de souris congéniques sv129 invalidées pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) a été guidé par les premiers résultats obtenus dans le modèle Swiss suggérant l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans les mécanismes abortifs observés lors de l'infection.

Dans les deux modèles, l'infection précoce par *T. gondii* n'interfère pas avec les mécanismes d'implantation embryonnaire. En effet, nos résultats n'ont pas mis en évidence de différence significative du nombre de fœtus retrouvé chez les souris infectées ou non infectées. En revanche, l'infection induit des résorptions, processus abortif chez la souris, mises en évidence à partir de J8 de gestation chez les souris Swiss et sv129. Les résorptions sont caractérisées par une diminution de la taille des unités fœto-placentaires ainsi que par la présence d'hémorragies.

Le premier mécanisme évoqué à l'origine des résorptions observées est un effet direct de la prolifération de *T. gondii* dans le placenta. En effet, des résultats obtenus dans un modèle d'infection murin par *Trypanosoma cruzi* montre l'apparition d'une mortalité fœtale accompagnée d'une multiplication de ce parasite dans la décidua ainsi qu'une nécrose ischémique placentaire menant à la perte fœtale (Mjihdi *et al.*, 2004). Des résultats similaires dans un modèle d'infection ovine par la bactérie à Gram négatif *Chlamydia abortus* au cours du deuxième trimestre de gestation montrent également l'apparition d'avortements associés à la multiplication de ce microorganisme dans le chorion placentaire, site de production hormonale responsable du maintien de la gestation (Buxton *et al.*, 2002). De plus, un parasite, *Neospora caninum*, apicomplexa phylogénétiquement très proche de *T. gondii*, représentant la source majeure d'avortements chez les ovins et les bovins induit une mort fœtale au début de la gestation directement liée à sa prolifération et associée à des lésions placentaires et fœtales. Dans notre modèle Swiss, nous avons mis en évidence une très faible charge parasitaire associée aux résorptions à J10 de gestation ainsi que l'absence de lyse cellulaire. Ces résultats indiquent que *T. gondii* ne joue probablement pas un rôle direct dans les résorptions et nous ont conduit à rechercher d'autres mécanismes, indirects, pouvant expliquer le processus abortif observé.

La deuxième hypothèse évoquée est un possible déséquilibre de la balance cytokinique placentaire. En effet, plusieurs cytokines sont requises pour l'établissement et le maintien de la gestation et peuvent être perturbées localement ou au niveau systémique en cas d'infection maternelle et entraîner un retard de croissance fœtale ou un avortement (Entrican, 2002). Parmi les cytokines, qui semblent être délétères en cas de production excessive, le TNF- $\alpha$  (responsable de thrombose et d'une contraction des muscles lisses), et l'IFN- $\gamma$ , (habituellement exprimé à des niveaux très bas voire absents dans le placenta), possèdent des propriétés abortogènes. Nos résultats montrent une forte production sérique d'IFN- $\gamma$ , mais

également utérine chez les souris infectées à partir de J8 avec un pic de production à J10 lors de l'infection par *T. gondii* alors que les productions sériques et utérines du TNF- $\alpha$  ne varient pas. Les résultats concernant la production de TNF- $\alpha$  sont à confronter avec ceux obtenus par Mjihdi *et al.* dans un modèle d'infection murin (BALB/c) par *T. cruzi*. Dans ce modèle, les auteurs montrent que la production systémique et placentaire TNF- $\alpha$  en fin de gestation (jour 17-19 de gestation) est à l'origine de la mortalité fœtale observée et non celle d'IFN- $\gamma$  apparaissant vers le jour 9 de gestation (Mjihdi *et al.*, 2004). Nous pouvons également confronter ces résultats avec ceux obtenus dans un modèle d'infection murine (C57BL/6) par *L. major* en début de gestation. Dans ce modèle, la production de cytokines Th1 perturbe l'équilibre cytokinique placentaire nécessaire au bon déroulement de la gestation et provoque une augmentation significative du nombre de résorptions fœtales. Ce phénomène est associé à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  utérins (Krishnan *et al.*, 1996). Dans un autre modèle de résorption fœtale caractérisé par l'accouplement de souris CBA/J  $\times$  DBA/2 dont la différence de fond génétique induit des processus abortifs, les résorptions observées sont attribuées à la production de TNF- $\alpha$  macrophagique qui active les cellules NK produisant de l'IFN- $\gamma$  et exerçant une activité cytotoxique vis-à-vis de l'embryon. Ces activités des cellules NK ont pu être démontrés par leur déplétion provoquant une diminution du taux de résorptions de 50% (Clark *et al.*, 1998).

D'autres travaux dans des modèles d'infection à *N. caninum* partagent l'hypothèse du rôle de la réponse Th1 (avec forte production d'IFN- $\gamma$ ) dans la mort fœtale *in utero* (Maley *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2002).

Afin de confirmer l'hypothèse d'une implication de l'IFN- $\gamma$  dans les résorptions observées, nous avons mis en place un second modèle reprenant le même protocole expérimental et utilisant des souris sv129 congéniques invalidées pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$ . Les premiers résultats obtenus dans ce modèle confirment que l'infection des souris *wt* induit un processus abortif. En effet, elles présentent un taux de résorption équivalent à celui observé chez les souris Swiss. Cette première observation montre que les mécanismes abortifs mis en jeu ne sont pas dépendants du fond génétique de la souche de souris utilisée dans la limite de nos expériences. Par ailleurs, le taux de résorptions diminue de près de 50% chez les souris infectées IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages confirmant le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les processus abortifs observés. Cependant, la persistance d'un certain pourcentage de résorption suggère que d'autres facteurs que l'IFN- $\gamma$  sont impliqués. Parallèlement à cette

diminution du nombre de résorptions chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées, nous observons également une amélioration symptomatique (baisse de la déshydratation et augmentation de la locomotion) chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées qui semblent moins sensibles à l'infection par rapport aux souris sauvages. Paradoxalement, cette amélioration de l'état de santé de la mère est associée à une augmentation significative de la charge parasitaire sérique et utérine. Ces données confirment : (i) l'importance de l'IFN- $\gamma$  dans le contrôle de l'infection par *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1988), (ii) son implication dans les phénomènes immunopathologiques maternels et (iii) l'indépendance des résorptions observées vis-à-vis de la prolifération placentaire de *T. gondii*.

Les mécanismes d'action de l'IFN- $\gamma$  dans la mise en place des processus abortifs ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses ont été avancées, parmi elles, l'existence d'une synergie entre le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . En effet, ces deux cytokines peuvent notamment agir : par un effet toxique direct provoquant l'apoptose des trophoblastes (Yui *et al.*, 1994) ou par l'activation de cellules potentiellement cytotoxiques pour les trophoblastes (M $\Phi$ , cellules uNK ou CTL) (Baines *et al.*, 1997).

### **Implication des cellules uNK dans le processus abortif toxoplasmique**

Dans notre modèle Swiss, les analyses histologiques ont montré la présence d'hémorragies et d'une hypocellularité de la *decidua basalis* associées à une diminution significative du nombre de cellules uNK matures qui pourrait être en partie responsable de ces anomalies. En effet, des études réalisées chez des souris déplétées en cellules uNK (*tge26* et *Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma_c$ <sup>-/-</sup>*) ont montré la présence d'anomalies déciduales dont une hypocellularité marquée accompagnée d'œdèmes et de la perte de l'épaississement mésométrial ainsi que l'absence de modifications des artères spiralées (Croy *et al.*, 2002).

Chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées, le nombre de cellules uNK matures diminue et leur morphologie est anormale (diminution de la taille et du nombre de granules intracytoplasmiques). Cette morphologie a également été observée par Ashkar *et al.* qui a montré que l'IFN- $\gamma$  contrôle la maturation des cellules uNK ainsi que leur sénescence. Dans ce modèle, l'absence des cellules uNK induit des anomalies vasculaires placentaires dont les mécanismes à l'heure actuelle sont encore inconnus. Les auteurs suggèrent, à partir de leurs

données, que les cellules uNK sont essentielles au bon déroulement de la gestation par leur action sur la vascularisation placentaire (Ashkar *et al.*, 2000). Nos données contredisent partiellement cette étude car la quasi-disparition des cellules uNK observée dans notre modèle IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infecté n'est pas accompagnée d'atteintes vasculaires. Nos résultats se rapprochent en revanche de l'étude menée par Barber *et al.* sur les souris Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> qui ont montré que les anomalies vasculaires décrites par Ashkar *et al.* ne sont pas uniformément observées chez ces souris. Ils remettent donc en question la nécessité de ces cellules dans le bon déroulement de la gestation et suggèrent que malgré la présence d'anomalies vasculaires considérables et une décidua pratiquement inexistante, la gestation peut être maintenue.

