



ÉCOLE DOCTORALE ED414
UR3073 PHAVI



THÈSE présentée par :
Benjamin GEILLER

Soutenue le : **05 novembre 2024**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé / Immunologie

**L'immunoprivilège dans la toxoplasmose oculaire :
Rôle des interférons de type I et III et de PD-L1 dans la
dynamique de l'infection**

THÈSE dirigée par :

PFAFF Alexander

MCU PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

VILLENA Isabelle

PU PH, Université de Reims

GOMBERT Jean-Marc

PU PH, Université de Poitiers

AUTRES MEMBRES DU JURY :

SAUER Arnaud

PU PH, Université de Strasbourg

Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

Code de la Propriété Intellectuelle

Article L122-4 : Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9 : Dispositions pénales / Penal provisions.

Licence attribuée par l'auteur



Benjamin GEILLER

L'immunoprivilège dans la toxoplasmose oculaire : Rôle des interférons de type I et III et de PD-L1 dans la dynamique de l'infection

Résumé

La toxoplasmose oculaire (TO) est une uvéite infectieuse causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*. L'œil, et plus particulièrement la rétine, est un organe bénéficiant d'un immunoprivilège. Cette tolérance immunologique assure un contrôle étroit de la réponse immunitaire afin d'éviter une trop forte inflammation, et ainsi des dommages irréversibles. Cette tolérance est assurée par les barrières hémato-rétiniennes externes et internes, ainsi que par des facteurs cytokiniques et membranaires. Néanmoins, l'ensemble de ces dispositifs doivent être contrôlés de manière dynamique afin de pouvoir assurer la clairance d'un pathogène en cas d'infection, mais sans pour autant causer une inflammation exacerbée. « L'immunoprivilège versus le contrôle de l'infection » est donc un élément clef dans la physiopathologie de la TO. Néanmoins, les dynamiques d'expressions des marqueurs, ainsi que le rôle des différents médiateurs cytokiniques sur les barrières rétiniennes, restent encore à déterminer.

La thèse se divise en deux volets principaux : La première partie qui se focalise sur le rôle des interférons de type I et III sur la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe ainsi que sur le profil de sécrétion cytokinique de cellules rétiniennes humaines. Une seconde partie combinant une approche *in vitro* et *in vivo* dans laquelle nous avons étudié l'effet de l'infection par *T. gondii* sur l'expression de PD-L1, un ligand immunomodulateur contrôlant l'état d'activation des lymphocytes T.

Concernant la première partie : Nous avons pu observer que les souches virulentes induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires, alors qu'une souche non virulente n'induit aucune sécrétion cytokinique. Ensuite, nous avons pu montrer que les interférons (IFN- β , IFN- γ et IFN- λ 1) induisent une localisation significativement plus importante de ZO-1 au niveau des jonctions serrées, de manière STAT1 indépendant.

Dans la seconde partie : Nous avons décrit un mécanisme parasitaire protéase dépendant qui permet la déplétion de PD-L1. Nous avons également étudié le rôle central des cellules de Müller dans l'immunoprivilège rétinien à travers leurs expressions importantes de PD-L1. Finalement, nous avons mis en lumière le rôle des interférons de type I et III dans l'expression de PD-L1 dans la rétine.

Mots-clés : Toxoplasmose Oculaire ; Interférons ; Immunoprivilège ; Rétine ; PD-L1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus profonde gratitude à mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans chacun des projets que j'ai entrepris. Votre présence constante et votre encouragement m'ont permis de surmonter les nombreux défis rencontrés tout au long de ce parcours. Un merci tout particulier à mon père, dont l'aide précieuse dans la correction de ce manuscrit a été d'un grand secours.

Je souhaite également remercier ma femme, Solenne, qui a partagé cette aventure à mes côtés et l'a vécue avec moi, avec tout ce que cela implique. Son soutien indéfectible durant toute la thèse m'a permis de garder le cap. Elle a non seulement été une source de réconfort, mais elle m'a aussi aidé dans la correction du manuscrit, pour cela je lui en suis profondément reconnaissant.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Alexander. Grâce à lui, j'ai appris énormément de choses durant ces trois années, tant sur le plan scientifique que personnel. Nos nombreuses discussions, tout comme nos pauses café partagées, ont grandement enrichi cette expérience. Alexander, tu as su me guider avec bienveillance et rigueur tout au long de ce parcours et je suis convaincu que grâce à l'accompagnement et aux compétences que tu m'as transmis, je serai un futur chercheur passionné, à l'écoute, pédagogue et intègre. Merci pour ta confiance et ton accompagnement constant.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à mes collègues de l'équipe Toxoplasmose oculaire, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer au quotidien. Un remerciement tout particulier à Lydia Arnoux pour son engagement sans faille et son aide technique précieuse ainsi qu'à Estérina Hoffmann, qui a été d'une grande importance dans la réalisation de ce projet.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres du CNR Toxoplasmose, et en particulier Laetitia Beal et Chloé Gommenginger, pour leur soutien, ainsi que pour les nombreuses choses que j'ai pu apprendre grâce à elles.

Enfin, un grand merci à l'équipe Malaria, en particulier Didier Ménard et Lucien Platon. J'ai grandement apprécié nos discussions enrichissantes, qui ont été sources d'inspiration. Je tiens également à remercier Lucien pour sa participation à la relecture du draft du second article.

Je tiens également à remercier Valentin Greigert d'avoir accepté d'être présent en tant que membre invité de mon jury de thèse, pour ses précieux conseils, sa contribution à l'article n°1 et sa relecture approfondie de l'article n°2.

Je tiens également à remercier tous les stagiaires de BTS, licence, master ainsi que les externes en médecine ou en pharmacie qui ont participé à ce projet de thèse. Un grand merci à Caroline Hillenbrand, Marion Mélandri, Julien Roos, Apolline Poli, Oihanna Merlo, Iuliia Tsybenko, Anca Teodora Strechie et Camila Cevallos pour leur implication et leur contribution précieuse.

Un grand merci également à la Fondation de France et à ses généreux donateurs pour avoir financé mon salaire dans le cadre de ce projet pendant trois années.

Sommaire

Liste des figures et tableaux

Abréviations

Introduction

Partie I : *Toxoplasma gondii* : Morphologie, Cycle parasites et Épidémiologiep.1

Chapitre 1 : Morphologie et cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii*p.1

1.1 Morphologiep.1

1.2 Cycle parasitairep.2

Chapitre 2 : Manifestations cliniques et épidémiologie de la Toxoplasmose.....p.4

2.1 Toxoplasmose congénitalep.4

2.2 Toxoplasmose cérébrale et multi-viscéralep.4

2.3 Toxoplasmose oculairep.5

Chapitre 3 : Diversité des souches de *Toxoplasma gondii*p.7

3.1 Une seule espèce, une grande variété de souchesp.7

Partie II : Physiopathologie de la Toxoplasmosep.10

Chapitre 1 : Physiopathologie généralep.10

1.1 Reconnaissance du parasite.....p.11

1.2 Recrutement des cellules immunitaires, sources d'IFN- γ p.12

1.3 Conclusion physiopathologie générale.....p.13

Partie III : Rôle des interférons dans la Toxoplasmosep.14

Chapitre 1 : Les interférons chez l'Homme et la sourisp.14

1.1 Interférons de type I, II et IIIp.15

Chapitre 2 : Inhibition de la multiplication de *T. gondii* par les interféronsp.17

2.1 Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1)p.18

2.2 Nitric oxide synthase inductible (iNOS)p.18

2.3 ISG15p.18

<u>Chapitre 3</u> : Focus sur les interférons de type I et III dans le contrôle de la multiplication de <i>Toxoplasma gondii</i>	p.19
3.1 Les interférons de type I	p.19
3.2 Rôle spécialisé des interférons de type III au niveau des barrières physiologiques et muqueuses	p.19

Partie IV : Immunoprivilège et Toxoplasmose oculairep.21

<u>Chapitre 1</u> : Définitions et concepts clés	p.21
--	-------------

<u>Chapitre 2</u> : Une structure anatomique et une organisation tissulaire optimisant l'immunoprivilège rétinien.....	p.22
--	-------------

2.1 Anatomie de l'œil et de la rétine.....	p.22
2.2 Barrières hémato-rétiniennes : internes et externes.....	p.23
2.3 Rôle des macroglies et microglies dans la rétine.....	p.25

<u>Chapitre 3</u> : L'immunoprivilège rétinien à l'échelle moléculaire ; facteurs membranaires et solubles impliqués.....	
---	--

3.1 Etat de l'art.....	p.26
3.2 « <i>Programmed death ligand</i> » PD-L1/2 un élément clef de la tolérance périphérique	p.27
3.3 Exhaustion des lymphocytes T dans les infections chroniques	p.30
3.4 Facteurs modulant la réponse immunitaire	p.31
3.5 La toxoplasmose oculaire, une réponse immunitaire en environnement immunoprivilégié.....	p.32
3.6 Conclusion physiopathologie de la toxoplasmose oculaire.....	p.34

Contributions précédentes du laboratoirep.35

Objectifs de l'Étude

<u>Objectif 1</u> : Rôle des interférons de type I et III dans la Toxoplasmose oculaire	p.38
---	-------------

<u>Objectif 2</u> : Immunoprivilège <i>versus</i> contrôle de l'infection	p.39
---	-------------

Articles de recherche originaux

Article 1 :

Interférons de Type I et III et fonction de barrière dans un modèle « *in vitro* » de Toxoplasmose oculairep.41

1.1 Résumé en françaisp.41

1.2 Schéma récapitulatifp.43

Données Expérimentales Non-Publiées (Article I)

Partie I : Matériels et Méthodesp.61

1.1 Effet du traitement combiné des interférons sur la multiplication de *T. gondii* p.61

1.2 Mise au point d'un protocole de différenciation de cellules rétinienne pigmentaires épithélialesp.61

1.3 Dosage multiplex Luminex du surnageant de culture cellulaire en réponse à l'infectionp.63

Partie II : Résultatsp.63

Figure 1p.63

Figure 2p.65

Figure 3p.67

Article 2 :

Interferons and Toxoplasma shape PD-L1 regulation in retinal barrier cells: The critical role of proteasesp.69

2.1 Résumé en françaisp.69

2.2 Schéma récapitulatifp.71

Données Expérimentales Non-Publiées (Article II)

Partie I : Matériels et Méthodesp.102

1.1 Évaluation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ après mise en contact avec des RPE traitées avec du surnageant de parasitep.102

1.2 Modèle murin de toxoplasmose oculairep.102

Partie II : Résultatsp.103

Figure 1p.103

Figure 2p.105

Discussion généralesp.108

Conclusions et Perspectivesp.113

1.1 Principaux Résultats**p.113**

1.2 Importance des Résultats**p.113**

1.3 Limites de l'Étude**p.115**

a) Modèle de barrière hémato-rétinienne externe

b) Modèle murin de toxoplasmose oculaire

1.4 Perspectives**p.116**

Références

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1. La structure de *Toxoplasma gondii* sous la forme tachyzoïte.

Figure 2. Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii*.

Figure 3. Fond d'œil montrant des lésions cicatricielles suite à une toxoplasmose oculaire.

Figure 4. Classification phylogénétique des souches toxoplasmiques en 6 clades et 14 haplogroupes.

Figure 5. Les étapes d'invasion et de dissémination de *Toxoplasma gondii* dans son hôte.

Figure 6. Voie de signalisation canonique des interférons.

Tableau 1. Les principales ISG qui permettent le contrôle de *T. gondii* chez l'Homme et la souris.

Figure 7. L'anatomie de l'œil chez la souris.

Figure 8. Les barrières hémato-rétiniennes externes (BHRe) et internes (BHRi).

Figure 9. Structure moléculaire des jonctions serrées.

Figure 10. La voie de signalisation du couple PD-1 : PD-L1/PD-L2.

Tableau 2. Facteur de transcription associé au phénotype d'exhaustion T.

Figure 11. Mécanisme de physiopathologie de la toxoplasmose oculaire.

Articles de recherche originaux

Article n°1 : Type I and III interferons shape the retinal cytokine network and barrier function in an *in vitro* model of ocular toxoplasmosis.

Schéma récapitulatif n°1. Schéma récapitulatif de l'article de recherche originale n°1 Geiller *et al.* 2023 présentant les principales conclusions et élément de discussion.

Figure 1. The four cell lines express IFNLR1 receptor subunit.

Figure 2. Type II, but not type I and III interferons inhibit parasite proliferation.

Figure 3. RPE cytokine secretion is differentially modified in a parasite strain and interferon type dependent manner.

Figure 4. Microglia and Astrocyte cytokine secretion is differentially modified in a parasite strain and interferon type dependent manner.

Figure 5. Müller cytokine secretion is differentially modified in a parasite strain and interferon type dependent manner.

Figure 6. Interferons and infection modulate ZO-1 tight junction organization.

Figure 7. IFN- λ 1 and IFN- β enhance barrier function in an STAT1 independent manner.

Figure S1. Differentiation protocol induces the expression of RPE primary cell markers.

Figure S2. Interferon stimulation induces tight junction morphology changes.

Données expérimentales non-publiées (Article I)

Matériel et méthode

Tableau 1. Amorce ciblant les ADNc humain MERTK, RPE65, ITGB5 et GAPDH pour l'évaluation de la différenciation des cellules RPE.

Tableau 2. Protocole d'amplification utilisé sur le thermocycleur CFX Real-Time PCR System.

Résultats

Figure 1. Résultats de qPCR ciblant le gène *TgB1* (parasitaire) et *GAPDH* (humain).

Figure 2. Protocole de différenciation de la lignée RPE, ARPE-19.

Figure 3. L'effet des interférons sur la réponse cytokinique à l'infection est évalué par le dosage multiplex Luminex du surnageant de culture cellulaire.

Article n°2 : Interferons and Toxoplasma shape PD-L1 regulation in retinal barrier cells: The critical role of proteases

Schéma récapitulatif n°2. Schéma récapitulatif de l'article de recherche originale n°2 Geiller *et al.* 2024 présentant les principales conclusions et éléments de discussion.

Figure 1. Modulation of PD-L1 mRNA and protein expression by *T. gondii* infection.

Figure 2. Regulation of PD-L1 in human microglia, astrocytes, Müller, and RPE cells by IFN stimulation.

Figure 3. Protease-dependent reduction of PD-L1 expression on the outer blood-retinal barrier model by infected co-culture supernatants.

Figure 4. Impact of interferon neutralization on PD-L1 expression, GFAP levels, and CD11b+ cell distribution in a mouse model of ocular toxoplasmosis.

Données expérimentales non-publiées (Article II)

Résultats

Figure 1. L'expression de PD-L1 dans la rétine de souris infectées par *T. gondii* aux jours 0, 7 et 14 après réinfection.

Figure 2. Étude de l'effet immunomodulateur des RPE sur une lignée de lymphocyte T (Jurkat).

Liste des abréviations

A549 : Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATG : Autophagy-related

BCR : B Cell Receptor

BHRe : Barrière hémato-rétinienne externe

BHRi : Barrière hémato-rétinienne interne

BIM: Bcl-2-interacting mediator of cell death

CCL: CC chemokine ligand

CCR : CC chemokine receptor

CD : Cluster de différenciation

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

DAMP : Damage associated molecular patterns

DC: Dendritic cell

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

GBP : Guanylate-binding protein

GPI : Glycosylphosphatidylinositols

GRA : Dense Granule Protein

HRPE : Human retinal pigment epithelial cell

HSP70 : Heat shock protein 70

ICOS-L : Inducible T-cell costimulatory ligand

IDO : L'indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IFNAR : Interferon alpha receptor

IFNGR : Interferon gamma receptor

IgV : Domaine immunoglobuline 5

IL : Interleukine

iNOS : Inducible nitric oxide synthases

IRF : Interferon regulatory factors

IRG : Immunity related guanosine triphosphatases

ISG : Interferon stimulated genes

ISGF : Interferon stimulated gene factors

ITCH : HECT domain-containing E3 ubiquitin ligase

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif

ITSM : Immunoreceptor tyrosine-based switch motif

JAK : Janus Kinase

KO : knock-out

LB : Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

MARVEL domain : MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link

MCP1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MIC : Microneme Protein

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide

NFκB : Nuclear factor kappa B

NGS : New generation sequencing

NK : Natural killer

NK-T : Natural killer T cell

NLR : NOD-like receptors

NLRP : NOD-like receptor protein, pyrin domain containing

PAMP : Pathogen associated molecular patterns

PD-1 : Programmed death 1

PLCγ1 : Phospholipase C gamma 1

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

ROP : Rhoptry protein

RPE : Retinal pigment epithelial cell

S100A11 : S100 calcium-binding protein A11

SHP-1 : Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1

SNP : Single nucleotide polymorphism

SOCS : Suppressor of cytokine signaling proteins

STAT : Stat proteins, for signal transducers and activators of transcription

T. gondii : *Toxoplasma gondii*

TCR : T cell receptor

TLR : Toll like Receptors

TO : Toxoplasmosis oculaire

TYK : Tyrosine kinase

U3 : Ubiquitin ligase E3

USP18 : Ubiquitin specific peptidase 18

ZO : Zonula-occludens

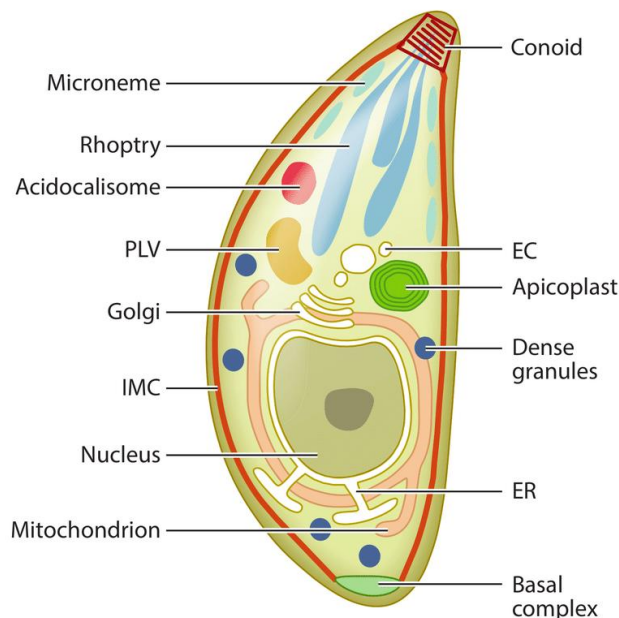
Introduction

Partie I : *Toxoplasma gondii* : Morphologie, cycle parasitaire et épidémiologie

Chapitre 1 : Morphologie et cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii*

1.1 Morphologie

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) est un parasite intracellulaire obligatoire décrit pour la première fois en 1908 dans un rongeur d’Afrique du Nord, *Ctenodactylus gundi* lui donnant ainsi son nom de genre et d’espèce (1). Ce parasite fait partie de la classe des *Coccidies* et du phylum des *Apicomplexa* et partage donc un très grand nombre de caractéristiques structurales spécifiques de ce phylum. Un de ses organelles caractéristiques est l’apicoplaste, un plaste ne permettant plus la photosynthèse, vestige d’une endosymbiose secondaire avec une algue (2). Le toxoplasme possède également un complexe apical comprenant des organelles impliquées dans l’invasion et la modulation de la cellule hôte. Les structures principales la composante sont (**Fig.1**) :



Les conoïdes et les cercles polaires et apicaux permettant l’invasion de la cellule hôte (3).

Les rhoptries et **miconèmes** permettant la sécrétion d’effecteurs ROP et MIC, impliqués dans des modifications précoces de la cellule hôte (4).

Les granules denses (GRA) contiennent les GRA, également impliqués dans la modification de la cellule hôte, mais plus tardivement (5).

(Fig.1) La structure de *Toxoplasma gondii* sous la forme tachyzoïte. Blader *et al.* 2015

1.2 Cycle parasitaire

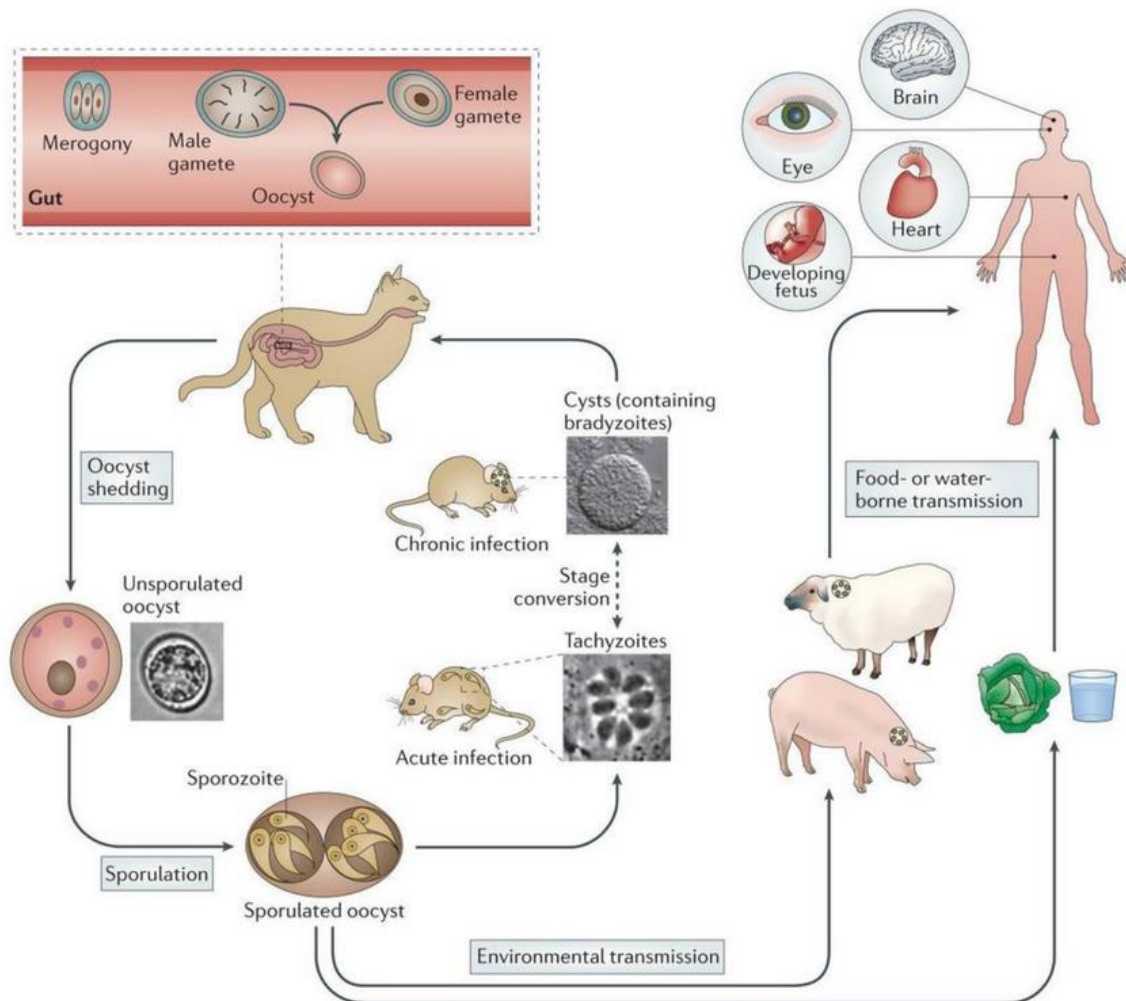
Cette structure est maintenue durant les trois principales formes non sexuées du parasite¹. *T. gondii* est un parasite ayant un cycle dit hétéroxène, donc impliquant plus qu'un hôte (**Fig.2**). L'hôte définitif dans lequel il réalise sa reproduction sexuée est le félin. Cela est dû à la présence d'une enzyme, la delta-6-desaturase, retrouvée au niveau du tube digestif des félins et initiant la différenciation du parasite en sa forme sexuée (6). Le résultat de cette reproduction sexuée est l'oocyste qui sera relargué dans les selles du félin. Après une étape de sporulation, qui dure quelques jours, cet oocyste contenant deux fois quatre sporozoïtes devient infectieux et permettra l'infection des hôtes intermédiaires. Les hôtes intermédiaires, sont principalement les rongeurs et les petits oiseaux mais *T. gondii* est virtuellement capable d'infecter tous les animaux homéothermes. À la suite de l'ingestion des sporozoïtes par l'hôte intermédiaire, ils se différencient en tachyzoïtes, la forme parasitaire dotée d'une réplication active et asexuée. Cette forme parasitaire va être capable d'infecter toutes les cellules nucléées de l'hôte infesté. Durant la phase précoce de l'infection le parasite va notamment infecter les monocytes/macrophages et cellules dendritiques et être capable d'induire un phénotype hyper-migratoire lui permettant ainsi de se disperser rapidement via le réseau lymphatique et sanguin. Plus tardivement durant l'infection et sous la forte pression du système immunitaire, le parasite va induire sa différenciation en bradyzoïte et former des kystes intracellulaires. Cet enkystement se fait exclusivement dans certains types cellulaires à différenciation terminale et ayant une très longue durée de vie, soient les cellules nerveuses et musculaires de tous types (7). Malgré une réplication fortement ralentie dans ce stade, le parasite reste tout de même actif métaboliquement et sécrète de nombreux effecteurs au sein de sa cellule hôte afin de maintenir une niche parasitaire optimale (8). Cette forme parasitaire est responsable de la phase chronique de l'infection et explique chez l'Homme, le maintien de l'immunité, à vie d'un individu infecté ainsi que certaines formes cliniques liées ou non à une immunodéficience engendrant la réactivation des kystes. Les kystes contenant les bradyzoïtes

¹ Etymologie des dénominations des différents stades parasitaires par Frenkel J K. en 1973. (6)

- Sporozoïte- provient du terme « *trophicos* » en grec et signifie nourriture.
- Tachyzoïte- provient du terme « *tachos* » en grec et signifie rapide.
- Bradyzoïte- provient du terme « *Brady* » en grec et signifie lent.

INTRODUCTION – PARTIE I : *Toxoplasma gondii* : Morphologie, cycle parasitaire et épidémiologie

permettent également de fermer le cycle parasitaire en infectant un nouvel hôte définitif par prédation.



(Fig.2) Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii*. Hunter et al. 2011

Représentation du cycle parasitaire hétéroxène de *T. gondii* avec le chat domestique en tant que félin hôte définitif et la souris comme hôte intermédiaire. Dans le tube digestif de l'hôte définitif les merogonies se différencient en gamètes mâle ou femelle qui, après fusion, forment l'oocyste. Cet oocyste est ensuite relargué dans l'environnement via les selles du chat. Après sporulation, les oocystes contenant des sporozoïtes deviennent infectieux et vont pouvoir infecter un hôte intermédiaire. Après ingestion par l'hôte des sporozoïtes, ils se différencient rapidement en tachyzoïtes et envahissent l'hôte, causant la phase aiguë de l'infection. Plus tardivement, sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes et forment des kystes intracellulaires dans les tissus musculaires et nerveux marquant le passage en phase chronique de l'infection. Ces kystes sont infectieux et permettent d'infecter un nouvel hôte définitif par prédation.

Chapitre 2 : Manifestations cliniques et épidémiologie de la Toxoplasmose

2.1 Toxoplasmose congénitale

Dans le monde on estime qu'environ un tiers de la population est chroniquement infectée par le parasite *Toxoplasma gondii*. La prévalence est cependant extrêmement hétérogène et dépend probablement de nombreux facteurs à la fois culturels et environnementaux (9). En France, la séroprévalence est estimée entre 30% et 50% selon les régions, avec une tendance à la baisse (10–12). Ces chiffres proviennent des sérologies systématiques faites pour toutes les femmes enceintes en France et reflètent donc principalement la séroprévalence des femmes en âge de procréer. La séroprévalence pour l'ensemble de la population est donc, en réalité, probablement sous-estimée étant donné que des études montrent une croissance de la séropositivité avec l'âge (13). Cette surveillance accrue des femmes enceintes est due à la capacité du parasite à traverser la barrière placentaire, envahissant le fœtus et causant des dommages importants. Cette transmission materno-fœtale est possible uniquement chez les femmes séronégatives et varie selon le stade de grossesse. En effet, il existe une corrélation inverse entre le stade de grossesse et le taux de transmission au fœtus (14). Également, plus la transmission se fait tardivement, moins les conséquences cliniques pour le fœtus et le futur bébé sont importantes. Les complications cliniques d'une toxoplasmose congénitale sont multiples : avortement, malformations, retard mental, atteintes oculaires, etc (15). Grâce à la surveillance importante du statut immunitaire des femmes et du programme de dépistage au cours des grossesses en France, la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale est très faible, de l'ordre de 200 par an en moyenne entre 2007 et 2020 (16).

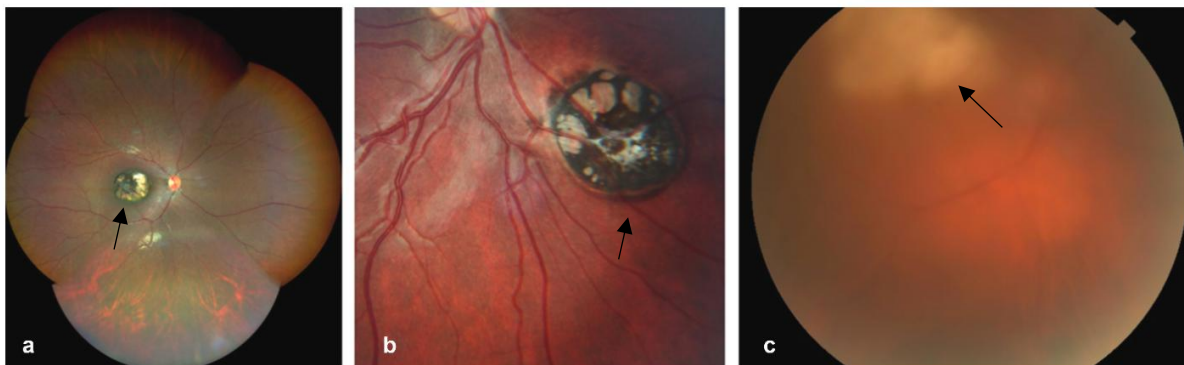
2.2 Toxoplasmose cérébrale et multi-viscérale

Une seconde manifestation clinique de l'infection toxoplasmique touche les personnes ayant une déficience immunitaire, le plus souvent acquise, en raison d'une maladie infectieuse ou d'un traitement médicamenteux dans le cadre d'une greffe ou d'une pathologie auto-immune (17). Lors de la primo-infection, elle peut provoquer des phases aiguës très importantes avec des atteintes multiviscérales potentiellement mortelles (17). Une diminution de la vigilance du système immunitaire entraînera des conséquences importantes

chez les patients déjà chroniquement infectés. Le contrôle et le maintien du parasite sous sa forme bradyzoïte sont essentiellement dus à l'action des lymphocytes T CD8 maintenant une pression immunitaire et empêchant la réactivation des kystes (18).

2.3 Toxoplasmose oculaire

Chez les personnes immunocompétentes, la phase aiguë de l'infection est majoritairement asymptomatique. Dans certain cas, des symptômes pseudo-grippaux peuvent survenir dépendamment de l'état général de la personne, ainsi que de la souche parasitaire infectante. La principale forme clinique retrouvée chez les individus immunocompétents est la toxoplasmose oculaire (TO). Longtemps uniquement associée à une pathologie secondaire à une toxoplasmose congénitale, une étude (19) montre en 2008 qu'elle peut toucher l'ensemble des individus chroniquement infectés par le parasite. D'après une étude de 2003 (20), environ 2% des personnes infectées feront une toxoplasmose oculaire au cours de leurs vies, soit approximativement 800 000 personnes en France.



(Fig.3) Fond d'œil montrant des lésions cicatricielles suite à une toxoplasmose oculaire (a. et b.) foyer infectieux actif (c.) Goh, E. J. H. *et al.* (2022)

La TO est une rétinohoroïdite pouvant causer des troubles de la vue allant d'une perte de l'acuité visuelle, à la cécité de l'œil. On estime qu'elle est très souvent non diagnostiquée car souvent sans symptôme facilement perceptible et donc largement sous-estimée. La localisation des foyers infectieux est déterminante pour la gravité des symptômes observés. En effet, une infection à proximité ou au sein de la région maculaire aura des répercussions plus sévères qu'une lésion très éloignée de cette dernière (21). Cette région étant plus vascularisée au cours du développement fœtal que les autres zones de la rétine, cela explique également les toxoplasmoses plus graves observées chez les enfants, suite à une

INTRODUCTION – PARTIE I : *Toxoplasma gondii* : Morphologie, cycle parasitaire et épidémiologie

toxoplasmose congénitale, puisque les kystes sont majoritairement localisés dans cette région (22). Même si les symptômes peuvent passer inaperçus, les lésions cicatricielles subsistent et sont visibles lors d'examens médicaux. La TO peut se manifester 1 à 2 mois après l'infection, mais également très longtemps après, lors de la phase chronique, avec la réactivation des kystes de la rétine. Ces kystes peuvent être localisés dans toutes les couches de la rétine, principalement dans les neurones (photorécepteurs, cellules ganglionnaires, neurones bipolaires...) mais également dans les cellules de Müller (23). Les raisons exactes causant la réactivation de ces kystes chez des individus immunocompétents ne sont pas connues. Les causes sont probablement, multiparamétriques, incluant un fond génétique, un contexte clinique ou environnemental, ainsi que la souche parasitaire infestante.

Chapitre 3 : Diversité des souches de *Toxoplasma gondii*

3.1 Une seule espèce, une grande variété de souches

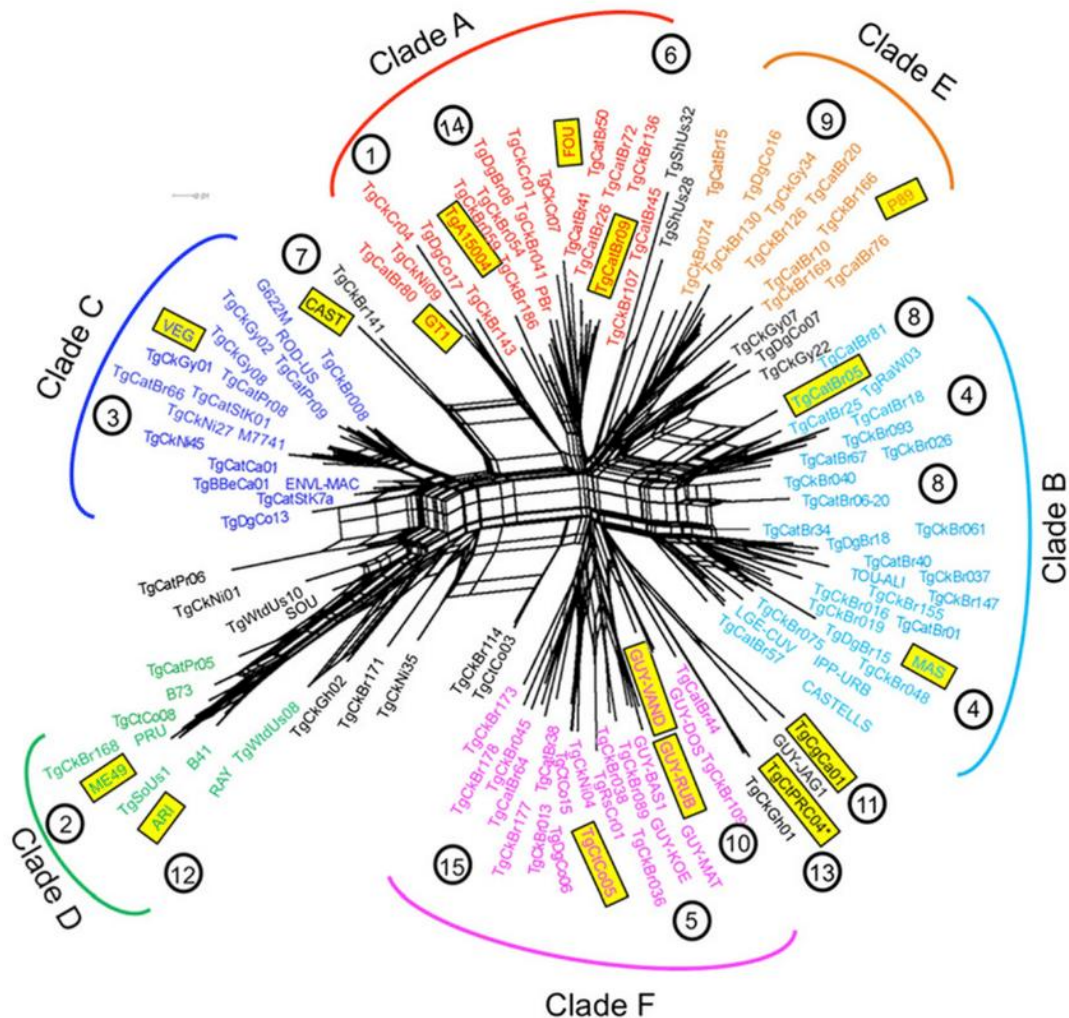
Même si on ne décompte qu'une seule espèce *gondii* dans le genre *Toxoplasma*, de nombreuses souches existent. À l'heure actuelle plusieurs classifications co-existent. La classification la plus ancienne est une classification phénotypique basée sur la virulence des souches sur modèles murins (24). Cette classification permet de créer 4 groupes de souches clonales :

- Les souches de type I ayant une virulence importante.
- Les souches de type II qui sont dites avirulente, car non létale en dessous d'un certain inoculum.
- Les souches de type III ayant une virulence intermédiaire.
- Les souches atypiques.

Le principal avantage de subdiviser les souches de cette manière réside dans sa corrélation avec le polymorphisme de certains facteurs de virulence largement documentés. Par exemple, les souches de type II contrairement aux souches de type I et III, expriment une version fonctionnelle de l'effecteur granule dense 15 (GRA15) induisant une forte activation du facteur de transcription « *nuclear factor kappa B* » (NFκB) ce qui permet l'initiation d'une réponse immunitaire adaptée et ainsi une virulence réduite. D'autres effecteurs polymorphiques tels que les « *roptry protein 16* » (ROP16), ROP18 et ROP5 et leurs répercussions physiopathologiques sont décrits dans cette revue (25). Néanmoins, cette classification basée sur la virulence chez la souris, ne reflète pas nécessairement la virulence des souches chez l'Homme. En effet, il n'y a pas de corrélation absolument établie entre la virulence observée chez la souris et celle observée chez l'homme. Ceci peut notamment être expliqué par de nombreux facteurs intrinsèques à l'Hôte qui peuvent moduler cette virulence.

INTRODUCTION – PARTIE I : *Toxoplasma gondii* : Morphologie, cycle parasitaire et épidémiologie

La seconde classification plus récente est phylogénétique (26) (**Fig.4**), elle est réalisée selon différentes techniques aboutissant à des répartitions différentes des souches. Les principales techniques employées sont l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP), le séquençage de microsatellites et le séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblant donc les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP). La technique RFLP par exemple a permis de séparer les souches en 6 clades et 15 haplogroupes.



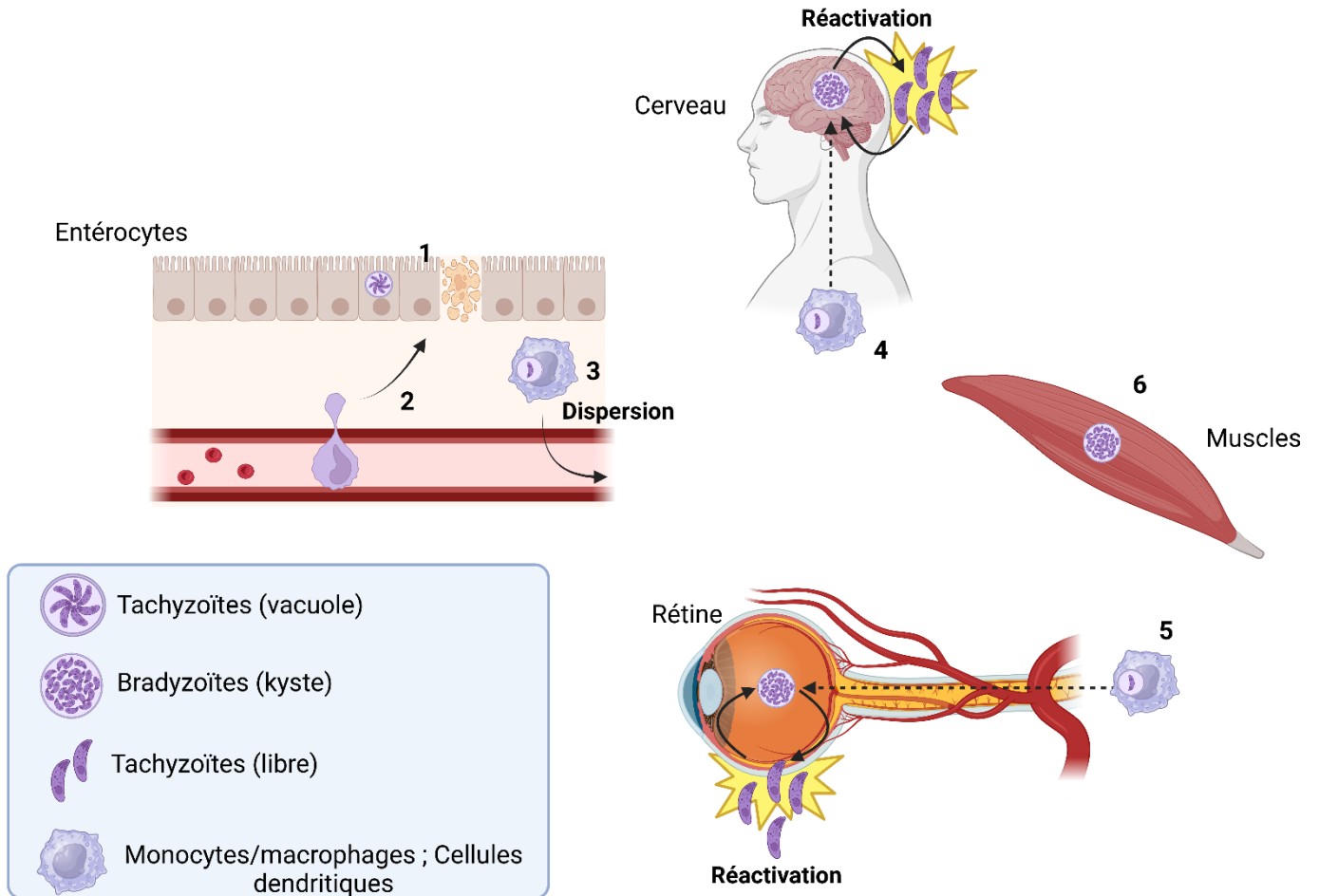
(Fig.4) Classification phylogénétique des souches toxoplasmiques en 6 clades et 14 haplogroupes. Su *et al.*, (2012)

Cette répartition ne permet néanmoins pas de retrouver de relation avec la classification phénotypique. En effet, dans chaque haplogroupe il est possible de retrouver plusieurs types de souches différentes. Les haplogroupes, ne reflètent donc pas la virulence de la souche parasitaire mais permettent d'avoir une idée de leurs proximités génétiques. Ce type de classification est également un outil indispensable pour tenter d'expliquer la répartition

géographique des souches dans le monde ainsi que la très grande diversité de parasites retrouvée dans certaines régions comme l'Amérique du Sud notamment. Cette diversité plutôt hétérogène semble être liée d'une part, à l'histoire de la domestication des félins (27) sélectionnant certaines souches très clonales et donc réduisant fortement la diversité génétique des souches. D'autre part, la variété et le type d'hôte intermédiaire impactent également très fortement la diversité des souches ainsi que leurs virulences (28). En effet, en Europe, la majorité des études montre la présence d'une importante proportion de souches parasites de type II (29). En Amérique du Nord en revanche, il existe une répartition plus hétérogène entre les souches de type I, II et III. Dans certaines régions d'Amérique du Sud par contre, il circule une variété extrêmement importante de souches parasites. Cette diversité devient d'autant plus importante dans les régions rurales, où la présence du chat domestique est plus faible et où l'on retrouve une variété beaucoup plus importante d'hôtes intermédiaires. Dans ce contexte, des mécanismes d'hybridations entre des souches du « *nouveau monde* » et des souches clonales ont également été récemment décrits donnant une explication supplémentaire à cette diversité observée (27). Souvent, ces souches sont associées à une virulence importante et à un tableau clinique généralement différent de celui retrouvé en Europe et en Amérique du Nord.