Cependant, les données précédentes analysent le rôle encore discuté, des cellules uNK hors d'un contexte infectieux. Dans notre étude au cours de l'infection par *T. gondii*, nous observons à la fois une diminution des cellules uNK dans les unités fœto-placentaires résorbées dans le modèle de souris Swiss et une quasi-disparition au sein des unités non résorbées dans le modèle de souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>. Ces données semblent indiquer que la diminution du nombre des cellules uNK ne jouerait pas un rôle majeur dans les mécanismes de résorption observés. Ces résultats sont à confronter avec ceux obtenus dans un modèle de souris déficientes pour l'IL-10 dans lequel l'implication des cellules uNK dans les mécanismes abortifs d'origine inflammatoire (injection de LPS à J6,5 de gestation) a été montré. Dans ce modèle, les auteurs n'observent pas d'augmentation de production d'IFN- $\gamma$  et suggèrent que le TNF- $\alpha$  serait une des cytokines induisant le processus abortif et que la résorption fœtale serait induite par l'activité des cellules uNK (Murphy *et al.*, 2005). Dans une autre étude réalisée par Barber *et al.* dans un modèle murin IL-15<sup>-/-</sup> d'infection à *L. monocytogenes*, la production d'IFN- $\gamma$  placentaire ne varie pas au cours de l'infection. Les auteurs suggèrent à partir de leurs données que les cellules uNK ne représentent pas la source d'IFN- $\gamma$  placentaire et avancent l'hypothèse que ces cellules ne jouent pas un rôle essentiel dans les fonctions placentaires ou la réaction immunitaire face à *L. monocytogenes* (Barber & Pollard, 2003).

Dans notre étude, nos résultats diffèrent. En effet, nous observons une augmentation de la production placentaire d'IFN- $\gamma$  sans modification du TNF- $\alpha$  lors de l'infection. Ces résultats suggèrent que l'infection induirait un processus abortif impliquant d'autres mécanismes que ceux observés par Murphy *et al.* et soulève la question du rôle des cellules uNK dans l'apparition des résorptions. Cependant, le modèle de souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> ne permet

pas de répondre à cette question car les cellules uNK chez ces souris ne peuvent être activées par l'IFN- $\gamma$ . Il serait nécessaire de réaliser une expérience complémentaire de transfert de moelle osseuse de souris sauvages à des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> avant l'accouplement dans notre protocole expérimental afin d'étudier le rôle de l'activation des cellules uNK.

La diminution lors de l'infection du nombre de cellules uNK observée dans le modèle Swiss pourrait être la conséquence d'une diminution de production de l'IL-15. En effet, cette cytokine est essentielle dans la régulation des fonctions des cellules uNK (Ye *et al.*, 1996). Sa présence placentaire chez la souris et la femme semble être limitée à la déciduala suggérant un rôle local dans le développement des cellules uNK (Ashkar *et al.*, 2003). Nous avons ainsi quantifié la production placentaire des ARNm codant l'IL-15 dans notre modèle Swiss. Nos résultats ont mis en évidence dans les unités fœto-placentaire infectées et résorbées une diminution significative de ces ARNm au cours de l'infection suggérant que la diminution des cellules uNK matures observée chez ces souris pourrait être en partie liée à la diminution de l'IL-15 au cours de l'infection.

La même étude réalisée chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> n'a pas mis en évidence de différence de production des transcrits entre les souris infectées et non infectées. Ces données démontrent un rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-15 et suggèrent que la diminution d'IL-15 pourrait être impliquée dans les mécanismes de résorption. En revanche, la diminution du nombre de cellules uNK observées dans les deux modèles de souris infectées ne semble pas être dépendante de la production d'IL-15. Ces résultats sont à confronter avec ceux de Loke *et al.* qui ont montré que la diminution de progestérone, pré-menstruelle ou lors d'un avortement, induit l'apoptose des cellules uNK, conséquence de la diminution de production d'IL-15 (Loke *et al.*, 1995) par les cellules stromales et les M $\Phi$  utérins (Okada *et al.*, 2000). Des données complémentaires concernant la quantification protéique de cette cytokine mais également la production de progestérone sont en cours de réalisation dans nos modèles afin de confirmer l'importance de la production de cette cytokine dans le placenta et d'étudier sa régulation dans un cadre infectieux à l'interface materno-fœtale. En effet, la régulation utérine de l'IL-15 soulève actuellement de nombreuses questions notamment celles sur les conséquences de sa sur- ou sous-production qui pourrait, comme suggéré par Chegini *et al.* (Chegini *et al.*, 2002) être responsable des avortements spontanés récurrents observés chez la femme enceinte.

La diminution du nombre de cellules uNK observée dans le modèle de souris Swiss lors de l'infection pourrait être la conséquence d'une activation de ces cellules par l'IFN- $\gamma$  induisant leur maturation et leur sénescence (hypothèse supportée par les données d'Ashkar *et al.*, 2000). De plus, l'observation d'une apoptose massive des cellules placentaires au sein des unités infectées résorbées, correspondant aux trophoblastes du cône ectoplacentaire (placenta en formation) mais également aux cellules uNK matures, plaide en faveur d'une activation des cellules uNK par l'IFN- $\gamma$ , provoquant probablement une apoptose et/ou une lyse des cellules trophoblastiques portant les allo-antigènes paternels. Par ailleurs, l'absence d'apoptose placentaire chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées montre le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les phénomènes apoptotiques observés lors du processus abortif infectieux. L'absence de cellules apoptotiques chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> infectées conforte l'hypothèse de l'activation par l'IFN- $\gamma$  des cellules uNK qui n'exerceraient pas chez ces souris leurs activités cytotoxiques envers les cellules trophoblastiques.

Bien qu'il n'existe aucune étude similaire à notre travail, certaines études permettent de confirmer notre hypothèse sur le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les mécanismes apoptotiques ainsi que celui de l'apoptose dans les mécanismes abortifs induit par *T. gondii*. Tout d'abord, l'infection par ce parasite induit sur culture primaire de cellules trophoblastiques l'apoptose des cellules non infectées sans pour autant que l'origine de cette apoptose en ait été déterminée (Abbasi *et al.*, 2003). Par ailleurs, les travaux d'Aschkenazi *et al.* montrent que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  augmentent *in vitro* la sensibilité des trophoblastes à l'apoptose en régulant l'expression du système Fas/FasL (Aschkenazi *et al.*, 2002). Ces données sont confirmées par Lee *et al.* qui mettent en évidence *in vitro* que la production d'IFN- $\gamma$  induit une apoptose des trophoblastes et émettent l'hypothèse que ce mécanisme pourrait être à l'origine d'avortements spontanés récurrents chez la femme (Lee *et al.*, 2005). De façon tout à fait intéressante, l'étude de S. Savion *et al.* dans un modèle murin a montré que l'injection de LPS induit des résorptions faisant suite à une apoptose des cellules placentaires accompagnée d'une augmentation de p53 (capable d'induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose incluant le récepteur Fas) et d'une diminution de Bcl2 (Savion *et al.*, 2002). Dans notre étude sur le modèle Swiss, parallèlement à l'augmentation de l'IFN- $\gamma$  placentaire et à l'apoptose observée au sein des unités fœto-placentaires infectées et résorbées, nous observons également une augmentation de production utérine de la protéine p53 et de la protéine Bax accompagnées d'une diminution de production de Bcl2. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits précédemment et confirment également ceux observés dans l'étude

*in vitro* sur des cytotrophoblastes humains en condition d'hypoxie montrant une altération de la production de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et une sur-expression de Bax par les cellules trophoblastiques (Hu *et al.*, 2006).

### **Dérégulations des phénomènes vasculaires placentaires lors de l'infection par *T. gondii* liées au processus abortif**

La présence constante dans le modèle Swiss d'hémorragies associées à des décollements placentaires au cours de l'infection permettent d'évoquer l'hypothèse d'une dérégulation des mécanismes vasculaires placentaires. En effet, l'altération de la vasculogénèse peut jouer un rôle comme cela a pu être montré dans un modèle murin infecté par la bactérie à Gram négatif *Bartonella birtlesii* avant accouplement. Dans ce modèle, des retards de croissance intra-utérins et des résorptions fœtales sont associées à des lésions vasculaires placentaires perturbant probablement les échanges materno-fœtaux (Boulouis *et al.*, 2001). L'absence des décollements placentaires et d'hémorragies chez les souris IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectées indique que l'IFN- $\gamma$  pourrait être impliqué dans les dérégulations vasculaires induites par l'infection. Ces données sont partiellement confirmées par Mullarky *et al.* qui ont démontré dans un modèle murin (C57BL/6) d'infection aiguë par *T. gondii* qu'une forte production d'IFN- $\gamma$  provoque des hémorragies indépendantes du dépôt de fibrine médié par le TNF- $\alpha$  (Mullarky *et al.*, 2006).

Dans notre travail, nous observons une dilatation significative des artères spiralées chez les souris Swiss infectées, dilation non présente chez les souris IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectées. Ces résultats confirment l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans la vasodilatation des artères spiralées et sont en accord avec ceux d'Ashkar *et al.* (Ashkar *et al.*, 2000). De plus, ils permettent d'évoquer le rôle probable de cette dilatation dans l'apparition des hémorragies utérines. Cependant, ces études ne portent sur des modèles infectieux.