Partie II : Physiopathologie de la Toxoplasmose

Chapitre 1 : Physiopathologie générale



(Fig.5) Les étapes d'invasion et de dissémination de *Toxoplasma gondii* dans son hôte. (Figure créée sur Biorender.com)

1. Après ingestion *T. gondii* infecte les entérocytes du tube digestif de son hôte, induisant des dommages cellulaires et une inflammation. **2.** Recrutement de cellules immunitaires par chimiotactisme. **3.** Invasion de monocytes/macrophages et cellules dendritiques permettant la dissémination via le réseau sanguin et lymphatique. **4.** Passage de la barrière hémato-encéphalique et invasion du cerveau (formation de kystes). **5.** Passage des barrières hémato-rétiniennes et invasion de la rétine (formation de kystes). **6.** Infection des cellules musculaires squelettiques et cardiaques (formation de kystes).

1.1 Reconnaissance du parasite

Chez l'homme, l'infection se fait soit par ingestion de parasites sous la forme de bradyzoïtes contenus dans les kystes, soit par ingestion de la forme sporozoïte contenue dans les oocystes excrétés par les félins. Indépendamment de la source de contamination, le parasite se différencie rapidement en tachyzoïte après l'arrivée dans le tube digestif (**Fig.5**). Le parasite infecte les entérocytes et traverse la barrière intestinale, lui permettant ainsi de se disperser dans son hôte. Cette première phase dans l'intestin de l'hôte induit une première réponse immunitaire due, d'une part à la reconnaissance du parasite, grâce à des motifs moléculaires associés aux pathogènes « *pathogen associated molecular patterns* » (PAMP) et d'autre part aux motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires « *Damage associated molecular patterns* » (DAMP) relargués lors de lyse des cellules infectées. Ces différents motifs sont reconnus par une multitude de récepteurs de l'immunité innée. Les « *Toll-like receptors* » (TLR), plus particulièrement les TLR2, TLR4, TLR7, TLR9, TLR11 et TLR12 sont importants pour la reconnaissance de *T. gondii* (30). Après reconnaissance de leurs ligands, les TLR activent « *myeloid differentiation primary response 88* » (MyD88) formant le Myddosome et induisant l'activation de multiples facteurs de transcription tels que ceux de la famille des « *Interferon regulatory factors* » (IRF) et NFκB (31). Cela va conduire à la sécrétion de cytokines et de chémokines permettant la polarisation de la réponse immunitaire selon la nature du ligand reconnu. Lors d'une infection toxoplasmique la première cytokine centrale sécrétée est l'IL-12 permettant l'induction d'une réponse immunitaire protectrice de type I.

Les TLR jouent donc un rôle central dans la reconnaissance du parasite et l'amorçage de la réponse immunitaire, néanmoins leur importance respective est variable en fonction de l'espèce considérée. Chez le rongeur, les TLR endosomaux 11 et 12 sont les plus importants. En effet, des souris KO pour le gène codant le TLR11 ou le TLR12 ont la même susceptibilité à une infection toxoplasmique que des souris MyD88 KO. Ces deux TLR reconnaissent directement la profiline, une protéine importante dans le contrôle de la polymérisation de l'actine et indispensable à l'invasion et la mobilité parasitaire de *T. gondii* (32). L'Homme en revanche ne possède pas de gène fonctionnel codant pour le TLR11 et aucun gène pour le TLR12, sa reconnaissance repose donc principalement sur les TLR2, TLR4, TLR7 et TLR9. En utilisant uniquement des données obtenues chez la souris, l'importance relative de ces TLR est très certainement sous-estimée chez l'Homme. En effet, chez la souris l'absence du TLR2

n'a un impact que lors d'infection avec une charge parasitaire conséquente, et le KO du TLR4 reconnaissant « *Heat Shock protein 70* » (HSP70) et les glycosylphosphatidylinositols GPI n'a pas d'effet notable. Les TLR7 et TLR9 sont endosomaux et respectivement responsables de la reconnaissance des uraciles, de l'ARN et de l'ADN non méthylé avec des motifs CpG bactériens ou viraux (30). Ils sont activables avec de l'ARN et de l'ADN parasitaire, mais également avec des ARN et ADN de l'hôte. De plus, le TLR7 n'est pas exprimé par les cellules dendritiques CD8 α^+ qui jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse immunitaire toxoplasmique (33). D'autres familles de senseurs de l'immunité innée existent, comme ceux des « *NOD-like receptors* » (NLR) et plus particulièrement « *NOD- LRR- and pyrin domain containing 1* » (NLRP1) qui induisent l'activation de l'inflammasome et ainsi l'activation par clivage de la proIL-1 β et de la proIL-18 en IL-1 β et IL-18. *In vitro*, la capacité de NLRP1 à reconnaître *T. gondii* est néanmoins dépendante de la présence de lipopolysaccharide LPS un PAMP bactérien. Malgré tout, NLRP1 pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance parasitaire, puisque son KO induit une augmentation de la susceptibilité. Les premières étapes de l'infection se déroulant au niveau du tube digestif, un mécanisme de « *priming* » par le microbiote intestinal pourrait donc être impliqué. Récemment, l'importance de NLRP3 dans la reconnaissance et l'élimination de la vacuole parasitophore a également été décrite. La reconnaissance du parasite nécessite l'interaction entre la U3 ubiquitine ligase ITCH et la protéine parasitaire GRA35. En absence d'IFN- γ cette interaction va entraîner la mort de la cellule par pyroptose, une mort cellulaire due à l'activation de l'inflammasome et entraînant une inflammation très importante. En présence d'IFN- γ la vacuole parasitophore est ubiquitinylée et détruite sans causer la mort de la cellule (34).

1.2 Le recrutement des cellules immunitaires, sources d'IFN- γ

À la suite de la reconnaissance du parasite via des mécanismes de l'immunité innée, diverses cytokines seront sécrétées et conduisent au recrutement de cellules immunitaires sur les lieux de l'inflammation. Dans un premier temps, ce sont essentiellement les neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules dendritiques ainsi que les cellules « *natural killer* » (NK) qui vont infiltrer les tissus concernés. Les différents mécanismes conduisant à la sécrétion de chemokines et leurs importances lors d'infection toxoplasmique sont peu connus. Les chemokines sont une classe de cytokines chemo-attractantes agissant sous forme de gradient de concentration et permettant le recrutement de certaine population

immunitaire. Le recrutement spécifique d'une cellule est conditionné par l'expression de son récepteur qui peut varier en fonction de l'état d'activation de la cellule et du contexte inflammatoire. L'alarmine S100A11 a récemment été décrite comme un acteur crucial de la réponse immunitaire anti-toxoplasmique humaine. S100A11 est sécrétée par les monocytes infectés et va conduire à la sécrétion de la chémokine « *CC ligand 2* » (CCL2) (35). CCL2 ou « *monocyte chemoattractant protein 1* » (MCP1) interagit avec ses récepteurs « *CC receptor 2* » (CCR2) et CCR4 et permet le recrutement de monocytes inflammatoires iNOS⁺. Cette chemokine a également montré son importance dans la réponse immunitaire au niveau du système nerveux central. En effet, dans un modèle murin de C57BL/6J l'absence de sécrétion de CCL2 par les astrocytes augmente la charge parasitaire durant la phase chronique de l'infection. Cette charge parasitaire plus importante est due à une infiltration moins importante de cellules myéloïdes et de LT CD4⁺ spécifiques de *T. gondii* (36). Les monocytes/macrophages et les DC CD8α⁺ vont être les premiers producteurs d'IL-12, l'interleukine permettant d'induire la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Leurs importances ont très rapidement été mises en évidence, puisque leurs absences entraînent une susceptibilité accrue à l'infection par *Toxoplasma gondii* (37). Cette susceptibilité est néanmoins moins importante que chez des souris KO pour l'IFN-γ, notamment dû au fait que les neutrophiles représentent également une source importante d'IFN-γ, mais cette sécrétion n'est ni dépendante de l'IL-12, ni de l'activation des TLR (38).

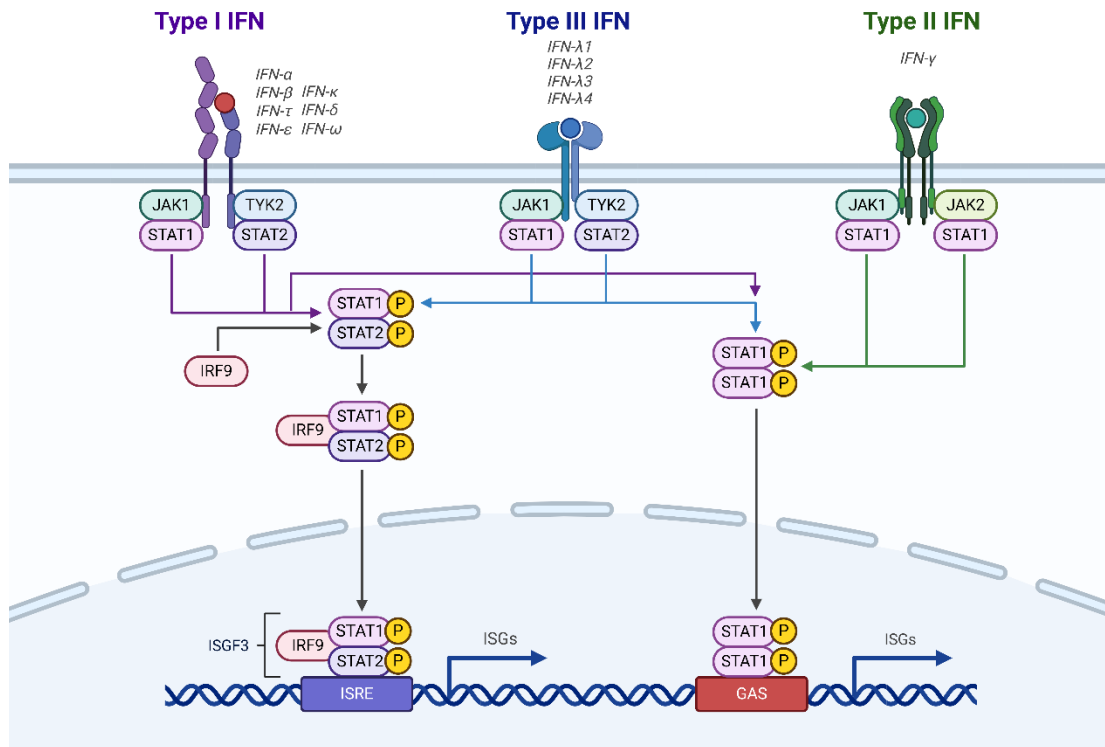
1.3 Conclusion physiopathologie générale

L'histoire coévolutive entre *Toxoplasma gondii* et ses hôtes intermédiaires a favorisé l'émergence de systèmes de détection dédiés à la reconnaissance de ce parasite. Cette reconnaissance permet d'amorcer une réponse immunitaire protectrice polarisée de type I (Th1). Cette réponse immunitaire est construite autour de l'IFN-γ et de la réponse cytotoxique dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T CD8⁺, NK et NKT. La pression du système immunitaire va ensuite conduire à l'enkystement sous la forme bradyzoïte du parasite lui permettant de persister dans son hôte. Une pression immunitaire permanente est nécessaire pour éviter la réactivation des kystes. Cette pression est principalement exercée par les LT CD8 cytotoxique (18). Pour une raison non connue, malgré une pression immunitaire active,

des kystes au niveau de la rétine peuvent se réactiver, étant à l'origine d'une chorioretinite appelée Toxoplasmose oculaire.

Partie III : Rôle des interférons dans la Toxoplasmose

Chapitre 1 : Les interférons chez l'Homme et la souris



(Fig.6) Voie de signalisation canonique des interférons. Figure reprise de “Interferon Pathway”, de BioRender.com (2024). Retrouvé sur <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.1 Les interférons de type I, II et III

Les interférons, décrits initialement comme interférant avec la multiplication virale en 1957 (39) sont une famille de cytokines classées en 3 types (**Fig.6**). Chez les interférons de type I, il existe 9 isotypes différents : IFN- α , IFN- β , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- ω , IFN- ζ et IFN- ν . Chez l'Homme les deux isoformes principales sont l'IFN- α et l'IFN- β mais les isoformes IFN- ϵ , IFN- κ et IFN- ω sont également retrouvées, dépendamment du contexte. Les autres isoformes sont soit absentes du génome humain soit présentes sous forme de pseudogène. Malgré la multitude d'isoformes les interférons de type I se lient tous au même récepteur hétérodimérique « *interferon alpha receptor 1 / 2* » (IFNAR1 / IFNAR2). Le domaine cytosolique du récepteur est associé à la tyrosine kinase « Janus Kinase 1 » JAK1 et à la « Tyrosine Kinase 2 » TYK2 qui vont phosphoryler « *Stat proteins, for signal transducers and activators of transcription 1* » (STAT1) et STAT2 entraînant leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. Dans le noyau ils vont s'associer avec « *IFN regulatory factor 9* » (IRF9) pour former le complexe « *IFN stimulated gene factor 3* » (ISGF3) agissant comme facteur de transcription pour de nombreux « *IFN stimulated genes* » (ISG) (40).

Les interférons de type III sont subdivisés en 4 isoformes : IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) et IFN- λ 4. Chez l'Homme on retrouve l'ensemble des 4 isoformes, l'expression de l'IFN- λ 4 est variable à cause de la présence d'une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture de la région promotrice du gène. La séquence peptidique de l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3 est très proche de l'ordre de 96 %. L'IFN- λ 1 en revanche n'a une homologie de seulement 81% (41). Chez la souris on ne retrouve que l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3, l'IFN- λ 1 est un pseudogène et l'IFN- λ 4 est complètement absent. Tout comme les interférons de type I, les 4 isoformes des interférons de type III interagissent avec le même récepteur hétérodimérique, composé d'une sous-unité spécifique « *IFN lambda receptor 1* » (IFNLR1) et d'une sous-unité IL-10R2. La transduction du signal est ensuite la même que pour les interférons de type I, conduisant à la formation du même complexe ISGF3. Malgré cette redondance apparente les interférons de type III agissent de manière différente et complémentaire aux interférons de type I. En effet, le récepteur des interférons de type I est exprimé de manière quasi ubiquitaire, celui des interférons de type III en revanche est restreint. L'expression de la sous unité spécifique IFNLR1 est restreinte principalement aux cellules épithéliales et endothéliales de tous types, ainsi qu'à certaines cellules immunitaires. Ce « *pattern* » est également retrouvé

chez la souris, il existe néanmoins plusieurs différences concernant l'expression du récepteur parmi les populations de cellules immunitaires. Les lymphocytes B et les macrophages murins n'expriment pas ce récepteur, contrairement à ceux de l'Homme. De plus, pour de nombreux types cellulaires, l'expression de ce récepteur reste encore incertaine ou fait l'objet de débats (42). L'expression du récepteur semble donc concentrée au niveau des différentes barrières physiologiques. Même si le mécanisme de transduction est partagé avec celui des interférons de type I, la dynamique et l'intensité du signal transduit est très différente. En effet, à cause d'une quantité de récepteur plus faible, la phosphorylation de STAT1 et STAT2 est plus faible. Cela entraîne une différence dans le profil des ISG exprimés, notamment de certains ISG très inflammatoires tels qu'IRF1 fortement induits par les interférons de type I mais absents pour les interférons de type III (43,44). Une autre différence majeure est l'induction beaucoup moins importante d'ISG agissant en rétrocontrôle négatif tels que les protéines de la famille SOCS et USP18 (45). En conséquence, la réponse aux interférons de type III est moins inflammatoire et plus longue, permettant ainsi de prendre le relais de la réponse initiale des IFN de type I qui est très brève mais très intense. La combinaison de ces deux réponses a sûrement été sélectionnée ainsi au cours de l'évolution, puisqu'elle permet donc un contrôle plus efficace, en limitant les dommages causés par une inflammation exacerbée.

Les interférons de type II ne sont composés que d'une seule isoforme, l'interféron gamma. L'IFN- γ a été décrit pour la première fois par E. Frederick Wheelock en 1965 (46), il est connu depuis longtemps comme une cytokine capable d'inhiber de manière directe la multiplication de *T. gondii* (47). Après fixation à son récepteur hétérodimérique « *interferon gamma receptor 1* » IFNGR1 / IFNGR2 il va induire la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1 (48) servant de facteur de transcription pour de nombreux ISG. Contrairement aux deux autres types d'interférons décrits précédemment, la sécrétion d'IFN- γ est restreinte aux cellules immunitaires et plus particulièrement aux lymphocytes T helper 1, aux LT CD8⁺, aux neutrophiles et aux cellules NK. L'expression de son récepteur en revanche est quasi ubiquitaire. L'IFN- γ joue également un rôle essentiel dans la polarisation de la réponse immunitaire, sécrété par les LT CD4⁺ helper 1 (LTh1) il agit négativement sur l'expression de GATA3 un facteur de transcription nécessaire pour la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LTh2.

Chapitre 2 : Inhibition de la multiplication de *Toxoplasma gondii* par les interférons

Les 3 types d'interférons possèdent tous certaines spécificités mais conduisent finalement tous à l'expression d'un groupe de gènes impliqués dans des mécanismes de défense contre les pathogènes intracellulaires nommé ISG. Parmi ces ISG on retrouve de très nombreux effecteurs modulant le milieu intracellulaire afin de le rendre moins propice à la multiplication de pathogène. La liste des ISG, pour lesquels un effet direct sur la multiplication toxoplasmique est connu, sont : L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), « *inductible nitric oxide synthase* » (iNOS), ISG15, les « *guanylate binding proteins* » (GBP) et les « *IFN-inducible GTPases* » (IRG). Les IRG ne sont pas exprimés chez l'homme et sont spécifiques à la réponse anti-toxoplasmique murine laissant IDO, GBP1, iNOS et ISG15 comme principaux effecteurs décrits chez l'Homme (49). Ces effecteurs peuvent ensuite être classés en 3 sous-groupes en fonction de leurs modes d'action. Les ISG privant le parasite d'un composé essentiel à sa multiplication, les ISG induisant un stress oxydatif et ceux permettant la destruction de la vacuole parasitophore :

Effector molecule (s)	IFN	Host species	Cell type (s)	<i>T. gondii</i> strain (s)	Mechanism of protection
NOXs, SOD*	IFN- γ	humans, mice	monocytes, macrophages, DCs	type I	ROS toxicity
iNOS	IFN- γ	mice	macrophages, muscle cells	type I, II	RNS toxicity
IDO1	IFN- γ	humans	macrophages, fibroblasts,	type I, II	tryptophan depletion
	IFN- β		glioblastoma, endothelial cells macrophages	type I	
IRGs, GBPs	IFN- γ	mice	macrophages, fibroblasts, astrocytes, muscle cells and others	type II, III	PV disruption, parasite killing, host cell death
IRGs?* (Irgm1/Irgm3- dependent)	IFN- β	mice	fibroblasts, macrophages intestinal cells	type II	PV disruption, parasite growth inhibition
	IFN- λ				
IRGs	IFN- γ	wild-derived mice, e.g. CIM	diaphragma cells	type I, II, III	PV disruption, parasite killing, host cell death
GBP1	IFN- γ	humans	macrophages, mesenchymal stromal cells	type I, II	PV disruption, parasite killing, host cell death
ISG15, RNF213, ubiquitin, autophagy proteins	IFN- γ (ISG15, RNF213)	humans	epithelial cells endothelial cells, HFF	type II, III, to a lesser extent type I type II	non-canonical autophagy, parasite growth restriction PV fusion with lysosomes, acidification
Unknown	IFN- γ	humans	HFF	type I	Host cell death, premature parasite egress

Tableau 1 : Les principaux ISG qui permettent le contrôle le *T. gondii* chez l'Homme et la souris (49).

2.1 L'indoleamine 2,3-dioxygénase IDO1

IDO est un groupe de 3 enzymes intervenant dans le catabolisme du tryptophane et permettant la production de cofacteur NAD⁺ avec des catabolites intermédiaires tels que la kynurénine. *Toxoplasma gondii* étant auxotrophe pour le tryptophane, une diminution dans son accessibilité résulte en une diminution de sa multiplication. Le métabolisme du tryptophane impacte également fortement l'activation de la réponse immunitaire, une forte activité d'IDO et une faible concentration de tryptophane conduisent à un environnement immunosuppresseur. En effet, les métabolites intermédiaires dans le catabolisme du tryptophane ont un effet inhibiteur de la voie mTORC1 et augmentent l'expression de PD1 chez les LT CD8⁺(50).

2.2 Inductible Nitric oxide synthase iNOS

Il existe 3 isoformes de l'enzyme « *Nitric oxide synthase* » (NOS) ayant des activités ainsi qu'une localisation tissulaire différente : nNOS exprimé de manière constitutive dans les cellules neuronales, eNOS également exprimé de manière constitutive dans les cellules endothéliales et iNOS une forme inductible, initialement décrite chez les macrophages mais pouvant être induite en réponse aux IFN ou par la voie NFκ-B dans n'importe quel type cellulaire. Grâce à son activité de désamination oxydative de la L-arginine et de la L-citruline il va produire du monoxyde d'azote NO ayant une action inhibitrice sur la multiplication parasitaire de *Toxoplasma gondii* mais également sur d'autres protozoaires tels que *Leishmania spp.* ou encore *Trypanosoma spp* (51).

2.3 ISG15

Récemment un mécanisme impliquant ISG15 a été décrit, permettant le recrutement de LC3 à la surface de la vacuole parasitophore conduisant à son élimination grâce à des mécanismes d'autophagie (52). Ce mécanisme a été mis en évidence en réponse à une stimulation d'IFN-γ sur des lignées cellulaires humaines HeLa et A549. En effet, l'étude de l'interactome d'un des effecteurs clés de la voie de l'autophagie (ATG) ATG5 a révélé une interaction avec ISG15. ISG15 est un ISG attribué aux interférons de type I et III, mais son expression est tout de même induite en réponse à l'IFN-γ. Même si l'article de Bhushan *et al.*

ne s'intéresse pas à l'effet des interférons de type I et III dans ce mécanisme, il pourrait être impliqué dans le contrôle parasitaire de ces types d'interférons.

Chapitre 3 : Focus sur les interférons de type I et III dans le contrôle de la multiplication de *Toxoplasma gondii*

3.1 Les interférons de type I

La capacité des interférons de type I à pouvoir limiter la prolifération parasitaire de *T. gondii* est très débattue, déjà au début des années 90. En 1991, Manuel A. Orellana a montré que l'IFN- β recombinant murin pouvait réduire la multiplication toxoplasmique dans des macrophages humains ainsi qu'augmenter la survie de souris C57 infectées (53). La discussion faisait déjà référence à plusieurs articles montrant l'absence d'effet notable de l'IFN- β sur la réponse anti-toxoplasmique (54–56) et une autre étude montrant un effet des IFN- β sur des macrophages humains, via un mécanisme dépendant de IDO (57). IDO est très fortement exprimé en réponse à l'IFN- γ et cela dans la majorité des cellules, mais l'IFN- β est également capable de l'induire de manière beaucoup plus faible (58). Les études précédemment décrites ont toutes été conduites sur des macrophages humains dérivés de monocytes. L'étude de Chandrasekharam N. Nagineni en 1996 a été réalisée sur des cellules rétinienne pigmentaires épithéliales humaines primaires (HRPE) (59). Cette étude montre un effet de l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- γ et le TNF- α sur la multiplication parasitaire, grâce à un mécanisme qui dépend d'IDO. En effet, la complémentation du milieu en tryptophane réduit l'effet des cytokines et les HRPE n'expriment pas iNOS. Par ailleurs, leurs résultats confirment également la capacité de l'IFN- α et de l'IFN- β d'induire IDO mais de manière significativement moins importante que l'IFN- γ .

3.2 Rôle spécialisé des interférons de type III au niveau des barrières physiologiques et muqueuses

Les données qui concernent le rôle des IFN- λ dans la réponse immunitaire anti-toxoplasmique sont encore plus anecdotiques. Les mécanismes impliqués dans la régulation de *T. gondii* par les IFNs de type I pourraient être redondant avec ceux des interférons de type III. Néanmoins, dans d'autres contextes, c'est le plus souvent une complémentarité et non une redondance qui est démontrée. La thèse de Valentin Greigert en 2019 s'est intéressée à cette question en étudiant les ISG exprimés en réponse aux différents types d'interférons dans des

lignées cellulaires oculaires humaines. Ses résultats montrent une expression d'ISG15 par des cellules rétinienne pigmentaires épithéliales, des cellules microgliales, des astrocytes et des cellules de Müller en réponse à l'IFN- λ 1, l'IFN- λ 2, IFN- β et l'IFN- γ . Les résultats montrent également que l'IFN- β induit la plus forte expression d'ISG15 et que l'IFN- λ 1 et l'IFN- λ 2 induisent une réponse similaire. Les interférons de type III sont donc capables d'induire l'expression d'ISG15 dans des cellules rétinienne humaines ainsi ils pourraient donc également induire l'élimination de la vacuole parasitophore par des mécanismes d'autophagie (52).

L'expression du récepteur aux IFN de type III, principalement restreinte aux cellules épithéliales, confère aux IFN de type III un rôle clé dans la défense des barrières physiologiques. De nombreuses données concernant leur importance dans la réponse immunitaire des épithéliums intestinaux, des épithéliums respiratoires, des épithéliums urogénitaux ainsi que de la peau existent (42). En effet, des souris *ifnlr1*^{-/-} KO montrent par exemple une susceptibilité accrue aux infections intestinales à rotavirus (60) ainsi qu'aux infections respiratoires à l'influenza virus (61). Les IFN- λ sont également capables d'agir sur l'endothélium microvasculaire cérébral en diminuant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et en réduisant ainsi l'infection cérébrale au virus West-Nile (62). Ces données montrent également, par l'utilisation de souris *STAT1*^{-/-} KO, que l'effet est indépendant de la voie canonique des interférons. Le même effet est également observé avec les interférons de type I, néanmoins à ce jour le mécanisme impliqué reste encore à déterminer. Ceci met donc en évidence une nouvelle fonction des interférons dans le contrôle de la perméabilité des zones immunoprivilégiées comme le système nerveux central.

Partie IV : Immunoprivilège et Toxoplasmose oculaire

Chapitre 1 : Définitions et concepts clés

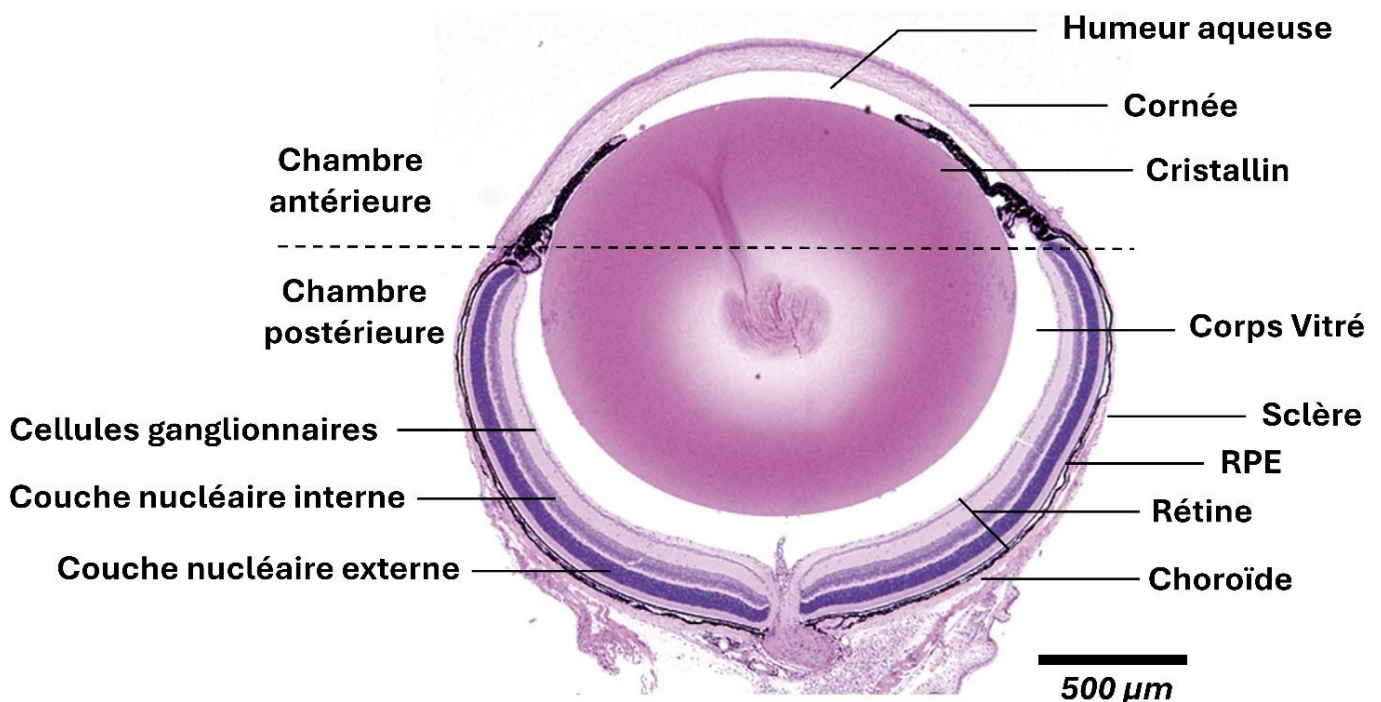
L'immunoprivilège ou privilège immunitaire comprend un ensemble de mécanisme et de structure qui permettent de restreindre l'accès et limiter l'activation de la réponse immunitaire dans certains tissus fragiles qui ont une importance capitale pour la survie de l'individu ou de l'espèce. Les principaux organes concernés et historiquement décrit comme immunoprivilégié sont le cerveau, l'œil ainsi que les gonades. Ce concept est né dans le contexte d'expérience d'homogreffe (greffe d'un tissu provenant d'un individu différent mais de la même espèce) aujourd'hui appelée allogreffe et plus particulièrement à la suite d'observations faite par Y. Shirai en 1921 (63) puis plus-tard complétées par les travaux de P.B. Medawar au milieu du XXème siècle (64). Ces travaux démontrent qu'une allogreffe de tissu cutané au niveau du cerveau ou de la chambre antérieure de l'œil n'entraîne pas de rejet du greffon et qu'elle conduit à un état de tolérance antigénique systémique de l'hôte. Cela est possible uniquement lorsque la rencontre avec l'antigène se fait au niveau du site immunoprivilégié, puisqu'une immunisation préalable à la greffe entraîne le rejet du greffon. Cette observation souligne donc également que le contexte de rencontre de l'antigène conditionne la réponse immunitaire, une rencontre dans un site immunoprivilégié conduisant à un état de tolérance immunologique. Plus tard, Medawar définira cette tolérance immunologique par « l'absence de réaction immunitaire dans un contexte où elle serait normalement attendue » (65). Cette tolérance est dite périphérique et s'oppose à la tolérance centrale, qui désigne les mécanismes de sélection positive et négative lors de la maturation du TCR et du BCR de la lignée lymphoïde. Bien que les expériences historiques ayant permises la description initiale du privilège immunitaire soient relativement anciennes sa définition est en permanent questionnement et l'état actuel des connaissances tend à montrer que le privilège immunitaire se traduit plus par un spectre que par un phénomène absolu (66). Différents mécanismes et structures sont impliqués dans l'établissement du privilège immunitaire. D'une part, la présence de barrières physiques qui limitent l'accès aux cellules du système immunitaire périphérique. D'autre part, des facteurs membranaires et solubles sont présents pour inhiber l'activation et l'action des cellules immunitaires. Dans la section suivante nous

allons nous attarder plus spécifiquement sur les différentes composantes anatomiques et cellulaires impliquées dans l'établissement du privilège immunitaire oculaire.

Chapitre 2 : Une structure anatomique et une organisation tissulaire optimisant l'immunoprivilège rétinien

2.1 Anatomie de l'œil et de la rétine

La chambre postérieure de l'œil est composée de trois structures principales (**Fig.7**) : La sclère est composée de tissus conjonctifs formant une enveloppe rigide et épaisse ayant une fonction structurale. La choroïde qui est un tissu conjonctif fortement vascularisé avec un endothélium fenestré assurant l'apport de nutriment à la rétine adjacente. La rétine, principalement constituée de photorécepteurs, de neurones, de cellules gliales et microgliales.



(Fig.7) L'anatomie de l'œil chez la souris.(67)

Les cellules rétiniennes pigmentaires épithéliales (RPE) reposent sur la membrane de Bruch et séparent le sang choroïdien de la rétine neurale. La rétine est ensuite subdivisée en 3 couches principales :

- La couche nucléaire externe ou ONL en anglais pour « *outer nuclear layer* ». C'est dans cette couche que l'on retrouve les noyaux des photorécepteurs (cônes et bâtonnets).
- La couche nucléaire interne ou INL « *inner nuclear layer* ». Correspondant à la couche des interneurons (cellules bipolaires, horizontales et amacrine). C'est également dans cette couche que se situe le noyau des cellules de Müller, mais dont le prolongement cytoplasmique traverse toutes les couches de la rétine.
- Finalement, à l'abord de la vitré se situe la couche de cellule ganglionnaire ou GCL « *ganglion cell layer* ». Cette couche est composée principalement de cellules ganglionnaires et d'astrocytes. Les cellules ganglionnaires sont des neurones dont le rôle est de transmettre le signal provenant des interneurons vers le nerf optique.

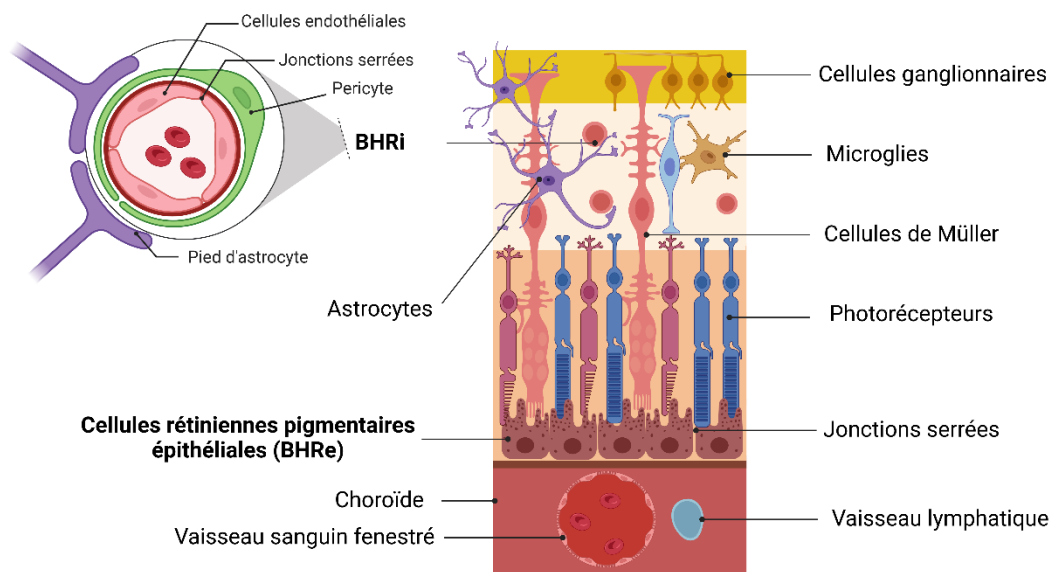
Deux couches plexiformes séparent les deux couches nucléaires : la couche nucléaire externe et interne sont séparées par la couche plexiforme externe ou « *outer plexiform layer* » (OPL), et la couche nucléaire interne et la couche des cellules ganglionnaires par la couche plexiforme interne ou « *inner plexiform layer* » (IPL). La rétine comprend également une population de cellules immunitaires résidentes, nommées microglies. Les microglies se situent dans la couche nucléaire interne (INL) et dans la couche plexiforme interne (IPL).

2.2 Barrières hémato-rétiniennes : internes et externes

La rétine fait partie du système nerveux central et possède donc à ce titre des structures assurant son étanchéité et son immunoprivilège vis-à-vis du système immunitaire. Cette étanchéité est assurée par deux barrières (**Fig.8**) :

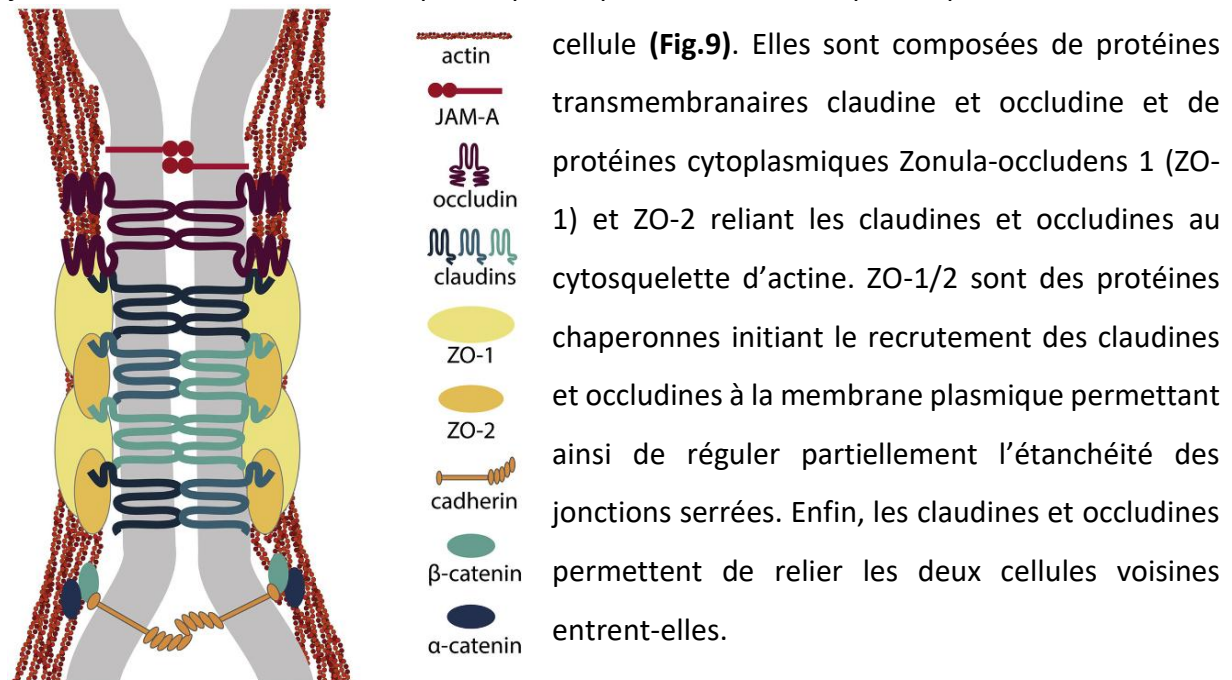
- La barrière hémato-rétinienne externe (BHRe) dont l'étanchéité est assurée par un épithélium simple de cellules rétiniennes pigmentaires épithéliales (RPE) qui permet de séparer la choroïde des photorécepteurs.
- La barrière hémato-rétinienne interne (BHRi) composée d'un endothélium microvasculaire irrigant la rétine et supportée par des péricytes et des pieds astrocytaires. Cette barrière est structurellement semblable à la composante vasculaire de la barrière hémato-encéphalique et remplit des fonctions similaires.

Barrières Hémato-rétiniennes



(Fig.8) : Les barrières hémato-rétiniennes externe (BHRe) et interne (BHRI). (Figure créée sur Biorender.com)

L'étanchéité de ces deux barrières est assurée par la présence de jonctions serrées. Les jonctions serrées sont des complexes protéiques retrouvés aux pôles apicaux latéraux de la



(Fig.9) : Structure moléculaire des jonctions serrées (68).

Il existe une grande variété de claudines ayant un tropisme tissulaire et des fonctions spécifiques. En effet, les claudines forment également des pores ioniques sélectifs permettant ainsi de réguler l'osmolarité du milieu extracellulaire ou bien d'assurer le maintien d'un potentiel membranaire. Le principal rôle des claudines est donc d'assurer l'étanchéité ionique de la jonction serrée. Les occludines font partie de la famille des « *MARVEL domain containing proteins* » et sont impliquées dans des mécanismes de remodelages des jonctions nommées « *leak pathway* » permettant le passage de plus grosses macromolécules. Ensemble les claudines et occludines sont donc responsables d'un contrôle dynamique et spécifique de l'étanchéité de la jonction serrée (68).

2.3 Rôle des macroglies et microglies dans la rétine

Comme décrit dans les précédentes sections, la rétine est composée des cellules neurales permettant de remplir la fonction primaire de la rétine et des cellules gliales que l'on peut diviser en deux catégories :

Les macroglies de la rétine sont principalement les astrocytes et les cellules de Müller.

Les cellules de Müller représentent 90 % des cellules gliales de la rétine. Leurs corps cellulaires s'étendent de la GCL jusqu'au RPE et leurs processus permettent d'assurer l'échange de molécules entre toutes les couches de la rétine, permettant ainsi d'assurer l'homéostasie et la survie des neurones. Elles jouent également un rôle important dans le maintien de l'étanchéité de la barrière hémato-rétinienne interne (BHRI) en apportant un support à l'endothélium vasculaire irrigant la rétine (69).

Les astrocytes sont des cellules gliales ayant une forme stellaire et remplissent un rôle similaire aux cellules de Müller. Leurs corps cellulaires sont principalement localisés dans la couche ganglionnaire et les pieds astrocytaires se lient à la fois aux axones des neurones et à l'endothélium vasculaire rétinien. Ainsi, ils assurent le maintien de la BHRI, ainsi que la communication axonale le long du faisceau de fibre optique (69).

Les microglies sont une population de macrophages spécialisés résidents de la rétine. L'ontogénie exacte des microglies est longtemps restée très débattue, des avancées récentes dans le domaine montrent, que les microglies sont dérivées du sac vitellin embryonnaire et envahissent le système nerveux central, avant la mise en place de la barrière hémato-encéphalique. Les microglies se différencient ensuite spécifiquement de manière

spatiotemporelle, mais également sous l'influence de stimulus environnementaux (70). Leurs fonctions sont multiples puisqu'ils sont capables de se polariser en fonction du contexte inflammatoire en microglies de type M1 pro-inflammatoire ou de type M2 anti-inflammatoire participant à la régénération tissulaire (71,72).

Chapitre 3 : L'immunoprivilège rétinien à l'échelle moléculaire ; facteurs membranaires et solubles impliqués.

3.1 État de l'art

L'immunoprivilège de la rétine est assuré par la présence de deux barrières hémato-rétiniennes : la BHRe et la BHRI précédemment décrites. En complément de la BHRe et de la BHRI l'immunoprivilège de la rétine est également assuré par la présence de facteurs solubles et membranaires permettant de contrôler la réponse immunitaire. En effet, les RPE composants la BHRe sécrètent également de nombreux facteurs solubles anti-inflammatoires tels que :

- « *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 2 alpha* » (CLTA-2 α) qui permet l'induction de cellules T régulatrices (T reg) sous l'influence de « *Tumor growth factor bêta* » (TGF- β) et de la vitamine A (73). Les T reg ainsi générés produisent une quantité importante de TGF- β et d'IL-10 inhibant l'activation de nombreux effecteurs de l'immunité.
- « *alpha melanocyte stimulating hormone* » (α -MSH) permettant l'inhibition de la génération de ROS, NO, cytokine pro-inflammatoire (74). De plus, les macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles possèdent également un récepteur pour l' α -MSH, inhibant leurs capacités à être recrutés par chimiotactisme (75).

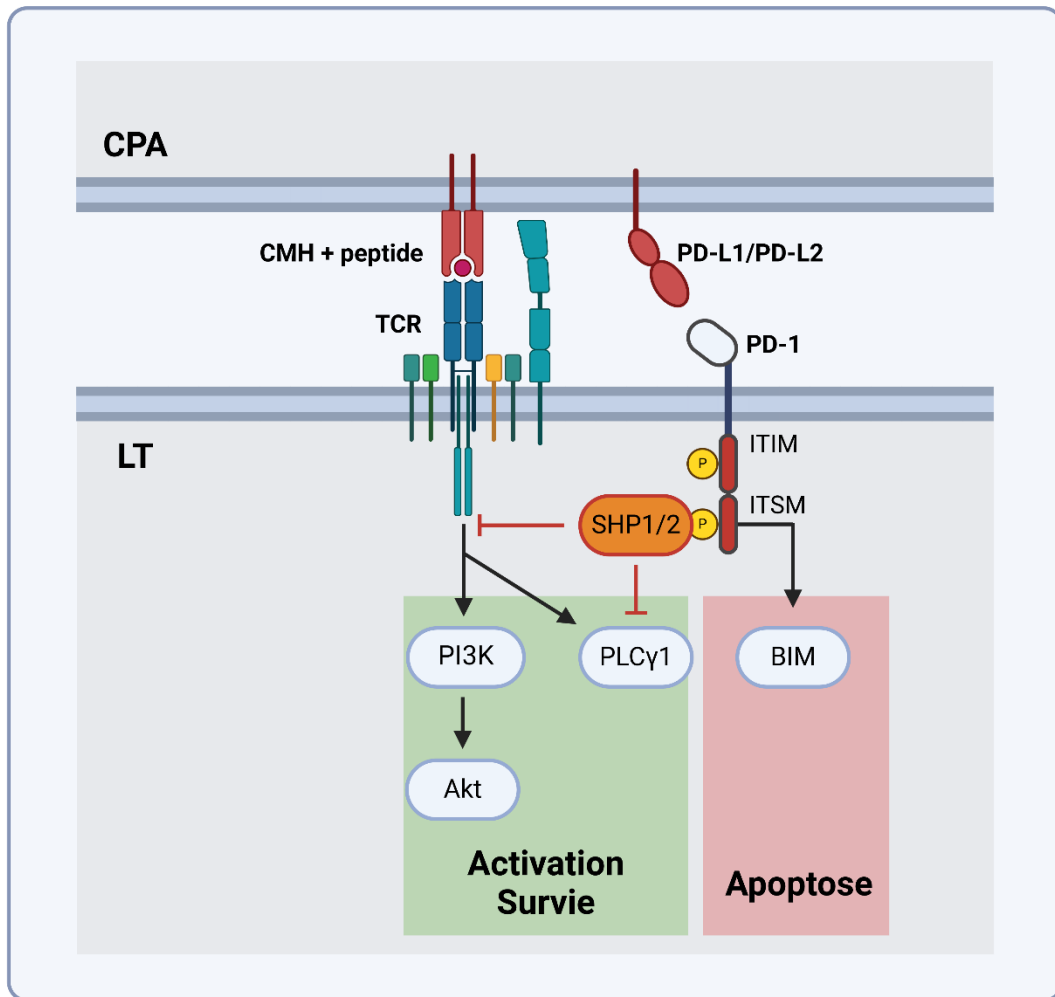
Des facteurs membranaires, récepteurs et ligands sont également responsables du maintien de l'immunoprivilège oculaire. Les protéines du CMH jouent un rôle clef dans l'activation et l'activité de réponse immunitaire adaptative mais également innée par leurs implications dans les mécanismes d'immuno-surveillance. En condition homéostatique, il y a une faible expression du CMH de classe I dans l'œil. Cette faible expression est modulable en cas d'infection. En effet, lors d'une toxoplasmose oculaire, l'expression du CMH I plus particulièrement de la β 2-microglobuline est augmentée (76). Les études qui s'intéressent à

la régulation de l'immunoprivilège oculaire dans un contexte d'infection toxoplasmique sont rares. Un des articles traitant le sujet a été réalisé sur un modèle murin et montre que, lors d'une toxoplasmose oculaire, l'expression du CMH de classe II est augmentée sur les cellules résidentes, dont notamment les photorécepteurs. Néanmoins, les cellules CMH II⁺ infiltrantes n'expriment pas les protéines de la famille B7 : CD80, CD86, ICOS-L et PD-L2 mais expriment PD-L1. Ils montrent également que cette expression du CMH II et de PD-L1 est grandement dépendante de l'IFN- γ à la fois pour les cellules résidente et infiltrante. Cependant, l'IFN- γ semble nécessaire mais pas suffisant pour induire l'expressions du CMH II au niveau de la rétine (77).

L'interaction entre la superfamille des récepteurs CD28 et le groupe de ligands B7 apportent des stimulus soit d'activation soit d'inhibition supplémentaires aux lymphocytes et représentent donc également un point de contrôle clé dans la balance immunoprivilège *versus* contrôle de l'infection. Cette superfamille est composée du récepteur CD28 et de « *Inducible T-cell costimulator* » (ICOS) qui donnent un second signal d'activation aux lymphocytes et du récepteur PD-1, de « *B- and T-lymphocyte attenuator* » (BTLA) et de « *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* » (CTLA-4) qui apportent un signal inhibiteur (78).

3.2 « *Programmed death ligand* » PD-L1/2 un élément clef de la tolérance périphérique :

PD-L1 et PD-L2 sont les deux ligands du récepteur PD-1 permettant notamment de réguler négativement l'activité des LT. PD-L1 est exprimé de manière constitutive par un grand nombre de cellules à la fois hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. L'expression de PD-L2, en revanche, est restreinte aux macrophages et aux cellules dendritiques soulignant ainsi l'importance de PD-L1 dans le maintien de la tolérance périphérique et dans le contrôle de l'inflammation. Le récepteur PD-1 est principalement exprimé par les LT, LB, NK-T et NK (79). Il possède un domaine extracellulaire de type IgV permettant de lier PD-L1 et PD-L2 ainsi que deux domaines cytosoliques : un « *immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif* » (ITIM) et un « *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* » (ITSM) qui porte à lui seul l'activité inhibitrice du récepteur (**Fig.10**) (80).



(Fig.10) La voie de signalisation du couple PD-1 : PD-L1/PD-L2. (Figure créée sur Biorender.com) Adapté de Frank A. et al. 2016 (79). Mécanisme d'inhibition PD-1 : PD-L1/PD-L2 dépendant entre une cellule présentatrice d'antigène (CPA) et un lymphocyte T (LT). Après reconnaissance du ligand (PD-L1 ou PD-L2) par le récepteur PD-1 les deux domaines ITIM et ITSM sont phosphorylés. Cela conduit au recrutement des phosphatases « *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* » (SHP-1) et SHP-2 inhibant l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la phospholipase C gamma 1 (PLC γ 1) réduisant ainsi l'activation et la survie des lymphocytes T. De plus, l'inhibition de PLC γ 1 conduit à l'inhibition de la voie Ras/ « *Mitogen-activated protein kinase kinase* » (MEK)/ « *extracellular signal-regulated kinase* » (ERK) augmentant ainsi l'expression de la « *bcl-2-like protein* » BIM, une protéine pro-apoptotique.

L'expression de PD-L1 est constitutive mais peut être amplifiée après stimulation d'un grand nombre de cytokines à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. En effet, le promoteur du gène cd274 contient des sites de fixation pour IRF1, STAT3 et NFκB permettant son induction respectivement en réponse aux interférons, aux cytokines de la famille de l'IL-2 et aux lipopolysaccharides (LPS) (81). Puisque l'expression de PD-L1 est IRF1 dépendante, les interférons de type III seraient donc incapables d'induire son expression puisque incapable d'induire l'expression de cette ISG (43). Néanmoins, des études récentes menées dans le contexte du cancer du poumon à non-petites cellules semblent indiquer que l'IFN-λ3 augmente l'expression (ARNm) et de la localisation membranaire de PD-L1 (82). Concernant le système nerveux central aucune donnée n'existe.

La toxoplasmose est une infection chronique, soumettant les clones de LT CD8⁺ spécifiques à une exposition longue et répétée aux antigènes toxoplasmiques. Cela augmente donc en conséquence leur état d'exhaustion pouvant, à terme, mener à une diminution de leur capacité cytotoxique effectrice. Or, la pression exercée par les LT CD8⁺ est essentielle afin d'éviter une réactivation trop importante des cystes pouvant causer des pathologies sévères (18). PD-L1 semble être un acteur important dans ces mécanismes, puisque sa neutralisation entraîne une diminution de la réactivation des cystes dans le cerveau et une diminution de la mortalité chez la souris pendant la phase chronique (83,84). D'autres études plus récentes confirment ces résultats et montrent que la neutralisation de PD-1 augmente l'infiltration dans le cerveau de LT CD8⁺ diminuant ainsi fortement la quantité de kystes (85).

Le rôle de PD-L1 dans la physiopathologie de la toxoplasmose oculaire n'a été décrit que dans une seule publication en 2010 (77). Cette étude a été réalisée chez la souris C57BL/6 et se base principalement sur des analyses par cytométrie en flux marquant le CMH de classe II, ainsi que des ligands du groupe B7, sur les principales populations immunitaires infiltrantes et résidentes. Néanmoins, les marqueurs utilisés pour différencier les cellules immunitaires infiltrantes et résidentes ne sont basés que sur l'expression du CD45 et ne permettent donc pas de différencier finement les différentes populations cellulaires résidentes. Les résultats montrent néanmoins que l'expression de PD-L1 est augmentée dans les rétines infectées de manière IFN-γ dépendante.

3.3 L'exhaustion des lymphocytes T dans les infections chroniques

L'exhaustion peut être définie par un état d'activation avancé entraînant un phénotype dysfonctionnel associé à la perte de la capacité effectrice ou mémoire du lymphocyte T (86). Cette notion est en permanente évolution depuis sa description initiale (87) et connaît de grandes avancées grâce notamment aux techniques « *single cell* ». Ces avancées ont permis de décrire certains facteurs de transcription et récepteurs clés. En effet, l'état d'exhaustion est associé à une expression réduite de T-bet responsable des capacités effectrices ainsi qu'à une expression augmentée d'EOMES responsable du phénotype mémoire (88). Le « *nuclear factor of activated T cells* » (NFAT) semble également être un facteur de transcription important. En effet, lorsqu'il n'est pas sous forme d'hétérodimère avec « *activator protein 1* » (AP-1) mais sous forme d'homodimère il régule l'expression de PD-1, « *lymphocyte activation gene 3* » (LAG-3) et « *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* » (TIM-3) (89). L'importance de ces récepteurs inhibiteurs sera discutée dans la section suivante. Ces facteurs associés à d'autres (**Tableau 2**) semblent donc permettre de différencier les LT effecteurs, les LT en cours d'exhaustion ainsi que les LT en état d'exhaustion terminale (86).

Transcription factor	Effector T cell	Progenitor exhausted T cell	Terminally exhausted T cell
TCF-1 Ratio of T-bet and EOMES	High More T-bet	High More T-bet	Low More EOMES
BATF ^a	Complexed with IRF4 promotes effector function	High	High
NFAT	Heterodimer with AP-1	Unclear	NFAT homodimer
PRDM1	High	Low	High
NR4A	Low	High	High
TOX	Low	High	High

Tableau 2 : Facteurs de transcription associés au phénotype d'exhaustion T. Adapté de (86).

3.4 Facteur modulant la réponse immunitaire

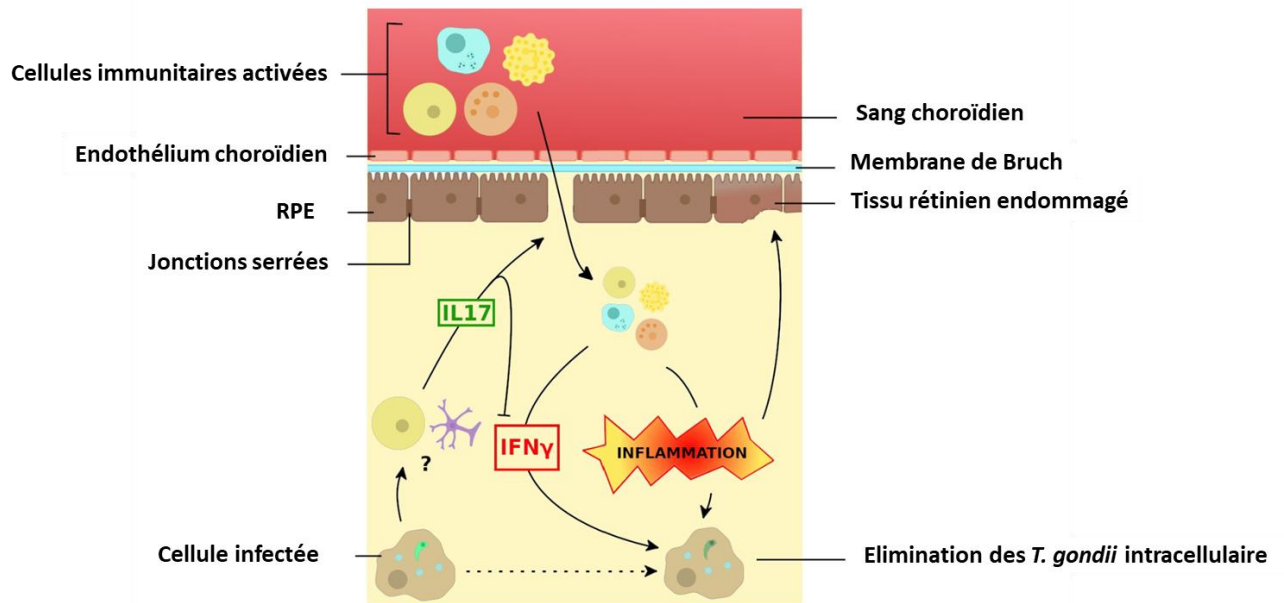
Il existe une grande variété de couples récepteur/ligand inhibiteurs, en plus des interactions impliquant les récepteurs de la superfamille CD28 et les ligands du groupe B7 précédemment discutés. En effet, LAG-3, TIM-3 ou encore TIGIT possèdent des fonctions similaires à PD-1 ou CTLA-4. L'ensemble des mécanismes d'inhibitions détaillés de LAG-3, TIM-3 et TIGIT connus, sont décrits dans cette revue de 2024 (90).

- LAG-3 est un récepteur exprimé après activation par les LT CD4⁺, LT CD8⁺, NK et NKT. Il possède une séquence peptidique analogue à celle du CD4 qui lui permet d'interagir avec le CMH de classe 2 induisant l'inhibition du lymphocyte T (91).
- TIM-3 est un récepteur exprimé après activation par les LT CD4⁺, LT CD8⁺, NK et NKT mais plus particulièrement les LTh1. Il interagit avec le ligand Galac-9 exprimé de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, entraînant l'inhibition et l'apoptose du lymphocyte T (92).
- TIGIT est un récepteur exprimé de manière transitoire après activation chez les LT et les « *innate lymphoïde cells* » (ILC). Son expression est stable dans certaines populations immunitaires telles que les LT régulateurs et les « *LT follicular helper* » (LTfh). Ses ligands sont le CD155 et CD112, exprimés à la fois par les principales CPA mais également des cellules non-hématopoïétiques dans de multiples tissus. Son action inhibitrice est principalement due à deux mécanismes : Le premier mécanisme fait intervenir un domaine ITIM cytosolique inhibant les voie PI3K, NFκB et MEK (93). Le second est dépendant de la compétition avec le récepteur de costimulation CD226 interagissant avec CD112 et donnant un signal d'activation. Le premier mécanisme est donc redondant avec celui du couple PD-1 : PD-L1/PD-L2 et le second avec celui de CTLA-4.

Cette grande variété de ligand et récepteurs très conservés intégrant des mécanismes à la fois redondants et complémentaires souligne donc l'importance majeure de la tolérance périphérique afin de garantir l'homéostasie et limiter l'immuno-pathologie.

3.5 La toxoplasmose oculaire, une réponse immunitaire en environnement immunoprivilégié

Dès les premières étapes de l'invasion oculaire par le parasite, de nombreuses questions subsistent. En effet, afin d'établir avec succès une infection chronique de la rétine, le parasite doit traverser les deux barrières hémato-rétiniennes protégeant cet organe fragile. Diverses hypothèses coexistent, telles que l'utilisation d'une cellule immunitaire comme cheval de Troie, le passage paracellulaire facilité par la sécrétion de protéases ou encore un passage transcellulaire par l'infection et la destruction des cellules composant la barrière (94). Probablement, *T. gondii* utilise l'ensemble de ces mécanismes dépendamment du contexte. Grâce à la microscopie biphoton, il a été observé que le parasite traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique. Pour y parvenir, il détourne une cellule immunitaire, qu'il utilise afin de franchir la barrière par diapédèse (95). Un mécanisme similaire pourrait également être envisagé au niveau de la barrière hémato-rétinienne interne, car ces deux barrières sont structurellement apparentées. Une fois dans la rétine, le parasite est capable d'infecter l'ensemble des cellules qui la compose (96) créant ainsi un foyer inflammatoire pouvant causer des premières atteintes oculaires, généralement 1 à 2 mois après l'infection. Cette phase est néanmoins majoritairement asymptomatique et la multiplication parasitaire est rapidement contrôlée par le système immunitaire, obligeant le parasite à s'enkyster. La formation de kystes concerne principalement les cellules nerveuses, bien que des kystes aient également été rapportés dans les cellules de Müller (23,97).



(Fig.11) Mécanisme de physiopathologie de la toxoplasmose oculaire. D'après Greigert V. *et al.* 2020.

La balance de la réponse immunitaire oculaire est essentielle pour garantir le contrôle du parasite sans causer d'inflammation exacerbée. La balance Th1/Th17 (**Fig.11**) joue un rôle important dans ce mécanisme puisque la neutralisation de l'IL-17A réduit l'inflammation et la pathologie oculaire chez la souris (98).

Chez l'Homme, l'IL-17A ainsi que l'IFN- γ sont retrouvées dans l'humeur aqueuse de patients européens, mais elles sont absentes chez les patients d'Amérique du Sud ayant principalement des cytokines Th2 associé à des toxoplasmoses oculaires plus sévère (99). Cette gravité accrue est principalement imputable aux souches parasitaires, puisqu'en Amérique du Sud circulent des souches parasitaires plus virulentes qu'en Europe (27,28).

Il est également intéressant de noter que la polarisation Th17 peut être induite via l'IL-23, mais également grâce au TGF- β et à l'IL-6. Or, le TGF- β est une cytokine très présente dans l'environnement immuno-privilegié de la rétine, et est augmentée en cas d'inflammation (73). Ceci est supporté par des données obtenues dans un modèle murin de toxoplasmose oculaire montrant que la neutralisation de l'IL-6 est bénéfique, réduisant la pathologie et la quantité de parasites dans la rétine (100). La même étude montre également que la neutralisation de l'IFN- γ est délétère et induit l'augmentation de l'IL-6 et de l'IL-12/23p40 montrant ainsi que l'IFN- γ possède également un rétrocontrôle négatif sur la réponse Th17.

Cette inflammation accrue va avoir également pour conséquence de créer une boucle de rétrocontrôle positive en induisant la disruption des barrières rétiniennes. Ces mécanismes sont bien décrits dans le cadre de maladies inflammatoires stériles (101,102) et montrent notamment que les astrocytes entretiennent l'inflammation causée par l'IL-17 en sécrétant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6, le TNF α et le CCL2.

3.6 Conclusion physiopathologie de la toxoplasmose oculaire

La balance de la réponse immunitaire et plus particulièrement la balance Th1/Th17 semble être centrale dans le contexte de la toxoplasmose oculaire. En effet, le microenvironnement rétinien semble amplifier les effets du parasite sur le détournement de la réponse immunitaire, visible notamment par une corrélation positive entre la virulence de la souche infectante et la gravité de la toxoplasmose oculaire.

Contributions précédentes du laboratoire

Historique de la thématique : Les interférons de type I et III dans la toxoplasmose oculaire

La thématique de recherche du laboratoire, centrée sur le rôle des interférons de type I et III dans la toxoplasmose oculaire, s'inscrit dans une tradition scientifique bien établie. Cette thématique trouve son origine dans les résultats de transcriptomique obtenus sur la voie JAK-STAT lors de la thèse d'Élise Rochet (soutenue en 2014), sous la direction du Pr Candolfi. Une observation clé a émergé de ces travaux : les souris C57BL/6, caractérisées par une faible expression des gènes stimulés par les interférons (ISG) associés aux interférons de type I et III, présentent une inflammation oculaire marquée lors de la toxoplasmose oculaire. À l'inverse, les souris Balb/c, exprimant fortement ces ISG, développent une pathologie oculaire nettement plus modérée.

Cette observation suggère un lien potentiel entre l'expression des ISG spécifiques aux interférons de type I et III et la susceptibilité à la toxoplasmose oculaire. Cette hypothèse a orienté les travaux de thèse de Valentin Greigert (soutenue en 2020), visant notamment à étudier la cinétique du profil transcriptionnel d'ISG sur des lignées cellulaires oculaires humaines en réponse aux interférons de type I et III et à l'infection toxoplasmique. Des travaux préliminaires ont également mis en évidence, d'une part, un effet inhibiteur des IFN- β , IFN- λ 1 et IFN- λ 2 sur la prolifération de *T. gondii* et, d'autre part, un rôle protecteur de ces interférons contre l'augmentation de la perméabilité induite par le parasite dans les cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes (RPE).

Description et rationnel de mon projet de thèse :

Les travaux de Valentin Greigert constituent les bases de la première partie de mon projet de thèse, qui vise à approfondir l'étude des rôles des IFN- β et IFN- λ 1 dans différents aspects de la physiopathologie de la toxoplasmose oculaire. Ces recherches se concentrent sur trois axes principaux : la multiplication parasitaire, la perméabilité des barrières hémato-rétiniennes et les dynamiques du réseau cytokinique. Ce projet s'appuie sur l'expertise et les modèles établis au sein de l'équipe, tout en développant de nouveaux modèles, notamment celui de la barrière hémato-rétinienne externe.

La seconde partie de mon projet de thèse est principalement axée autour de la problématique suivante : d'une part, l'œil, et plus particulièrement la rétine, fait partie du système nerveux

Contributions précédentes du laboratoire

central et possède donc un privilège immunitaire. Ce privilège immunitaire protège cet organe fragile contre une activation excessive de la réponse immunitaire, qui pourrait causer des dommages irréversibles. Néanmoins, d'autre part, en cas d'invasion de cet organe par un pathogène tel que *Toxoplasma gondii*, la réponse immunitaire doit s'activer pour garantir le contrôle du parasite, qui, sans cela, provoquerait également des dégâts très importants.

Nous savons cependant que, cliniquement, les étapes initiales de l'infection sont très souvent asymptomatiques, ce qui souligne l'existence d'un mécanisme permettant de contrôler le parasite sans générer une inflammation excessive. Cela implique donc des mécanismes complexes de régulation dynamique de la réponse immunitaire oculaire face au pathogène *Toxoplasma gondii*. Bien que de nombreuses données de la littérature mettent en avant divers acteurs solubles, membranaires et cellulaires susceptibles d'être impliqués, rares sont les études qui explorent cette question dans le contexte des pathologies infectieuses, et aucune ne s'attarde sur la toxoplasmose oculaire chez l'humain.

Au cours des premières phases du projet, plusieurs facteurs potentiellement impliqués ont été identifiés. Cependant, la maturation du projet a conduit à une focalisation sur le ligand PD-L1. Ce choix repose sur des études montrant son rôle crucial chez la souris dans la toxoplasmose oculaire.

Cette seconde partie du projet conserve une attention particulière à l'implication des interférons, constituant le fil conducteur et l'un des principaux axes de recherche de l'équipe dirigée par le Dr Alexander Pfaff. Les résultats obtenus dans ce cadre promettent de contribuer significativement, non seulement à la compréhension de la toxoplasmose oculaire, mais également à des connaissances fondamentales sur les interférons dans la rétine, tant en conditions homéostatiques que pathologiques. Cette recherche est d'autant plus essentielle compte tenu de la première description relativement récente des interférons de type III par Laure Dumoutier *et al.* en 2003, comparée aux deux autres types d'interférons, laissant encore de nombreuses questions ouvertes.

~

Objectifs de l'étude

Objectif 1 : Rôle des interférons de type I et III dans la Toxoplasmose oculaire

Objectif 2 : Le rôle de PD-L1 dans l'Immunoprivilège *versus* le contrôle de l'infection

~

Objectifs de l'étude

Objectif 1 : Rôle des interférons de type I et III dans la Toxoplasmose oculaire

L'étude du rôle des interférons de type I et III dans la physiopathologie de la TO, est une thématique de recherche développée depuis de nombreuses années au sein du laboratoire. La thèse de Valentin Greigert en 2019 s'est intéressée à l'étude des ISG exprimés en réponse aux différents types d'interférons dans des lignées cellulaires oculaires humaines. Ses résultats montrent une expression d'ISG15 par des cellules rétinienne pigmentaires épithéliales (RPE), des cellules microgliales, des astrocytes et des cellules de Müller en réponse à l'IFN- λ 1, l'IFN- λ 2, l'IFN- β et l'IFN- γ . Les interférons de type III ont démontré leur capacité à induire l'expression d'ISG15 dans les cellules rétinienne humaines, ce qui pourrait également déclencher l'élimination de la vacuole parasitophore par des mécanismes d'autophagie (52). Des résultats préliminaires publiés dans sa thèse vont dans ce sens, en effet, un « *priming* » de cellules rétinienne humaines avec des interférons de type I et III semble capable de réduire la multiplication parasitaire. Le premier objectif de ma thèse est donc d'étudier l'effet des interférons de type I et III, sur le contrôle de la multiplication parasitaires, dans des lignées cellulaires rétinienne humaines. La capacité des différentes souches toxoplasmiques à interagir et à manipuler de manière distincte leurs cellules hôtes est bien documentée. Pour cette raison, l'ensemble des expériences seront réalisées en parallèle avec deux souches parasitaires de classification phénotypique différentes :

- Une souche de type I virulente, nommée RH, largement décrite dans la littérature, bien qu'elle ne reflète pas fidèlement les souches de terrain.
- Une souche de type II, Me49, dite avirulente, représentative de la majorité des souches circulantes en Europe.

L'avantage majeur de ces deux souches sont leurs utilisations historiques en tant que modèle dans de nombreux laboratoire ainsi que pour un grand nombre de travaux fondamentaux.

L'utilisation de souches de terrain, ainsi que de souches de type III ou atypiques, ne font pas partie des objectifs de cette thèse, bien que leurs études seraient pertinentes dans le cadre de la recherche sur la toxoplasmose oculaire. Néanmoins, l'ensemble des techniques mises au point dans le cadre de cette thèse permettront l'étude d'un plus grand éventail de souches à l'avenir.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'étude de la barrière hémato-rétinienne humaine est complexe. En effet, les cellules rétinienne pigmentaires épithéliales (RPE) primaires humaines sont quasiment inaccessibles. Des modèles de lignées cellulaires existent mais ont des limitations. La lignée ARPE-19 est une lignée de RPE très bien décrite dans de nombreux contextes et possède de nombreuses caractéristiques de cellules primaires saines. Néanmoins, leur principale limitation est qu'en absence de différenciation spécifique, elles ne sont pas capables de se polariser et donc incapables de former des complexes jonctionnels (103). Malgré tout, des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent que, même en l'absence de différenciation, les interférons seraient capables de réduire l'effet de l'infection toxoplasmique sur la perméabilisation de la BHRé. De plus, une étude montre également un effet des interférons de type I et III sur la perméabilité de la barrière vasculaire hémato-encéphalique, réduisant l'infection cérébrale du virus West Nile (62). L'objectif durant ma thèse sera donc de mettre au point un modèle 2D de barrière hémato-rétinienne externe permettant l'étude du rôle des interférons sur sa perméabilité ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués.

L'environnement cytokinique oculaire dans le contexte de la toxoplasmose oculaire est essentiel puisqu'une polarisation cytokinique aberrante est associée à une aggravation importante de la pathologie oculaire (98,99). *T. gondii* est capable, grâce à de nombreux facteurs de virulence, de moduler et de contrôler cette réponse cytokinique à son avantage en inhibant notamment la réponse Th1. Les interférons de type I et III partagent la même voie de signalisation. Cette apparente redondance est en réalité une complémentarité traduite par une cinétique et des profils d'ISG différents (104). Mon objectif sera donc d'étudier le profil de cytokines sécrétées en réponse à l'infection par différentes souches (RH et Me49), à la stimulation par les interférons (IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1) ainsi que l'effet de l'infection sur le profil cytokinique induit par les interférons (stimulation aux IFN + infection). Pour cette expérience, nous avons la possibilité d'utiliser une seconde souche virulente apparenté à une souche de type 1 : la souche FOU, du clade A et de l'haplogroupe VI isolée d'une toxoplasmose humaine d'origine africaine. Contrairement à la souche RH qui est une souche de laboratoire, la souche FOU représente plus fidèlement le comportement d'une souche virulente de terrain. Malheureusement, en raison de la difficulté à cultiver cette souche *in vitro*, nous n'avons pas pu l'inclure dans l'ensemble des expériences détaillées dans

OBJECTIFS DE L'ETUDE

l'objectif n°1. Pour cette raison, les données expérimentales relatives à cette souche n'ont pas pu être incluses dans l'article n°1 et sont donc présentées en tant que données expérimentales non publiées.

Enfin, dans le projet initial de la thèse, nous avons prévu de réaliser et d'analyser un séquençage d'ARN messager (RNAseq) de rétine murine dans le contexte d'une toxoplasmose oculaire. À l'aide d'anticorps neutralisants anti-IFN- β et anti-IFN- λ 2/3, nous avons également pour objectif d'étudier l'importance des interférons de type I et III dans le profil transcriptionnel oculaire au cours de cette pathologie. Cependant, des retards dans la livraison des résultats nous ont contraints à reconsidérer cet objectif. L'ensemble des résultats obtenus ne sont donc pas inclus dans ce travail, mais constituera le socle de futures investigations, lesquelles sont plus amplement détaillées dans la section perspective de cette thèse.

Objectif 2 : Le rôle de PD-L1 dans l'Immunoprivilège *versus* le contrôle de l'infection

Le privilège immunitaire des divers tissus qui constituent l'œil fait partie des premiers sites immunoprivilégiés décrits (65). Ce privilège immunologique repose néanmoins sur des mécanismes de contrôle dynamiques, permettant l'activation de la réponse immunitaire en cas d'invasion par un pathogène. Ainsi, elle permet l'élimination et la clairance du pathogène, la réparation du tissu endommagé et un retour à l'homéostasie. Un grand nombre de facteurs sont décrits dans la littérature, néanmoins les facteurs immunomodulateurs modifiés lors d'une toxoplasmose oculaire sont très peu étudiés. Ces modifications sont-elles souches dépendantes ? Permettent-elles d'expliquer, en partie, les manifestations cliniques dépendantes des souches ? À ce jour, une seule étude a été menée chez la souris et a étudié l'expression des ligands du groupe B7, du CMH de classe I et de classe II dans le contexte de la toxoplasmose (77). Cette étude montre que l'environnement oculaire dans le contexte d'une toxoplasmose oculaire est immunomodulateur et permet d'inhiber l'activation des lymphocytes T CD4⁺, via des mécanismes qui dépendent au moins partiellement de PD-L1. Ces travaux mettent donc en lumière le rôle central que joue PD-L1 dans le contrôle de la réponse immunitaire dans le contexte de la Toxoplasmose oculaire. Cependant, les résultats ne permettent pas d'établir précisément les types cellulaires résidents impliqués. En effet, le seul marqueur utilisé pour différencier les cellules

OBJECTIFS DE L'ETUDE

immunitaires infiltrantes des cellules résidentes est l'expression du CD45. Un des objectifs de ma thèse est donc de tenter de décrire les types cellulaires majoritairement impliqués dans ces mécanismes immunomodulateurs chez la souris. De plus, après la mise au point de modèles *in vitro*, mon objectif est d'étudier ces différents aspects sur des cellules oculaires humaines en me focalisant plus particulièrement sur PD-L1 et la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe). En effet, dans de nombreuses pathologies inflammatoires non infectieuses, la perte de l'intégrité de la BHRe est un élément majeur de la physiopathologie.

Articles de recherche original

Article I : Type I and III interferons shape the retinal cytokine network and barrier function in an *in vitro* model of ocular toxoplasmosis.

1.1 Résumé en français article n°1.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle des interférons de type I (IFN- β) et de type III (IFN- λ 1) dans différents aspects de la physiopathologie de toxoplasmose oculaire (multiplication parasitaire, profils cytokinique, perméabilité de la BHRé) en utilisant des cellules rétiniennes humaines. Pour commencer, nous avons donc étudié le rôle des interférons de type I et de type III sur la multiplication parasitaire dans des lignées oculaires humaines. Malgré de premiers résultats indiquant un potentiel effet de ces interférons, nous avons finalement conclu que, contrairement à l'IFN- γ , les IFN de type I et III n'étaient pas capables d'inhiber la prolifération du parasite. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets des interférons β , γ et λ 1 sur le profil de sécrétion cytokinique de cellules rétiniennes humaine avec et sans infection toxoplasmique. Pour ceci nous avons utilisé la technologie Luminex, une technique d'ELISA sur billes magnétiques permettant de doser simultanément 15 cytokines impliquées dans la physiopathologie de la TO. Nous avons tout d'abord constaté qu'en condition homéostatique les cellules RPE, astrocytaires et microgliales sécrètent de l'IFN- λ 1. Cette sécrétion est ensuite amplifiée en réponse à l'infection ou la stimulation par les interférons dans l'ensemble des lignées cellulaires étudiées. Nos résultats montrent également que contrairement à l'IFN- β et l'IFN- γ , l'IFN- λ 1 est incapable d'induire la sécrétion de chémokines permettant le recrutement de cellules immunitaires. Plus généralement, les IFN de type III induisent moins de sécrétion cytokinique pro-inflammatoire, ceci confirmant des résultats récemment publiés dans d'autres contextes. Finalement, nous avons comparé les cytokines produites en réponse à l'infection par 2 souches différentes (RH et Me49). Nous avons pu observer que la souche virulente RH induit la sécrétion de cytokines inflammatoires, alors qu'une souche non virulente Me49 n'induit aucune sécrétion cytokinique. Ceci confirme donc un lien fort entre la virulence de la souche de *T. gondii* et l'inflammation oculaire. Après

avoir constaté le rôle immunomodulateur de l'IFN- λ et sa sécrétion importante lors de l'infection toxoplasmique, nous avons étudié son rôle ainsi que celui de l'IFN- β et l'IFN- γ sur la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe). Basé sur un modèle décrit (103), nous avons mis au point un modèle de BHRe 2D avec des cellules RPE différenciées possédant un phénotype proche de cellules primaires. Grâce à ce modèle, nous avons pu montrer par microscopie confocale que les interférons (IFN- β , IFN- γ et IFN- λ 1) induisent une localisation significativement plus importante de ZO-1 au niveau des jonctions serrées. La protéine ZO-1 est une protéine clef du complexe jonctionnel puisqu'elle relie les protéines claudines et occludines au cytosquelette d'actine de la cellule. Cette localisation jonctionnelle augmentée de ZO-1 est associée à une augmentation de la résistance transépithéliale ainsi qu'à une diminution de la perméabilité au FITC-dextran. À l'aide d'un inhibiteur spécifique du transducteur de signal STAT1, la fludarabine, nous avons pu démontrer que le mécanisme est indépendant de la voie STAT1, voie canonique des interférons. Ceci confirme notamment des résultats publiés sur la barrière hémato-encéphalique (79). Quant à l'infection par *T. gondii*, elle entraîne une délocalisation de ZO-1 menant à une diminution importante de la résistance électrique transépithéliale et une augmentation importante de la perméabilité au FITC-dextran. Ceci confirme que le parasite est capable d'induire l'ouverture de la BHRe de manière active.

1.2 Schéma récapitulatif

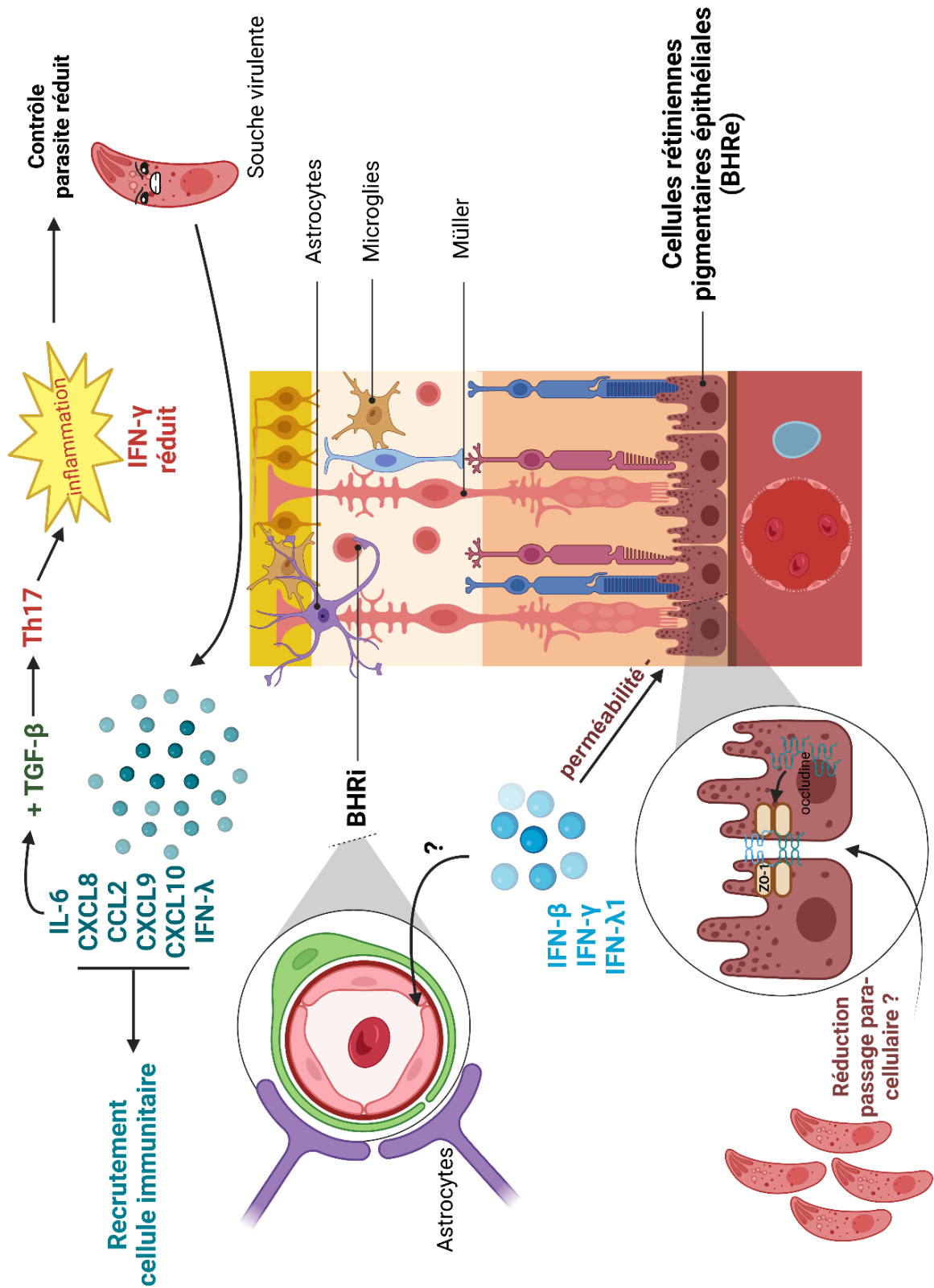


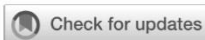
Schéma récapitulatif n°1 : Schéma récapitulatif de l'article de recherche originale n°1 Geiller et al. 2023 présentant les principales conclusions et éléments de discussion.