Le développement de la vascularisation à l'interface materno-fœtale est nécessaire à la croissance embryonnaire. En effet, une vascularisation placentaire insuffisante conduit à une mortalité fœtale accrue, à une prééclampsie ainsi qu'à des retards de croissance (Red-Horse *et al.*, 2004). L'expression coordonnée de facteurs de croissance angiogéniques tel que le VEGF

et de leurs récepteurs respectifs sur les trophoblastes permet un bon développement placentaire (Lam *et al.*, 2005). Nos résultats montrent une augmentation de la quantité d'ARNm placentaire codant le VEGF lors de l'infection dans le modèle Swiss. Ces données sont confirmées par différentes études qui montrent un lien entre l'inflammation et l'angiogénèse dans certaines pathologies et autres processus infectieux (Girardi *et al.*, 2006). En effet, des médiateurs inflammatoires sont capables de stimuler la production de VEGF et ainsi de favoriser l'angiogénèse pouvant induire des dommages tissulaires.

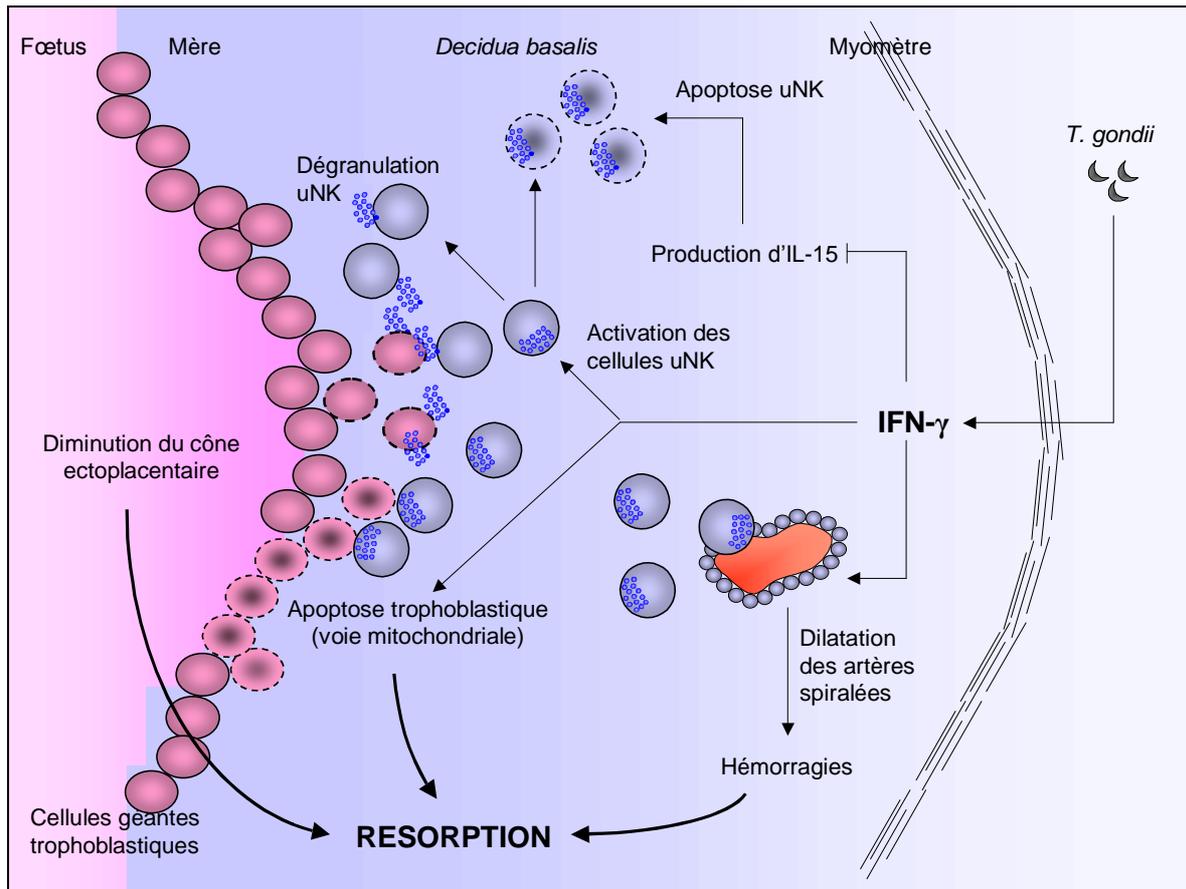
Nous avons également mené cette investigation dans le modèle de souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> afin de vérifier l'existence d'un lien éventuel entre l'IFN- $\gamma$  et le VEGF. En effet, une étude *in vitro* menée sur des trophoblastes extravilloux par Choi *et al.* ont montré que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  étaient capables de réguler la synthèse de VEGF trophoblastique lors du premier trimestre de gestation. De plus, les auteurs ont observé que l'IFN- $\gamma$  était un inducteur puissant du VEGF et que le TNF- $\alpha$  augmentait fortement l'expression des ARNm codant le VEGF (Choi *et al.*, 2002). Nos résultats montrent une augmentation de production des transcrits chez les souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, similaire à celle observée chez les souris Swiss et suggèrent que la production des ARNm du VEGF placentaire est indépendante de la production de l'IFN- $\gamma$  lors de l'infection. Cette sur-expression de VEGF ne semble pas être impliquée dans les mécanismes de résorption observés. Nos résultats sont différents mais s'inscrivent dans un contexte infectieux.

Croy *et al.* ont avancé l'hypothèse que la fonction principale des cellules uNK serait de guider les cellules endothéliales artérielles et lymphatiques, par le biais de la production de VEGF, vers le site d'implantation ou directement vers les trophoblastes, ces derniers synthétisant également du VEGF ce qui renforcerait ce gradient moléculaire (Croy & Xie, 2006). Des études *in vitro* sur les cellules uNK (Mukhtar & Stewart, 1988) ainsi que des études *in vivo* sur d'autres types lymphocytaires (Shakhar *et al.*, 2005) montrent leur forte mobilité et leur réponse aux antigènes et aux molécules chimio-attractives trophoblastiques, ces propriétés les adressant au site d'implantation et s'accompagnant d'un processus de néo-angiogénèse placentaire. La présence des trophoblastes fournirait par ailleurs une deuxième vague de facteurs de croissance pour les cellules uNK, et soutiendrait l'expansion massive de ces cellules. Une fois la circulation placentaire établie (approximativement au jour 9) et entièrement fonctionnelle (environ au jour 10,5), la fonction des cellules uNK ne serait plus exigée ce qui entraînerait leur disparition. Cette hypothèse permet ainsi de trouver une

explication à la position extrêmement localisée des cellules uNK mais également à leur durée de vie limitée. L'ensemble de nos résultats obtenus sur les modèles Swiss et IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> montrant à la fois une quasi-disparition des cellules uNK chez les IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> et le maintien d'une augmentation du VEGF utérin ce qui semble indiquer que les cellules uNK ne représentent pas la source principale de VEGF utérin lors de l'infection.

# Conclusions et Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus dans notre étude nous a permis de mettre en évidence quelques aspects des relations hôte-*T. gondii* à l'interface materno-fœtale. Au cours des premiers jours de gestation, l'infection induit un mécanisme abortif indépendant de la multiplication du parasite dans l'organisme maternel. Les mécanismes impliqués dans ces résorptions sont en revanche dépendants de la production d'IFN- $\gamma$  et liés à l'apparition d'hémorragies, à une vasodilatation des artères spiralées et une dérégulation de la production placentaire d'IL-15. Par ailleurs, les unités résorbées présentent une diminution du nombre de cellules uNK et une apoptose massive des cellules placentaires faisant intervenir notamment la voie mitochondriale. Ces données nous permettent d'avancer l'hypothèse que les processus abortifs mis en jeu sont le résultat de la réponse immunitaire induite par l'infection et notamment la production d'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine induirait une activation des cellules uNK entraînant leur maturation et leur sénescence précoce et provoquerait une apoptose et/ou une lyse des cellules trophoblastiques. Parallèlement, l'IFN- $\gamma$  serait capable de déréguler les processus de vasculogénèse caractérisés par une dilatation des artères spiralées et l'apparition d'hémorragies, l'ensemble de ces différents mécanismes aboutissant à la résorption observée au cours de l'infection dans notre modèle d'étude (**Figure 38**).



**Figure 38.** Hypothèses sur les mécanismes de résorption induits lors d'une infection par *T. gondii*. L'IFN- $\gamma$  joue un rôle dans l'apparition des hémorragies placentaires probablement par la dilatation des artères spiralées utérines. De plus, sa production induit une apoptose massive des cellules de la *decidua basalis* et du cône ectoplacentaire. Cette apoptose pourrait être la conséquence d'une activation des cellules uNK, qui induiraient l'apoptose des cellules trophoblastiques et/ou exerceraient leur activité lytique (dégranulation). Par ailleurs, l'IFN- $\gamma$  semble réguler l'IL-15, cytokine essentielle à la survie des uNK. Ces dérégulations de la vascularisation placentaire et de l'activité des cellules uNK seraient les facteurs principaux impliqués dans les résorptions observées.

De nombreuses perspectives sont envisageables à partir de nos données afin de démontrer les différentes hypothèses émises ou de confirmer certains points de notre étude. En effet, l'activation des cellules uNK pourrait être démontrée à la fois par un marquage des perforine permettant de visualiser la dégranulation de ces cellules ainsi que par une expérience de transfert de moelle osseuse issue de souris sauvages chez des souris IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup> avant accouplement et infection. Par ailleurs, il est nécessaire de confirmer la dérégulation de la production protéique utérine de l'IL-15 lors de l'infection et de vérifier si celle-ci n'est pas liée à production de progestérone. Enfin, de nombreux couples cytokiniques sont connus pour être impliqués dans les processus de gestation. L'utilisation de micro-arrays et la comparaison de la production de plusieurs autres cytokines telles que l'IL-18 ou l'IL-23, entre autres, pourraient ouvrir de nouveaux champs d'investigation.

# Bibliographie

**Abbasi, M., Kowalewska-Grochowska, K., Bahar, M. A., Kilani, R. T., Winkler-Lowen, B. & Guilbert, L. J. (2003).** Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* **188**, 608-616.

**Abou-Bacar, A. (2004).** Identification de mécanismes immunologiques impliqués dans la transmission materno-fœtale de *Toxoplasma gondii* dans un modèle murin : Thèse de l'Université Louis Pasteur.

**Abram, M., Schluter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M. & Deckert, M. (2003).** Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**, 177-182.

**Adjogbe, K. D., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., Mackenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F. & Daubener, W. (2004).** GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol* **34**, 1255-1264.

**Aggarwal, B. B. (2003).** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756.

**Ahn, H. J., Kim, S., Kim, H. E. & Nam, H. W. (2006).** Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* **44**, 303-312.

**Ain, R., Tash, J. S. & Soares, M. J. (2003).** Prolactin-like protein-A is a functional modulator of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Mol Cell Endocrinol* **204**, 65-74.

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

**Alexander, C. M., Hansell, E. J., Behrendtsen, O., Flannery, M. L., Kishnani, N. S., Hawkes, S. P. & Werb, Z. (1996).** Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* **122**, 1723-1736.

**Aliberti, J. (2005).** Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* **5**, 162-170.

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

- Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V. B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J. M. & Sher, A. (2003).** Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* **4**, 485-490.
- Ambroise-Thomas, P. & Pelloux, H. (1993).** Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today* **9**, 61-63.
- Ancelle, T., Goulet, V., Tirard-Fleury, V., Baril, L., du Mazaubrun, C., Thulliez, P., Weislo, M. & Carmé, B. (1996).** La toxoplasmose chez la femme enceinte en 1995. *BEH* **51**.
- Ando, N., Hirahara, F., Fukushima, J., Kawamoto, S., Okuda, K., Funabashi, T., Gorai, I. & Minaguchi, H. (1998).** Differential gene expression of TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors during the first trimester of pregnancy at the human maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* **40**, 48-56.
- Andrade, E. F., Stumbo, A. C., Monteiro-Leal, L. H., Carvalho, L. & Barbosa, H. S. (2001).** Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol* **33**, 337-341.
- Aplin, J. (2000).** Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 115-125.
- Argiles, J. M., Carbo, N. & Lopez-Soriano, F. J. (1997).** TNF and pregnancy: the paradigm of a complex interaction. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 181-188.
- Arnaiz-Villena, A., Martinez-Laso, J., Castro, M. J., Morales, P., Moscoso, J., Varela, P., Gomez-Casado, E. & Allende, L. M. (2001).** The evolution of the MHC-G gene does not support a functional role for the complete protein. *Immunol Rev* **183**, 65-75.
- Ashkar, A. A., Black, G. P., Wei, Q., He, H., Liang, L., Head, J. R. & Croy, B. A. (2003).** Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol* **171**, 2937-2944.
- Ashkar, A. A., Di Santo, J. P. & Croy, B. A. (2000).** Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* **192**, 259-270.
- Ashkar, A. A. & Croy, B. A. (1999).** Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* **61**, 493-502.
- Aschkenazi, S., Straszewski, S., Verwer, K. M., Foellmer, H., Rutherford, T. & Mor, G. (2002).** Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* **66**, 1853-1861.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998).** Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.

- Aspinall, T. V., Guy, E. C., Roberts, K. E., Joynson, D. H., Hyde, J. E. & Sims, P. F. (2003).** Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* **33**, 97-103.
- Avril, T., Jarousseau, A. C., Watier, H., Boucraut, J., Le Bouteiller, P., Bardos, P. & Thibault, G. (1999).** Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism. *J Immunol* **162**, 5902-5909.
- Baban, B., Chandler, P., McCool, D., Marshall, B., Munn, D. H. & Mellor, A. L. (2004).** Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* **61**, 67-77.
- Baines, M. G., Duclos, A. J., Anteck, E. & Haddad, E. K. (1997).** Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. *Am J Reprod Immunol* **37**, 471-477.
- Barber, E. M. & Pollard, J. W. (2003).** The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **171**, 37-46.
- Beaman, K., Angkachatchai, V. & Gilman-Sachs, A. (1996).** TJ6: the pregnancy-associated cytokine. *Am J Reprod Immunol* **35**, 338-341.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O. & Joiner, K. A. (1994).** The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* **127**, 947-961.
- Beeson, J. G., Brown, G. V., Molyneux, M. E., Mhango, C., Dzinjalama, F. & Rogerson, S. J. (1999).** *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis* **180**, 464-472.
- Bell, S. C. & Billington, W. D. (1983).** Anti-fetal allo-antibody in the pregnant female. *Immunol Rev* **75**, 5-30.
- Benson, G. V., Lim, H., Paria, B. C., Satokata, I., Dey, S. K. & Maas, R. L. (1996).** Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* **122**, 2687-2696.
- Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A. & Joiner, K. A. (1994).** Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **68**, 247-257.
- Bertoli, F., Espino, M., Arosemena, J. R. t., Fishback, J. L. & Frenkel, J. K. (1995).** A spectrum in the pathology of toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* **119**, 214-224.
- Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000).** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 607-623.

**Blaschitz, A., Juch, H., Volz, A., Hutter, H. & Dohr, G. (2005a).** Soluble HLA-G, the discussion is going on! *Mol Hum Reprod* **11**, 723-727.

**Blaschitz, A., Juch, H., Volz, A., Hutter, H., Daxboeck, C., Desoye, G. & Dohr, G. (2005b).** The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms. *Mol Hum Reprod* **11**, 699-710.

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

**Boulouis, H. J., Barrat, F., Bermond, D., Bernex, F., Thibault, D., Heller, R., Fontaine, J. J., Piemont, Y. & Chomel, B. B. (2001).** Kinetics of *Bartonella birtlesii* infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. *Infect Immun* **69**, 5313-5317.

**Bouteiller, P. L. (2002).** Commentary. Major breakthrough in the HLA-G debate: occurrence of pregnancy in human depends on the HLA-G status of preimplantation embryos. *Eur J Immunol* **32**, 309-310.

**Bowen, J. M., Chamley, L., Mitchell, M. D. & Keelan, J. A. (2002).** Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta* **23**, 239-256.

**Brabin, B. J., Romagosa, C., Abdelgalil, S., Menendez, C., Verhoeff, F. H., McGready, R., Fletcher, K. A., Owens, S., D'Alessandro, U., Nosten, F., Fischer, P. R. & Ordi, J. (2004).** The sick placenta-the role of malaria. *Placenta* **25**, 359-378.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

**Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L. & Boothroyd, J. C. (1988).** Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **141**, 3584-3591.

**Buxton, D. (1998).** Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* **29**, 289-310.

**Buxton, D., Anderson, I. E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattegedera, S. & Entrican, G. (2002).** Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J Comp Pathol* **127**, 133-141.

**Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Mennechet, F. J., Martin, V., Lepage, A. C., Schwartzman, J. D. & Kasper, L. H. (2001).** Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* **120**, 914-924.

**Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E. N., Kastelein, R. & Hunter, C. A. (2000).** Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **165**, 2619-2627.

- Candolfi, E., Hunter, C. A. & Remington, J. S. (1994).** Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* **62**, 1995-2001.
- Carey, K. L., Donahue, C. G. & Ward, G. E. (2000).** Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **105**, 25-37.
- Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K. & Ward, G. E. (2004).** The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell* **3**, 1320-1330.
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K. & Sibley, L. D. (1999).** Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* **1**, 225-235.
- Carruthers, V. B. (2002).** Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* **81**, 111-122.
- Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A. & Yoshinaga, K. (2000).** Embryo implantation. *Dev Biol* **223**, 217-237.
- Cesbron-Delauw, M. F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M. P., Camus, D., Capron, A. & Dubremetz, J. F. (1994).** Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **269**, 16217-16222.
- Cha, D. Y., Song, I. K., Lee, G. S., Hwang, O. S., Noh, H. J., Yeo, S. D., Shin, D. W. & Lee, Y. H. (2001).** Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. *Korean J Parasitol* **39**, 233-240.
- Chan, C. C., Lao, T. T. & Cheung, A. N. (1999).** Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. *Placenta* **20**, 223-227.
- Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R. & Suci-Foca, N. (2002).** Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* **3**, 237-243.
- Chaouat, G., Menu, E., Clark, D. A., Dy, M., Minkowski, M. & Wegmann, T. G. (1990).** Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* **89**, 447-458.
- Chaouat, G. (1994).** Synergy of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines in murine pregnancy: alloimmunization prevents abortion but does not affect the induction of preterm delivery. *Cell Immunol* **157**, 328-340.
- Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliott, J. F., Mosmann, T. & Wegmann, T. G. (1995a).** IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by *in vivo* injection of IFN-tau. *J Immunol* **154**, 4261-4268.