(Created with BioRender.com)

Description de la figure :

L'infection par une souche virulente RH, mais pas par une souche avirulente Me49, induit la sécrétion de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires, entraînant : D'une part, le recrutement de cellules immunitaires infiltrant la rétine ; D'autre part, une action sur la polarisation de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th17, due à l'action concomitante de l'IL-6 et du TGF-bêta. Comme précédemment décrit par notre équipe, cette polarisation cytokinique a pour conséquence une diminution de la sécrétion d'IFN- γ et, par conséquent, un contrôle réduit du parasite.

Les interférons de type I (IFN- β), de type II (IFN- γ) et de type III (IFN- λ 1) diminuent la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe), constituée d'une monocouche de cellules rétinienne pigmentaires épithéliales (RPE). Cette diminution de la perméabilité est due à une relocalisation d'une protéine chaperonne associée aux jonctions serrées : ZO-1. Le mécanisme impliqué ne fait pas intervenir la voie canonique des interférons, qui dépend de STAT1.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Irene S. Soares,
University of São Paulo, Brazil

REVIEWED BY

George So Yap,
Rutgers University, United States
Christian Schwerk,
Heidelberg University, Germany

*CORRESPONDENCE

Alexander W. Pfaff
✉ pfaff@unistra.fr

†PRESENT ADDRESSES

Valentin Greigert,
Department of Molecular Microbiology,
Washington University School of Medicine,
St. Louis, MO
Caroline A. Hillenbrand,
Transplantation & Clinical Virology,
Department Biomedicine, University of
Basel, Basel, Switzerland

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Parasite Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 19 January 2023

ACCEPTED 11 April 2023

PUBLISHED 02 May 2023

CITATION

Geiller B, Greigert V, Hillenbrand CA,
Gommenginger C, Beal L, Brunet J,
Filisetti D, Villard O, Denis J and Pfaff AW
(2023) Type I and III interferons shape the
retinal cytokine network and barrier
function in an *in vitro* model of
ocular toxoplasmosis.
Front. Immunol. 14:1148037.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1148037

COPYRIGHT

© 2023 Geiller, Greigert, Hillenbrand,
Gommenginger, Beal, Brunet, Filisetti, Villard,
Denis and Pfaff. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Type I and III interferons shape the retinal cytokine network and barrier function in an *in vitro* model of ocular toxoplasmosis

Benjamin Geiller¹, Valentin Greigert^{1†}, Caroline A. Hillenbrand^{1†},
Chloé Gommenginger², Laetitia Beal², Julie Brunet^{1,2},
Denis Filisetti^{1,2}, Odile Villard^{1,2}, Julie Denis^{1,2}
and Alexander W. Pfaff^{1,2*}

¹Institut de Parasitologie et Pathologie Tropicale, UR 7292 Dynamique des Interactions Hôte-Pathogène, Fédération de Médecine, Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France,

²Service de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Introduction: The particularities of the ocular immune environment and its barrier protection in the context of infection are not well elucidated. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* is one of the pathogens successfully crossing this barrier and establishing chronic infection in retinal cells.

Methods: As a first approach, we studied the initial cytokine network *in vitro* in four human cell lines: Retinal pigmented epithelial (RPE), microglial, astrocytic and Müller cells. Furthermore, we looked at the consequences of retinal infection on the integrity of the outer blood-retina barrier (oBRB). We particularly focused on the roles of type I and type III interferons, (IFN- β and IFN- λ). Especially IFN- λ is known for its significant role in barrier defense. However, its effect on the retinal barrier or *T. gondii* infection remains unexplored, unlike IFN- γ , which has been extensively studied in this context.

Results and Discussion: Here, we show that stimulation with type I and III interferons did not limit parasite proliferation in retinal cells we tested. However, IFN- β and IFN- γ strongly induced inflammatory or cell-attracting cytokine production, whereas IFN- λ 1 showed less inflammatory activity. Concomitant *T. gondii* infection influenced these cytokine patterns, distinctly depending on the parasite strain. Interestingly, all these cells could be stimulated to produce IFN- λ 1. Using an *in vitro* oBRB model based on RPE cells, we observed that interferon stimulation strengthened membrane localization of the tight junction protein ZO-1 and enhanced their barrier function, in a STAT1-independent manner.

Conclusion: Together, our model shows how *T. gondii* infection shapes the retinal cytokine network and barrier function, and demonstrates the role of type I and type III interferons in these processes.

KEYWORDS

Toxoplasma gondii, retina, ocular immunology, interferons, inflammation, barrier function, tight junctions

Introduction

The eye is, like the brain, protected by an efficient barrier system and a particular immune environment, which protects this fragile organ from damage by overwhelming inflammatory reaction (1). Pathogens entering into the eye have to manipulate both the barriers and the interaction between resident cells. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* uses brain and eye as a protective niche to achieve chronic infection and thus enhance transmission probability. This long-time persistence in retinal cells requires parasite-induced modification of the ocular immune environment. How the parasite enters the eye is still a subject of debate, despite recent advances (2, 3). In analogy to the blood-brain barrier which has been studied more intensively, the parasite reaches the retina via the outer or inner blood retinal barrier (oBRB/iBRB). The oBRB is made up by retinal pigmented epithelial (RPE) cells (4). The barrier function is provided by the highly modulable tight junctions, apico-lateral protein structures formed of trans-membranous proteins like occludin and claudins connected to the cell cytoskeleton through the zonula occludens (ZO) protein family (5). ZO-1 plays a central role in regulating tight junction integrity (6). Barrier permeability is affected by numerous mediators including interferons. In humans, three types of interferons are described. Type I essentially consists of IFN- α and IFN- β isoforms (7), Type II only of IFN- γ (8) and type III of four IFN- λ isoforms (9). Each interferon type binds to its specific heterodimeric receptor, signals through the JAK/STAT pathway (10) and subsequently induces the expression of interferon stimulated genes (ISGs) (11). The ISG expression can be redundant or specific to certain interferon types. Our previous studies showed the pathogenic roles of the resulting production of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-17 (12, 13). These and many other studies demonstrated the central and protective role of IFN- γ in *T. gondii* induced immune response, by limiting parasite proliferation (14). Regarding type I interferons, the available results are less conclusive. While IFN- β dependent mechanisms, involving immune-related GTPases (IRGs), leading to parasitophorous vacuole destruction have been described in murine myeloid cells (15), no homologous mechanism has been found so far in humans. Type III interferons are mainly known for anti-viral activities, even if some recent studies looked at parasitic infection. Its role in *T. gondii* infection has not yet been addressed. Importantly, these interferons are mainly reputed for their role in barrier immune responses (16). This is reflected by the predominant expression of type III specific IFNLR1 receptor subunit in epithelial and endothelial cells, but also some myeloid and lymphoid cells, in contrast to the ubiquitously expressed type I interferon receptor (17). Importantly, IFN- λ stimulation results in a much weaker inflammatory reaction, due to a considerably lower density of its receptor on the cell surface (18). These specific features give to type III interferons a non-redundant unique role in barrier defense mechanisms, despite the common transduction pathway with type I interferons (19). The role of IFN- λ on the ocular barrier has been completely neglected so far. Of importance for our study, IFN- λ 1 (IL-29) and IFN- β were shown to enhance blood-brain barrier function in a viral infection model. However, the exact mechanism by which type I and III interferons are enhancing barrier function stays elusive. Here, we conducted *in vitro* studies to address the role of type I and

III interferons in this process, using various human non-neuronal retinal cell types, namely microglia, astrocyte, Müller and RPE cell. We showed that, while type I and III interferons do not control parasite proliferation in these cells, they do shape secretion of inflammatory cytokines and chemokines, interacting with *T. gondii* infection. Importantly, interferons and infection modulate ZO-1 tight junction organization in differentiated RPE cells, and thus barrier permeability, in an STAT1 independent manner.

Materials and methods

Cell lines and parasites

Retinal pigmented epithelial RPE cells ARPE-19 (ATCC) were cultivated in DMEM/F-12K Glutamax (Gibco) 10% SVFi (Gibco) Penicillin/Streptavidin (Hyclone). Astrocytes U-118MG (ATCC) were cultivated in DMEM 4.5g/L L-Glutamine (Lonza), 10% SVFi, P/S. Müller MOI-M1 (UCLB,UK) and Microglia HMC3 (ATCC) were cultivated in DMEM (Gibco), 200mM glutamate (Gibco), 10% SVFi, P/S. All cell incubations were performed at 37°C, 5% CO₂.

The *Toxoplasma gondii* strains RH and Me49 were obtained from the French Biological Resource Center Toxoplasma (CRB Toxoplasma; Laboratoire de Parasitologie, CHU Reims, Reims, France). Tachyzoites of the RH strain were maintained by weekly passages in Swiss-Webster mice, for use in medical diagnostic tests. The Me49 strain was maintained in Vero (ATCC) cell cultures.

Flow cytometry

Cells were harvested with 0.05% trypsin EDTA and incubated in 37°C and 5% CO₂ under agitation during 24 hours. Cells were then counted and 1x10⁶ cells per conditions prepared for labeling. Cell Fc-receptors were blocked using Fc binding inhibitor (Invitrogen) and cells were labeled with 5 μ g/mL mouse AlexaFluor488 anti-IFNLR1 antibody (R&D Systems) or AlexaFluor488 isotype control antibody (Invitrogen, A21467) in FACS buffer (1xPBS, 5% SVFi, 0.1% NaN₃ sodium azide). Cells were analyzed using an Attune cytometer (ThermoFisher) with following gating strategy: First, cell debris were eliminated and viable cells were gated using FSC-A/SSC-A dot plot, then doublets were eliminated using SSC-A/SSC-H dot plot. Voltage was set with isotype control sample and maintained for all analysis.

Impact of interferon stimulation on parasite proliferation

Cells were plated in 24 well culture plates (TPP), incubated for 24 hours with 20ng/mL of IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 (Peprotech) or control PBS BSA 0.1% and then infected with *T. gondii* RH or Me49 strain at a MOI of 1:10. To allow parasite invasion, the cultures were first incubated for 2h (RH) or 3h (Me49), when half of the cell cultures were harvested. The remaining cultures were washed with

PBS to remove extracellular parasites and further incubated in medium plus interferons for 24h (RH) or 48h (Me49). Cells were harvested with 0.05% Trypsin-EDTA. DNA was extracted using the QIAamp DNA tissue minikit (Qiagen, France), eluted with 200µl elution buffer, and stored at -20°C. Real-time PCR specific for the TgB1 sequence of *T. gondii* (Table 1) was performed on a CFX light cycler using SsoAdvanced SYBRGreen supermix (Biorad). Parasite quantification was done using external standard samples with known parasite concentrations.

ARPE-19 cell line differentiation

Cells were differentiated according to the protocol described by Hazim et al. (20). Briefly, cells were cultivated in T75 flask for two weeks with MEM-Nicotinamide medium: 1% N1 (Invitrogen), 1% SVFi, 1% P/S, 0.25mg/mL Taurine (Sigma-Aldrich), Hydrocortisone 20ng/mL (Sigma-Aldrich), Triiodo-thyronine 0.013 ng/mL (Sigma-Aldrich) and 10mM nicotinamide (Sigma-Aldrich). After 3 times 10min TrypLE (Gibco) treatment, the remaining cells were placed on 0.4µM PET transwell inserts (Falcon, 353095) in 24-well-plates, coated with natural mouse laminin (Invitrogen). Cell medium was changed 3 times per week during 8 weeks before use. Differentiation was verified using RT-PCR analysis of markers indicating primary like cell phenotype. Cells on transwells were harvested every week during 8 weeks using Nucleozol (Macherey-Nagel, MN). RNA was extracted with TriZol reagent, according to the manufacturer's recommendations. Then, 20ng of RNA was reverse transcribed to cDNA using Qscript reagent (VWR). Real-time PCR specific for the BEST1, RPE65, OCLN, MERTK, ZO-1, ITGB5 and housekeeping gene GAPDH mRNA (Table 1) was performed on CFX light cycler and SSoAdvanced SybrGreen (Biorad).

Confocal microscopy

Differentiated ARPE-19 cultures on inserts were stimulated with 20ng/mL of IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1, or infected with *T. gondii* RH strain at a MOI of 1:1, as schematically shown in Figure S1F. Cells were first fixed with PBS 4% paraformaldehyde for 15

minutes and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 minutes. Then, samples were labeled successively with 5µg/mL mouse anti-ZO-1 (Invitrogen, 33-9100) and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A32727), or with 5µg/mL mouse anti-IFNLR1 Alexa Fluor 488 (RDSsystems, FAB5260G). For cells cultivated on transwells, the membranes were first cut out and then mounted on microscopy slide with Prolong Gold (Invitrogen). Otherwise, cells were cultivated on round cover slides and then similarly mounted.

Images were taken with a Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscopy system. Settings were defined at the beginning of each experiment with the first control sample and maintained for all other samples of the same replicate. Image post treatment and measurements were made with FIJI software. For figures, minimum brightness was set to 100. For all measurements, raw images were used. The measurement of tight junction fluorescence was realized as follows (<https://imagej.net/imaging/segmentation>): First, auto threshold (method=default white) was applied, then the image was converted to mask and copied by the tool "Create selection". This selection was then restored on the raw image and the mean gray values and area data were gathered. The same protocol was applied to all images.

Supernatant cytokine dosage

RPE cells, Müller cells, astrocytes and microglial cells were plated in 24 well culture plates (TPP) for 24h. Then, they were stimulated with 20ng/mL IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1, or infected with *T. gondii* RH or Me49 strain (MOI 1:1) for 20h. Cell culture supernatants were recovered and 14 cytokines were dosed (IL-1β et α, IL-23, IL-12p70, TNF-α, IL-6, IFN-β, IL-29 (IFN-λ1), IL-10, IL-17A, CXCL10, CXCL8, CXCL9, CCL2) with a ProcartaPlex (ThermoFisher) kit on an Magpix Luminex (ThermoFisher) according to manufacturer's recommendations.

STAT1 immunoblotting

RPE cells were plated in 10mL petri dishes (TPP) for 24h. Then, they were treated with different concentrations of fludarabine (Sigma-Aldrich) for 24h before 20ng/mL IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1

TABLE 1 PCR Primers.

Target	Forward	Reverse
RPE65	5'-GATCTCTGCTGCTGAAAGG-3'	5'-TGGGGAGCGTGACTAAATTC-3'
ZO-1	5'-AGCCATTCGCCAAGGAGTTG-3'	5'-ATCACAGTGTGGTAAGCGCA-3'
OCLN	5'-GGAGGACTGGATCAGGGAT-3'	5'-TCAGCAGCAGCCATGTACTC-3'
ITGB5	5'-CGGGGACAACGTAACTGCT-3'	5'-ACGCAATCTCTCTTGGTGCT-3'
MERTK	5'-AGACTTCAGCCACCCAAATG-3'	5'-GGGCAATATCCACCATGAAC-3'
BEST1	5'-CCCGAAAATCACCTCAAAGA-3'	5'-GCTTCATCCCTGTTTCCAA-3'
GAPDH	5'-AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC-3'	5'-CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT-3'
TgB1	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'

stimulation. After 1h stimulation for IFN- γ , IFN- β and 3h stimulation for IFN- λ 1 cells were washed in 1xTBS and harvested using RIPA buffer. Lysates were then denatured at 100°C for 5 minutes in Laemmli buffer (Biorad) and protein separated in 10% SDS polyacrylamide gel at 150V for 1h using an Invitrogen mini gel tank and blot module (Invitrogen). Proteins were then transferred on a polyvinylidene difluoride PVDF membrane at 250mA for 1h. Membranes were then blocked 2h with TBS bovine serum albumin (BSA) 5% at room temperature. Membranes were then incubated with primary STAT1 (Invitrogen, AHO0832) at 500ng/mL, Tyr701 PhosphoSTAT1 at 500ng/mL (Invitrogen, 33-3400) and β -actin at 50ng/mL (Invitrogen, A5441) antibodies over night at 4°C. Finally, membranes were incubated 2h at room temperature with 125ng/mL sheep anti-mouse IgG HRP (GE healthcare, NA931V) secondary antibodies and visualized with clarity western ECL substrate (Biorad) on ChemiDoc MP (Biorad). Band intensity was then analyzed using FIJI gel tools.

FITC dextran permeability assay and electric resistance

After the differentiation protocol, RPE cells were pre-incubated for 24h with 250 μ M fludarabine or in MEM-Nic medium, as indicated. Then, cells were stimulated with 20ng/mL of IFN- β , IFN- γ or IFN- λ 1, or infected with *T. gondii* RH strain at a MOI of 1:1, as schematically shown in Figure S1F. For the FITC dextran assay, 1mg/mL 70kDa fluoresceine dextran (Invitrogen) in DMEM/F-12K without phenol red (Gibco) was placed in the upper transwell chamber. After an incubation time of 48h for interferon stimulated condition and 24h for infected conditions, 50 μ L medium was taken in the lower chamber. These time points had been established in preliminary experiments. The FITC mean fluorescence intensity (MFI) was measured at 521nm wavelength using a Varioskan Lux (ThermoFisher). Electrical resistance was measured at 0h, 24h and 48h with a calibrated EOM2 probe (World precision instruments) at 37°C and expressed as TEER [Ohm x cm²].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on Graphpad Prism v8.0. Normality was confirmed for all groups with Shapiro-Wilk normality test at $\alpha=5\%$. To compare groups, unpaired t-tests were performed, with statistical significance considered at $p < 0.05$. Considered sample sizes (n) and replicate numbers are mentioned below each figure.

Results

All cell lines in this study express the type III interferon specific subunit IFNLR1

Unlike type I and II interferon receptor subunits, the IFNLR1 subunit, necessary for IFN- λ signaling, is not ubiquitously expressed. Therefore, we first verified their expression in the four human cell lines used in this study by confocal microscopy and flow cytometry. The microscopy images clearly showed an expression by all cell types (Figure 1A). Flow cytometry analysis confirmed these results (Figure 1B). Nevertheless, expression of the receptor was relatively low, as shown by the small difference with the isotype control. Astrocytes and RPE cells appeared to have a higher receptor expression than the other cell lines tested, but also here, the difference was small and not visible on microscopy images. We conclude that all studied cell types express the IFNLR1 subunit at relatively low levels.

Type I and III interferons do not limit *Toxoplasma gondii* proliferation

The role of interferon-gamma in controlling *T. gondii* proliferation is established. The role of type I interferons but also of the most recently discovered type III interferons has yet to be elucidated. Therefore, we studied the effect of stimulation of human

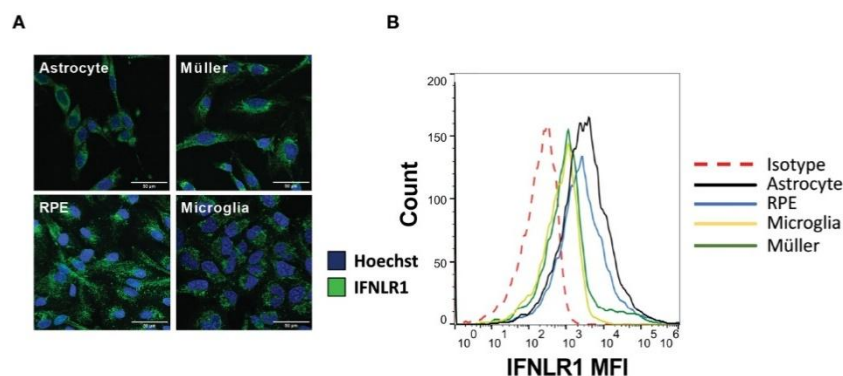


FIGURE 1

The four cell lines express IFNLR1 receptor subunit. (A) Confocal microscopy image of RPE, astrocytes, microglia and Müller cells. Cells were plated on cover slides for 24h. The cells were then fixed, permeabilized and the IFNLR1 subunit and cell nuclei labeled with AlexaFluor488 and Hoechst 33342, respectively. (B) Flow cytometry assay for IFNLR1 receptor subunit. Cells were harvested by trypsinization and placed 24h under agitation to restore membranous receptor expression. Finally, they were labeled and analyzed as described in Material and Methods.

cells with these interferons on parasitic proliferation by real-time quantitative PCR. As such control may vary between parasite strains, proliferation was assessed for the virulent RH strain as well as the avirulent Me49 strain. The results in Figure 2 show that IFN- γ significantly inhibited the parasitic proliferation of RH and Me49 strains in all studied cell types. This reduction was about 50%, compared to the PBS control. By contrast, neither IFN- β , nor IFN- λ 1, exerted significant inhibition of parasite proliferation in any cell type or by any strain used. No significant difference in parasite number was observed at 2h p.i. or 3h p.i., indicating no effect of IFN- β , IFN- γ and IFN- λ 1 on parasitic cell invasion (not shown). These results highlight that neither type I IFN- β nor type III IFN- λ 1 can directly limit parasite invasion or proliferation. Nevertheless, to verify indirect effects, we next studied their abilities to act on cytokine secretion profiles of human retinal cell lines in response to infection.

Interferons strongly shape ocular cytokine secretion

Our results show that IFN- γ , but not IFN- β and IFN- λ 1 control parasite proliferation in the four cell types studied. We then measured the cytokines induced in response to stimulation with these interferons, with or without *T. gondii* infection in these cells, using a 14-plex Luminex bead-based assay (Figures 3–5). Remarkably, secretion of IFN- λ 1 was significantly enhanced by

IFN- γ in all cell types and by IFN- β in RPE and Müller cells. The highest levels were measured in RPE and Müller cell cultures with 585 pg/mL and 450 pg/mL, respectively. The inflammatory cytokine IL-6 was significantly up-regulated by IFN- β and IFN- γ in all cell types, with the exception of IFN- β stimulated astrocytes and Müller cells, where significance was not reached. By contrast, IFN- λ 1 stimulation did not induce IL-6 production in any cell type. The equally inflammatory cytokine IL-8 showed already very high baseline expression in Astrocytes, which was not further enhanced by interferon stimulation. Microglial and Müller cells showed intermediate baseline secretion, which was further enhanced by IFN- β stimulation. In RPE cells, the lower IL-8 baseline secretion was substantially amplified in response to IFN- β . IFN- γ and IFN- λ 1 stimulation did not influence IL-8 expression in any cell type. The chemokine CXCL10 (IFN- γ induced protein 10) was, as expected, induced by IFN- γ in all cell types, but also by IFN- β in astrocytes and Muller cells. The chemokine CCL2 (MCP-1) was strongly induced by IFN- γ in all cell types, by IFN- β in Müller and RPE cells and IFN- λ 1 in RPE cells only. Again, IFN- λ 1 stimulation resulted mostly in lower levels than the other interferons. Lastly, CXCL9 (MIG) was only detected upon IFN- γ stimulation, and only in Muller cells. All other cytokines tested were not, or very lowly expressed. To summarize, we first confirmed that all cell types are effectively responding to all three types of interferons. Then, we showed that IFN- λ 1 is constitutively secreted by Astrocytes, RPE and Müller cells and further enhanced by interferon stimulation in all cell types. Finally, the

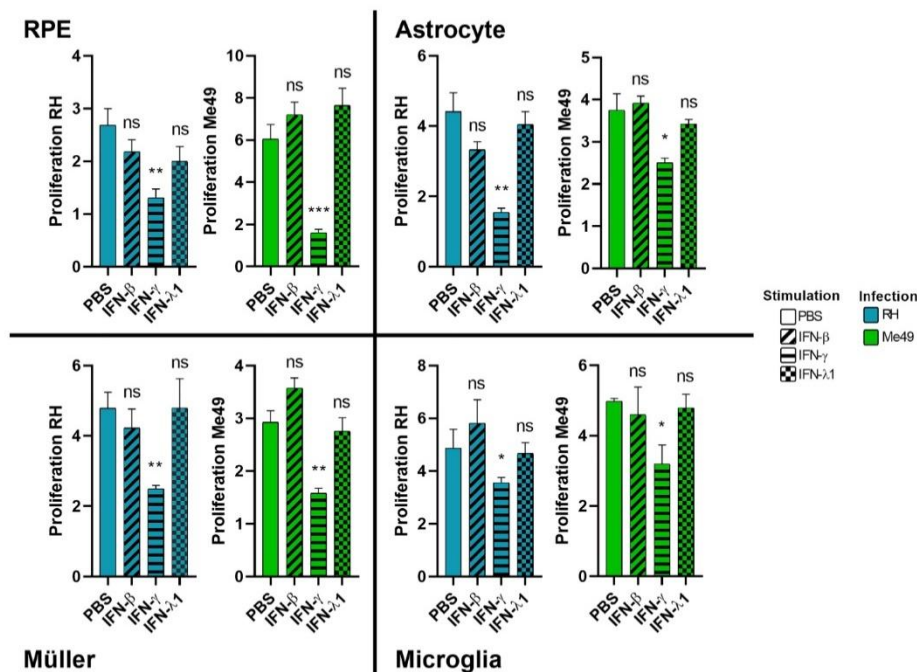
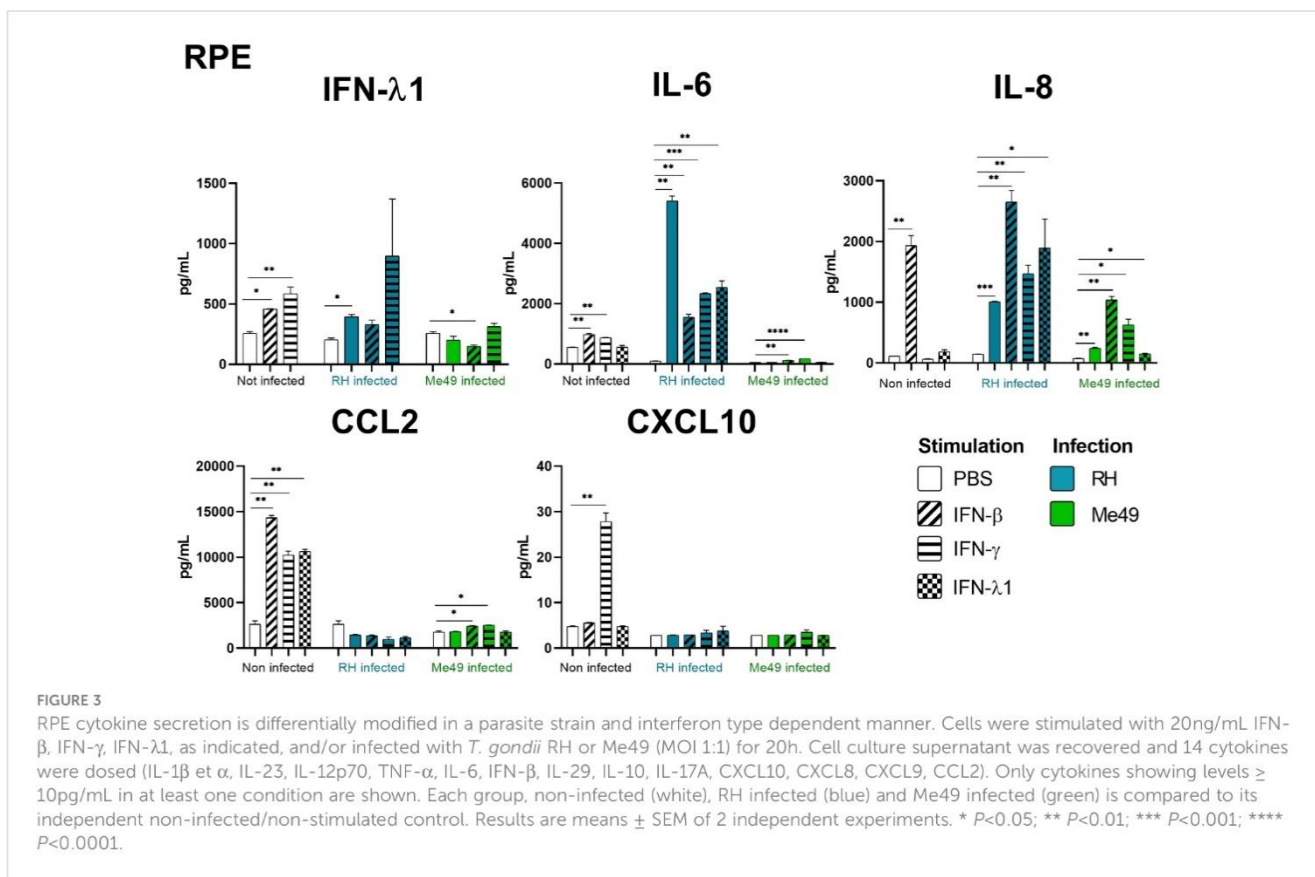


FIGURE 2

Type II, but not type I and III interferons inhibit parasite proliferation. Cells were stimulated for 24 hours with 20ng/mL of indicated interferons before being infected by RH or Me49 *T. gondii* strain at a MOI of 1:10. Proliferation is calculated as fold changes between parasite numbers at 2h p.i. (RH) and 3h p.i. (Me49) (invasion), compared to 24hpi and 48hpi, respectively (proliferation), as determined by qPCR. Results are expressed as means \pm SEM, n=4. The experiment was repeated 3 times independently with similar results. ns: non significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to PBS control.



inflammatory actions of type I and II interferons were not observed with type III interferons. Next, we looked at cytokine secreted in response to infection by two different parasite strains.

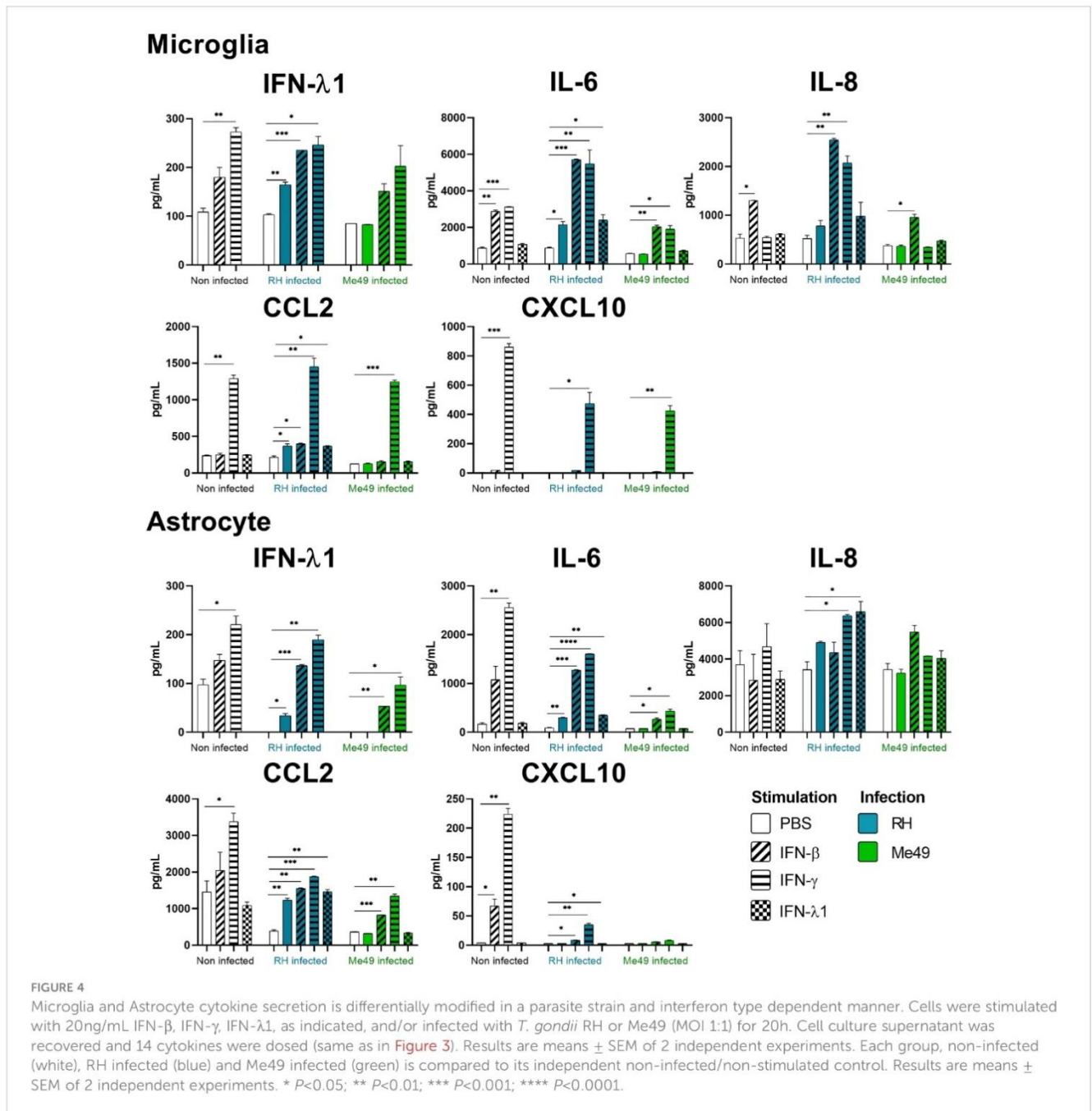
Toxoplasma gondii RH infection but not Me49 induces pro-inflammatory cytokine secretion

As next step to study cellular interaction during *T. gondii* infection, we looked at cytokine secretion in cell culture supernatants of infected microglia, astrocytes, RPE and Müller cells. Since different parasite strains are known to induce very different cellular reactions, secretion profiles of human ocular cell lines in response to infection by *T. gondii* RH and Me49 strains were investigated (Figures 3–5). With RH infection, we observed significantly increased secretions of IFN- λ 1 and IL-6 in all cell types, whereas secretion of CCL2 was significantly increased in microglia, astrocytes and Müller cells, but not RPE cells. RH infection also significantly increased secretion of IL-8 in RPE and Müller cells, but not in microglia nor in astrocytes, here probably due to the high baseline secretion. Similarly, RPE and Müller cells were the ones that secreted the most IFN- λ 1 (around 400 pg/mL and 250 pg/mL respectively) in response to RH infection. Surprisingly, RPE cells also secreted the most IL-6 (up to 5400 pg/mL) in response to infection. Taken together, this points to a central role of RPE cells in immune response to *T. gondii* infection. In sharp contrast, the impact of Me49 infection was limited to

moderately increased secretion of IL-8 by RPE cells and CCL2 by Müller cells.

Toxoplasma gondii infection modifies interferon-mediated cytokine secretion

Our previous results show local production of IFN- λ 1. Moreover, high levels of type I and II interferons are described during *in vivo* ocular infections. Therefore, we next studied the impact of the three types of interferons on the cytokine secretion profiles of infected cells (Figures 3–5). Notably, we observed synergistic effects for IL-6 and IL-8 secretion in microglia cells by concomitant RH infection and interferon stimulation. Again, this effect was generally less pronounced for IFN- λ stimulation. Interestingly, CXCL10, which was not spontaneously expressed and not induced by infection, showed considerably less interferon-induced expression in RH and Me49 infected cells. The same observation was made with the related chemokine CXCL9, only expressed in Müller cells. These results suggest that, even if type I and III interferons do not control *T. gondii* proliferation in retinal cells, there is a strong interaction between infection and interferon induced cytokine secretion, shaping the inflammatory environment in the retina during ocular toxoplasmosis. Taken together, these cytokine secretion profiles show that retinal resident cells secrete important amounts of chemokines, type III interferons and inflammatory cytokines in response to both infection and interferon stimulation. Importantly, induction of



inflammatory cytokines was not observed with IFN-λ1 stimulation. These results raise the question of the impact of interferons on barrier integrity and particularly of type III interferons already described as being involved in such situations.

Interferons and *Toxoplasma gondii* infection cause ZO-1 mediated tight junction reorganization in a human outer blood-retina barrier model

Type I and especially type III interferons are known for playing a key role in upregulating or downregulating barrier permeability.

For this reason, we studied the expression and localization of the tight junction scaffolding protein ZO-1 by confocal microscopy and RT-PCR in an outer blood-retina barrier (oBRB) model in response to interferon stimulation and *T. gondii* infection. As non-differentiated ARPE-19 cells do not form tight junctions, we first verified our differentiation protocol. Indeed, ARPE-19 cells differentiated during 8 weeks on transwell inserts in MEM-Nic medium showed strongly enhanced expression of primary RPE markers (Figure S1A), and still expressed IFNLR1 (Figures S1G, H). ZO-1 was present in non-differentiated RPE cells, but localized in vesicles throughout the cytoplasm, whereas it was localized at junctions in differentiated cells (Figure S1E). Interestingly, ZO-1 mRNA levels and electrical resistance were not impacted during

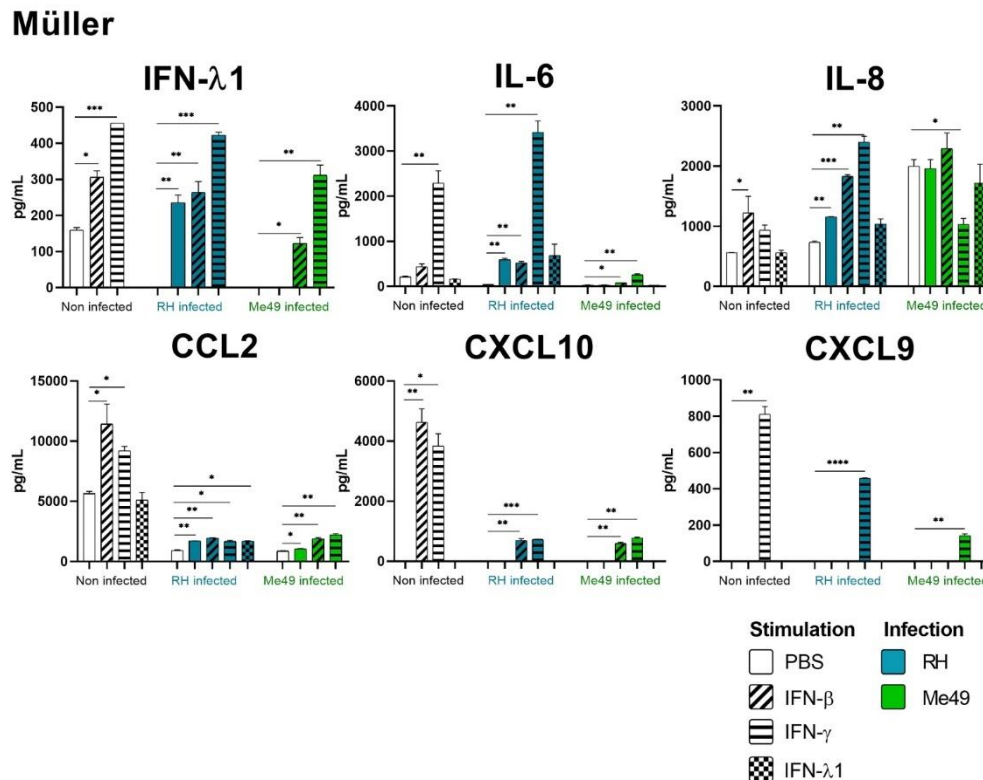


FIGURE 5

Müller cytokine secretion is differentially modified in a parasite strain and interferon type dependent manner. Cells were stimulated with 20ng/mL IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1, as indicated, and/or infected with *T. gondii* RH or Me49 (MOI 1:1) for 20h. Cell culture supernatant was recovered and 14 cytokines were dosed (same as in Figure 3). Each group, non-infected (white), RH infected (blue) and Me49 infected (green) is compared to its independent non-infected/non-stimulated control. Results are means \pm SEM of 2 independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

differentiation (Figures S1B, D). Such differentiated RPE cells were then used as oBRB model. We first investigated the effect of interferon treatment on ZO-1 localization, by confocal microscopy. As shown in (Figure 6A), IFN- β , IFN- γ , and IFN- λ 1 treatment increased ZO-1 tight junction localization, compared to PBS control. Image analysis confirmed this visual assessment, both for ZO-1 mean fluorescence intensity (MFI), as for total ZO-1 fluorescence, calculated by multiplying the ZO-1 MFI by the tight junction area (Figure 6B). This increase was more important with IFN- γ and IFN- λ 1 than with IFN- β stimulation. A closer look at the junction structure also revealed slight changes in the tight junction morphology, such as increased occurrence of spikes and ruffles. (Figures S2A–C). Infection of cells with *T. gondii* RH strain resulted in localized increased ZO-1 expression but also gaps and broken areas (Figure 6A). Concomitant IFN- λ 1 stimulation did not rescue the observed ‘infection’ phenotype. The inability of heat inactivated tachyzoites to induce any significant changes in ZO-1 localization and tight junction structure demonstrated that this effect was due to active parasite infection and/or virulence factor secretion. Interestingly, while image analysis revealed a significant increase in ZO-1 MFI upon infection, the total amount of fluorescence at the tight junction complex was not significantly different from the PBS control, due to the large gaps and broken areas (Figure 6C). This was in accordance with the absence of ZO-1 transcriptional activity

in response to infection (Figure 6D). Infection thus seemed to induce a reorganization of ZO-1 protein within the junction rather than to modify its expression or trafficking to the junctions. To conclude, these results highlight the positive effect of interferon stimulation on ZO-1 tight junction localization and showed that *T. gondii* actively induces tight junction reorganization thus creating gaps and broken areas. Next, we wanted to see if this reorganization is associated with the permeability and barrier function of our BHR model.