**Chaouat, G., Menu, E., Delage, G., Moreau, J. F., Khrishnan, L., Hui, L., Meliani, A. A., Martal, J., Raghupathy, R., Lelaidier, C. & et al. (1995b).** Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *Hum Reprod* **10 Suppl 2**, 55-59.

**Chaouat, G. (1995c).** [Early immunosuppression and implantation]. *Contracept Fertil Sex* **23**, 617-621.

**Chaouat, G., Cayol, V., Mairovitz, V. & Dubanchet, S. (1999).** Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **42**, 1-13.

**Chaouat, G., Ledee-Bataille, N., Dubanchet, S., Zourbas, S., Sandra, O. & Martal, J. (2004).** Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? *Immunol Lett* **92**, 207-214.

**Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2002).** Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* **115**, 3049-3059.

**Chegini, N., Ma, C., Roberts, M., Williams, R. S. & Ripps, B. A. (2002).** Differential expression of interleukins (IL) IL-13 and IL-15 throughout the menstrual cycle in endometrium of normal fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* **56**, 93-110.

**Choi, S. J., Park, J. Y., Lee, Y. K., Choi, H. I., Lee, Y. S., Koh, C. M. & Chung, I. B. (2002).** Effects of cytokines on VEGF expression and secretion by human first trimester trophoblast cell line. *Am J Reprod Immunol* **48**, 70-76.

**Christiansen, O. B., Nielsen, H. S. & Kolte, A. M. (2006).** Inflammation and miscarriage. *Semin Fetal Neonatal Med* **11**, 302-308.

**Chumpitazi, B. F., Simon, J., Polack, B., Peyron, F., Picot, S., Ricard, J. & Ambroise-Thomas, P. (1998).** Human platelet inhibition of *Toxoplasma gondii* growth. *Clin Exp Immunol* **111**, 325-333.

**Chwalisz, K., Benson, M., Scholz, P., Daum, J., Beier, H. M. & Hegele-Hartung, C. (1994).** Cervical ripening with the cytokines interleukin 8, interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha in guinea-pigs. *Hum Reprod* **9**, 2173-2181.

**Cintra, W. M. & De Souza, W. (1985).** Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Submicrosc Cytol* **17**, 503-508.

**Clark, D. A., Chaouat, G., Arck, P. C., Mittrucker, H. W. & Levy, G. A. (1998).** Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *J Immunol* **160**, 545-549.

**Clark, D. A., Ding, J. W., Chaouat, G., Coulam, C. B., August, C. & Levy, G. A. (1999).** The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant Fgl2 in the success or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans. *Am J Reprod Immunol* **42**, 37-43.

- Clark, D. A., Chaouat, G. & Gorczynski, R. M. (2002).** Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol* **47**, 275-282.
- Clark, D. A., Arck, P. C., Jalali, R., Merali, F. S., Manuel, J., Chaouat, G., Underwood, J. L. & Mowbray, J. F. (1996).** Psycho-neuro-cytokine/endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **35**, 330-337.
- Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G., Indiveri, F., Ferrone, S. & Puppo, F. (2003).** Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* **33**, 125-134.
- Cook, M. J. (1983).** Female Genital System. In *In The Mouse In Biological Research*, pp. 116. Edited by J. D. S. a. J. G. F. H.L. Foster, eds.
- Copp, A. J. (1979).** Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm. *J Embryol Exp Morphol* **51**, 109-120.
- Coppens, I., Sinai, A. P. & Joiner, K. A. (2000).** *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* **149**, 167-180.
- Coppens, I. (2006a).** Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol* **8**, 1-9.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C. & Joiner, K. A. (2006b).** *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* **125**, 261-274.
- Coudert, P. & Provôt, F. (1973).** Sporogonie d'Eimeria stiedae. *Ann Rech Vet* **4**, 371-388.
- Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S. & Seeber, F. (2006).** *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *Embo J* **25**, 3214-3222.
- Cross, J. C., Werb, Z. & Fisher, S. J. (1994).** Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* **266**, 1508-1518.
- Croy, B. A., Ashkar, A. A., Foster, R. A., DiSanto, J. P., Magram, J., Carson, D., Gendler, S. J., Grusby, M. J., Wagner, N., Muller, W. & Guimond, M. J. (1997).** Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol* **35**, 111-133.
- Croy, B. A., Chantakru, S., Esadeg, S., Ashkar, A. A. & Wei, Q. (2002).** Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *J Reprod Immunol* **57**, 151-168.
- Croy, B. A. & Xie, X. (2006).** In vivo models for studying homing and function of murine uterine natural killer cells. *Methods Mol Med* **122**, 77-92.
- Darde, M. L., Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. (1992).** Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* **78**, 786-794.

- Das, S. K., Wang, X. N., Paria, B. C., Damm, D., Abraham, J. A., Klagsbrun, M., Andrews, G. K. & Dey, S. K. (1994).** Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* **120**, 1071-1083.
- de Souza, W. (2005).** Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol* **123**, 1-18.
- Denkers, E. Y., Butcher, B. A., Del Rio, L. & Bennouna, S. (2004).** Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* **34**, 411-421.
- Derouin, F. & Garin, Y. J. (1993).** Pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12**, 475-476.
- Derouin, F. (2001).** Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs* **2**, 1368-1374.
- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M. & et al. (1995).** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**, 406-409.
- Dowse, T. & Soldati, D. (2004).** Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol* **7**, 388-396.
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C. & Gilbert, R. (1999).** Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* **353**, 1829-1833.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2006).** The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* **6**, 5773-5784.
- Entrican, G. (2002).** Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J Comp Pathol* **126**, 79-94.
- Fallon, P. G., Jolin, H. E., Smith, P., Emson, C. L., Townsend, M. J., Fallon, R. & McKenzie, A. N. (2002).** IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* **17**, 7-17.
- Fazleabas, A. T., Kim, J. J. & Strakova, Z. (2004).** Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. *Placenta* **25 Suppl A**, S26-31.
- Ferreira Ade, M., Vitor, R. W., Gazzinelli, R. T. & Melo, M. N. (2006).** Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* **6**, 22-31.
- Foulon, W., Villena, I., Stray-Pedersen, B., Decoster, A., Lappalainen, M., Pinon, J. M., Jenum, P. A., Hedman, K. & Naessens, A. (1999).** Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* **180**, 410-415.

**Freyre, A., Bonino, J., Falcon, J., Castells, D., Correa, O. & Casaretto, A. (1999).** The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasitol* **81**, 85-88.

**Fried, M. & Duffy, P. E. (1996).** Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**, 1502-1504.

**Fuentes, I., Rubio, J. M., Ramirez, C. & Alvar, J. (2001).** Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* **39**, 1566-1570.

**Galosy, S. S. & Talamantes, F. (1995).** Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in the mouse. *Endocrinology* **136**, 3993-4003.

**Garin, J. P. & Ambroise-Thomas, P. (1963).** [the Serological Diagnosis of Toxoplasmosis by the Fluorescent Antibody Method (Indirect Technic)]. *Presse Med* **71**, 2485-2488.

**Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. & Sher, A. (1991).** Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* **146**, 286-292.

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

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

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

**Gendron, R. L., Nestel, F. P., Lapp, W. S. & Baines, M. G. (1990).** Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil* **90**, 395-402.

**Girardi, G., Yarilin, D., Thurman, J. M., Holers, V. M. & Salmon, J. E. (2006).** Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* **203**, 2165-2175.

**Guimond, M. J., Wang, B. & Croy, B. A. (1998).** Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. *J Exp Med* **187**, 217-223.

**Gupta, N., Zahn, M. M., Coppens, I., Joiner, K. A. & Voelker, D. R. (2005).** Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* **280**, 16345-16353.

- Haig, D. M. (1998).** Poxvirus interference with the host cytokine response. *Vet Immunol Immunopathol* **63**, 149-156.
- Hakansson, S., Charron, A. J. & Sibley, L. D. (2001).** Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *Embo J* **20**, 3132-3144.
- Halonen, S. K. & Weidner, E. (1994).** Overcoating of Toxoplasma parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol* **41**, 65-71.
- Hansen, W. R., Keelan, J. A., Skinner, S. J. & Mitchell, M. D. (1999).** Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues: a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **57**, 243-257.
- He, X. L., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C. & Garcia, K. C. (2002).** Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat Struct Biol* **9**, 606-611.
- Hehl, A., Krieger, T. & Boothroyd, J. C. (1997).** Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1. *Mol Biochem Parasitol* **89**, 271-282.
- Herrler, A., von Rango, U. & Beier, H. M. (2003).** Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online* **6**, 244-256.
- Hill, J. A. (1992).** Immunological contributions to recurrent pregnancy loss. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **6**, 489-505.
- Hinoue, A., Fushiki, S., Nishimura, Y. & Shiota, K. (2001).** In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* **132**, 59-67.
- Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R. A. & Himeno, K. (1995).** Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **155**, 244-251.
- Homan, W. L., Vercammen, M., De Braekeleer, J. & Verschueren, H. (2000).** Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* **30**, 69-75.
- Honore, S., Couvelard, A., Garin, Y. J., Bedel, C., Henin, D., Darde, M. L. & Derouin, F. (2000).** [Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]. *Pathol Biol (Paris)* **48**, 541-547.
- Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995).** *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* **172**, 1561-1566.
- Howe, D. K., Honore, S., Derouin, F. & Sibley, L. D. (1997).** Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* **35**, 1411-1414.

**Hu, R., Zhou, S. & Li, X. (2006).** Altered Bcl-2 and Bax expression is associated with cultured first trimester human cytotrophoblasts apoptosis induced by hypoxia. *Life Sci* **79**, 351-355.

**Hughes, H. P. (1988).** Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol Today* **4**, 340-347.

**Hunt, J. S., Vassmer, D., Ferguson, T. A. & Miller, L. (1997).** Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* **158**, 4122-4128.

**Id Boufker, H., Alexandre, H., Carlier, Y. & Truyens, C. (2006).** Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. *Am J Pathol* **169**, 1730-1738.

**Irving, J. A. & Lala, P. K. (1995).** Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* **217**, 419-427.

**Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H., Suzuki, Y., Li, Y. F. & Takayama, M. (2003).** Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* **24**, 53-64.

**Janku, J. (1923).** Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu žluté skvrny v oku normálně velikem a mikrophthalmickém s nálezem parazitů v sítnici. *Cas. Lek. Cesk.* **62**, 1021-1027, 1054-1059, 1081-1085, 1111-1115, 1138-1143.

**Jiang, S. P. & Vacchio, M. S. (1998).** Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol* **160**, 3086-3090.

**Johnson, M., Broady, K., Angelici, M. C. & Johnson, A. (2003).** The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis. *Microbes Infect* **5**, 797-806.

**Joiner, K. A. & Roos, D. S. (2002).** Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* **157**, 557-563.

**Joswig, A., Gabriel, H. D., Kibschull, M. & Winterhager, E. (2003).** Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 44.

**Jung, C., Lee, C. Y. & Grigg, M. E. (2004).** The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol* **34**, 285-296.

**Kasper, L., Courret, N., Darche, S., Luangsay, S., Mennechet, F., Minns, L., Rachinel, N., Ronet, C. & Buzoni-Gatel, D. (2004).** *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol* **34**, 401-409.

**Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K. & Yagita, H. (1999).** Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* **163**, 1906-1913.

- Keelan, J. A., Blumenstein, M., Helliwell, R. J., Sato, T. A., Marvin, K. W. & Mitchell, M. D. (2003).** Cytokines, prostaglandins and parturition--a review. *Placenta* **24 Suppl A**, S33-46.
- Keeley, A. & Soldati, D. (2004).** The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* **14**, 528-532.
- Khan, I. A. (2007).** Toll road for *Toxoplasma gondii*: the mystery continues. *Trends Parasitol* **23**, 1-3.
- Kimber, S. J. (2005).** Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* **130**, 131-145.
- King, A., Allan, D. S., Bowen, M., Powis, S. J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S. E., McMichael, A. J., Loke, Y. W. & Braud, V. M. (2000).** HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* **30**, 1623-1631.
- Kiso, Y., Yoshizawa, M., Wilson, J. A., McBey, B. A. & Croy, B. A. (1994).** Immunohistochemical analysis of beta 1-integrin receptors displayed by murine uterine natural killer cells over the course of successful pregnancy. *J Reprod Immunol* **27**, 213-225.
- Krishnan, L., Guilbert, L. J., Wegmann, T. G., Belosevic, M. & Mosmann, T. R. (1996).** T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol* **156**, 653-662.
- Krzysiek, J. & Turowski, G. (1996).** [Immunology of early pregnancy. I. Immunologically competent cells in the endometrium and decidua]. *Ginekol Pol* **67**, 467-471.
- Lam, C., Lim, K. H. & Karumanchi, S. A. (2005).** Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* **46**, 1077-1085.
- Lawrence, D. A. (1996).** Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* **7**, 363-374.
- Le Bouteiller, P. & Pröll, J. (2001).** Immunologie placentaire : le fœtus face à un double défi. Réalités en Gynécologie-Obstétrique. *57*, 9-17.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D. & Cesbron-Delauw, M. F. (1999).** Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell* **10**, 1277-1287.
- Lee, J., Choi, B. C., Cho, C., Hill, J. A., Baek, K. H. & Kim, J. W. (2005).** Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of TH1 immunity. *Fertil Steril* **83**, 1047-1049.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J. & Boothroyd, J. C. (2000).** *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol* **96**, 89-96.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J., Grigg, M. E., Camps, M. & Boothroyd, J. C. (2001).** Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* **31**, 1285-1292.

- Lepage, A. C., Buzoni-Gatel, D., Bout, D. T. & Kasper, L. H. (1998).** Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **161**, 4902-4908.
- Leport, C. & Remington, J. S. (1992).** [Toxoplasmosis in AIDS]. *Presse Med* **21**, 1165-1171.
- Leriche, M. A. & Dubremetz, J. F. (1991).** Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* **45**, 249-259.
- Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W. G., Paria, B. C., Moller, D. E., Morrow, J. D., DuBois, R. N., Trzaskos, J. M. & Dey, S. K. (1999).** Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13**, 1561-1574.
- Lin, H., Mosmann, T. R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S. & Wegmann, T. G. (1993).** Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* **151**, 4562-4573.
- Loke, Y. W. & King, A. (2000).** Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **14**, 827-837.
- Loke, Y. W., King, A. & Burrows, T. D. (1995).** Decidua in human implantation. *Hum Reprod* **10 Suppl 2**, 14-21.
- Lyons, R. E., McLeod, R. & Roberts, C. W. (2002).** *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* **18**, 198-201.
- Maddox, J. F., Hachicha, M., Takano, T., Petasis, N. A., Fokin, V. V. & Serhan, C. N. (1997).** Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem* **272**, 6972-6978.
- Magno, R. C., Straker, L. C., de Souza, W. & Attias, M. (2005).** Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal* **11**, 166-174.
- Maley, S. W., Buxton, D., Macaldowie, C. N., Anderson, I. E., Wright, S. E., Bartley, P. M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C. M., Storset, A. K. & Innes, E. A. (2006).** Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J Comp Pathol* **135**, 130-141.
- Manger, I. D., Hehl, A. B. & Boothroyd, J. C. (1998).** The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun* **66**, 2237-2244.
- Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M. & Chauat, G. (1997).** Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* **9**, 355-380.

- Martin, A. M., Liu, T., Lynn, B. C. & Sinai, A. P. (2007).** The *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole Membrane: Transactions Across the Border. *J Eukaryot Microbiol* **54**, 25-28.
- Mason, L. H., Ortaldo, J. R., Young, H. A., Kumar, V., Bennett, M. & Anderson, S. K. (1995).** Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J Exp Med* **182**, 293-303.
- Mason, N. J., Fiore, J., Kobayashi, T., Masek, K. S., Choi, Y. & Hunter, C. A. (2004).** TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **72**, 5662-5667.
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Boudin, C. & Deloron, P. (2000).** Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunol* **22**, 191-199.
- Mennechet, F. J., Kasper, L. H., Rachinel, N., Li, W., Vandewalle, A. & 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.
- Menon, R., Lombardi, S. J. & Fortunato, S. J. (2002).** TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet* **19**, 201-204.
- Mercier, C., Adjogble, K. D., Daubener, W. & Delauw, M. F. (2005).** Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* **35**, 829-849.
- Minns, L. A., Menard, L. C., Foureau, D. M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D. W., Buzoni-Gatel, D. & Kasper, L. H. (2006).** TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **176**, 7589-7597.
- Mirkes, P. E., Little, S. A. & Umpierre, C. C. (2001).** Co-localization of active caspase-3 and DNA fragmentation (TUNEL) in normal and hyperthermia-induced abnormal mouse development. *Teratology* **63**, 134-143.
- Mjihdi, A., Lambot, M. A., Stewart, I. J., Detournay, O., Noel, J. C., Carlier, Y. & Truyens, C. (2002).** Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am J Pathol* **161**, 673-680.
- Mjihdi, A., Truyens, C., Detournay, O. & Carlier, Y. (2004).** Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **107**, 58-64.
- Mjihdi, A. (2005).** Capacité de reproduction de la souris et infection aigue par *Trypanosoma cruzi*. Thèse de l'Université Libre de Bruxelles. F201 - Faculté de médecine - Médecine
- Moffett, A. & Loke, C. (2006).** Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* **6**, 584-594.
- Moffett-King, A. (2002).** Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* **2**, 656-663.