IFN- β and IFN- λ 1 increase barrier function in a STAT1-independent manner

Since interferons caused increased ZO-1 junction localization in our oBRB model, we next studied their functional impact on permeability and tried to elucidate the underlying mechanisms. Particularly, studies of the role of STAT1 transduction gave contradictory results. ARPE-19 cells showed distinct STAT1 phosphorylation upon IFN- β stimulation (Figure 7A). To study the role of this activation, we treated the cells with the established STAT1 inhibitor fludarabine. We first verified the absence of detectable cell toxicity for all concentrations tested after a 72h treatment (Figure S1C). Then, we wanted to validate this inhibitor

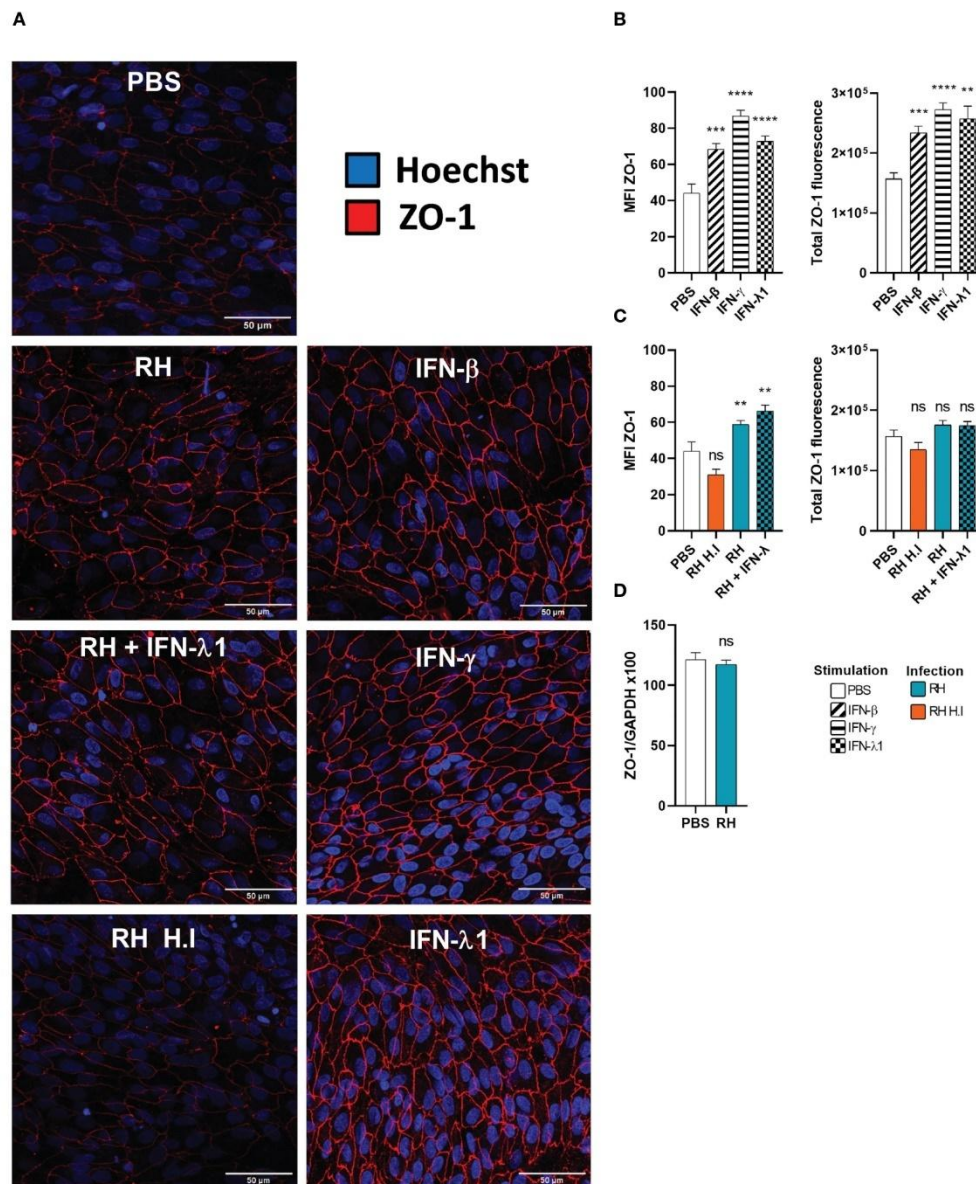


FIGURE 6

Interferons and infection modulate ZO-1 tight junction organization. (A) Confocal microscopy images of the outer blood-retina barrier model showing the effect of interferon stimulation and toxoplasmic infection on ZO-1 expression and localization. ARPE-19 RPE cells were differentiated for 8 weeks on laminin coated transwells. Then, they were treated with 20ng/mL IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1 and/or infected at a MOI of 1:1 with live or heat-inactivated (H.I.) *T. gondii* RH strain for 14h. The ZO-1 protein was labeled with AlexaFluor 555 and cell nuclei with Hoechst 33342. (B) and (C) Fluorescence intensity analysis. MFI = Mean fluorescence intensity. Total ZO-1 fluorescence = MFI of the junction area x junction area. Results were expressed as means ± SEM, n=12 (4 transwells per condition and 3 images per transwell). The experiment was repeated 3 times independently with similar results. ns: non significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (D) Infection does not modify ZO-1 mRNA expression. RT-PCR analysis of ZO-1 expression in response to *T. gondii* infection. Results were expressed as means ± SEM, n=4. The experiment was repeated twice independently with similar results.

in our model. Fludarabine treatment resulted in a significant decrease of total STAT1 amount, as well as of STAT1 Tyr701 phosphorylation in response to IFN-β (Figure 7A). Regarding IFN-λ1, the amount of pSTAT1 Tyr701 was too low to be detected by Western blot (Figure 7B), possibly due to generally low expression of IFN-λ receptor (18), as was also evident for our model described in this study. Still, as IFN-β and IFN-λ1 use the same transduction pathways, we can assume that fludarabine also reduces STAT1 phosphorylation by IFN-λ1 stimulation.

To study the role of STAT1 and its activation, the oBRB model was stimulated with interferons, with or without fludarabine treatment (Figures 7C, D). Both IFN-β and IFN-λ1 significantly increased electrical barrier resistance at both 24h and 48h of stimulation. Fludarabine treatment did not modify electrical resistance in non-stimulated cells, as well as interferon stimulated cells, suggesting a STAT1 independent mechanism. Finally, barrier tightness was also studied in a 70kDa fluorescein-dextran permeability assay (Figure 7C). In accordance with the electrical

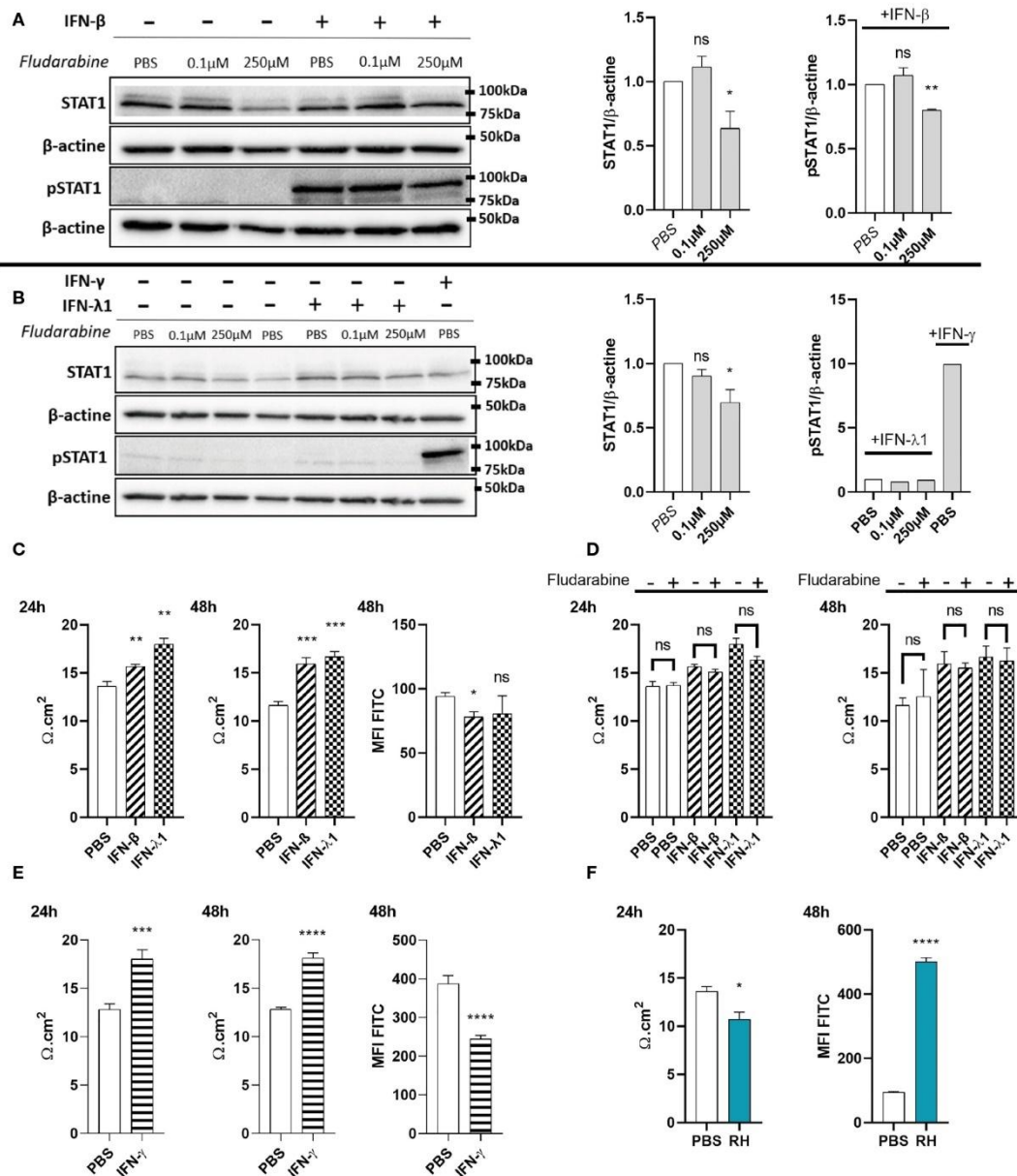


FIGURE 7
 IFN-λ1 and IFN-β enhance barrier function in a STAT1 independent manner. **(A)** Western blots and their densitometric analysis of lysates from RPE cells treated with PBS, 0.1μM or 250μM fludarabine and stimulated with 20ng/mL IFN-β for 1 hours. Mean intensity of STAT1 and pSTAT1 were normalized to β-actin expression from the same sample. Results are expressed as means ± SEM of 2 independent experiments. **(B)** Western blots and their densitometric analysis of lysates from RPE cells treated with PBS, 0.1μM or 250μM fludarabine and stimulated with 20ng/mL IFN-λ1 for 3 hours or IFN-γ for 1 hour. Mean intensity of STAT1 and pSTAT1 were normalized to β-actin expression from the same sample. Results are expressed as means ± SEM of 2 independent experiments. **(C–F)** RPE cells differentiated for 8 weeks on transwell inserts were stimulated with 20ng/mL IFN-β, IFN-λ1 or IFN-γ and treated with 250μM fludarabine or infected with RH strain at a MOI of 1:1 as indicated. Electrical resistance was measured after 24h and 48h. FITC-dextran (1mg/mL) in culture medium was placed in the upper transwell chamber. Fluoresceine MFI in the lower chamber was measured 48h after 20ng/mL interferon stimulation or after 24h *T. gondii* RH strain infection. Results are expressed as means ± SEM, n=4. The experiment was repeated 3 times independently with similar results. ns: non significative, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001, compared to PBS control unless otherwise indicated.

resistance, IFN-β stimulation resulted in a significant decrease in FITC-dextran permeability. However, the decrease upon IFN-λ1 stimulation, did not reach statistical significance. We also tested the impact of IFN-γ treatment on electrical resistance and dextran permeability. Like type I and III interferon, IFN-γ also significantly enhanced electrical resistance and reduced dextran permeability

(Figure 7E), in accordance with previously observed enhanced ZO-1 tight junction localization. Overall, these results show that type I and III, but also IFN-γ, are capable of enhancing ZO-1 tight junction localization, leading to reduced barrier permeability. This effect of type I and III interferons was independent of the canonical STAT1 transduction pathway.

Toxoplasma gondii infection induces permeabilization of the outer blood-retina barrier

As our confocal microscopy images demonstrated tight junction reorganization and partial destruction by *T. gondii* infection, we also studied the impact of infection on barrier function. We observed a significant decrease in electrical resistance at 24h of infection, as well as a concordant strong increase of FITC-dextran permeability in infected cell cultures (Figure 7F). Microscopic examination showed the same aspect of an intact cell layer as in non-infected cells (not shown). These results demonstrate an active role of the parasite in diminishing barrier integrity and confirm that the reorganization observed by microscopy is linked to higher barrier permeability.

Discussion

Here, we aimed to study the immune network regulating entry and installation of the parasite *T. gondii* in the retina. We specifically looked at the roles of type I and III interferons, known to regulate endothelial and epithelial barrier functions. For the blood-brain barrier, IFN- λ has been shown to limit virus passage (21). Unlike type II interferons, little is known about the involvement of type I and III interferons in the physiopathology of toxoplasmosis, particularly in the context of ocular toxoplasmosis (22). One of the central differences between these two types of interferons is the much more restricted expression of the receptor for IFN- λ . Our results show that all the cell lines in this study do express the IFN- λ receptor and are potentially activable by this cytokine, indicating that, in the eye, this receptor is not restricted to barrier cells. However, we found no significant effect of type I and III interferons on parasite proliferation in any cell type tested, in apparent contradiction to one study on IFN- β in ARPE-19 cells (23). This might be due to different experimental conditions. Generally, the effect of IFN- β on *T. gondii* proliferation has not been extensively investigated, and no study has yet looked at the effect of IFN- λ , so it is yet unknown if our results point to specific regulation mechanisms in cells within the CNS. The exact involvement of intracellular effector mechanisms employed by the different interferons in CNS and other cells could explain our results. Despite some redundancy in ISGs induced by each interferon they are considered to have mostly complementary roles in pathogen elimination (19). Some studies describe the promising role of ISG15, usually attributed to type I interferon stimulation, in autophagy-mediated parasite elimination (24). However, our results suggest this direct anti-parasitic mechanism to be insufficient in human ocular cell lines.

We then studied indirect effector mechanisms of the interferons in retinal cell types. We first observed that IFN- λ 1 secretion was induced in all cell lines upon stimulation by IFN- β and IFN- γ . As both interferons, especially IFN- γ , are omnipresent during acute *T. gondii* infection, this means local presence of elevated levels of IFN- λ 1 during infection. When comparing the effect of the interferons on the production of other cytokines, we see considerable overlap

between IFN- β and IFN- γ , which induced an inflammatory secretion profile, also including chemokines attracting neutrophils and activated lymphocytes, confirming their role in immune activation. By contrast, IFN- λ 1 induced much lower secretion of these inflammatory cytokines and does not seem to participate in this inflammatory loop. Interestingly, a recent study demonstrated even an active immunomodulatory role of IFN- λ 1 (25). In light of our results, this cytokine could be used in the immune privileged ocular environment to enhance epithelial barrier functions without the inflammatory properties of the other interferons. This merits further studies, as it could functionally explain the observed abundant production of IFN- λ 1. The basal secretion of this cytokine in RPE cells indicates a constant immunomodulatory role on other retinal cells. This lack of inflammatory activity of IFN- λ 1, which we confirmed here for various retinal cell types, clearly distinguishes this cytokine from IFN- β , despite sharing a common STAT1-STAT2 heterodimer signaling pathway. This difference has been explained by absence of the more inflammatory STAT1 homodimers due to low density receptor expression (18), which we also describe here for the retinal cell lines.

Cellular reaction to *T. gondii* infection and the resulting clinical outcome of ocular toxoplasmosis are known to be highly strain-dependent (26). In our study, the expression of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 was highly upregulated in response to infection with the virulent RH strain. This upregulation was particularly observed in synergy with interferon stimulation, demonstrating a dynamic interacting process of infection and interferon-induced cytokine production. In sharp contrast, no such upregulation was observed in Me49 infected cells, with some exception for IL-8. Even more, interferon induced IL-6 production was diminished in cells concomitantly infected with Me49. These opposite regulation patterns of inflammatory cytokines is consistent with the activation of STAT3 by virulent *T. gondii* strains, like RH, but not avirulent strains, such as Me49 (26). In interferon stimulated cells, secretion of chemokines CXCL10, CCL2 and CXCL9, known to be STAT1 dependent (27), was diminished by both parasite strains, and expression of Th1 cytokines, like IFN- β or IL-12, not observed. This indicates the action of the parasitic STAT1 reducing effector molecule TgIST (28) in our retinal cell lines.

Our previous human and mouse studies showed ocular expression of the signature cytokine IL-17A, which localized at least partially to Muller cells (13). The fact that the strong inflammatory response observed in our study did not include measurable levels of IL-17A could indicate that yet unknown factors by infiltrating cells are needed for IL-17A expression. Exploring the role of this cytokine, particularly in interaction with interferon stimulation, would be interesting, given its capacity to diminish barrier function (29). The barrier tightening action of IFN- λ is well described, especially for virus dissemination (30), but no study has looked at the retinal barrier. Our oBRB model of differentiated ARPE-19 cells allowed us to demonstrate the strong effect of different interferons on the intercellular localization of the tight junction protein ZO-1. In fact, IFN- β and more strongly IFN- γ and IFN- λ 1 induced more abundant ZO-1 charged vesicles and increased ZO-1 positioning at the tight junction complex. The resultant structure of the tight junctions, with characteristic ruffles

and spikes has been previously attributed to enhanced barrier efficiency (31). Remarkably, ARPE-19 cells are not capable of correctly expressing and positioning claudins at the tight junction complex (32). Claudins are the keystone of the pore pathway responsible for building a strong transepithelial electric resistance (TEER) (31). This leads to low electric resistance, also observed in other studies. The use of an established differentiation protocol (20) allowed us to approach primary RPE cell characteristics, like the expression of recognized markers and the ZO-1 localization to tight junctions. Even if this long differentiation step did not improve TEER, type I and III interferon stimulation of differentiated RPE cells did lead to increased electrical resistance and reduced dextran permeability. This suggests that other tight junction proteins than claudin can be recruited to tighten the barriers. Occludin is one of the candidates, as it is involved in the leak pathways allowing the passage of larger macromolecules (5). Even if the exact mechanisms remain to be elucidated, we showed that interferons are capable of outer blood retinal barrier tightening through ZO-1 reorganization at the cell membrane, an effect already described in other barrier models such as the blood-brain barrier (21, 33), intestinal barrier (34), and lung barrier (17). We confirmed here previous observations that *T. gondii* infection weakens ARPE-19 barrier function (35, 36), probably by secreting MMP like secreted excreted proteases (37), and showed the barrier preserving effect of interferon stimulation, even during concomitant infection.

The activation of the JAK/STAT pathway, demonstrated by abundant pTyr701 STAT1 in RPE cells following IFN- β stimulation is not surprising. The lack of detectable pTyrSTAT1 following IFN- λ 1 stimulation, however, is likely due to much less efficient STAT1 stimulation by this cytokine, despite the signaling through the same signal pathway (19) and the limited sensitivity of Western blot. Modulation of ZO-1 localization and tight junction morphology was not affected by the STAT1 inhibitor fludarabine. Even if this treatment only partially diminished pSTAT1 band intensity, this difference should be enough to detect significant difference (38). Moreover, despite a much stronger STAT1 phosphorylation induced by IFN- β than IFN- λ 1, we observed more efficient ZO-1 junction localization after IFN- λ 1 treatment. Together, these results suggest a STAT1 independent mechanism of tight junction organization. The same lack of STAT1 involvement was observed for tight junction formation at the blood-brain barrier (21), indicating a general link between interferon stimulation and tight junction regulation bypassing the canonical JAK/STAT pathway, by a yet unknown mechanism. Several non-canonical, STAT1 independent pathways have been described, such as the Crkl-C3G axis which activates RAP1 (39), known to participate in cell polarity and tight junction regulation in interaction with Shank2 (40).

In conclusion, we introduced an *in vitro* model to investigate the immune interaction between retinal cells, with particular focus on the role of type I and type III interferons. IFN- λ 1 is readily produced by these cells by *T. gondii* infection and infection-induced cytokine responses. According to our results, these interferons do not act by controlling parasite proliferation, leaving this role to IFN- γ . Instead, they regulate the barrier function of the oBRB in a

STAT1 independent manner. Further studies on how this influences passage of parasites, but also activated immune cells, into the retina are needed to assess the pathophysiological role of these interferons and possibly to identify immunological targets for this ocular disease.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

BG: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Visualization, Data Writing – original draft, Writing – review and editing. VG: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Software, Writing – review and editing. CH: Investigation, Software, Writing – review and editing. CG and LB: Investigation, Writing – review and editing. JB and DF: Funding acquisitions, Resources, Writing – review and editing. OV and JD: Funding acquisition, Supervision, Writing – review and editing. AP: Project Administration, Supervision, Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Software, Visualization, Data Writing – original draft, Writing – review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

BG received a Berthe Fouassier Ph.D. scholarship of the *Fondation de France* (grant no. 120246). VG received a Berthe Fouassier Ph.D. scholarship of the *Fondation de France* (grant no. 89967). It was further supported by non-specific funding of the *Université de Strasbourg* and the *Hopitaux Universitaires de Strasbourg*.

Acknowledgments

Image acquisition and image analysis were performed on the Imaging Platform of the CRBS, PIC-STRA UMS 38, Inserm, Unistra, Strasbourg.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1148037/full#supplementary-material>

FIGURE S1

(A) Differentiation protocol induces the expression of RPE primary cell markers. ARPE-19 cells were differentiated as explained in Material and Methods. The RT-qPCR results are shown as fold changes of cDNA copy numbers relative to non-differentiated ARPE-19 cells. N=1 with 3 independent experiments showing similar results. (B) Differentiation protocol does not modify ZO-1 expression. Quantification of ZO-1 mRNA by RT-PCR. RPE cells were differentiated in DMEM/F12 or MEM-Nic medium, as detailed in Material and Methods. Results are expressed as means \pm SEM, n=4 with 2 independent experiments showing similar results. (C) Fludarabine does not affect differentiated ARPE-19 cell viability. After 8 weeks in MEM-Nic medium, cells were treated with 250 μ M fludarabine for 72h. Cell viability in supernatant and on adherent cells were assayed using trypan blue. Results are expressed as percentage \pm SEM, n=4 with 3 independent experiments. (D) Differentiation protocol does not modify TEER in ARPE-19 cells. ARPE-19 cell were cultivated in DMEM/F-12 medium until reaching confluency or 8 weeks

in MEM-Nicotinamide medium on laminin coated transwells (n=8). (E) Differentiation protocol is essential for correct ZO-1 junction localization. ARPE-19 cell were cultivated in DMEM/F-12 medium until reaching confluency (Non-diff.) or differentiated (Diff.) as detailed in Material and Methods. Cells were marked with anti ZO-1 (red) antibody and Hoechst33342 (blue). (F) Experimental procedure for BHRc treatments. After differentiation as detailed in Material and Methods, RPE cells were infected by introducing parasites in the upper transwell chamber. For interferon stimulation or fludarabine treatment, the medium of the upper and lower chambers was replaced with fresh medium containing 20ng/mL interferon or 250 μ M fludarabine. (G) Differentiated ARPE-19 cells express the IFNLR1 receptor subunit (Flow cytometry). Differentiated cells were prepared for flow cytometry analysis as described in material and methods. The MFI of IFNLR1 marked cells (blue) were compared with IgG isotype marked control (red). (H) Differentiated ARPE-19 cells express the IFNLR1 receptor subunit (Microscopy). Confocal microscopy image of DMEM/F-12 cultivated (Non-diff.) or differentiated (Diff.) RPE cells. The cells were fixed, permeabilized and the IFNLR1 subunit and cell nuclei labeled with AlexaFluor488 (green) and Hoechst 33342 (blue), respectively.

FIGURE S2

Interferon stimulation induces tight junction morphology changes. Differentiated RPE cells were stimulated with interferons or PBS (as indicated on panels) and marked with anti-ZO-1-Alexa555 (red) antibody and Hoechst33342 (blue). Z-stack sections were made using confocal microscopy. 3D images with surface rendering were then created with Imaris. (A) Two different views of the same cell were represented and tight junction ruffles are indicated by arrows. (B) Top views of 3D images with surface rendering on PBS control and IFN- λ 1 treated cells. (C) IFN- λ 1 enhances the amount of cytoplasmic vesicles containing ZO-1 proteins (side view).

TABLE S1

FIJI macro used for sample analysis.

TABLE S2

Raw experiment data.

References

- Forrester JV, McMenamin PG, Dando SJ. CNS infection and immune privilege. *Nat Rev Neurosci* (2018) 19(11):655–71. doi: 10.1038/s41583-018-0070-8
- Weidner JM, Kanatani S, Hernández-Castañeda MA, Fuks JM, Rethi B, Wallin RPA, et al. Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by toxoplasma gondii coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. *Cell Microbiol* (2013) 15(10):1735–52. doi: 10.1111/cmi.12145
- Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by toxoplasma gondii. *Cell Microbiol* (2010) 12(3):292–300. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x
- O'Leary F, Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J* (2021) 290(4):878–91. doi: 10.1111/febs.16330
- Otani T, Furuse M. Tight junction structure and function revisited. *Trends Cell Biol* (2020) 30(10):805–17. doi: 10.1016/j.tcb.2020.08.004
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* (2006) 126(4):741–54. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.043
- Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* (2014) 14(1):36–49. doi: 10.1038/nri3581
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* (2004) 75(2):163–89. doi: 10.1189/jlb.0603252
- Ank N, West H, Paludan SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* (2006) 26(6):373–9. doi: 10.1089/jir.2006.26.373
- Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* (2007) 178(5):2623–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2623
- Green R, Ireton RC, Gale M. Interferon-stimulated genes: new platforms and computational approaches. *Mamm Genome* (2018) 29(7–8):593–602. doi: 10.1007/s00335-018-9755-6
- Rochet E, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, Bourcier T, Candolfi E, et al. Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect Immun* (2015) 83(5):2109–17. doi: 10.1128/IAI.02985-14
- Sauer A, Pfaff AW, Villard O, Creuzot-Garcher C, Dalle F, Chiquet C, et al. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis* (2012) 206(8):1319–29. doi: 10.1093/infdis/jis486
- Sturge CR, Yarovinsky F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during toxoplasma gondii infection. *Infect Immun* (2014) 82(8):3090–7. doi: 10.1128/IAI.01722-14
- Mahmoud ME, Ui F, Salman D, Nishimura M, Nishikawa Y. Mechanisms of interferon-beta-induced inhibition of toxoplasma gondii growth in murine macrophages and embryonic fibroblasts: role of immunity-related GTPase M1. *Cell Microbiol* (2015) 17(7):1069–83. doi: 10.1111/cmi.12423
- Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. Interferon- λ : immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity* (2015) 43(1):15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.001
- Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol* (2019) 19(10):614–25. doi: 10.1038/s41577-019-0182-z
- Forero A, Ozarkar S, Li H, Lee CH, Hemann EA, Nadjisombati MS, et al. Differential activation of the transcription factor IRF1 underlies the distinct immune responses elicited by type I and type III interferons. *Immunity* (2019). 51(3):451–64.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.007
- Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity* (2019) 50(4):907–23. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.025
- Hazim RA, Volland S, Yen A, Burgess BL, Williams DS. Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide. *Exp Eye Res* (2019) 179:18–24. doi: 10.1016/j.exer.2018.10.009
- Lazear HM, Daniels BP, Pinto AK, Huang AC, Vick SC, Doyle SE, et al. Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Sci Transl Med* (2015) 7(284):284ra59. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4304

22. Greigert V, Bittich-Fahmi F, Pfaff AW. Pathophysiology of ocular toxoplasmosis: facts and open questions. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14(12):e0008905. doi: 10.1371/journal.pntd.0008905
23. Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of toxoplasma gondii replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* (1996) 64(10):4188–96. doi: 10.1128/iai.64.10.4188-4196.1996
24. Bhushan J, Radke JB, Perng YC, McAllister M, Lenschow DJ, Virgin HW, et al. ISG15 connects autophagy and IFN- γ -Dependent control of toxoplasma gondii infection in human cells. *mBio* (2020) 11(5):e00852–20. doi: 10.1128/mBio.00852-20
25. Zaroni I, Granucci F, Broggi A. Interferon (IFN)- λ takes the helm: immunomodulatory roles of type III IFNs. *Front Immunol* (2017) 8:1661. doi: 10.3389/fimmu.2017.01661
26. Melo MB, Jensen KD, Saeij JP. Toxoplasma gondii effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* (2011) 27(11):487–95. doi: 10.1016/j.pt.2011.08.001
27. Casazza RL, Lazear HM. Why is IFN- λ less inflammatory? one IRF decides. *Immunity* (2019) 51(3):415–7. doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.019
28. Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart MP, Vollaire J, Jossierand V, Bertini RL, et al. Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses. *J Exp Med* (2016) 213(9):1779–98. doi: 10.1084/jem.20160340
29. Chen Y, Yang P, Li F, Kijlstra A. The effects of Th17 cytokines on the inflammatory mediator production and barrier function of ARPE-19 cells. *PLoS One* (2011) 6(3):e18139. doi: 10.1371/journal.pone.0018139
30. Wells AI, Coyne CB. Type III interferons in antiviral defenses at barrier surfaces. *Trends Immunol* (2018) 39(10):848–58. doi: 10.1016/j.it.2018.08.008
31. Lynn KS, Peterson RJ, Koval M. Ruffles and spikes: control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* (2020) 1862(9):183339. doi: 10.1016/j.bbmem.2020.183339
32. Peng S, Wang SB, Singh D, Zhao PYC, Davis K, Chen B, et al. Claudin-3 and claudin-19 partially restore native phenotype to ARPE-19 cells via effects on tight junctions and gene expression. *Exp Eye Res* (2016) 151:179–89. doi: 10.1016/j.exer.2016.08.021
33. Douam F, Soto Albrecht YE, Hrebikova G, Sadimin E, Davidson C, Kottenko SV, et al. Type III interferon-mediated signaling is critical for controlling live attenuated yellow fever virus infection *In Vivo*. *mBio* (2022) 8(4):e00819–17. doi: 10.1128/mBio.00819-17
34. Odendall C, Voak AA, Kagan JC. Type III IFNs are commonly induced by bacteria-sensing TLRs and reinforce epithelial barriers during infection. *J Immunol* (2017) 199(9):3270–9. doi: 10.4049/jimmunol.1700250
35. Nogueira AR, Leve F, Morgado-Diaz J, Tedesco RC, Pereira MCS. Effect of toxoplasma gondii infection on the junctional complex of retinal pigment epithelial cells. *Parasitology* (2016) 143(5):568–75. doi: 10.1017/S0031182015001973
36. Song HB, Jun HO, Kim JH, Lee YH, Choi MH, Kim JH. Disruption of outer blood-retinal barrier by toxoplasma gondii-infected monocytes is mediated by paracrine activated FAK signaling. *PLoS One* (2017) 12(4):e0175159. doi: 10.1371/journal.pone.0175159
37. Rosenberg A, Sibley LD. Toxoplasma gondii secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host Microbe* (2021) 29(7):1186–1198.e8. doi: 10.1016/j.chom.2021.04.016
38. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med* (1999) 5(4):444–7. doi: 10.1038/7445
39. Mazewski C, Perez RE, Fish EN, Platanias LC. Type I interferon (IFN)-regulated activation of canonical and non-canonical signaling pathways. *Front Immunol* (2020) 11:606456. doi: 10.3389/fimmu.2020.606456
40. Sasaki K, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, et al. Shank2 binds to aPKC and controls tight junction formation with Rap1 signaling during establishment of epithelial cell polarity. *Cell Rep* (2020) 31(1):107407. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.088

Figure S1

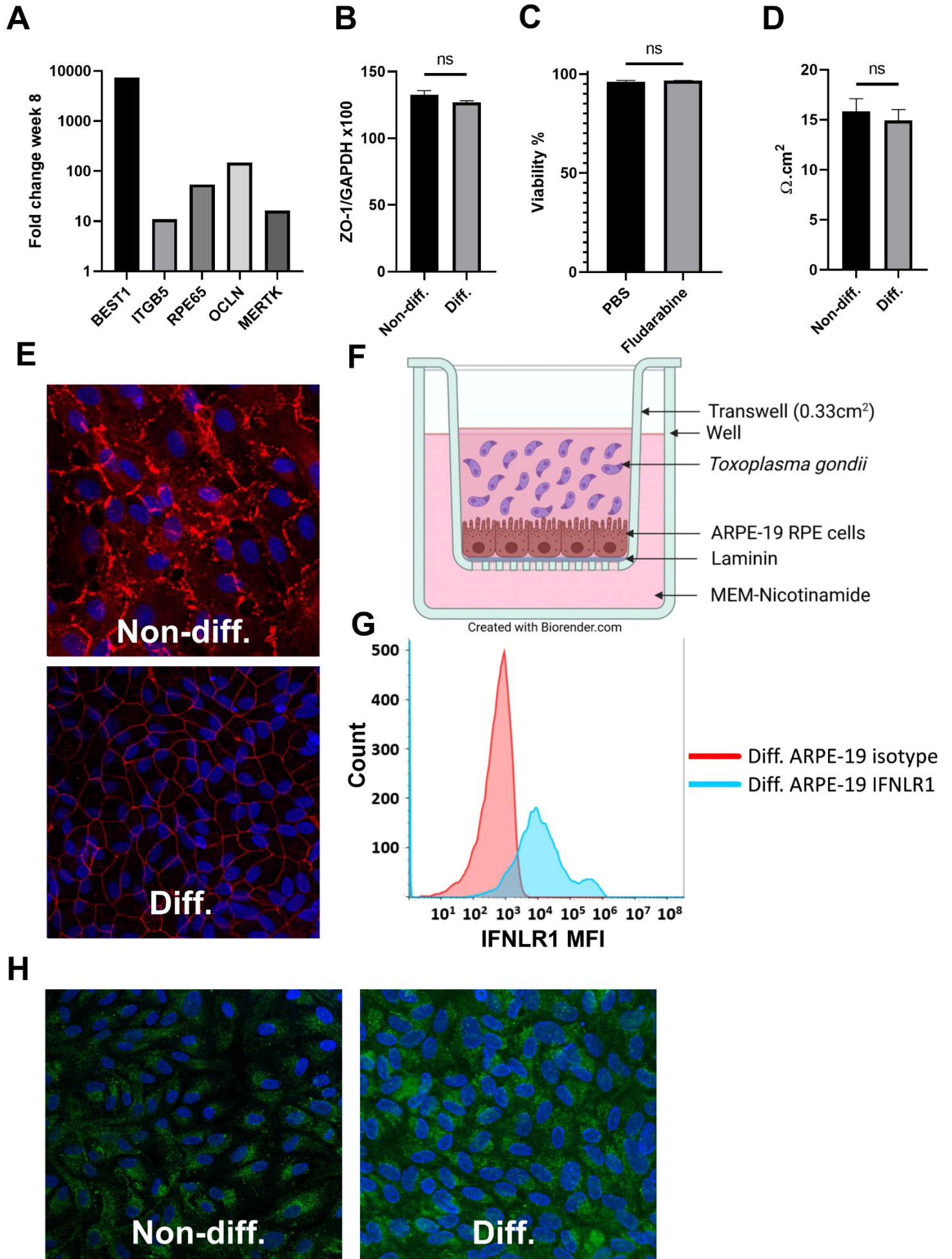
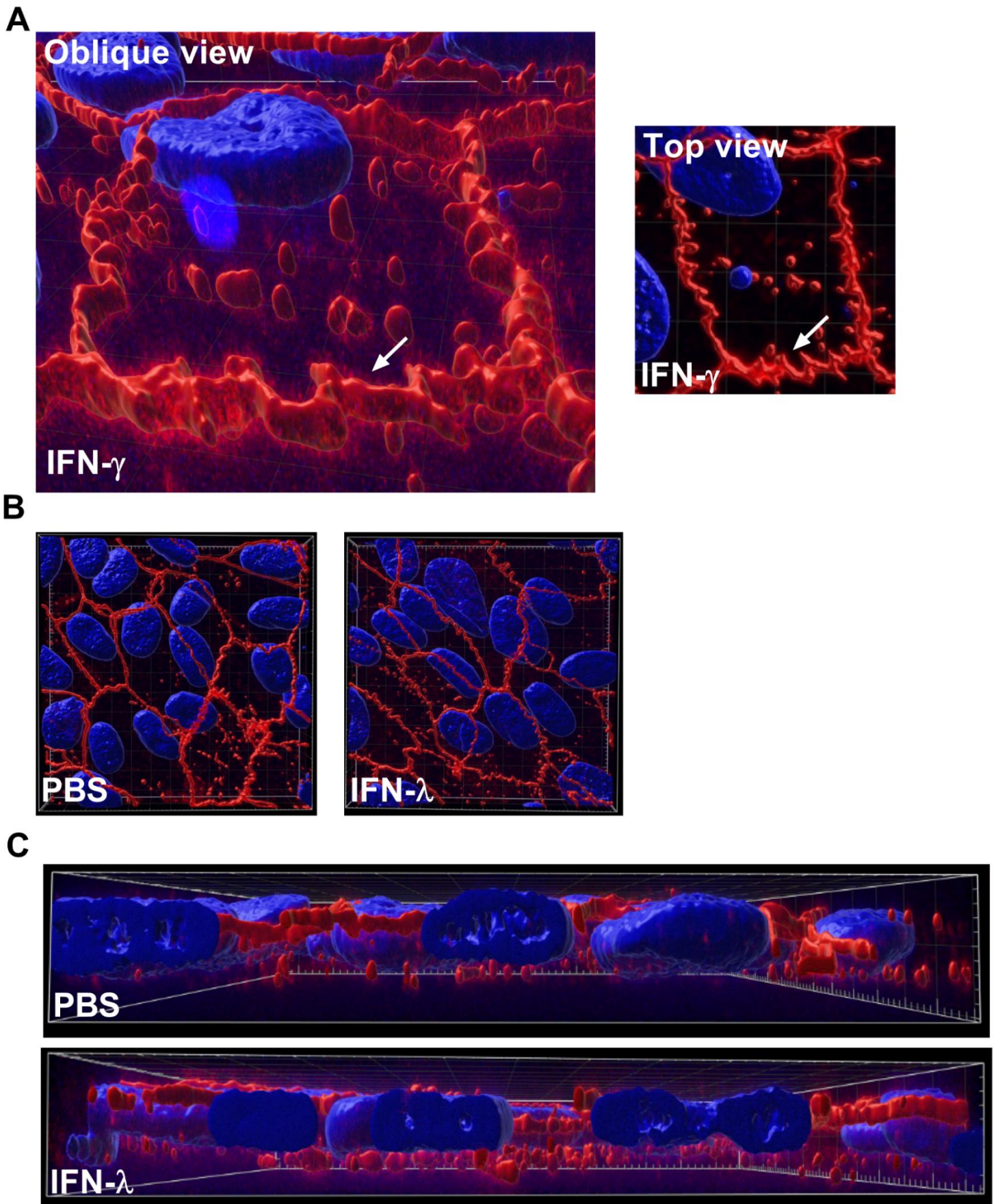


Figure S2



Données expérimentales non-publiées (Article 1)

Partie I : Matériels et méthodes

1.1 Effet du traitement combiné des interférons sur la multiplication de *T. gondii*

Des microglies humaines HMC3 (ATCC) sont mises en plaque 24 puits (Nunc) dans du DMEM (Gibco), avec 4,5 g/L de L-glutamine (Gibco), 10% de SVFi (Gibco) et de la P/S (Hyclone) avec une densité cellulaire de 50 000 cellules par puits. Après 24h en culture, les microglies sont stimulées avec 20 ng/mL d'IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 recombinant humain (Peprotech) ou bien avec les combinaisons suivantes : IFN- β + IFN- γ ; IFN- β + IFN- λ 1 ; IFN- γ + IFN- λ 1 ; IFN- β + IFN- γ + IFN- λ 1 (avec 20 ng/mL pour chaque interféron). Après 24h de stimulation, les microglies sont infectées avec 50 000 tachyzoïtes de *T. gondii* RH, soit une multiplicité d'infection de 1 parasite pour 10 cellules. Ensuite, 2h après l'infection, les cellules sont lavées avec du PBS 1X afin d'éliminer les parasites extracellulaires et restimulées avec 20 ng/mL des interférons correspondants. Finalement, après 24h d'infection, les cellules sont récoltées, l'ADN est extrait (colonne d'extraction Qiagen) et les parasites sont quantifiés par une qPCR (CFX Light Cycler et SSoAdvanced SybrGreen de Biorad) ciblant le gène *TgB1* (parasitaire) et *GAPDH* (humain). La séquence des amorces est disponible dans : Geiller *et al.* 2023. L'expression de *TgB1* est ensuite normalisée selon l'expression de *GAPDH*.

1.2 Mise au point d'un protocole de différenciation de cellules rétiniennes pigmentaires épithéliales

800 000 cellules rétiniennes pigmentaires épithéliales sont mises en culture dans des boîtes de Petri de 10 mL (TPP) dans du milieu de différenciation MEM-Nic (103) : 1% de supplément N1 (Invitrogen), 1% de SVFi (Gibco), P/S (Hyclone), 0,25 mg/mL de taurine (Sigma-Aldrich), hydrocortisone 20 ng/mL (Sigma-Aldrich), triiodo-thyronine 0,013 ng/mL (Sigma-Aldrich) et 10 mM de nicotinamide (Sigma-Aldrich). Après 8 semaines de différenciation, les cellules différenciées sur boîte de Petri, différenciées sur inserts ou non différenciées sont récoltées avec 1 mL de Nucleozol (Macherey-Nagel, MN) et l'ARN est extrait en suivant le protocole préconisé par le fabricant. Ensuite, 100 ng d'ARN sont rétro-transcrit en ADNc, en utilisant le kit qScript™ cDNA Synthesis (Quantabio, 733-1174). Finalement, une qPCR en temps réel

utilisant les amorces du **tableau 1** est réalisée sur un CFX Light Cycler et du SSoAdvanced SybrGreen (Biorad) en utilisant le programme du **tableau 2**. Une gamme permet de déterminer le nombre de copie de chaque ADNc d'intérêt. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage *GAPDH* et les « *folds* » sont exprimés par rapport aux cellules RPE non différenciées.

Gène	Séquence de l'amorce sens (5' → 3')	Séquence de l'amorce antisens (5' → 3')
<i>MERTK</i>	AGACTTCAGCCACCCAAATG	GGGCAATATCCACCATGAAC
<i>RPE65</i>	GATCTCTGCTGCTGGAAAGG	TGGGGAGCGTGACTAAATTC
<i>ITGB5</i>	CGGGGACAACTGTAAGTCT	ACGCAATCTCTTGGTGCT
<i>GAPDH</i>	AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC	CCGGAGGGGCCATCCACAGTC

Tableau 1 : Amorce ciblant les ADNc humain *MERTK*, *RPE65*, *ITGB5* et *GAPDH* (Eurofins) pour l'évaluation de la différenciation des cellules RPE.

Nombre de cycles	Étape	Température (°C)	Temps
1	Activation	95	5 min
40	Dénaturation	95	10 sec
	Hybridation	55	30 sec
1	Courbe de fusion	65 à 95 (0,5)	5 sec

Tableau 2 : Protocole d'amplification utilisé sur le thermocycleur CFX Real-Time PCR System (Biorad)

1.3 Dosage multiplex Luminex du surnageant de culture cellulaire en réponse à l'infection

Les astrocytes, microglies, RPE et cellules de Müller sont mises en plaque 24 puits (Nunc). Après 48h de culture, les cellules sont infectées par *T. gondii* RH, Me49 ou FOU avec un ratio d'infection de 1:1, soit approximativement 300 000 tachyzoïtes. Après 20h d'infection, 250 μ L du surnageant de chaque condition est récupéré et centrifugé à 3 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est ensuite aliquoté et congelé à -80°C. Le dosage des cytokines se fait à l'aide de l'automate Magpix (Invitrogen) et du kit Procartaplex (Luminex). Le panel permettra de doser les 15 cytokines suivantes : IFN- α , IFN- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12p70, IL-17A (CTLA-8), IL-23, IL-29 (IFN- λ 1), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIG (CXCL9), TNF alpha.

Partie II : Résultats

Étude des effets synergiques et antagonistes de la costimulation aux interférons sur l'inhibition de la multiplication parasitaire

Tous les types d'interférons sont présents en grande quantités dans le contexte de la toxoplasmose oculaire. De plus, dans les mécanismes de réponse antivirales, les interférons de type III sont déjà connus pour leurs actions synergiques avec les interférons de type I. L'objectif de cette expérience a donc été d'étudier les effets synergiques entre interférons sur l'inhibition de la multiplication parasitaire chez des microglies humaines. Les résultats confirment en premier lieu que seul les interférons de type II sont capables d'inhiber de manière significative la multiplication parasitaire (**Fig.1**). De la même manière, la combinaison entre l'IFN- β et l'IFN- γ inhibe significativement la multiplication parasitaire dans une amplitude très similaire à celle de l'IFN- γ seul. Néanmoins, de manière surprenante, la combinaison entre l'IFN- γ et l'IFN- λ 1 n'inhibe pas la multiplication parasitaire de manière significative. La même chose est observable lorsque les 3 types d'interférons sont combinés. Pour conclure, la combinaison des interférons ne semble pas avoir d'effet synergique notable. Au contraire, un effet antagoniste dû à l'IFN- λ 1 est même observable dans les conditions expérimentales décrites ici. Il serait maintenant intéressant de tester d'autres lignées cellulaires oculaires humaines ainsi que différentes concentrations d'interférons plus physiologiques.

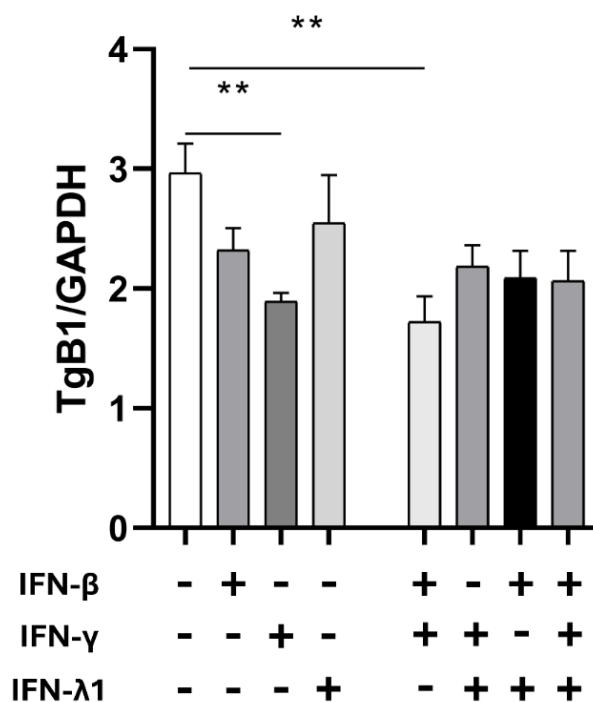


Figure 1 : Résultats de qPCR ciblant le gène *TgB1* (parasitaire) et *GAPDH* (humain). Le nombre de copie du gène *TgB1* est normalisé par rapport aux copies du gène *GAPDH*. Le graphique représente la moyenne des ratios *TgB1/GAPDH* \pm l'écart type. Le test statistique réalisé est un test de Kruskal-Wallis avec n=4 échantillons et $\alpha=5\%$; ** P<0,001.

Protocole de différenciation de la lignée cellulaire ARPE-19

La différenciation des RPE en utilisant des inserts de culture est optimale. En effet, les inserts de culture permettent de générer artificiellement deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, favorisant ainsi la mise en place d'une polarisation apicaux-basale, essentielle à la différenciation d'un épithélium mature et imperméable. Les jonctions serrées sont des structures apicaux-latérales nécessitant une polarité cellulaire. Ce mode de culture très onéreux réduit néanmoins considérablement la quantité de cellules différenciables, limitant ainsi certaines applications nécessitant des quantités importantes de matériel biologique. C'est pour cette raison, que nous avons évalué la différenciation des cellules RPE sur une surface plastique, en utilisant un milieu de culture enrichi en nicotinamide, un membre de la famille de la vitamine B3. Ce modèle de différenciation a été mis au point par l'équipe de David S. Williams (103) et nous avons pu confirmer leurs résultats. En effet, l'image de microscopie montre clairement qu'après 8 semaines de différenciation, les RPE forment un épithélium pavimenteux simple (**Fig. 2A**). Cette morphologie est également associée à l'expression de marqueurs tels que *RPE65*, codant pour une caroténoïde oxygénase impliquée dans la formation de 11-cis-rétinol, permettant la régénération du pigment des photorécepteurs, *MERTK*, codant pour une protéine transmembranaire, et *ITGB5*, codant pour l'intégrine $\beta 5$, tous deux impliqués dans des mécanismes de phagocytose essentiels au maintien de l'homéostasie rétinienne (**Fig. 2B**). L'expression de ces marqueurs est grandement augmentée avec la différenciation dans des proportions similaires sur insert de culture ou sur une surface plastique dans une boîte de Petri.

Pour conclure, la différenciation des cellules RPE est essentielle afin de garantir une réponse cellulaire plus comparable à celle de cellules primaires humaines. Cette différenciation est possible à la fois sur insert de culture et sur une surface plastique, mais nécessite un milieu de culture enrichi en nicotinamide. La différenciation sur insert de culture permet néanmoins une meilleure polarisation et donc une étude plus fiable des jonctions serrées ainsi que de la fonction barrière.

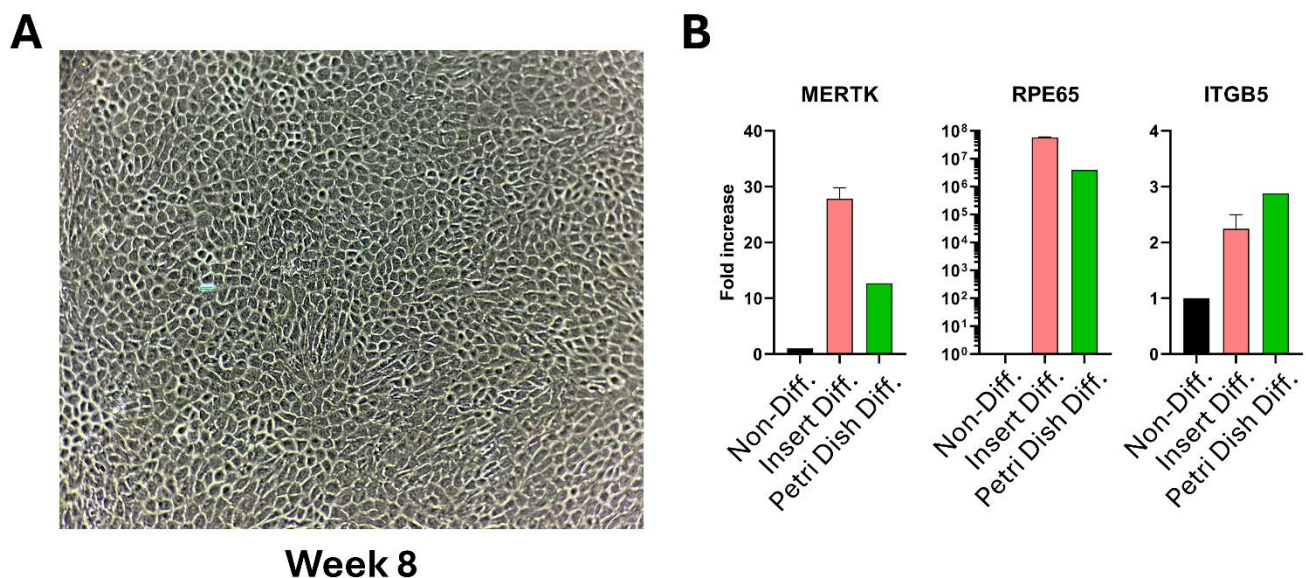


Figure 2 : Protocole de différenciation de la lignée de cellule RPE, ARPE-19. **(A)** Image de microscopie optique avec contraste de phase d'une culture de cellules RPE différenciées durant 8 semaines sur boîte de Petri de 10 mL. **(B)** Résultats de RT-qPCR montrant l'expression des marqueurs de différenciations spécifiques des cellules RPE : *MERTK*, *RPE65* et *ITGB5* chez des cellules non différenciées, différenciées sur insert de culture ou différenciées dans des boîtes de Petri. Le nombre de copie d'ARNm de chaque cible est normalisé par rapport à un gène de ménage : *GAPDH*. Les « folds » sont ensuite calculés par rapport aux cellules RPE non différenciées. Les graphiques représentent la moyenne des « folds » \pm l'écart type avec n=3 échantillons.

Profil cytokinique de cellules rétinienne humaine en réponse à l'infection par *T. gondii* FOU

L'objectif a été de définir le profil cytokinique de cellules rétinienne humaine en réponse à l'infection par différentes souches toxoplasmiques. (Les données des souches RH et Me49 publiées dans Geiller *et al.* 2023 sont présentées avec les données non-publiées de la souche FOU). Parmi les 15 cytokines dosées (IFN- α , IFN- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IFN- λ 1, CXCL10, CCL2, CXCL9 et TNF- α), seulement 4 sont retrouvées dans le surnageant contrôle et sont ensuite augmentées en réponse à l'infection : IL-6, CXCL8, CCL2 et IFN- λ 1 (**Fig. 3**). De manière surprenante, la sécrétion basale en absence d'infection de certaines cytokines et chimiokines pro-inflammatoires est relativement élevée. En effet, les microglies sécrètent environ 1 500 pg/mL d'IL-6 et les astrocytes, RPE et cellules de Müller entre 1 500 et 3 000 pg/mL d'IL-8 et de CCL2. Il est intéressant de souligner, que le seul interféron sécrété est l'interféron de type III IFN- λ 1. En effet, les RPE et les microglies en sécrètent de manière constitutive, mais sa sécrétion est également induite en réponse à l'infection par une souche virulente chez les astrocytes et les cellules de Müller.

L'infection avec une souche virulente de type I RH et FOU augmente de manière conséquente la sécrétion d'IL-6, CXCL8, CCL2 et d'IFN- λ 1. L'infection par une souche moins virulente de type II Me49, en revanche, n'induit la sécrétion d'aucune cytokine, indépendamment du type cellulaire considéré. Il est également intéressant de noter, que l'infection par la souche FOU semble plus pro-inflammatoire, que la souche RH chez les astrocytes et les cellules de Müller. En effet, l'infection induit la sécrétion de quantités plus importantes de CXCL8 et de CCL2 chez les astrocytes, et d'IL-6, d'IFN- λ 1, de CXCL8 et de CCL2 par les cellules de Müller.

Pour conclure, la sécrétion basale et induite lors d'une infection toxoplasmique d'IFN- λ 1 par les cellules rétinienne humaine souligne son importance dans la physiopathologie de la toxoplasmose oculaire ainsi que plus généralement dans l'homéostasie rétinienne. La virulence de la souche infestante semble être corrélée avec la nature et la quantité de cytokines sécrétées. En conséquence, l'infection par une souche virulente va induire le recrutement d'un nombre plus important de monocytes/macrophages (CCL2) ainsi que de neutrophiles (CXCL8). CXCL8 participe également à la perméabilisation de l'endothélium vasculaire, amplifiant ainsi l'infiltration de cellules immunitaires (105). Finalement, IL-6, en combinaison avec les quantités importantes de TGF- β retrouvées dans l'environnement rétinien, va conduire à la polarisation Th17 (106), amplifiant ainsi l'inflammation.

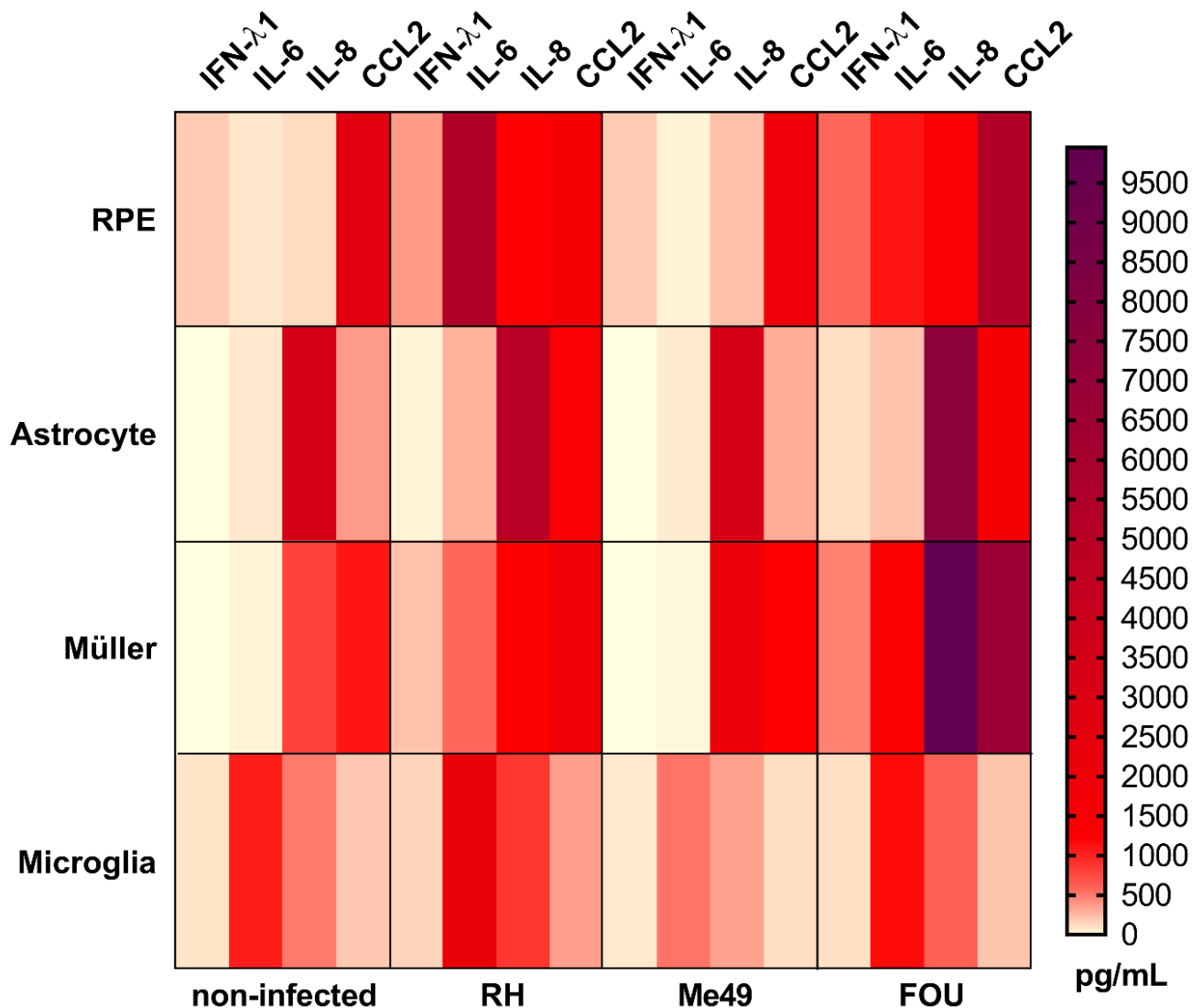


Figure 3 : La réponse cytokinique en réponse à l’infection est évaluée par le dosage multiplex Luminex du surnageant de culture cellulaire. Les conditions évaluées pour chaque types cellulaires (RPE, astrocytes, Müller et microglies) sont : non infectée, infectée avec une souche virulente de type I RH, non virulente de type II Me49, et très virulente de type I FOU. Les cellules sont mises en plaque 24 puits. La figure présente les cytokines en pg/mL variant en réponse à l’infection : IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-29 (IFN-λ1) et MCP-1 (CCL2). n=4 échantillons par condition.

Article II : Interferons and Toxoplasma shape PD-L1 regulation in retinal barrier cells: The critical role of proteases

Article en cours de soumission dans le journal « *Frontiers in Immunology* » section « parasite immunology ».

1.1 Résumé en français article n°2.

L'objectif principal de cette étude était d'examiner les dynamiques d'expression de la protéine de point de contrôle immunitaire PD-L1 (*CD274*) au cours de la toxoplasmose oculaire et de déterminer comment les interférons de type I et III régulent cette expression dans la rétine. PD-L1 joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii*, en particulier en contrôlant les réponses des LT. Les interférons sont connus pour induire l'expression de PD-L1 via le facteur de transcription IRF1, qui se lie au promoteur du gène *CD274*. Nos résultats montrent que les interférons de type I (IFN- β) et de type II (IFN- γ) sont capables d'induire l'expression de l'ARNm de PD-L1. En revanche, l'interféron de type III (IFN- λ 1) ne parvient pas à induire l'expression de PD-L1 au niveau transcriptomique dans les cellules microgliales, astrocytaires, de Müller et les RPE. Cependant, l'IFN- λ 1 augmente significativement la localisation membranaire de PD-L1 dans les cellules de Müller, suggérant l'existence de voies non canoniques dépendantes des interférons pour la régulation de PD-L1.

Les cellules de Müller, ayant la plus haute expression basale de PD-L1 à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine, montrent également la réponse la plus marquée à la stimulation par les interférons, indiquant un rôle important dans la régulation immunitaire rétinienne. Pendant l'infection aiguë ou la réactivation des kystes, *T. gondii* prolifère dans la rétine, affectant divers types de cellules résidentes et infiltrantes. Nous avons étudié l'impact des facteurs solubles induits par cette infection sur la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe). Nous avons tout d'abord constaté que la protéine des jonctions serrées ZO-1 est déstabilisée par le surnageant de coculture infectée. Cependant, contrairement aux attentes, l'expression de PD-L1 est fortement diminuée. Nos données montrent que l'infection, ainsi que les milieux conditionnés par les parasites (surnageant parasite seul), suffisent à réduire l'expression de PD-L1 sur les RPE du modèle de BHRe. Cela indique donc que cet effet dépend d'un facteur parasitaire soluble. L'inhibition des protéases a restauré l'expression de PD-L1, indiquant que des protéases sécrétées / excrétées par *T. gondii* sont responsables de manière directe ou

indirecte de la dégradation de PD-L1 membranaire. Ainsi dévoilant un nouveau mécanisme de régulation immunitaire par *T. gondii*.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'impact de la neutralisation des interférons IFN- β et IFN- λ 2/3 dans un modèle murin de toxoplasmose oculaire sur l'expression de PD-L1, GFAP et CD11b. Nous avons précédemment montré que *Toxoplasma gondii* peut moduler l'expression de PD-L1 et que cette expression est fortement augmentée dans les cellules rétinienne humaines en réponse aux interférons. Au jour 7 après l'infection, l'expression de PD-L1 est fortement augmentée dans les cellules pigmentaires rétinienne (RPE) et les cellules de Müller, confirmant une corrélation entre l'expression de PD-L1 et l'inflammation oculaire. La neutralisation de l'IFN- β a montré un effet notable sur l'expression de PD-L1 aux jours 1 et 3 mais n'affecte pas l'expression pendant l'infection. En revanche, la neutralisation de l'IFN- λ 2/3 a augmenté l'expression de PD-L1 dans les yeux infectés aux jours 1 et 7.

Quant à l'activation gliale, nous avons observé que l'activation des cellules de Müller, marquée par GFAP, est induite par l'infection mais semble revenir à la normale au jour 7. La neutralisation des interférons, en absence d'infection, induit déjà une activation des cellules de Müller. Néanmoins, en présence d'infection, cette activation est réduite, particulièrement avec l'IFN- λ 2/3 au jour 3.

Enfin, l'infection par *T. gondii* entraîne la migration des microglies CD11b⁺ vers la couche des cellules ganglionnaires (GCL). La présence de microglies allongées localisées dans la couche IPL des rétines infectées suggèrent une activation et une migration significative.

En conclusion, nos résultats montrent que la neutralisation des interférons affecte différemment l'expression de PD-L1 et l'activation des cellules de Müller dans le contexte de l'infection par *T. gondii* et que les interférons jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire rétinienne.

1.2 Schéma récapitulatif

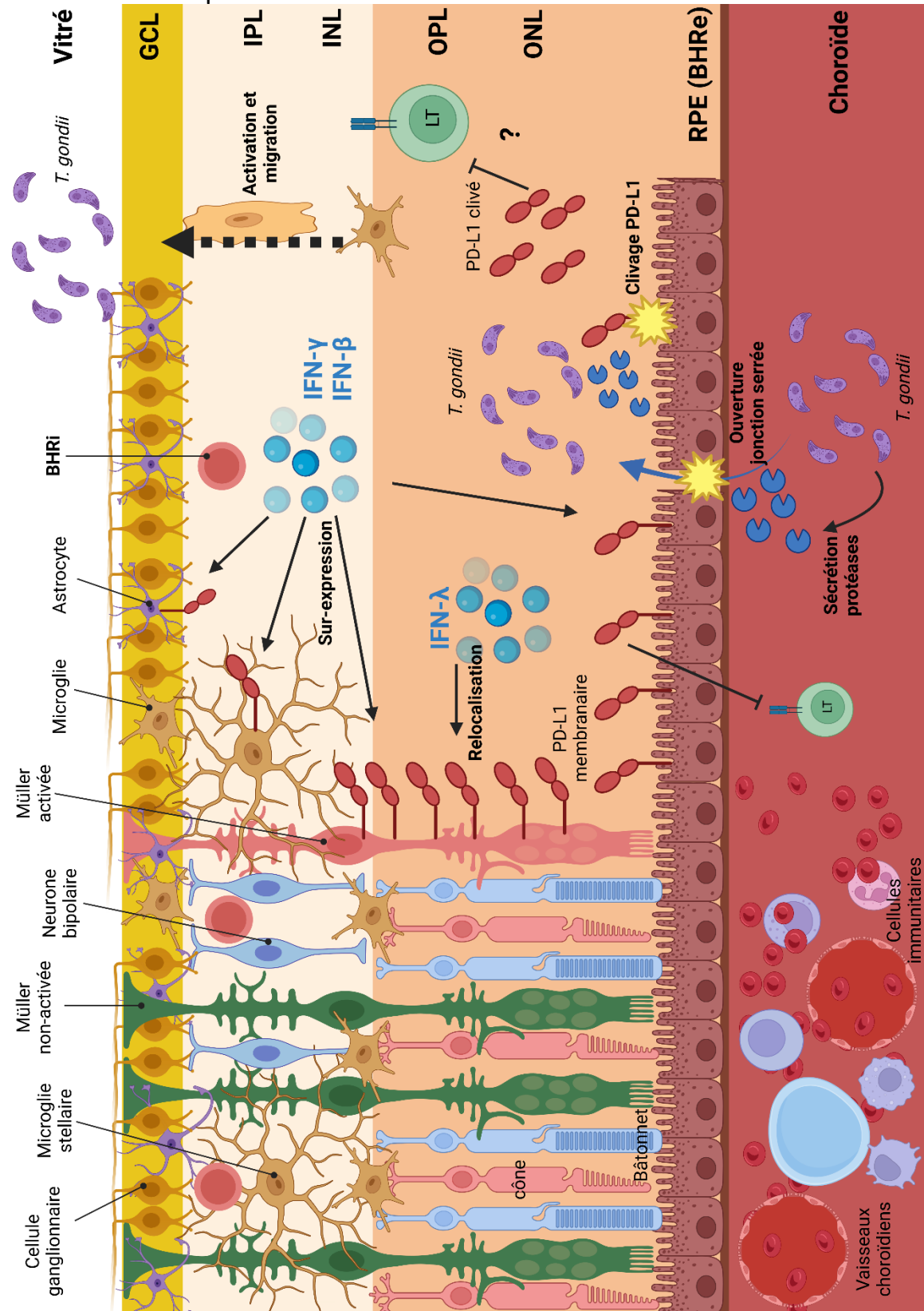


Schéma récapitulatif n°2 : Schéma récapitulatif de l'article de recherche original n°2 Geiller et al. 2024 présentant les principales conclusions et éléments de discussion. (Created with BioRender.com)

Description figure :

Les interférons (IFN) de type I (IFN- β) et de type II (IFN- γ) induisent une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules de Müller, les microglies, les astrocytes et les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne (RPE). En revanche, les IFN de type III (IFN- λ) augmentent uniquement l'apprêtement membranaire de PD-L1 chez les cellules de Müller.

Dans notre modèle *in vitro*, le parasite *Toxoplasma gondii* sécrète des protéases capables de cliver le ligand immunomodulateur PD-L1 et d'ouvrir la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe). PD-L1 interagit avec son récepteur PD-1, exprimé par la lignée lymphoïde, et délivre un signal d'inhibition. Des résultats préliminaires, non présentés dans l'article, suggèrent un potentiel effet de la forme soluble clivée de PD-L1, qui reste à confirmer.

Dans notre modèle *in vivo*, nous avons constaté que l'infection toxoplasmique induit une activation des cellules de Müller (rouge) exprimant fortement PD-L1. L'infection active également les microglies, qui changent de morphologie et migrent de la couche nucléaire interne (INL) vers la couche des cellules ganglionnaires (GCL).

Interferons and *Toxoplasma* shape PD-L1 regulation in retinal barrier cells: The critical role of proteases

Benjamin Geiller¹, Camilla Cevalos¹, Iuliia Tsybenko¹, Lydia Arnoux¹, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl², Alexander W. Pfaff^{1,3}

¹ Institut de parasitologie et de bactériologie UR3073 PHAVI Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

² Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (UPR 3212), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³ Service de Parasitologie et Mycologie Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Introduction

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* establishes chronic infection in the central nervous system, including the retina, causing ocular toxoplasmosis (OT) (1). This persistence relies on a fine balance between inflammatory and immunomodulatory mechanisms, especially in the immune-privileged ocular environment, where immune reactions must be tightly regulated to prevent irreversible damage. A central immunomodulatory receptor on immune cells is PD-1 (Programmed cell death protein 1), which binds to its cognate ligand PD-L1 (CD274) (2). In a mouse model of OT, PD-L1 was shown to be expressed by multiple infiltrating and resident retinal cell types, where it effectively inhibited CD4⁺ T cell proliferation. (3). In this model, PD-L1 upregulation was critically dependent on interferon gamma (IFN- γ), a central mediator of the immune response against *T. gondii* (4). In addition to IFN- γ , which is the sole representative of type II interferons, two other classes of interferon exist: type I interferons, primarily represented by IFN- α and IFN- β , and type III interferons, which include the IFN- λ isotypes (5). The expression of PD-L1 induced by interferons predominantly depends on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF1), an interferon-stimulated gene (ISG) that is specifically upregulated by type I and II interferons (6,7). However, recent studies have shown that PD-L1 expression is enhanced in non-small cell lung cancer cells in response to type III interferons (8), raising questions about the roles of type I and III interferons in regulating PD-L1 expression in retinal cells during OT.

Although the roles of type I and III interferons in *T. gondii* infection have not been fully described, we previously demonstrated that both types enhance the barrier function of the

outer blood-retinal barrier (oBRB) by regulating the tight junction localization of the chaperone protein zonula occludens-1 (ZO-1) (9). However, the impact of the ocular environment during infection on both barrier function and immune regulation remains unclear. This is particularly important, as uncontrolled inflammation can impair oBRB function (10).

In this study, we investigated the mechanisms of PD-L1 regulation in an *in vitro* *T. gondii* infection model using mono- and co-culture systems of human microglia, astrocytes, and Müller cells. We also assessed the effects of PD-L1 expression in an oBRB model composed of differentiated retinal pigmented epithelial (RPE) cells. Additionally, we used a mouse model of OT to assess the roles of type I and type III interferons in glial activation, PD-L1 expression, and microglial activity.

Our results revealed new roles for type I and III interferons in regulating PD-L1 in different retinal cell types during *T. gondii* infection. Furthermore, we identified a parasite protease-dependent mechanism that reduces PD-L1 expression, potentially disrupting immune regulation and promoting a strong local inflammatory response within the retina.

Material and Methods

Cell lines and parasites

Astrocytes U-118MG (ATCC), Müller MOI-M1 (UCLB, UK) and Microglia HMC3 (ATCC) were cultivated in DMEM (Gibco), supplemented with 4.5g/L L-glutamine (Gibco), 10% inactivated FBS (Gibco) and P/S (Hyclone). Human RPE cells (ARPE-19, ATCC) were differentiated according to the protocol described by Hazim *et al.* (11). Briefly, cells were cultivated in T75 flask (Falcon) for two weeks with MEM-Nicotinamide medium: 1% N1 supplement (Invitrogen), 1% inactivated FBS (Gibco), P/S (Hyclone), 0.25mg/mL Taurine (Sigma-Aldrich), Hydrocortisone 20ng/mL (Sigma-Aldrich), Triiodo-thyronine 0.013 ng/mL (Sigma-Aldrich) and 10mM nicotinamide (Sigma Aldrich). After 3 times 10min TrypLE (Gibco) treatment, the remaining cells were placed on 0.4µM PET transwell inserts (Falcon, 353095) in 24-well-plates (Falcon), coated with natural mouse laminin (Invitrogen). Cell medium was changed 3 times per week during 8 weeks before use.

All cell incubations were performed at 37°C and 5% CO₂. The *T. gondii* strains RH and Me49 were obtained from the French Biological Resource Center *Toxoplasma* (CRB *Toxoplasma*; Laboratoire de Parasitologie, CHU Reims, Reims, France). Parasites were maintained by

passages in Vero cells (ATCC) in RPMI 1640 (Gibco) without L-glutamine, 10% inactivated FBS (Gibco), P/S (Hyclone). Before use, parasites were washed three times in cold PBS, filtered through a 5µm filter (Millex: SLSV025LS) and counted by trypan blue exclusion on a KOVA slide.

Mice

Eight-to-twelve-week-old female RjOrl:SWISS mice, purchased from Centre d'Élevage R. Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed at our animal facility (accreditation no E67-482-37) under specific pathogen-free conditions were used in accordance to national and local regulation.

RT-qPCR

5 x 10⁴ astrocytes, microglia, or Müller cells were cultivated for 48 hours until near confluency in 24 well plates (Nunc). For RPE cells, 8-week-differentiated cells were used. Dependent on experimental conditions, cells were treated with 20ng/mL human recombinant IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1 (Peprotech) or infected with a multiplicity of infection (MOI) of 1 parasite for 1 cell (1:1) corresponding to approximately 3 x 10⁵ RH or Me49 *T. gondii* tachyzoites for all cell types. After 24 hours, cells were harvested with Nucleozol (Macherey-Nagel, MN) reagent and total RNA extracted following manufacturer's recommendation. RNA quantification and quality check were performed by measuring the OD at 260/280/230 nm by µdrop with a Varioskan LUX (Thermo Scientific). 10ng of RNA were reverse transcribed to cDNA, using qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quantabio, 733-1174) following manufacturer's recommendation. Then, Real-time PCR specific for PD-L1 (Forward: 5'-TTGCTGAACGCCCCATACAA-3' ; Reverse : 5'-GTAGCCCTCAGCCTGACATC-3') and housekeeping gene GAPDH (Forward : 5'-AGCAATGCCTCCTGACCACCAAC-3' ; Reverse : 5'-CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT-3') mRNA was performed on CFX light cycler and SSoAdvanced SybrGreen (Biorad). Finally, fold changes were calculated using the 2-ΔΔCT method.

Western blot

8 x 10⁵ astrocytes, microglia or Müller cells were plated in 10mL petri dishes (TPP) for 48h. For RPE cells, 8 week differentiated cells were used. Cells were infected with a MOI of 1:1 corresponding to approximately 3 x 10⁶ RH or Me49 *T. gondii* tachyzoites for 24 hours. Subsequently, cells were washed in 1X TBS (Thermo Scientific) and harvested on ice using a cell scraper (Falcon) and RIPA buffer composed of: 25mM Tris HCl pH 7,6 ; 150mM NaCl ; 1% NP-40 ; 1% sodium désoxycholate ; 0.1% SDS ; 0.01% Triton x-100 ; 1 protease/phosphatase inhibitor tab for 10mL (Pierce). Cell lysis and protein extraction were then completed by 1h incubation on ice, followed by 2 rapid freeze/thaw cycles at -80°C.

To perform the biphasic extraction of cytosolic and membrane proteins, the Mem-PER Plus Kit (Thermo Scientific 89842Y) was used following manufacturer's recommendations.

Lysates were then denatured at 100°C for 10 minutes in 2X Laemmli buffer (Biorad) containing 10% β-mercapto-ethanol and proteins separated in a 10% SDS-PAGE at 150V for 1h using an Novex mini gel tank and blot module. Proteins were then transferred on a polyvinylidene difluoride PVDF membrane (Biorad) at 30V for 1h. Wash steps were made using 1X TBS containing 0.05% Tween-20. Membranes were then blocked for 2h with 1X TBS and 5% BSA at room temperature (RT), They were then incubated with mouse@PD-L1 (Invitrogen, 14-5983-82) at 500ng/mL or mouse@β-actin at 50ng/mL (Invitrogen, A5441) antibodies overnight at 4°C. Finally, membranes were incubated 2h at RT with 125ng/mL sheep anti-mouse IgG HRP (GE healthcare, NA931V) secondary antibodies and visualized with clarity western ECL substrate (Biorad) on ChemiDoc MP (Biorad). Band intensities were analyzed using FIJI gel tools.

Immunofluorescence staining of glial and microglia cells

5 x 10⁴ astrocytes, microglia, or Müller cells were cultivated on round borosilicate glass cover slips for 48 hours until near confluency in 24 well plates (Nunc). Dependent on experimental conditions, cells were treated with 20ng/mL human recombinant IFN-β, IFN-γ or IFN-λ1 (Peprotech) or infected with a MOI of 1:1 corresponding to 3 x 10⁵ RH or Me49 *T. gondii* tachyzoites. After 24 hours, cells were first fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 minutes and then permeabilized with PBS + 0.1% Triton X-100 for 10 minutes at RT. Then, cells were incubated for 2h in PBS + 5% BSA at RT, followed by incubation with 5μg/mL Rat@PD-L1 ab (Invitrogen 14-5982-82) overnight at 4°C. Finally, cells were incubated during

1h at RT with 2.5 µg/mL donkey@rat ab linked to AlexaFluor647 (Invitrogen A48272) and 2 min with 1/200 diluted Hoechst33258 (Sigma 94403), before being mounted on microscopy slides with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen). Images were taken with a Zeiss Apotome 3 epifluorescence microscope. Settings were defined at the beginning of each experiment with the first control sample and maintained for all other samples of the same replicate. Image post treatment and measurements were made with FIJI software.

Coculture supernatant

Astrocytes, microglia and Müller cells were cocultured during 48 hours in DMEM (Gibco), 4.5g/L L-glutamine (Gibco), 10% inactivated FBS (Gibco), P/S (Hyclone) at a 1:1:1 ratio with a total amount of 5×10^4 cells per well in 24 well plates (Nunc). Homogeneous plating and correct cell ratio were verified with an inverted brightfield microscope with phase contrast. Cocultures were then infected at a MOI of 1:1 corresponding to approximately 3×10^5 RH or Me49 *T. gondii* tachyzoites for 20 hours. Control cultures were left non-infected. Finally, coculture media were harvested, centrifuged at 5000 x g during 15min at 4°C and supernatants stored at -80°C until use.

Parasite supernatant

10^7 *T. gondii* tachyzoites per well were placed in a 24 well plate (Nunc) in 200µL DMEM (Gibco), 4.5g/L L-glutamine (Gibco), 10% inactivated FBS (Gibco), P/S (Hyclone) for 24 hours. Finally, the culture media was harvested, centrifuged at 5000 x g during 15min at 4°C and supernatants stored at -80°C until use. For some experiments, parasite supernatants were treated with a protease inhibitor cocktail suitable for cell culture (Sigma, P1860-1ML) at 1/200 dilution just before use, as recommended by the manufacturer for effective protease inactivation without toxicity.

Effect of coculture supernatant and parasite supernatant on oBRB model

Differentiated RPE cells were treated with coculture supernatants or parasite supernatants, depending on experimental conditions. Conditioned medium was placed in both the upper transwell compartment (100 µL) and the bottom well (600 µL). For infected conditions, RPE cells were infected with a MOI of 1:1 corresponding to 3×10^5 RH or Me49 *T. gondii* tachyzoites. After 20 hours of incubation, cells were washed three times with 1X PBS, fixed with 4% PFA for 15 minutes and then permeabilized with PBS + 0.1% Triton X-100 for 10 minutes at RT.

Then, cells were incubated for 2h in PBS + 5% BSA at RT followed by an overnight incubation at 4°C with 5µg/mL rat@PD-L1 (Invitrogen 14-5982-82) and 5µg/mL mouse@ZO-1 (Invitrogen 33-9100). Cells were then incubated for 1h at RT with 2.5 µg/mL donkey@rat AlexaFluor647 ab (Invitrogen A48272) and 2.5 µg/mL sheep@mouse AlexaFluor555+ ab (Invitrogen A32727), and finally 2 minutes with 1/200 diluted Hoechst33258 (Sigma 94403). Then, the membranes were cut out using a scalpel before being mounted on microscopy slide with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen). Images were taken with a Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscopy system. Settings were defined at the beginning of each experiment with the first control sample and maintained for all other samples of the same replicate. Image post treatment and measurements were made with FIJI software. The measurement of specific ZO-1 tight junction fluorescence was realized as follows (<https://imagej.net/imaging/segmentation>): First, auto threshold (method=default white) was applied, then the image was converted to mask and copied by the tool “Create selection”. This selection was then restored on the raw image and the mean gray values and area data were gathered. The same protocol was applied to all images.

Mouse infection

Animal experimentation was approved by the local ethics committee (French national authorization number: APAFIS#43895-2023061311453553). Female SWISS mice were purchased by Janvier Labs (Le Genest St Isle, France) and housed in our SPF facility (accreditation number E-67-482-34) until use. Eight-to-twelve-week-old mice were intravitreally injected in both eyes using a 30-gauge needles (BD Microlance) on a 10µL syringe (Hamilton) under isoflurane anesthesia. Depending on experimental condition, the injected 5µL of sterile PBS per eye contained 20ng of mouse IgG1 kappa isotype control P3.6.2.8.1 (Invitrogen 14-4714-82) or mouse IL-28A/B neutralizing antibody (Biotechne, MAB17892-100) or mouse IFN-β neutralizing antibody (Biotechne, MAB8234-100). In infected conditions, 4,000 *T. gondii* Me49 tachyzoites were added to the solution. Three mice per group were euthanized on days 1, 3 and 7 post injection for immunofluorescence applications.

Mouse retina immunofluorescence

Eyes were enucleated and immediately fixed overnight at 4°C in 4% PFA in PBS. Eyes were then washed in PBS and incubated in sucrose gradient in PBS as follows: 2h in 10% sucrose,

overnight at 4°C in 20% sucrose, 2h in 30% sucrose. Then, they were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek), snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Using a cryostat (Leica), 16 µm thick sections were cut, placed on SuperfrostPlus adhesion microscope slides (Epredia, J1800AMNZ) and stored at -20°C.

For immunostaining, cryosections were incubated for 2h in PBS + 5% BSA at RT followed by overnight incubation at 4°C with 1.25 µg/mL rat@PD-L1 (Invitrogen 14-5982-82), 1.25 µg/mL mouse@CD11b (Invitrogen) and 1.25 µg/mL rabbit@GFAP (Invitrogen). Then, sections were incubated for 1h at RT with 1 µg/mL donkey@Rat AlexaFluor647 (Invitrogen A48272), 1 µg/mL sheep@mouse AlexaFluor555+ (Invitrogen A32727) and 1 µg/mL sheep@rabbit AlexaFluor444 (Invitrogen) and 2 minutes with 1/200 diluted Hoechst33258 (Sigma 94403). Finally, coverslips were mounted with Prolong Gold anti-fade reagent (Invitrogen). Images were taken with a Zeiss LSM 800 Airyscan confocal microscopy system. Settings were defined at the beginning of each experiment with the first control sample and maintained for all other samples of the same replicate. Image post treatment and measurements were made with FIJI software.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0. First, normality and equal standard deviation were analyzed by a Shapiro-Wilk test. When sampling followed normal distribution, the appropriate parametric test was performed. Otherwise, the corresponding non-parametric test was performed. If the result is normalized to a control group and only two groups were compared, a parametric one sample t test or corresponding non-parametric Wilcoxon signed-ranked was performed with a theoretical mean of 1. If the values were absolute values and more than two groups were compared, a One-Way ANOVA test with multiple comparison correction was performed. Finally, if only two groups with absolute values were compared, a parametric Student's *t*-test or corresponding non-parametric Mann-Whitney test was performed. For all statistical analyses, *p*-values < 0.05 were considered significant.

Results

Infection increases PD-L1 membrane protein levels in microglial cells, with opposite effects on RPE cells

Although PD-L1 expression has been reported in the context of OT in mice, its expression by human retinal cell types during *T. gondii* infection has not been explored. To address this, we infected human microglia, astrocytes, Müller cells and RPE cells with either the virulent type I *T. gondii* RH strain or the less virulent type II Me49 strain for 24h, and measured PD-L1 mRNA levels by real-time RT-qPCR. Relative expression levels were compared to a non-infected control, with IFN- γ stimulation serving as a positive control due to its well-documented ability to induce PD-L1 expression in various cell types. Our findings reveal that infection with either the RH or Me49 strain did not significantly alter PD-L1 mRNA expression in astrocytes, Müller cells, or RPE cells (**Figure 1A**). In contrast, infection with the RH strain significantly increased PD-L1 mRNA expression in microglial cells, reaching levels comparable to those induced by IFN- γ stimulation. Although Me49 infection also showed a trend toward increased PD-L1 expression in microglia, this effect was not statistically significant. Given the potential post-translational modifications of PD-L1 that affect protein stability and cellular localization, we next examined PD-L1 protein levels and membrane localization. PD-L1 is a highly glycosylated membrane protein, resulting in multiple bands on Western blot ranging from 33 kDa to approximately 55 kDa. Higher molecular weight forms correspond to more glycosylated membrane-associated proteins, while lower molecular weight bands reflect non- or low-glycosylated cytosolic forms (12). To distinguish these forms, we performed differential extraction of membrane and cytosolic proteins. In all cell lines, the 55 kDa form was enriched in the membrane fraction, particularly in RPE, microglia, and Müller cells, where no 55 kDa PD-L1 protein was detected in the cytosolic fraction. In contrast, the 35 kDa form predominated in the cytosolic fraction (**Figure 1B**). Therefore, in subsequent experiments, we considered the 55 kDa form as the active, membrane-localized form of PD-L1.