- Molestina, R. E. & Sinai, A. P. (2005a).** Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *J Cell Sci* **118**, 5785-5796.
- Molestina, R. E. & Sinai, A. P. (2005b).** Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host IkkappaBalpha. *Cell Microbiol* **7**, 351-362.
- Monzon-Bordonaba, F., Vadillo-Ortega, F. & Feinberg, R. F. (2002).** Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor-alpha: a role in pregnancy establishment and maintenance? *Am J Obstet Gynecol* **187**, 1574-1580.
- Morales, P. J., Pace, J. L., Platt, J. S., Phillips, T. A., Morgan, K., Fazleabas, A. T. & Hunt, J. S. (2003).** Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* **171**, 6215-6224.
- Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D. & Paul, P. (1999).** IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* **11**, 803-811.
- Morgan, B. P. & Holmes, C. H. (2000).** Immunology of reproduction: protecting the placenta. *Curr Biol* **10**, R381-383.
- Morlat, P., Chene, G., Leport, C., Rousseau, F., Luft, B., Aubertin, J., Hafner, R., Salamon, R. & Vilde, J. L. (1993).** Primary prevention of cerebral toxoplasmosis in patients with HIV infection: results of a double-blind randomized trial, pyrimethamine versus placebo. *Rev Med Interne* **14**, 1002.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & 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.
- Mukhtar, D. D. & Stewart, I. (1988).** Migration of granulated metrial gland cells from cultured explants of mouse metrial gland tissue. *Cell Tissue Res* **253**, 413-417.
- Murphy, S. P., Fast, L. D., Hanna, N. N. & Sharma, S. (2005).** Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *J Immunol* **175**, 4084-4090.
- Mullarky, I. K., Szaba, F. M., Berggren, K. N., Kummer, L. W., Wilhelm, L. B., Parent, M. A., Johnson, L. L. & Smiley, S. T. (2006).** Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not hemorrhage or pathogen burden, dictate levels of protective fibrin deposition during infection. *Infect Immun* **74**, 1181-1188.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995).** The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
- Naot, Y. & Remington, J. S. (1980).** An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* **142**, 757-766.

- Ngo, H. M., Yang, M. & Joiner, K. A. (2004).** Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol Microbiol* **52**, 1531-1541.
- Nicolle, C. & Manceaux, L. (1909).** Sur un protozoaire nouveau du *gondi*. *Arch. Inst. Pasteur* **2**, 97-103.
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G. & Fischer, H. G. (2001).** Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect* **3**, 689-699.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., Stedman, T. T., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Zahn, M., Yang, M., Pypaert, M., Joiner, K. A. & Coppens, I. (2005).** Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* **7**, 849-867.
- Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., Camus, D. & Dubremetz, J. F. (1996).** Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol* **82**, 237-244.
- Ogren, L., Southard, J. N., Colosi, P., Linzer, D. I. & Talamantes, F. (1989).** Mouse placental lactogen-I: RIA and gestational profile in maternal serum. *Endocrinology* **125**, 2253-2257.
- Ohira, T., Bannenberg, G., Arita, M., Takahashi, M., Ge, Q., Van Dyke, T. E., Stahl, G. L., Serhan, C. N. & Badwey, J. A. (2004).** A stable aspirin-triggered lipoxin A4 analog blocks phosphorylation of leukocyte-specific protein 1 in human neutrophils. *J Immunol* **173**, 2091-2098.
- Okada, H., Nakajima, T., Sanezumi, M., Ikuta, A., Yasuda, K. & Kanzaki, H. (2000).** Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4765-4770.
- Paffaro, V. A., Jr., Bizinotto, M. C., Joazeiro, P. P. & Yamada, A. T. (2003).** Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* **24**, 479-488.
- Pampfer, S. (2001).** Dysregulation of the cytokine network in the uterus of the diabetic rat. *Am J Reprod Immunol* **45**, 375-381.
- Paria, B. C., Lim, H., Das, S. K., Reese, J. & Dey, S. K. (2000).** Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 67-76.
- Parr, E. L., Parr, M. B. & Young, J. D. (1987).** Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. *Biol Reprod* **37**, 1327-1335.
- Parr, E. L., Young, L. H., Parr, M. B. & Young, J. D. (1990).** Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J Immunol* **145**, 2365-2372.

- Petraglia, F., Santuz, M., Florio, P., Simoncini, T., Luisi, S., Plaino, L., Genazzani, A. R., Genazzani, A. D. & Volpe, A. (1998).** Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol* **39**, 221-233.
- Pollard, J. W., Hunt, J. S., Wiktor-Jedrzejczak, W. & Stanley, E. R. (1991).** A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* **148**, 273-283.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslee, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M. F. & Pistoia, V. (2000).** T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol* **164**, 3741-3748.
- Prince, J. B., Auer, K. L., Huskinson, J., Parmley, S. F., Araujo, F. G. & Remington, J. S. (1990).** Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **43**, 97-106.
- Pszenny, V., Ledesma, B. E., Matrajt, M., Duschak, V. G., Bontempi, E. J., Dubremetz, J. F. & Angel, S. O. (2002).** Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 283-286.
- Quinn, H. E., Ellis, J. T. & Smith, N. C. (2002).** Neospora caninum: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol* **18**, 391-394.
- Raghupathy, R. (1997).** Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* **18**, 478-482.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. (2004).** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229-241.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M. & Fisher, S. J. (2004).** Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* **114**, 744-754.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N. & Sher, A. (1997).** *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* **186**, 1819-1829.
- Reischl, U., Bretagne, S., Kruger, D., Ernault, P. & Costa, J. M. (2003).** Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* **3**, 7.
- Reis e Sousa, C., Yap, G., Schulz, O., Rogers, N., Schito, M., Aliberti, J., Hieny, S. & Sher, A. (1999).** Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* **11**, 637-647.

- Robb, L., Li, R., Hartley, L., Nandurkar, H. H., Koentgen, F. & Begley, C. G. (1998).** Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med* **4**, 303-308.
- Romero, R., Mazor, M. & Tartakovsky, B. (1991).** Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* **165**, 969-971.
- Rossant, J. & Cross, J. C. (2001).** Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* **2**, 538-548.
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R. M., Menier, C., Dausset, J. & Carosella, E. D. (1997).** Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11520-11525.
- Saeij, J. P., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W. & Boothroyd, J. C. (2007).** *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* **445**, 324-327.
- Salek-Ardakani, S., Arrand, J. R. & Mackett, M. (2002).** Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology* **304**, 342-351.
- Savion, S., Zeldich, E., Orenstein, H., Shepshelovich, J., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V. & Fein, A. (2002).** Cytokine expression in the uterus of mice with pregnancy loss: effect of maternal immunopotentiality with GM-CSF. *Reproduction* **123**, 399-409.
- Sayles, P. C., Rakhmilevich, A. L. & Johnson, L. L. (1995).** Gamma delta T cells and acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Infect Dis* **171**, 249-252.
- Scharton-Kersten, T., Contursi, C., Masumi, A., Sher, A. & Ozato, K. (1997).** Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med* **186**, 1523-1534.
- Schatten, H. & Ris, H. (2004).** Three-dimensional imaging of *Toxoplasma gondii*-host cell interactions within the parasitophorous vacuole. *Microsc Microanal* **10**, 580-585.
- Scherf, A., Pouvelle, B., Buffet, P. A. & Gysin, J. (2001).** Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. *Cell Microbiol* **3**, 125-131.
- Schluter, D., Deckert-Schluter, M., Lorenz, E., Meyer, T., Rollinghoff, M. & Bogdan, C. (1999).** Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *J Immunol* **162**, 3512-3518.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J. & Joiner, K. A. (1994).** The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 509-513.

- Sehgal, A., Bettiol, S., Pypaert, M., Wenk, M. R., Kaasch, A., Blader, I. J., Joiner, K. A. & Coppens, I. (2005).** Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic* **6**, 1125-1141.
- Shakhar, G., Lindquist, R. L., Skokos, D., Dudziak, D., Huang, J. H., Nussenzweig, M. C. & Dustin, M. L. (2005).** Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* **6**, 707-714.
- Sharkey, A. M., King, A., Clark, D. E., Burrows, T. D., Jokhi, P. P., Charnock-Jones, D. S., Loke, Y. W. & Smith, S. K. (1999).** Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* **60**, 355-364.
- Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S. & Gazzinelli, R. T. (1993).** *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **150**, 3982-3989.
- Sibley, L. D., Adams, L. B. & Krahenbuhl, J. L. (1993).** Macrophage interactions in toxoplasmosis. *Res Immunol* **144**, 38-40.
- Simon, C., Moreno, C., Remohi, J. & Pellicer, A. (1998).** Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol* **39**, 117-131.
- Sinai, A. P. & Joiner, K. A. (1997).** Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* **51**, 415-462.
- Sinai, A. P. & Joiner, K. A. (2001).** The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* **154**, 95-108.
- Sinai, A. P., Webster, P. & Joiner, K. A. (1997).** Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* **110 ( Pt 17)**, 2117-2128.
- Slager, H. G., Van Inzen, W., Freund, E., Van den Eijnden-Van Raaij, A. J. & Mummery, C. L. (1993).** Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* **14**, 212-224.
- Son, E. S., Song, K. J., Shin, J. C. & Nam, H. W. (2001).** Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* **39**, 133-141.
- Spano, F., Ricci, I., Di Cristina, M., Possenti, A., Tinti, M., Dendouga, N., Tomavo, S. & Crisanti, A. (2002).** The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. *Int J Parasitol* **32**, 121-131.
- Stahl, W., Kaneda, Y. & Noguchi, T. (1994).** Reproductive failure in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* **80**, 22-28.
- Steketee, R. W., Nahlen, B. L., Parise, M. E. & Menendez, C. (2001).** The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 28-35.

- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. & Abbondanzo, S. J. (1992).** Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* **359**, 76-79.
- Straszewski-Chavez, S. L., Abrahams, V. M., Funai, E. F. & Mor, G. (2004).** X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* **10**, 33-41.
- Strauss, J. F., Martinez, F. & Kiriakidou, M. (1996).** Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* **54**, 303-311.
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2003).** Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* **299**, 414-416.
- Subauste, C. S., Chung, J. Y., Do, D., Koniaris, A. H., Hunter, C. A., Montoya, J. G., Porcelli, S. & Remington, J. S. (1995).** Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* *in vitro* and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *J Clin Invest* **96**, 610-619.
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. & Remington, J. S. (1988).** Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **240**, 516-518.
- Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L. E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H. & Gufwoli, E. (2000).** IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **164**, 5375-5382.
- Szekeres-Bartho, J., Barakonyi, A., Par, G., Polgar, B., Palkovics, T. & Szere day, L. (2001).** Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int Immunopharmacol* **1**, 1037-1048.
- Tarachand, U. (1986).** Decidualisation: origin and role of associated cells. *Biol Cell* **57**, 9-16.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. (2000).** *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**, 1217-1258.
- Thellin, O. & Heinen, E. (2003).** Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology* **185**, 179-184.
- Thellin, O., Coumans, B., Zorzi, W., Igout, A. & Heinen, E. (2000).** Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* **12**, 731-737.
- Thesleff, I. & Mikkola, M. L. (2002).** Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. *Sci STKE* **2002**, PE22.
- Toder, V., Fein, A., Carp, H. & Torchinsky, A. (2003).** TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *J Assist Reprod Genet* **20**, 73-81.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Trinchieri, G. (2003).** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 133-146.
- Trundley, A. & Moffett, A. (2004).** Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* **63**, 1-12.
- Van de Loo, F. A. & van den Berg, W. B. (2002).** Gene therapy for rheumatoid arthritis. Lessons from animal models, including studies on interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist as potential disease modulators. *Rheum Dis Clin North Am* **28**, 127-149.
- Van der Pouw Kraan, T. C., Boeije, L. C., Smeenk, R. J., Wijdenes, J. & Aarden, L. A. (1995).** Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* **181**, 775-779.
- Vassiliadis, S., Tsoukatos, D. & Athanassakis, I. (1994).** Interferon-induced class II expression at the spongiotrophoblastic zone of the murine placenta is linked to fetal rejection and developmental abnormalities. *Acta Physiol Scand* **151**, 485-495.
- Villegas, E. N., Elloso, M. M., Reichmann, G., Peach, R. & Hunter, C. A. (1999).** Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **163**, 3344-3353.
- Vinatier, D., Labalette, M., Dufour, P. & Monnier, J. C. (1993).** [Abortions of immunologic origin. A trial of etiologic classifications and therapeutic consequences]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **22**, 339-350.
- Voisin, G. A. (1974).** [Proceedings: Facilitating antibodies. Definition, nature and mechanism of action]. *Nouv Rev Fr Hematol* **14**, 518.
- Wang, H. & Dey, S. K. (2006).** Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* **7**, 185-199.
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. & Mosmann, T. R. (1993).** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* **14**, 353-356.
- Whittingham, D. G. & Wood, M.J. (1983).** Reproductive Physiology. In *In the Mouse In Biological Research*, pp. 137-164. Edited by J. D. S. a. J. G. F. H.L. Foster, eds.
- Wille, U., Villegas, E. N., Striepen, B., Roos, D. S. & Hunter, C. A. (2001).** Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **23**, 291-296.

- Wood, G. W., Hausmann, E. & Choudhuri, R. (1997).** Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* **46**, 62-69; discussion 69-70.
- Xu, C., Mao, D., Holers, V. M., Palanca, B., Cheng, A. M. & Molina, H. (2000).** A critical role for murine complement regulator *crry* in fetomaternal tolerance. *Science* **287**, 498-501.
- Yap, G. S. & Sher, A. (1999).** Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* **189**, 1083-1092.
- Ye, W., Zheng, L. M., Young, J. D. & Liu, C. C. (1996).** The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* **184**, 2405-2410.
- Yellon, S. M., Mackler, A. M. & Kirby, M. A. (2003).** The role of leukocyte traffic and activation in parturition. *J Soc Gynecol Investig* **10**, 323-338.
- Yui, J., Garcia-Lloret, M., Wegmann, T. G. & Guilbert, L. J. (1994).** Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* **15**, 819-835.
- Zheng, L. M., Ojcius, D. M., Liu, C. C., Kramer, M. D., Simon, M. M., Parr, E. L. & Young, J. D. (1991).** Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. *Faseb J* **5**, 79-85.

## **“Physiopathologie de l'infection à *Toxoplasma gondii* : mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant à l'arrêt de la gestation dans un modèle murin de toxoplasmose acquise“**

La gravité de la toxoplasmose congénitale varie avec l'âge de la grossesse. En effet, l'infection au cours du premier trimestre peut entraîner un avortement dont les mécanismes sont inconnus. L'objectif de ce travail a été de caractériser dans un modèle murin, les mécanismes abortifs lors d'une infection par *Toxoplasma gondii*. Des souris Swiss infectées avec des kystes de la souche ME49 de type II de *T. gondii* au lendemain de la fécondation, jour 1 (J1) de gestation, présentent des résorptions à partir de J10. De plus, peu de parasites sont présents dans les unités fœto-placentaires et aucune nécrose n'est observée. Nos résultats révèlent la présence dans les unités fœto-placentaires infectées d'hémorragies, d'une apoptose des cellules de la decidua basalis, d'une diminution du nombre de cellules NK utérine (uNK) matures, d'une dilatation des artères spiralées, d'une diminution des ARNm d'IL-15 et d'une augmentation des ARNm du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Par ailleurs, une augmentation d'IFN- $\gamma$  sérique et placentaire est observée chez ces souris. Connaissant le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans les processus abortifs non infectieux, nous avons utilisé des souris invalidées pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R $^{-/-}$ ) pour déterminer son rôle dans les mécanismes abortifs observés. Nos résultats montrent (i) une diminution du nombre de résorptions au cours de l'infection (ii) accompagnée d'une absence de dilatation des artères spiralées, d'apoptose des cellules placentaires et aucune modification de production des ARNm de l'IL-15. Cette étude suggère que les mécanismes abortifs induits par *T. gondii* lors de la gestation ne seraient pas dus à l'action directe du parasite à l'interface materno-fœtale mais à l'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ .

## **“Physiopathology of the *Toxoplasma gondii* infection: cellular and molecular mechanisms contributing to the gestation arrest in a murine model of acquired toxoplasmosis“**

The gravity of congenital toxoplasmosis varies with the age of the pregnancy. Indeed, infection during the first trimester generally involves a miscarriage whose mechanism is unknown. The objective of this work was to characterize, in a murine model, the mechanisms of the abortive process which occurred in the early phase of gestation after infection with *Toxoplasma gondii*. Swiss Webster mice were infected orally with cysts of ME49 strain of *T. gondii* at day 1 (1 dpc) of gestation. Moreover as few parasites as well as no cytolytic effects were detected in infected fœto-placental units, analysis of these units shows resorption processes at 10 dpc. Our results reveal the appearance of haemorrhages, hypocellularity of the decidua basalis accompanied by apoptosis of placental cells, decreased amount of mature uterine NK cells (uNK) and spiral arteries dilation. This was accompanied by a reduction of the IL-15 mRNA production and an increased production of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mRNA in infected fœto-placental units. In addition, an increase of serum and placental IFN- $\gamma$  was detected in infected mice. Knowing that IFN- $\gamma$  plays a role in non-infectious abortive processes, IFN- $\gamma$ R $^{-/-}$  mice were used to determine its role. Our results show (i) a decrease of resorptions during infection (ii) paralleled with an abolition of spiral arteries dilation, apoptosis of placental cells and finally a decreased production of IL-15. Taken together this study suggests that *T. gondii*-abortive process in the early phase of gestation is not due to a direct action of the parasite at the materno-foetal interface but to an up-regulation of IFN- $\gamma$  synthesis.

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, gestation, résorption, IFN- $\gamma$ , apoptose, cellules NK utérines, artères spiralées, VEGF, IL-15