We then investigated PD-L1 protein expression following infection with *T. gondii* RH and Me49 strains. In all cell types, the higher molecular weight form was consistently the most abundant, indicating predominant membrane localization (**Figure 1C**). In microglial cells, infection with the RH strain significantly increased the intensity of the 55 kDa band. Consistent with the mRNA results, infection with Me49 also slightly increased PD-L1 protein levels, though this

change was not statistically significant (**Figures 1C, 1D**). Infection did not significantly impact PD-L1 protein expression in astrocytes or Müller cells. Interestingly, infection significantly reduced PD-L1 expression in RPE cells (**Figures 1C, 1D**), particularly affecting the higher 55 kDa molecular weight band. Indeed, upon differential extraction of membrane and cytosolic proteins, the 55 kDa PD-L1 form was absent in the membrane fraction following infection (**Figure 1E**).

These results were further confirmed by immunofluorescence microscopy, which showed no apparent changes in PD-L1 localization in astrocytes and Müller cells following infection with either the RH or Me49 strains (**Figure 1F**). This was consistent with the absence of significant changes in mean fluorescence intensity (MFI) measurements (**Figure 1G**). Interestingly, in microglial cells, MFI measurements did not show significant changes following RH infection. This apparent discrepancy, compared to the upregulation observed at the mRNA and protein levels, may be explained by a heterogeneous response of microglial cells to the inflammatory stimulus. Indeed, fluorescence images clearly revealed the presence of both PD-L1^{low} (asterisks) and PD-L1^{high} (arrowheads) microglial cells (**Figure 1F**). Infection with the RH strain increased the number of PD-L1^{high} microglial cells compared to control. This heterogeneity was further confirmed by analyzing the fluorescence standard deviation, which significantly increased in response to infection (**Figure 1H**). This response appeared to be specific to microglia, as other cell types responded uniformly. This effect may be attributed to the presence of a negative paracrine feedback loop regulating PD-L1 expression.

Type I and II, but not type III, interferons enhance PD-L1 mRNA expression in human glial and RPE cells

During the acute phase of *T. gondii* infection, high levels of interferons are secreted, playing a critical role in the immune response. We examined the effects of IFN- β , IFN- γ , and IFN- λ 1 on PD-L1 mRNA expression in human retinal cells by real-time RT-qPCR analysis. Consistent with prior findings, IFN- γ robustly induced PD-L1 mRNA expression across all studied cell types (**Figure 2A**). Type I IFN- β also significantly increased PD-L1 expression to a level comparable to IFN- γ . In contrast, type III IFN- λ 1 had no observable effect on PD-L1 mRNA expression in any cell type. Interestingly, Müller and RPE cells were the most responsive to interferon stimulation compared to microglia and astrocytes. On average, interferons induced a twofold increase in PD-L1 expression in microglia and astrocytes, while Müller and RPE cells exhibited

an approximately fourfold increase. Despite this strong response, RPE cells exhibited the lowest baseline PD-L1 expression compared to the other cell types. Specifically, compared to RPE cells, baseline PD-L1 expression was approximately 4-fold higher in microglia, 6-fold higher in Müller cells, and 2-fold higher in astrocytes (**Figure 2B**).

Interferon-induced mRNA expression also influenced PD-L1 protein level and membrane localization. Fluorescence imaging showed a significant increase in PD-L1 expression in astrocytes, microglia and Müller cells in response to IFN- β , in Müller cells and astrocytes in response to IFN- γ , and exclusively in Müller cells in response to IFN- λ 1 (**Figures 2C, 2D**). In microglial cells, treatment with IFN- γ , which is pro-inflammatory, also not significantly increase MFI but elevate the number of PD-L1^{high} microglial cells, confirming previous observations from RH infection. Interestingly, in astrocytes, and even more prominently in Müller cells, all types of interferons increased PD-L1 membrane localization and distribution. PD-L1 labeling was detected across the entire cell surface and cytoplasmic extensions in stimulated cells, whereas in non-stimulated cells, it was localized around the cell body near the nucleus (**Figure 2C**). Notably, Müller cells were the only cell type responsive to IFN- λ 1 stimulation at the protein level, despite the absence of mRNA induction (**Figure 2A**), suggesting that IFN- λ 1 induces PD-L1 membrane relocalization in Müller cells, but not in microglia and astrocytes. Consistent with their higher PD-L1 mRNA expression, Müller cells exhibited significantly stronger baseline PD-L1 protein labeling compared to astrocytes, which expressed the lowest levels of PD-L1 (**Figure 2E**). Furthermore, Müller cells were the most responsive to interferon treatment, especially IFN- γ , with an average MFI of 8807 arbitrary units (AU), in contrast to astrocytes and microglia, which had average MFIs of 3738 AU and 3410 AU, respectively.

These findings demonstrate that type I and II interferons effectively induce PD-L1 mRNA expression in RPE cells, astrocytes, Müller cells, and microglia. Particularly, Müller cells exhibit the highest PD-L1 expression and responsiveness to interferons and are the only cells showing enhanced MFI by redistribution of PD-L1 to the membrane in response to IFN- λ 1. These results suggest a more substantial role for Müller cells in PD-L1-mediated immune regulation within the retina than previously recognized. In contrast, although RPE cells robustly increased PD-L1 mRNA expression in response to interferons, their baseline PD-L1 mRNA levels remained relatively low compared to other retinal cells...

Excreted parasitic proteases drive PD-L1 degradation in RPE cells of the outer blood-retinal barrier

Local parasitic proliferation in retinal cells during the acute phase of OT may trigger the release of soluble factors that influence retinal barriers, potentially modulating immune cell infiltration and activation. To examine these early stages of infection, we developed a simplified model to explore interactions between retinal glial and microglial cells and used our established oBRB model (9,11) (**Figure 3A**). This oBRB model consisted of 8-week differentiated RPE cells cultured on transwells. To complete this model, astrocytes, microglia, and Müller cells were co-cultured at a 1:1:1 ratio, infected with *T. gondii* RH or Me49 tachyzoites at a 1:1 MOI for 20 hours, and the resulting supernatants applied to the oBRB model for 24 hours. PD-L1 and ZO-1 expression and localization on the oBRB model were then assessed using confocal microscopy. ZO-1 is an intracellular membrane-associated chaperone protein that plays a central role in the stability and regulation of tight junctions.

RPE cells were differentiated using a specific culture media, MEM-Nicotinamide (MEM-Nic), while co-cultures were incubated in DMEM, which has a different composition and higher glucose and serum concentrations. To ensure these differences did not affect PD-L1 or ZO-1 expression, we first confirmed that the transition from MEM-Nic to DMEM had no significant impact on these markers (**Figures 3B, 3D**). Treatment of RPE cells with supernatants from RH-infected co-cultures significantly reduced both PD-L1 and ZO-1 labeling (**Figure 3B**) compared to non-infected controls, as also shown by MFI measurements (**Figure 3D**). Supernatants from Me49-infected co-cultures induced a similar decrease in PD-L1 expression but had no effect on ZO-1 (**Figures 3C, 3D**). Z-stack images and orthogonal views also revealed a clear reduction in PD-L1 apical localization (dashed line) and perinuclear staining, while ZO-1 localization became diffuse (arrowhead) under infected conditions, suggesting ZO-1 membrane delocalization rather than protein degradation (**Figure 3E**). These results demonstrate that soluble factors from *T. gondii*-infected co-cultures significantly reduce PD-L1 expression in the oBRB model, with a similar effect observed for both RH and Me49 strains, indicating a strain-independent response.

As most cytokines would be expected to upregulate PD-L1, we hypothesized that a parasite-derived factor may be responsible for the observed decrease. To test this, we investigated whether *T. gondii* infection directly impacts PD-L1 expression in RPE cells within the oBRB model. RPE cells were infected with RH tachyzoites at 1:10 and 1:1 MOIs corresponding respectively to 30 000 and 300 000 tachyzoites per well. In an additional condition, parasites were suspended in the lower chamber medium without direct contact with the cells. Confocal imaging revealed that at an MOI of 1:1, PD-L1 expression was significantly reduced compared to the 1:10 MOI condition (**Figures 3F, 3G**). Notably, this effect was not dependent on direct contact between parasites and cells, as it was also observed when parasites were only present in the lower chamber (**Figures 3F, 3G**). To further confirm that secreted or excreted parasitic factors alone could reduce PD-L1 expression, we incubated 10^7 *T.gondii* RH or Me49 tachyzoites in DMEM for 24 hours and applied the resulting supernatants to the oBRB model for 20 hours. Confocal microscopy analysis revealed that both *T. gondii* RH and Me49 tachyzoites supernatants decreased PD-L1 expression to a similar extent as infected co-culture supernatants (**Figures 3H, 3I**). We showed above that infection does not impact PD-L1 mRNA expression, suggesting that PD-L1 degradation or redistribution occur rather than changes at the transcriptional level.

Given these findings and previous reports that *T.gondii* secreted/excreted proteases are capable of disrupting tight junctions, facilitating paracellular passage (13), we hypothesized that parasitic proteases might also mediate PD-L1 degradation. To test this, we treated parasite supernatants with a protease inhibitor cocktail prior to incubation of the oBRB model. This treatment neutralized the effect of the supernatants, restoring PD-L1 expression levels, independently of the parasite strain (**Figures 3H, 3I**).

These results confirm that parasite-derived proteases contribute to PD-L1 degradation by cleaving membrane-bound PD-L1 or promoting its internalization and degradation, thereby reducing PD-L1 expression on RPE cells in the oBRB model.

Temporal patterns of PD-L1 expression and Müller cell activation in mouse retinas

In vitro experiments showed that *T. gondii* infection and interferon stimulation significantly modulate PD-L1 expression in retinal cells, with a prominent effect on Müller cells. To translate these findings to an *in vivo* context, we investigated the role of interferons in modulating PD-

L1 expression and immune cell behavior within the retina in our established mouse model of OT. To investigate how type I and III interferon responses shape retinal immune dynamics *in vivo*, we intravitreally treated mice with neutralizing antibodies against IFN- β and IFN- λ 2/3, along with *T. gondii* Me49 tachyzoites. We assessed the effect of infection and IFN- β or IFN- λ 2/3 neutralization on PD-L1, GFAP (glial and activation marker) and CD11b (macrophage and microglial marker) expression in the mouse retina, using confocal microscopy.

Previous work (20) suggested that retinal inflammation peaks at day 7 post-infection. Consistent with these findings, while no major infection effects were evident at days 1 and 3 (when comparing non-infected and infected condition at each day), PD-L1 expression was markedly upregulated by day 7 post-infection (**Figure 4A**). Furthermore, IFN- β neutralization in non-infected retinas enhanced PD-L1 labeling on day 1, as highlighted on the magnified view (**Figure 4B**), and to a lesser extent on day 3. In contrast, IFN- λ 2/3 neutralization increased PD-L1 expression in infected retinas on days 1 and 7, compared to both infected isotype controls and non-infected IFN- λ 2/3-neutralized eyes, as observed in the complete set of images (**Figure 4A**).

In agreement with our *in vitro* findings, PD-L1 expression was more prominent in Müller cells than in RPE cells or astrocytes. Müller cells, as the most abundant macroglial cells in the retina, play a central role in photoreceptor homeostasis and survival. Under homeostasis, GFAP expression was localized at Müller cell endfeet in the ganglion cell layer (GCL), with few fibers extending through the inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL). Activation of Müller cells, typically triggered by stress stimuli, is identifiable by the expression of GFAP in the whole cell length forming fibers extending through all retinal layers. Confocal microscopy showed that infection induced Müller cell activation on days 1 and 3 post-infection, but activation levels appeared to normalize by day 7 (**Figure 4C**). Interestingly, in the absence of infection, IFN- β and IFN- λ 2/3 neutralization already led to Müller cell activation compared to isotype controls (**Figure 4C**), with particularly notable activation on days 1 and 7, as highlighted in this magnified view (**Figure 4D**). In contrast, in infected retinas, neutralization of IFN- β and IFN- λ 2/3 had the opposite effect, reducing infection-induced Müller cell activation. (**Figure 4C**). With IFN- λ 2/3 neutralization, this effect became apparent by day 1, peaked at day 3, and declined by day 7. These findings show that IFN- β and IFN- λ 2/3 are necessary to maintain

Müller cell homeostasis in non-infected retinas. In contrast, Müller cell activation in response to infection is enhanced by IFN- β and IFN- λ 2/3, either directly or indirectly.

Müller cell activation in response to infection was further associated with microglial activation and migration, which displayed elongated CD11b-positive cells within the IPL of infected retinas (arrowheads), as showed by confocal z-stack imaging on day 7 (**Figure 4E**). Microglia located within the IPL normally exhibit highly ramified structures (asterisk) whereas activation under inflammatory conditions induces morphological changes and migration (arrowhead) (**Figure 4F**). While CD11b does not distinguish between microglia and macrophages, cell morphology strongly suggested that these cells were microglia (**Figure 4E, F**).

In summary, we demonstrated that PD-L1 expression peaked at day 7 post-infection at the height of inflammation. According to the localization of PD-L1 labeling, Müller and RPE cells appear mostly responsible for this upregulation. Furthermore, IFN- β and IFN- λ 2/3 play different roles, acting respectively on non-infected and infected retinas across early and later time points. Finally, infection triggers microglial activation and migration together with Müller cell activation, further highlighting their importance during OT.

Discussion

In this study, we aimed to elucidate the dynamics of PD-L1 (CD274) expression during OT and investigate the roles of type I and III interferons in regulating PD-L1 expression in the retina. PD-L1 is critical in maintaining immune privilege, particularly in the retina, where T cell-mediated immunity is essential for controlling *T. gondii* cysts and driving anti-parasitic responses (14). Interferons are potent inducers of PD-L1 expression, primarily due to the IRF1 binding site located on the promoter of the *CD274* gene (15). Consistent with that, our findings demonstrate that type I and II interferons, but not type III, effectively upregulate PD-L1 mRNA expression in retinal cell types such as microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells. This aligns with previous studies showing that IFN- λ does not induce IRF1-dependent chemokines, such as CXCL9 and CXCL10, in similar cell types (9). However, fluorescence microscopy revealed that IFN- λ 1 does upregulate PD-L1 localization at the cell membrane on Müller cells, suggesting the presence of alternative, cell-type-specific pathways that enhance membrane expression without a corresponding increase in transcription. Previous studies showed that PD-L1 is regulated through post-translational modifications, such as poly-glycosylation, which

stabilizes PD-L1 at the membrane, protecting it from endocytosis and subsequent proteasomal degradation (16).

Notably, Müller cells, the most abundant glial cells in the retina, showed the highest baseline PD-L1 expression at both the mRNA and protein levels, responding robustly to interferon stimulation. These findings point to a more prominent immunoregulatory role for Müller cells in the retina than previously recognized. Together with microglia and astrocytes, Müller cells are a major part of the non-neuronal component of the retina and are primarily responsible for maintaining retinal homeostasis and supporting neuronal function. However, this homeostasis is disturbed when *T. gondii* replicates within the retina, infecting diverse cell types, including both resident and infiltrating immune cells (17,18). Under inflammatory conditions, Müller cells actively participate in immune responses, exhibiting antigen-presenting cell (APC) behavior and potentially modulating to local immune environment (19). Microglia, the central nervous system's primary resident immune cells, balance pro- and anti-inflammatory functions during retinal inflammation (20,21), while astrocytes release various inflammatory mediators (10,22). Additionally, astrocytes and Müller cells contribute to the disruption of the inner blood-retinal barrier (iBRB) during various inflammatory conditions (10).

To assess the impact of pro-inflammatory factors released by *T. gondii*-infected microglia, astrocytes, and Müller cells on the outer blood-retinal barrier (oBRB), we hypothesized that cytokines produced during infection could modulate oBRB function and induce PD-L1 expression to dampen immune activation. As expected, exposure of the oBRB to supernatant from infected retinal cell co-cultures destabilized ZO-1, a key tight junction protein, consistent with previous reports (9,13). However, contrary to our expectations, supernatant from infected co-cultures significantly reduced PD-L1 expression on the oBRB. Since most inflammatory and anti-inflammatory cytokines increase PD-L1 expression (16), this finding suggests that *T. gondii* may release soluble factors that specifically suppress PD-L1. Indeed, our data indicate that both active infection and parasite-conditioned media decrease PD-L1 expression in the oBRB model. Recent studies have shown that the *T. gondii* genome encodes 49 distinct metallopeptidases (23) which can disrupt tight junctions in MDCK cells (13). Therefore, we investigated the effect of protease inhibitors on PD-L1 expression and found that protease inhibition partially restores PD-L1 expression at the oBRB. This suggests a novel

protease-dependent mechanism through which *T. gondii* may downregulate PD-L1 to modulate immune responses. The exact nature and origin of this protease remain unclear; it may be secreted directly by the parasite or produced by RPE cells in response to a parasitic factor. The hypothesis of RPE-derived protease secretion is supported by the observation that infection-induced decrease in PD-L1 expression appears to be specific to RPE cells. However, this specificity might also reflect the lower baseline PD-L1 expression in RPE cells, making them more susceptible to downregulation compared to other cell types. It is also worth considering that this effect could result from alternative parasite-driven mechanisms, such as STAT1 inhibition via the *T. gondii* TgIST effector (24,25), or extracellular vesicles carrying long non-coding RNAs (lnc-RNAs) or immune-modulating effectors, as observed in *Plasmodium* and other apicomplexan parasites (26). Since both type I RH and type II Me49 strains similarly reduced PD-L1 membrane localization, the involvement of strain-specific virulence factors such as GRA15 or GRA16 is unlikely (27,28).

Our *in vitro* results suggest a potential immune evasion mechanism in which *T. gondii* downregulates retinal PD-L1 expression. This reduction may exacerbate local inflammation and contribute to BRB disruption, especially in the early stages of infection. In contrast, our *in vivo* mouse model showed upregulation of PD-L1 expression, consistent with the study by Charles *et al.* (3). These contrasting observations highlight the complexity of PD-L1 regulation. A key limitation of our *in vitro* model is the lack of interferons and other cytokines secreted by infiltrating immune cells. This is particularly relevant given that Charles *et al.*, using IFN- γ knockout mice, demonstrated that IFN- γ plays a central role in driving PD-L1 expression, yet they also showed that certain cell populations retained elevated PD-L1 expression in the absence of IFN- γ , suggesting the involvement of additional regulatory pathways. In our *in vitro* experiments, we were able to dissect the complex interplay between interferons and retinal cells and found that both IFN- β and IFN- λ significantly contribute to PD-L1 regulation, particularly in Müller cells, which exhibited the highest levels of PD-L1 expression. These findings underscore the critical role of all three interferon types in regulating retinal PD-L1 expression.

It is important to consider that due to the low parasite load in the mouse retina, secreted proteases likely act more locally or at earlier stages than those assessed in our study. Additionally, differences in PD-L1 degradation between human and murine systems may be

significant and cannot be ruled out. These hypotheses warrant further investigation to better understand the temporal and spatial dynamics of protease activity during infection. Finally, while our study did not specifically focus on MHC expression in Müller cells, recent research underscores their potential role as antigen-presenting cells (APCs), expressing both MHC class I and II molecules alongside co-stimulatory factors (19). This observation is particularly significant, as MHC expression is crucial for the effective interaction of PD-L1 with T cells. A recent study on autoimmune uveitis further reinforced the central role of Müller cells, demonstrating their dual function in recruiting immune cells via chemokine secretion and regulating immune responses through the expression of immunomodulatory ligands and receptors (29), which corroborates our previous findings that Müller cells secrete high levels of chemokines in response to *T. gondii* infection and interferon stimulation (9) and confirm their central role in retinal immune modulation.

Conclusion

Our study provides new insights into the regulation of PD-L1 in retinal cells during OT, highlighting the distinct roles of type I and III interferons in this context. Müller cells emerge as key regulators of retinal immune homeostasis, particularly in their response to interferon signaling. The parasite *T. gondii* downregulates PD-L1 in the oBRB by a protease-dependent mechanism, potentially contributing to immune evasion and inflammation in retinal infection. Further investigations are warranted to fully elucidate retinal immune networks and PD-L1 regulation mechanisms, offering potential targets for therapeutic interventions in OT and other retinal inflammatory diseases.

Acknowledgments

We sincerely thank Lucien Platon and Valentin Greigert for their critical review of this work. Additionally, we extend our thanks to Pascal Kessler for his valuable support with the microscopy platform. Benjamin Geiller was supported by a Berthe Fouassier scholarship of the *Fondation de France*, contract n° 89967.

Références

1. Goh EJH, Putera I, La Distia Nora R, Mahendradas P, Biswas J, Chee SP, et al. Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*. 9 août 2023;31(7):1342-61.
2. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 20 mars 2018;48(3):434-52.
3. Charles E, Joshi S, Ash JD, Fox BA, Farris AD, Bzik DJ, et al. CD4 T-Cell Suppression by Cells from *Toxoplasma gondii*-Infected Retinas Is Mediated by Surface Protein PD-L1. *Infect Immun*. août 2010;78(8):3484-92.
4. Lüder CGK. IFNs in host defence and parasite immune evasion during *Toxoplasma gondii* infections. *Front Immunol*. 7 févr 2024;15:1356216.
5. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. avr 2019;50(4):907-23.
6. Forero A, Ozarkar S, Li H, Lee CH, Hemann EA, Nadsombati MS, et al. Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 17 sept 2019;51(3):451-464.e6.
7. Casazza RL, Lazear HM. Why Is IFN- λ Less Inflammatory? One IRF Decides. *Immunity*. 17 sept 2019;51(3):415-7.
8. Larsen TV, Daugaard TF, Gad HH, Hartmann R, Nielsen AL. PD-L1 and PD-L2 immune checkpoint protein induction by type III interferon in non-small cell lung cancer cells. *Immunobiology*. 1 mai 2023;228(3):152389.
9. Geiller B, Greigert V, Hillenbrand CA, Gommenginger C, Beal L, Brunet J, et al. Type I and III interferons shape the retinal cytokine network and barrier function in an in vitro model of ocular toxoplasmosis. *Front Immunol*. 2023;14:1148037.
10. Ferreira LB, Williams KA, Best G, Haydinger CD, Smith JR. Inflammatory cytokines as mediators of retinal endothelial barrier dysfunction in non-infectious uveitis. *Clin Transl Immunology*. 2023;12(12):e1479.
11. Hazim RA, Volland S, Yen A, Burgess BL, Williams DS. Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide. *Exp Eye Res*. févr 2019;179:18-24.
12. Wang YN, Lee HH, Hsu JL, Yu D, Hung MC. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis. *Journal of Biomedical Science*. 3 juill 2020;27(1):77.
13. Ramírez-Flores CJ, Cruz-Mirón R, Lagunas-Cortés N, Mondragón-Castelán M, Mondragon-Gonzalez R, González-Pozos S, et al. *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitate tachyzoites paracellular migration. *Cellular Microbiology*. 2021;23(3):e13283.

14. Salvioni A, Belloy M, Lebourg A, Bassot E, Cantaloube-Ferrieu V, Vasseur V, et al. Robust Control of a Brain-Persisting Parasite through MHC I Presentation by Infected Neurons. *Cell Rep.* 11 juin 2019;27(11):3254-3268.e8.
15. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation.* avr 2002;9(2):133-45.
16. Cha JH, Chan LC, Li CW, Hsu JL, Hung MC. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell.* 7 nov 2019;76(3):359-70.
17. Song HB, Jung BK, Kim JH, Lee YH, Choi MH, Kim JH. Investigation of tissue cysts in the retina in a mouse model of ocular toxoplasmosis: distribution and interaction with glial cells. *Parasitol Res.* août 2018;117(8):2597-605.
18. Furtado JM, Ashander LM, Mohs K, Chipps TJ, Appukuttan B, Smith JR. *Toxoplasma gondii* migration within and infection of human retina. *PLoS One.* 2013;8(2):e54358.
19. Schmalen A, Lorenz L, Grosche A, Pauly D, Deeg CA, Hauck SM. Proteomic Phenotyping of Stimulated Müller Cells Uncovers Profound Pro-Inflammatory Signaling and Antigen-Presenting Capacity. *Front Pharmacol.* 2021;12:771571.
20. Li H, Li B, Zheng Y. Role of microglia/macrophage polarisation in intraocular diseases (Review). *Int J Mol Med.* mai 2024;53(5):45.
21. Gao W, Jin X, Zhou P, Zhu H, Xie K, Jin B, et al. Relationship between Uveitis and the Differential Reactivity of Retinal Microglia. *Ophthalmic Res.* 2023;66(1):1206-12.
22. Ke Y, Sun D, Jiang G, Kaplan HJ, Shao H. PD-L1(hi) retinal pigment epithelium (RPE) cells elicited by inflammatory cytokines induce regulatory activity in uveitogenic T cells. *J Leukoc Biol.* déc 2010;88(6):1241-9.
23. Escotte-Binet S, Huguenin A, Aubert D, Martin AP, Kaltenbach M, Florent I, et al. Metallopeptidases of *Toxoplasma gondii*: in silico identification and gene expression. *Parasite.* 2018;25:26.
24. Huang Z, Liu H, Nix J, Xu R, Knoverek CR, Bowman GR, et al. The intrinsically disordered protein TgIST from *Toxoplasma gondii* inhibits STAT1 signaling by blocking cofactor recruitment. *Nat Commun.* 13 juill 2022;13(1):4047.
25. Matta SK, Olias P, Huang Z, Wang Q, Park E, Yokoyama WM, et al. *Toxoplasma gondii* effector TgIST blocks type I interferon signaling to promote infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 août 2019;116(35):17480-91.
26. Gioseffi A, Edelmann MJ, Kima PE. Intravacuolar Pathogens Hijack Host Extracellular Vesicle Biogenesis to Secrete Virulence Factors. *Front Immunol.* 2021;12:662944.
27. Guo G, Cui J, Song L, Tang L, Fan S, Shen B, et al. Activation of NF- κ B signaling by the dense granule protein GRA15 of a newly isolated type 1 *Toxoplasma gondii* strain. *Parasites & Vectors.* 29 sept 2022;15(1):347.

28. Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortet P, Barakat M, Kieffer S, et al. Host cell subversion by Toxoplasma GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe*. 17 avr 2013;13(4):489-500.
29. Quinn J, Salman A, Paluch C, Jackson-Wood M, McClements ME, Luo J, et al. Single-cell transcriptomic analysis of retinal immune regulation and blood-retinal barrier function during experimental autoimmune uveitis. *Sci Rep*. 28 août 2024;14(1):20033.

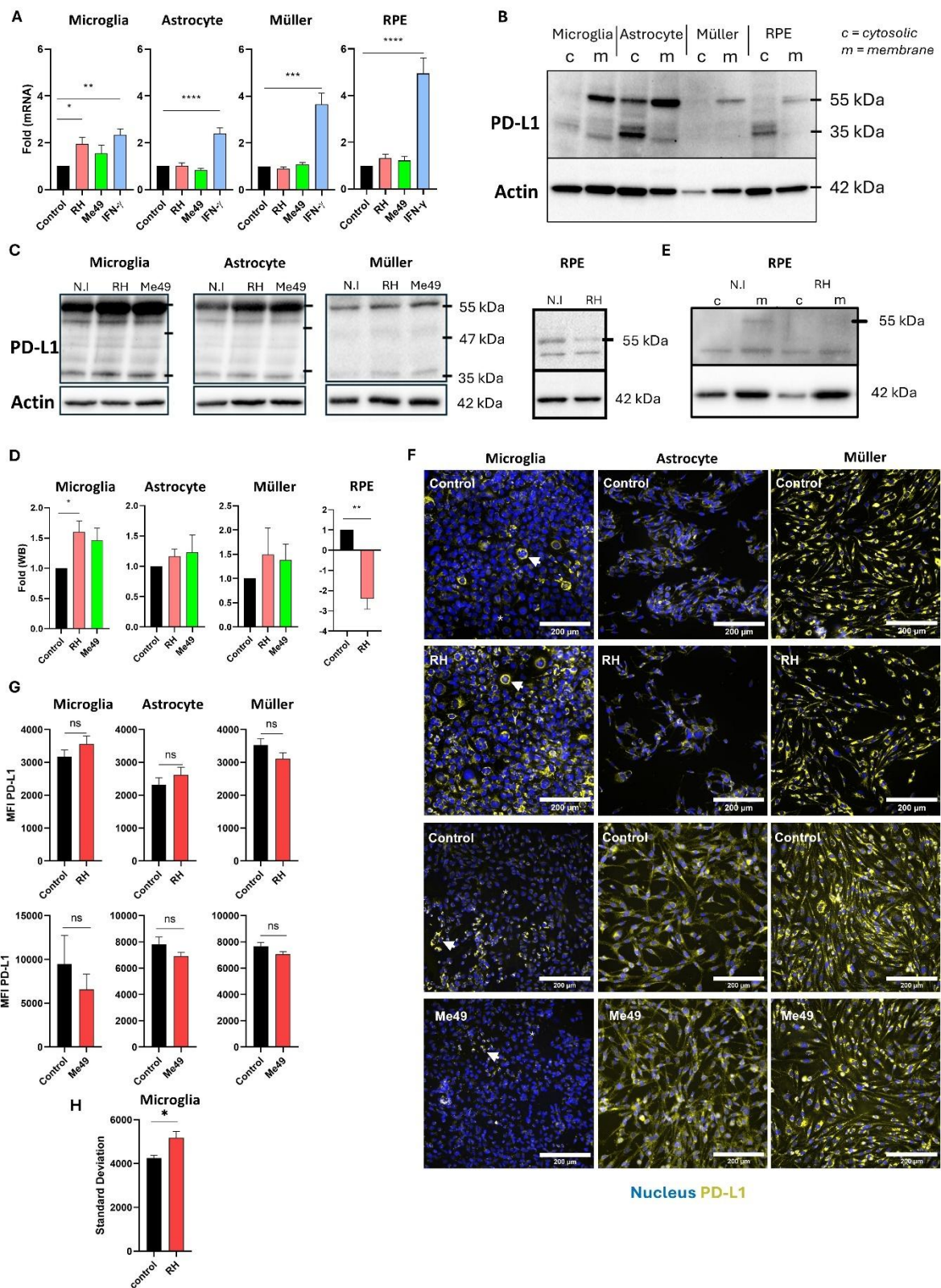


Figure 1 Modulation of PD-L1 mRNA and protein expression by *T. gondii* infecti

(A) Quantitative RT-qPCR analysis of PD-L1 mRNA expression levels in human microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells following infection with *Toxoplasma gondii* RH or Me49 strains, or with 20 ng/mL IFN- γ . Data are presented as mean \pm SEM of fold changes, normalized to the GAPDH housekeeping gene and to non-infected/non-stimulated controls. Results are pooled from three independent experiments, each with three replicates (n=9). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 compared to control. **(B)** Western blot analysis showing PD-L1 and β -actin expression in membrane (m) and cytosolic (c) protein fractions isolated from human microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells. **(C)** Western blot analysis of PD-L1 and β -actin expression in whole-cell lysates from human microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells infected with *T. gondii* RH or Me49 strains (MOI 1:1). **(D)** Quantification of PD-L1 band intensity from western blots, normalized to β -actin and non-infected controls. Data are shown as mean \pm SEM from three independent experiments (n=4). Statistical analysis: one-way ANOVA; *P < 0.05, **P < 0.01 compared to control. **(E)** Western blot analysis of PD-L1 and β -actin in membrane (m) and cytosolic (c) fractions from 8-week differentiated RPE cells infected with *T. gondii* RH. The experiment was repeated three times with consistent results. **(F)** Representative fluorescence microscopy images of PD-L1 expression in human astrocytes, microglia, and Müller cells infected with virulent *T. gondii* RH or less-virulent *T. gondii* Me49 strain (MOI 1:1). PD-L1 is shown in yellow, and nuclei are stained with Hoechst 33342 in blue. Arrowheads indicate PD-L1^{high} microglial cells, while asterisks mark PD-L1^{low} microglial cells. Images represent one of three independent replicates showing similar results. **(G)** Mean fluorescence intensity (MFI) analysis of PD-L1 expression in human microglia, astrocytes, and Müller cells infected with virulent *T. gondii* RH or less-virulent Me49 strain (MOI 1:1). Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments (n=12). Statistical analysis was performed using a T-test; ns = not significant (P > 0.05), *P < 0.05 compared to control. **(H)** Analysis of PD-L1 fluorescence variability (standard deviation) reflecting average variability within each image. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments (n=12). Statistical analysis: one-way ANOVA; *P < 0.05 compared to control.

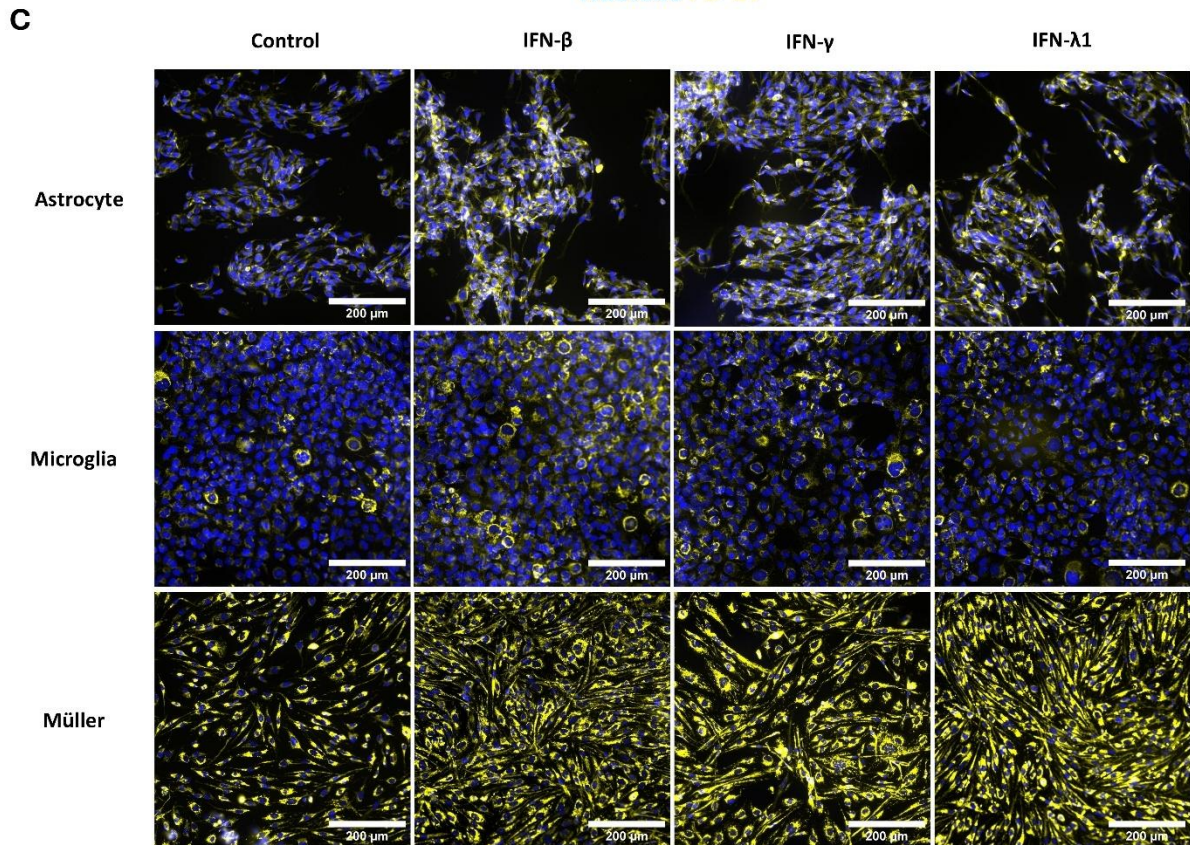
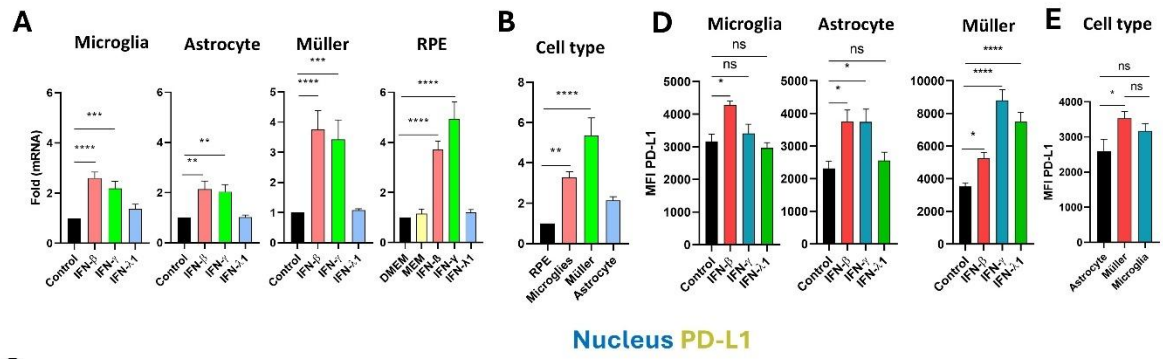


Figure 2 Regulation of PD-L1 in human microglia, astrocytes, Müller, and RPE cells by IFN stimulation.

(A) RT-qPCR analysis of PD-L1 mRNA expression in human microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells following stimulation with 20 ng/mL IFN- β , IFN- γ , or IFN- λ 1. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, each with four replicates (n=12). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 compared to control. **(B)** Baseline PD-L1 mRNA expression in human microglia, astrocytes, Müller cells, and RPE cells measured by RT-qPCR. Results are shown as mean \pm SEM of fold changes normalized to GAPDH and to RPE cells, which exhibited the lowest PD-L1 expression. Statistical analysis: one-way ANOVA; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 compared to RPE cells. **(C)** Representative fluorescence microscopy images of PD-L1 expression in human astrocytes, microglia, and Müller cells following stimulation with 20 ng/mL IFN- β , IFN- γ , or IFN- λ 1. PD-L1 is shown in yellow, nuclei in blue using Hoechst 33342. Images represent one of three independent replicates demonstrating consistent results. **(D)** Mean fluorescence intensity (MFI) analysis of PD-L1 expression in human microglia, astrocytes, and Müller cells following stimulation with 20 ng/mL IFN- β , IFN- γ , or IFN- λ 1. Data are shown as mean \pm SEM from three independent experiments (n=6 for IFN stimulation; n=12 for infection). Statistical analysis: one-way ANOVA; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 compared to control. **(E)** Baseline analysis of PD-L1 MFI in human microglia, astrocytes, and Müller cells. Data are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments (n=6). Statistical analysis: one-way ANOVA; ns = not significant (P > 0.05), *P < 0.05 compared to control.

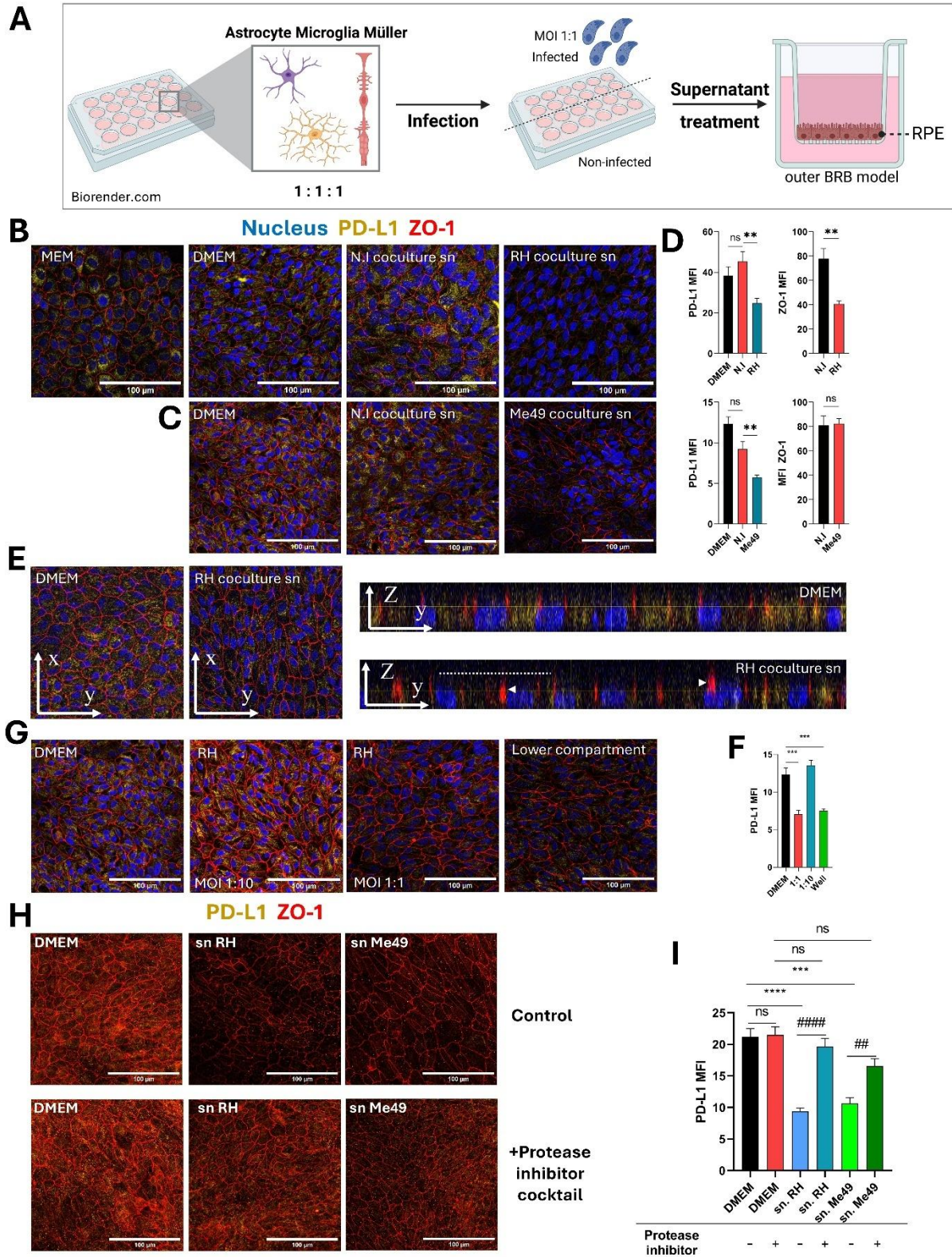


Figure 3 Protease-dependent reduction of PD-L1 expression on the outer blood-retinal barrier model by infected co-culture supernatants.

(A) Schematic diagram of the experimental protocol. Astrocytes, microglia, and Müller cells are co-cultured for 48 hours, followed by infection with *T. gondii* RH or Me49 tachyzoites for 20 hours. Culture media is then centrifuged to remove parasites, and the supernatants are collected. The oBRB (outer blood-retinal barrier) model is treated with these supernatants for 24 hours, after which PD-L1 and ZO-1 expression are analyzed via confocal microscopy. Created with BioRender.com. **(B, C)** Confocal images of the oBRB model illustrating the effects of infected co-culture supernatants on ZO-1 tight junction localization (red) and PD-L1 expression (yellow). Cell nuclei are stained in blue. MEM-Nic is the medium used for RPE cell differentiation, while DMEM is the medium used to produce co-culture supernatants (sn). N.I refers to non-infected co-cultures, and *T. gondii* RH or Me49 denotes infected co-cultures. Images represent one of three independent replicates with similar results. **(D)** Mean fluorescence intensity (MFI) analysis of confocal images, quantifying the effects of infected co-culture supernatants on ZO-1 localization and PD-L1 expression in the oBRB model. Data are presented as mean \pm SEM from a representative experiment (n=12), repeated three times with similar results. Statistical analysis by one-way ANOVA: ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.005$ as indicated on the graphs. **(E)** Confocal Z-stack and orthogonal views of the oBRB model reveal reduced PD-L1 expression and ZO-1 dislocation in response to treatment with infected co-culture supernatants. The dashed line indicates the apical cell side and arrowheads diffuse ZO-1 localization. **(F)** MFI analysis of confocal images quantifying the effects of direct *T. gondii* RH infection on PD-L1 expression in the oBRB model. Data are presented as mean \pm SEM from a representative experiment (n=9), repeated twice with similar results. Statistical analysis by one-way ANOVA: *** $P<0.0005$ as indicated on the graphs. **(G)** Confocal images showing the effects of direct *T. gondii* RH infection on PD-L1 and ZO-1 expression in the oBRB model. Infections were performed with the multiplicity of infection (MOI) indicated in the figure. The "lower compartment" condition represents the placement of 3×10^5 *T. gondii* RH tachyzoites in the bottom compartment of the oBRB model without direct cell contact. Representative images are shown from one of three independent replicates. **(H)** Confocal images showing the effects of supernatants from *T. gondii* RH and Me49-infected co-cultures treated with a protease inhibitor cocktail on PD-L1 and ZO-1 expression in the oBRB model. Representative images are from one of three independent replicates. **(I)** MFI analysis of confocal images illustrating the effects of protease inhibitor-treated *T. gondii* RH and Me49 supernatants on PD-L1 expression in the oBRB model. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments (n=12). Statistical analysis by one-way ANOVA: ns $P>0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared to DMEM control, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared to inhibitor-untreated parasite supernatant.

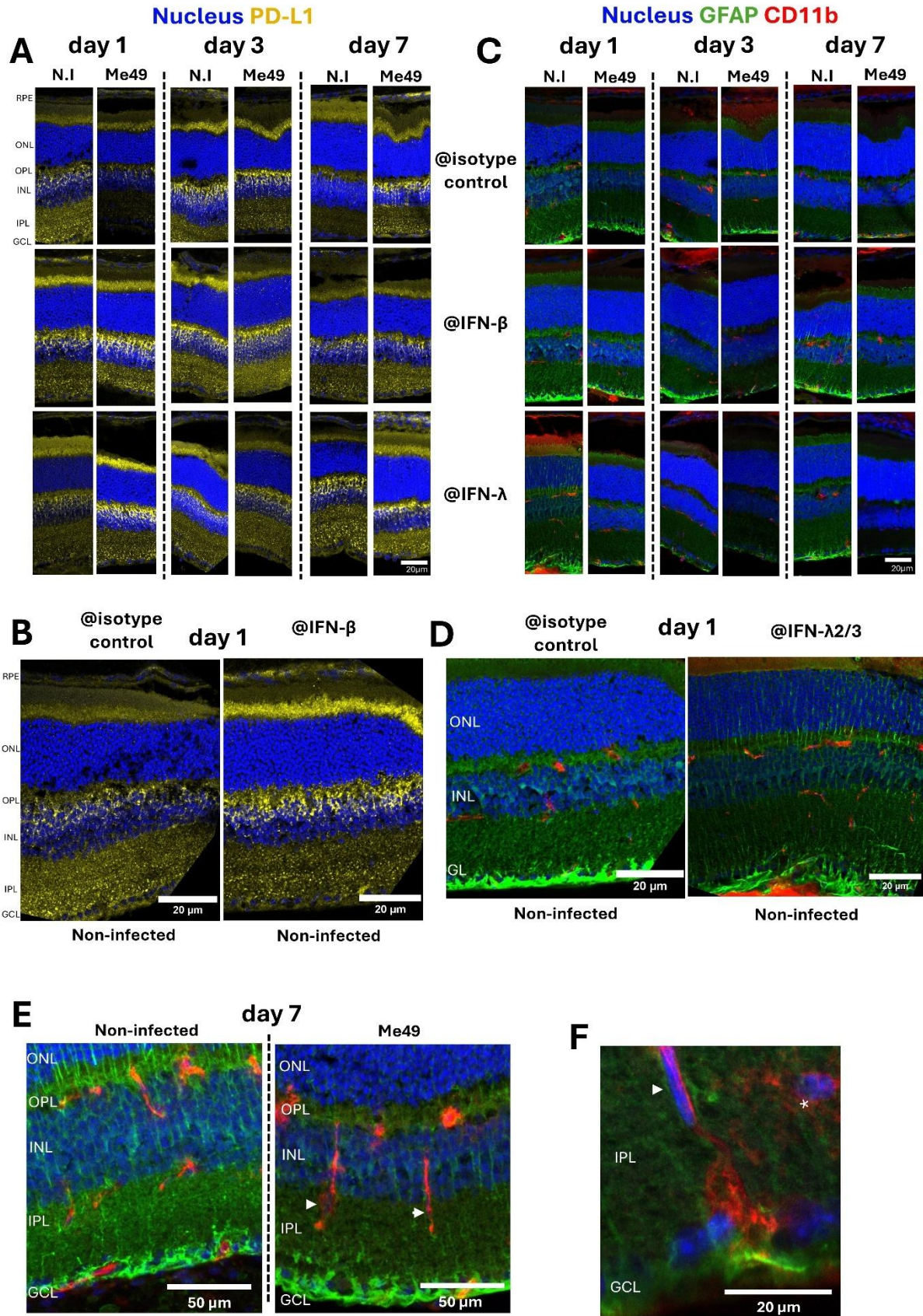


Figure 4 Impact of interferon neutralization on PD-L1 expression, GFAP levels, and CD11b+ cell distribution in a mouse model of ocular toxoplasmosis.

(A) Confocal microscopy images of non-infected or *T. gondii* Me49 infected mouse retina cryosections at 1, 3, and 7 days post-injection of 20 ng of either isotype control, IFN- β , or IFN- λ 2/3 neutralizing antibodies (arranged left to right for time points, top to bottom for antibody types). Retina layers are oriented from top to bottom as follows: RPE, outer nuclear layer (ONL), outer plexus layer (OPL), inner nuclear layer (INL), inner plexus layer (IPL), and ganglion cell layer (GCL). GFAP is labeled as described in green and CD11b in red. Nuclei are stained blue with Hoechst33342. **(B)** Confocal images of non-infected mouse retina cryosections at day 1 post-injection, comparing isotype control (left) and IFN- β (right) neutralizing antibody treatments. Retina layers are oriented and labeled as described. **(C)** Confocal microscopy images of non-infected or *T. gondii* Me49 infected mouse retina cryosections at 1, 3, and 7 days post-injection of 20 ng of either isotype control, IFN- β , or IFN- λ 2/3 neutralizing antibodies (arranged left to right for time points, top to bottom for antibody types). Retina layers are oriented as previously described. GFAP is labeled as described in green and CD11b in red. Nuclei are stained blue with Hoechst33342. **(D)** Confocal images of non-infected mouse retina cryosections at day 1 post-injection, comparing isotype control (left) and IFN- λ 2/3 (right) neutralizing antibody treatments. Retina layers are oriented and labeled as described. **(E)** Confocal Z-stack images of mouse retina cryosections at day 7 post-injection, comparing non-infected and *T. gondii* Me49-infected retinas treated with isotype control antibodies. Retina layers are oriented and labeled as described. **(F)** Confocal Z-stack image of *T. gondii* Me49-infected, isotype control antibody-treated retina sections at day 7 post-injection. Retina layers are oriented and labeled as described.

Données expérimentales non-publiées (article II)

Partie I : Matériels et méthodes

1.1 Évaluation de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ après mise en contact avec des RPE traitées avec du surnageant de parasite

Des cellules RPE différenciées sur insert sont prétraitées pendant 3h avec du surnageant de parasite RH et Me49 (comme décrit dans le draft n°2). Une suspension de 100 000 lymphocytes T CD4⁺ (Jurkat, E6-1) dans du milieu conditionné (surnageant de parasite seul) et contenant : 1 µg/mL d'anticorps @CD3 (Invitrogen 160037685), 1 µg/mL @CD28 (Invitrogen 14028982) est ajoutée dans le compartiment insert et le puits. Ensuite, 20 µL de BrdU (QIA80, Sigma) dilué 1/2000 dans du DMEM est ajouté dans l'insert et le puits. Après 24h, les lymphocytes sont transférés sur une plaque 96 puits (Nunc), centrifugés à 400 x g, puis un dosage colorimétrique ELISA est réalisé suivant les préconisations du fabricant du kit (QIA80, Sigma). La DO est finalement mesurée à 490 nm par le Varioskan LUX de Thermo Scientific.

1.2 Modèle murin d'une toxoplasmose oculaire avec réactivation

Des souris femelles RjOrl : SWISS âgées de huit à douze semaines (R. Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) ont reçu une injection par voie intrapéritonéale avec 100 µL d'une suspension contenant 4 000 tachyzoïtes Me49 de *T. gondii* dans du PBS stérile avec une aiguille gauge 26 (BD Microlance) sur une seringue de 1 mL (BD). Deux mois après l'infection, les souris ont ensuite reçu une injection par voie intravitréenne, dans les deux yeux, à l'aide d'une aiguille 30 gauge (BD Microlance) sur une seringue de 10 µL (Hamilton) sous anesthésie générale à l'isoflurane. Selon les conditions expérimentales, les 5 µL injectés contenaient 4 000 tachyzoïtes Me49 de *T. gondii* ou du PBS stérile. Trois souris par groupe ont été euthanasiées et énucléées aux jours 0, 7 et 14 après l'injection. Les yeux sont ensuite préparés pour l'immunomarquage comme décrit dans le draft de l'article n°2. Accréditation animalerie n° : E67-482-37 ; Autorisation projet n° : APAFIS#9095-2017030109328

Partie II : Résultats

Étude du profil d'expression spatial et temporel de PD-L1 dans un modèle de toxoplasmose oculaire avec réactivation

L'objectif de cette expérience a été d'étudier le profil d'expression spatial et temporel de PD-L1 dans la rétine dans le contexte d'une toxoplasmose oculaire avec réactivation. Contrairement au modèle utilisé dans le draft de Geiller *et al.* 2024, dans ce modèle, les souris sont déjà chroniquement infectées par *T. gondii* lors de la réinfection oculaire (**Fig. 4A**). De précédentes expériences sur des modèles similaires ont déjà montrés que le pic de l'inflammation oculaire se situe 7 jours après la réinfection, puis diminue avant de disparaître environ 14 jours après la réinfection (100). Comme précédemment décrit, au jour 0, et en l'absence de réinfection toxoplasmique, l'expression de PD-L1 est principalement restreinte au corps cellulaire des cellules de Müller avec une modeste expression au niveau de la barrière hémato-rétinienne externe composée par les RPE (**Fig. 4B**). Comme attendu, le pic de l'inflammation 7 jours après la réinfection correspond également au pic d'expression de PD-L1. Cette expression est augmentée de manière significative à la fois au niveau des cellules de Müller et des cellules RPE de la barrière hémato-rétinienne externe (**Fig. 4C**). L'expression au niveau des RPE est augmentée de manière beaucoup plus importante dans le modèle de réinfection comparé au modèle utilisé dans Geiller *et al.* 2024. Cela pourrait s'expliquer par la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire, avec une infiltration plus importante de LT CD4+ Th1 et LT CD8+ sécrétant des quantités plus importante d'IFN- γ , augmentant ainsi grandement l'expression de PD-L1. Cette réponse mémoire va également participer au contrôle rapide et à la résolution de l'inflammation 14 jours après la réinfection, conduisant au retour au taux d'expression basale de PD-L1 (**Fig. 4B, 4C**).

Pour conclure, ce modèle de réactivation confirme donc les résultats du modèle utilisé dans Geiller *et al.* 2024. Il montre également qu'une réinfection semble induire une réponse inflammatoire plus importante, visible par une expression accrue de PD-L1 par les RPE, comparé au modèle de toxoplasmose oculaire sans réinfection.

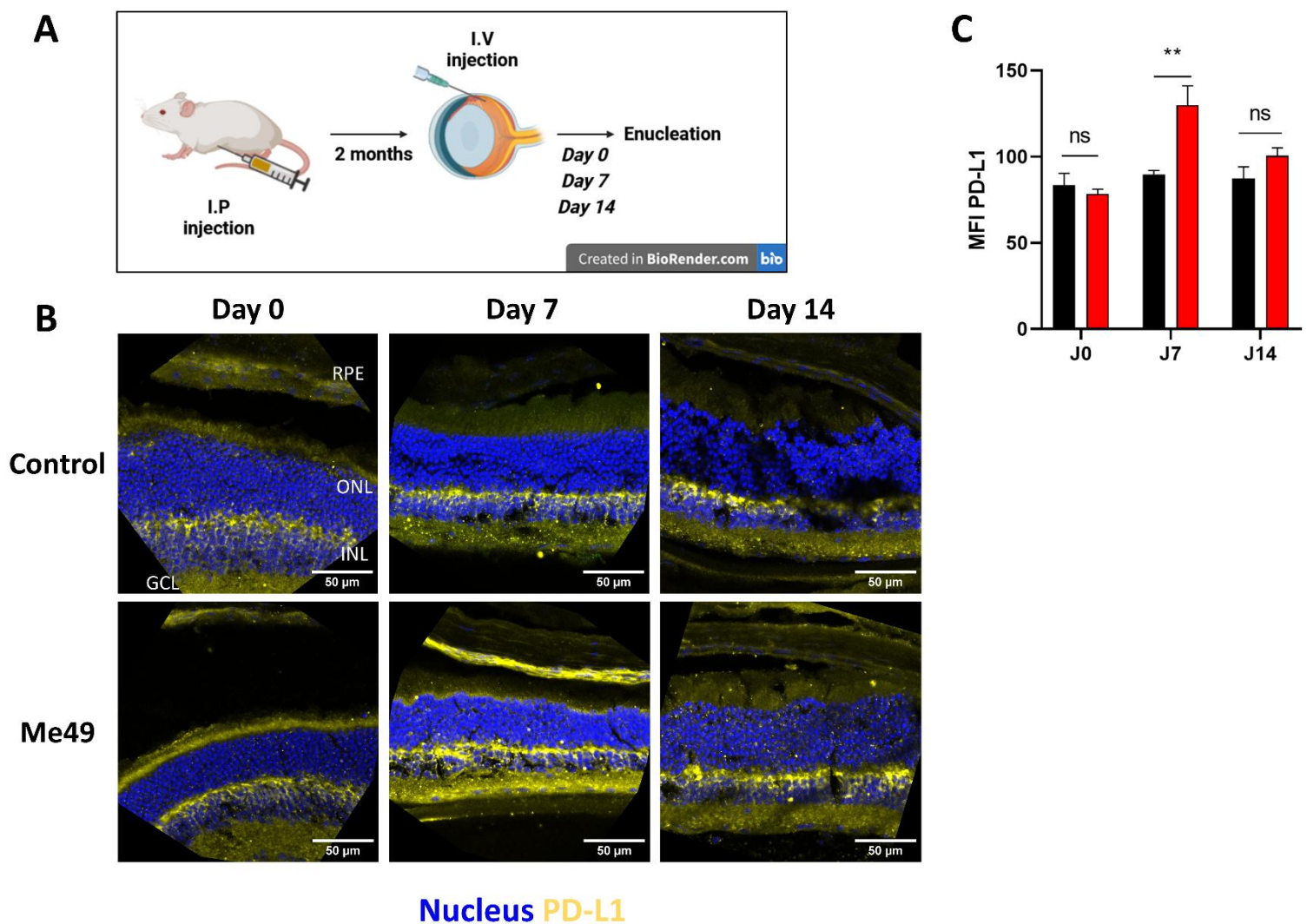


Figure 1 : L'expression de PD-L1 dans la rétine de souris infectées par *T. gondii* à jour 0, 7 et 14 post-réinfection. **(A)** Représentation schématique du modèle expérimental utilisé. Les souris sont d'abord infectées par injection intrapéritonéale (I.P.), puis après 2 mois, réinfectées par injection intravitréenne (I.V.) Créée sur Biorender.com. **(B)** Image de microscopie confocale de cryocoupe de rétine de souris. La protéine PD-L1 est marquée en jaune et le noyau des cellules en bleu avec du Hoechst33258. **(C)** Mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de PD-L1 entre le jour 0 (J0) et le jour 14 (J14). La barre noire correspond à la condition contrôle et la barre rouge à la condition infectée. Le graphique représente la moyenne des MFI \pm l'écart type. Le test statistique réalisé est un ANOVA avec comparaisons multiples ; $p > 0.05$ ns, $p < 0.01$.**

Étude de l'effet immunomodulateur des RPE sur une lignée de lymphocyte T, Jurkat

Même si l'expression basale de PD-L1 par les RPE est plutôt modeste, son expression est grandement augmentée dans la rétine autour du 7^{ème} jour après l'infection, probablement de manière IFN- γ dépendante comme précédemment décrit (77). *Toxoplasma gondii* est néanmoins également capable de sécréter des protéases qui induisent de manière directe ou indirecte la destruction de PD-L1. L'objectif de cette expérience a donc été d'étudier la capacité des RPE à inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+. Pour cela, nous avons dans un premier temps vérifié que notre protocole d'activation permettait d'augmenter la prolifération de notre lignée de lymphocytes T. Nos résultats montrent que le traitement avec des anticorps anti-CD3 et CD28 augmente de manière significative le nombre de cellules (**Fig. 5A, 5B**) ainsi que la prolifération, mesurée par incorporation de BrdU (**Fig. 5C**). Nous avons ensuite mis en contact des LT activés avec des RPE et mesuré la prolifération par l'incorporation de BrdU. Bien que l'activation induise l'augmentation de la prolifération des LT, le contact avec les RPE ne semble pas avoir d'impact sur la prolifération des LT (**Fig. 5D**). Ce résultat se confirme également lorsque l'impact du traitement des RPE par des surnageants de parasite est étudié. En effet, il n'y a aucune différence entre les LT placés dans l'insert (i.) en contact avec les RPE ou sans contact dans le puits (w.) (**Fig. 5E, 5F**). De manière surprenante, les surnageants de parasite semblent néanmoins avoir un effet sur la prolifération des LT activés. En effet, les surnageants de parasites RH et Me49 réduisent significativement la prolifération lymphocytaire (**Fig. 5E**). Si cet effet est directement induit par des facteurs parasitaires contenus dans les surnageants, ou bien de manière indirecte par un facteur soluble produit par les RPE, reste à définir. Un potentiel effet de la forme clivée de PD-L1 devrait également être investigué, même si peu probable, étant donné l'absence d'effet des RPE non traitées sur la prolifération lymphocytaire.

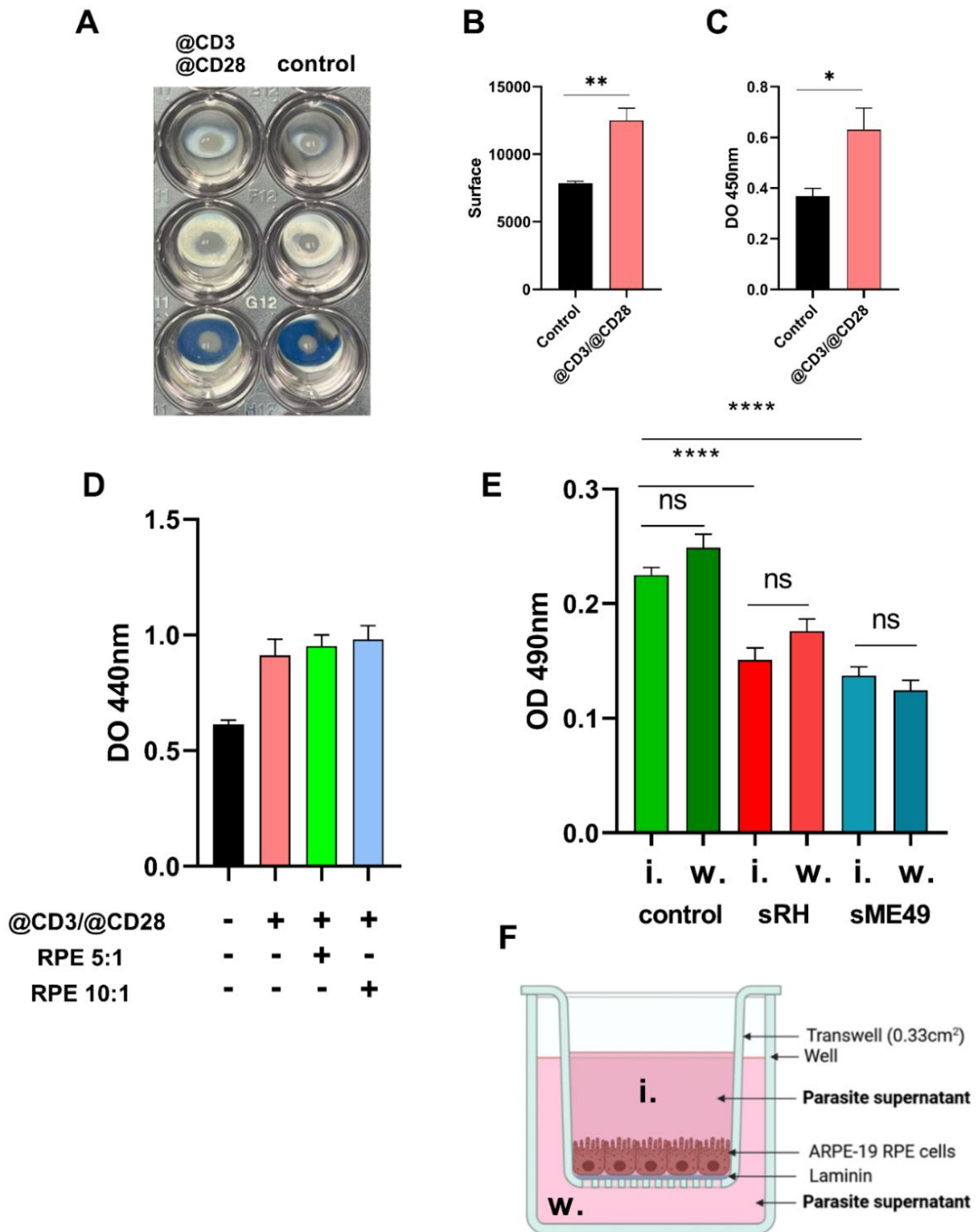


Figure 2 : Étude de l'effet immunomodulateur des RPE sur une lignée de lymphocyte T (Jurkat). Les RPE traitées avec du surnageant de parasite inhibent la prolifération des LT, sans contact nécessaire. **(A)** Image de 50 000 LT cultivés dans du RPMI 1640 complet (contrôle) ou une solution de RPMI 1640 complète contenant des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pendant 24h. **(B)** Mesure de la surface occupée dans le puits par les LT avec et sans activation par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Le graphique représente la surface moyenne \pm l'écart type. Le test statistique réalisé est un t-test avec $\alpha=5\%$; $p<0.01$ **. **(C)** Quantification colorimétrique de la prolifération (BrdU) des LT induite par l'activation avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Le graphique représente la densité optique moyenne (DO) \pm l'écart type. Le test statistique réalisé est un t-test avec $\alpha=5\%$; $p<0.05$ *. **(D)** Quantification colorimétrique de la prolifération (BrdU) des LT après activation (anti-CD3/CD28) et contact avec des RPE différenciées. **(E)** Quantification colorimétrique de la prolifération (BrdU) des LT après mise en contact avec des cellules RPE traitées avec du surnageant de parasite *T. gondii* RH (sRH), Me49 (sMe49) ou contrôle. Comme indiqué dans la représentation schématique **(F)**, "i." signifie insert et "w." signifie puits, correspondant donc au compartiment dans lequel les LT ont été disposés. Créée sur Biorender.com. Le graphique représente la densité optique moyenne (DO) \pm l'écart type. Le test statistique réalisé est une ANOVA avec comparaisons multiples ; $p>0.05$ ns, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ ***, $p<0.0001$ ****

Discussion générale

Cette thèse comprend deux volets principaux, le premier se focalise sur le rôle des interférons de type I et III dans le contrôle de la multiplication parasitaire, le profil de sécrétion cytokinique rétinien ainsi que la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe. Le second se focalise sur l'immunoprivilège oculaire et plus particulièrement sur l'étude de PD-L1 dans le contexte de la toxoplasmose oculaire.

Bien qu'une implication des interférons de type I et III dans le contrôle de la multiplication parasitaire est une piste prometteuse du fait de leurs capacités à induire des effecteurs comme ISG15, étant impliqué dans des mécanismes anti-toxoplasmiques (52). Dans le contexte de la toxoplasmose oculaire chez l'homme, les interférons de type I et III ne semble pas avoir d'effet notable sur la multiplication parasitaire. Cependant, récemment, un preprint montrent que l'IFN- λ 2/3 est capable d'inhiber la multiplication parasitaire dans des cellules intestinales et des neutrophiles de souris, via un mécanisme qui dépend des IRG (107). Chez l'Homme, les cellules intestinales ainsi que les neutrophiles sont décrites comme exprimant la sous-unité spécifique des interférons de type III IFNLR1 de manière très importante (108). Les IRG sont des GTPase qui ne sont cependant pas exprimés chez l'Homme et ne permettant donc pas aux IFN de type III d'agir de cette manière sur la multiplication parasitaire.

Au contraire, les interférons de type III exerceraient plutôt des fonctions anti-inflammatoires en induisant l'expression d'un groupe d'ISG moins inflammatoire, de manière moins intense mais sur une durée bien plus longue que les IFN de type I et II (43,104). Ainsi, permettant le contrôle de pathogène tout en limitant les risques d'une inflammation exacerbée. Cela a également pu être confirmé au cours de notre première étude montrant que seul les IFN de type I et II sont capables d'induire la sécrétion de CXCL9 et de CXCL10 des chémokines permettant entre autres le recrutement de LTh1, LT CD8 et de NK (109). Leurs sécrétions dépendant de IRF1, un facteur de transcription pro-inflammatoire nécessitant une homodimérisation de STAT1 et peut en conséquent uniquement être induit par les IFN de type I et II. L'effet anti-inflammatoire des IFN de type III est également visible lorsque l'on étudie les effets synergiques des interférons sur la multiplication parasitaire. En effet, nos résultats montrent que les interférons de type III sont capables d'inhiber les effets anti-toxoplasmique de l'IFN- γ . Des effets antagonistes similaires entre l'IFN- α et l'IFN- λ 1 sont déjà décrit dans le contexte d'infection virale, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus (110).

DISCUSSION GENERALE

Les interférons de type I et plus particulièrement ceux de type III, en raison de l'expression restreinte de leurs récepteurs principalement au niveau des épithéliums, jouent un rôle central dans les mécanismes de régulation de l'étanchéité des barrières physiologiques. En effet, l'IFN- β et l'IFN- $\lambda 3$ sont capables d'induire une augmentation de la résistance transépithéliale (TEER) sur des cellules endothéliales microvasculaires cérébraux murins. Cette augmentation est indépendante de la voie canonique des interférons, puisque le KO de STAT1^{-/-} n'a pas d'impact (62). Dans notre première étude nous avons montré que les 3 types d'interférons (IFN- β , IFN- γ , IFN- $\lambda 1$) étaient capables d'augmenter l'apprêtement de ZO-1 au niveau des jonctions serrées des RPE. Ainsi, induisant une augmentation de la TEER et une diminution de la diffusion de dextran fluorescent. Cependant, il est important de noter que la TEER basale des RPE ARPE-19 est très modéré, dû à l'absence d'expression des claudine 3 et 19 qui sont des acteurs majeurs dans cette perméabilité ionique (111). Un effet direct sur les protéines claudines est donc très peu probable. Néanmoins, nous avons également pu montrer que les interférons réduisent la perméabilité au dextran fluorescent de 80 kDa, un mécanisme faisant intervenir le « *leak pathway* » qui dépend des protéines occludines (112). De plus, nos images de microscopie confocale montre clairement un marquage plus important de ZO-1 au niveau du pôle apical-latéral cellulaire, sans induire d'augmentation de l'ARNm ZO-1. En conséquence, il est donc plus probable que les interférons agissent directement sur ZO-1, une protéine chaperonne permettant le recrutement des protéines occludines et claudines (113) permettant ainsi d'augmenter l'étanchéité de la BHR. À l'aide d'un inhibiteur, la fludarabine (114), permettant de réduire la quantité de STAT1 ainsi que sa phosphorylation, nous avons pu également confirmer que cet effet ne dépendait pas de la voie canonique des interférons. De nombreuses voies non-canoniques des interférons sont décrites (115), mais le lien entre les interférons et la régulation des jonctions serrées reste encore à définir.

L'hypothèse d'une action directe des interférons sur ZO-1 est également soutenue par nos résultats, montrant que la stimulation par l'IFN- $\lambda 1$ ne permet pas de contrer l'effet de l'infection par *Toxoplasma gondii* sur la délocalisation de ZO-1. En effet, une étude récente montre que le parasite est capable de sécréter/excréter des protéases capables d'entraîner la destruction des protéines transmembranaires de jonction serrée, entraînant ainsi la relocalisation de ZO-1 (116). En conséquence, une augmentation de ZO-1 seule, sans remplacement des protéines claudines ou occludines dégradées par le parasite, n'aurait pas

DISCUSSION GENERALE

d'impact suffisant sur la perméabilité de la barrière. Cependant, il n'est pas à écarter que les interférons pourraient avoir un effet plus tardivement, puisque ZO-1 devrait être en mesure d'induire le recrutement de nouvelles protéines claudines et occludines à la membrane (113), rétablissant ainsi la fonction barrière.

La fonction barrière des RPE est multifactorielle, impliquant des facteurs mécaniques qui permettent d'assurer l'étanchéité entre le compartiment choroïdien et rétinien, mais également des facteurs immunomodulateurs important, qui permettent le contrôle de l'activation et des capacités effectrices des lymphocytes T infiltrantes. De nombreuses études traitent ce sujet, principalement dans le contexte d'uvéite non infectieuse, mais une également dans le cadre de la toxoplasmose oculaire (77,117,118). Ces études ont cependant été réalisées sur des RPE primaires de souris. Nos résultats montrent que le modèle de BHRe humain utilisant des lignées ARPE-19 ne parvient pas à contrôler la prolifération de LT CD4⁺ activés. De précédentes études montrent que l'inhibition des LT par les RPE est principalement dépendante de PD-L1 (117). Même si nos résultats montrent clairement l'expression de PD-L1 par les RPE ARPE-19, cette expression est peut-être insuffisante pour le contrôle des LT. L'expression de PD-L1 par les RPE murins primaires sur nos cryocoupes ne semble cependant pas être beaucoup plus importante que celle du modèle *in vitro*. D'autres facteurs pourraient également être impliqués, nos résultats de cytokinome montrent que les RPE ARPE-19 ne sécrètent pas d'IL-10, une cytokine qui pourrait avoir un effet synergique avec PD-L1 (119).

Malgré tout, nos résultats montrent clairement une inhibition de la prolifération des LT activés lorsqu'ils sont traités avec du surnageant parasitaire et cela sans contact nécessaire avec les RPE. En outre, des résultats préliminaires indiquent que le traitement des lymphocytes avec du surnageant de parasite sans présence de RPE n'a pas d'effet sur la prolifération. Ainsi, suggérant l'action d'un facteur soluble sécrété par les RPE en réponse au traitement avec le surnageant parasitaire et agissant négativement sur la prolifération lymphocytaire.

Des formes non-membranaire de PD-L1 sont décrites dans la littérature, à la surface d'exosomes ou encore sous forme soluble (120), puisque nous avons pu montrer que le surnageant parasitaire induit la déplétion de PD-L1 membranaire d'une manière protéase dépendante. Il est possible que les protéases clivent la forme membranaire de PD-L1 et la libèrent ainsi dans le milieu. L'effet observé est ensuite dû à la forme soluble du ligand, ne nécessitant donc pas de contact direct avec les RPE pour induire un effet inhibiteur.

DISCUSSION GENERALE

Cependant, cette hypothèse n'explique pas l'absence d'effet inhibiteur des RPE non traitées sur les lymphocytes. Cette contradiction pourrait être attribuée au fait que les LT CD4⁺ jurkat ne sont pas restreints au CMH de classe II des RPE ARPE-19 et ne permet donc pas l'établissement d'une synapse immunologique stable et donc d'une interaction PD-1/PD-L1 efficace (121). En effet, l'interaction entre le TCR et le CMH est nécessaire pour l'activation par le lymphocyte de la molécule d'adhésion LFA-1, une intégrine qui va interagir avec ICAM-1 et ainsi stabiliser la synapse (122). Cette problématique n'est pas rencontrée dans les études précédemment réalisées chez la souris étant donné que les LT et les rétines proviennent de souris de même fond génétique et sont donc histocompatibles (77,117,118). Notre modèle expérimental « *in vitro* » ne permet donc malheureusement pas d'étudier précisément les interactions entre lymphocyte T et les cellules RPE de la barrière hémato-rétinienne externe.

Une autre conclusion importante de cette thèse met en lumière le rôle essentiel des cellules de Müller, souvent sous-estimé, dans divers aspects de la physiopathologie de la toxoplasmose oculaire. Nos résultats confirment que les cellules de Müller jouent un rôle central dans la régulation de la réponse inflammatoire, pouvant entraîner des effets neuroprotecteurs ou neurodégénératifs grâce aux mécanismes de gliose (123). En réponse à un stimulus inflammatoire, les cellules de Müller sont capables d'exprimer diverses molécules de costimulation de la famille B7, ainsi que les CMH de classe I et II, devenant ainsi des cellules présentatrices d'antigènes compétentes (124).

Cette capacité est cependant contrebalancée par une expression élevée de PD-L1. Dans notre modèle « *in vitro* », les cellules de Müller humaines présentent le taux d'expression basale de PD-L1 le plus élevé par rapport aux cellules RPE, astrocytes et microglies. En réponse aux interférons de type I et II, ce sont également elles qui montrent la plus forte induction de PD-L1. Ces observations sont confirmées dans notre modèle murin : lors d'une toxoplasmose oculaire, les cellules de Müller sont rapidement activées, ce qui se traduit par une surexpression de GFAP et de PD-L1. Une étude publiée en 2010 a identifié une population de cellules CD45 négatives, exprimant fortement PD-L1 dans les rétines de souris infectées par *T. gondii*, sans toutefois les identifier clairement (77). Nos résultats suggèrent donc, qu'il pourrait s'agir des cellules de Müller. De plus, cette étude révèle que l'IFN- γ est nécessaire, mais insuffisant à lui seul pour induire l'expression de PD-L1 dans la rétine. En accord avec ces données, nos résultats montrent que l'IFN- β et l'IFN- λ 2/3 contribuent également à

DISCUSSION GENERALE

l'expression de PD-L1 par les cellules de Müller. La neutralisation de ces interférons entraîne une réduction significative de l'expression de PD-L1 au jour 7 sur nos cryocoupes de rétine infectée. Ce constat est renforcé par le fait que seules les cellules de Müller induisent une relocalisation membranaire de PD-L1 en réponse à l'IFN- λ 1. Il est également notable que notre première étude ait montré que les cellules de Müller présentent une sécrétion cytokinique basale d'IFN- λ , fortement augmentée, en réponse à l'infection ainsi qu'aux interférons de type I et II.

Conclusions et perspectives

1.1 Principaux résultats

Cette thèse portant sur l'immunoprivilège dans la toxoplasmose oculaire et plus particulièrement le rôle des IFN- β , IFN- λ et de PD-L1 dans la dynamique de cette infection a permis de mettre en lumière plusieurs aspects importants de cette pathologie : la mise en évidence de l'effet des interférons sur la fonction barrière des RPE ; le profil de sécrétion cytokinique de cellules rétiniennes humaines dans le contexte d'une infection toxoplasmique ; la description d'un mécanisme parasitaire protéase dépendant, qui permet la déplétion de PD-L1 ; les cellules de Müller comme acteur central dans l'immunoprivilège rétinien à travers leurs expression importante de PD-L1 ; le rôle des interférons de type I et III dans l'expression de PD-L1 dans la rétine.

Plus généralement, concernant les interférons de type III, ces travaux confirment et élargissent la description de leurs actions dans le contexte de la toxoplasmose oculaire, ainsi que de celui de l'immunoprivilège oculaire. Plus encore, ces travaux décrivent un nouveau mécanisme parasitaire de modulation de la réponse immunitaire de l'hôte, passant par la déplétion protéase dépendante de PD-L1.

1.2 Importance des résultats

Les implications physiopathologiques de l'IFN- γ dans la toxoplasmose oculaire sont étudiées depuis le début des années 70. Bien que les interférons de type I aient également été examinés dans le contexte de la toxoplasmose, peu d'études se sont intéressées à leurs rôles spécifiques en milieu oculaire. Les interférons de type III, découverts plus récemment, sont souvent négligés, probablement en raison de leur apparente redondance avec les interférons de type I. Ces travaux soulignent non seulement le rôle central des interférons de type III dans la régulation de la fonction barrière de la BHRe, mais renforcent également le concept de synergie entre les réponses IFN de type III (IFN- λ), I (IFN- α , β) et II (IFN- γ).

De même, le concept d'immunoprivilège a constamment évolué depuis son apparition au début du 20^{ème} siècle. Des observations faites lors des premières expériences d'allogreffes ont révélé que certains tissus, comme le cerveau ou la chambre antérieure de l'œil, présentent un taux de rejet bien inférieur à d'autres tissus, tels que la peau. Aujourd'hui, de nombreux facteurs participants et régulant ce privilège immunitaire sont décrits dans une grande variété

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

de tissus. Toutefois, les interactions entre cet immunoprivilège et le contrôle de l'infection restent souvent mal comprises. Une seule étude aborde ce sujet dans le contexte de la toxoplasmose oculaire, laissant de nombreuses questions en suspens. Les travaux de cette thèse, centrés principalement sur le ligand PD-L1, ont permis de confirmer le rôle central de l'IFN- γ dans la régulation de l'expression de PD-L1 dans la rétine, tant chez la souris que chez l'Homme. Nos données montrent également que les IFN de type I et III jouent un rôle dans ces mécanismes, en influençant l'expression de PD-L1, à la fois dans un modèle murin de toxoplasmose oculaire et « *in vitro* » sur des lignées cellulaires humaines. De manière surprenante, nos résultats révèlent un rôle jusqu'alors peu connu des cellules de Müller, dans le maintien de la tolérance immunologique oculaire.

Le parasite *Toxoplasma gondii* possède de nombreux effecteurs lui permettant de manipuler la cellule hôte qu'il infecte. Ces effecteurs, issus des rhoptries ou des granules denses, lui permettent entre autres de : contrôler la polarisation de la réponse immunitaire, contrer les mécanismes moléculaires visant la vacuole parasitophore, ou encore induire des phénotypes hyper-migratoires chez les cellules dendritiques et les monocytes. Dans ces travaux, nous avons décrit un nouveau mécanisme dépendant de protéases. Ces protéases pourraient être d'origine parasitaire ou sécrétées par la cellule hôte en réponse à un effecteur parasitaire soluble. Ces données complètent ainsi des études précédentes, montrant que des protéases excrétées d'origine parasitaire, favorisent l'ouverture des jonctions serrées. De plus, nos résultats s'inscrivent dans le cadre de recherches récentes visant à utiliser *Toxoplasma gondii* comme traitement anticancéreux. En effet, une étude récente a démontré que l'infection par une souche parasitaire atténuée ROP17^{-/-} KO réduit significativement la taille du mélanome chez la souris et agit en synergie avec des anticorps neutralisants anti-PD-L1. Ainsi, nos conclusions pourraient avoir une importance majeure dans ce domaine, puisque PD-L1 est un acteur clé dans l'exhaustion de la réponse immunitaire anticancéreuse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1.3 Limites de l'étude

a) Le modèle de barrière hémato-rétinienne externe

Bien que nous utilisions un modèle de barrière hémato-rétinienne externe avec des cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes de la lignée ARPE-19 différenciées, qui présentent un phénotype proche de celui des cellules RPE primaires, ce modèle présente plusieurs limitations. L'absence d'expression des claudines 3 et 19 constitue une limitation majeure pour une étude approfondie de la fonction barrière. Une étude a cependant montré qu'un « *knock-in* » des claudines 3 et 19, sous le contrôle d'un promoteur fort, permet de rétablir une fonction barrière similaire à celle des cellules RPE primaires. Toutefois, ce modèle ne permet pas une étude précise des mécanismes de régulation des jonctions serrées, car leur expression est induite de manière ubiquitaire et artificielle. Pour contourner ce problème, certaines équipes se tournent vers l'utilisation de cellules primaires d'origine murine ou porcine. Bien que des études comparatives aient clairement démontré leur proximité phénotypique avec les cellules RPE humaines, ces modèles semblent inadéquats pour l'étude de la toxoplasmose oculaire ou de l'action des interférons sur la fonction barrière. En effet, certains mécanismes, tels que la présence de protéines IRG ou de TLR11/TLR12 chez la souris, ainsi que des profils d'expression d'interférons ou de leurs récepteurs différents de ceux de l'humain, pourraient grandement influencer les résultats. Ainsi, en raison de l'accès extrêmement restreint au matériel biologique humain, la lignée ARPE-19 représente un compromis valable pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de la toxoplasmose oculaire. De plus, l'absence de claudines dans ce modèle permet également de l'utiliser, par exemple, comme un modèle KO pour l'étude de mécanismes dépendant uniquement des occludines.

b) Modèle murin de toxoplasmose oculaire

Deux modèles murins distincts ont été utilisés pour ces travaux. Le premier modèle **(Geiller *et al.*, 2025, en préparation)** permet de modéliser les premières étapes de l'infection rétinienne par le parasite, juste après son passage à travers la barrière hémato-rétinienne externe (BHRe) ou interne (BHRi). Dans ce modèle, les yeux des souris sont infectés par une injection intravitréenne de tachyzoïtes, ce qui permet de contrôler et d'homogénéiser l'infection oculaire dans l'ensemble des souris. Toutefois, ce modèle ne reproduit pas toutes

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

les étapes d'une infection naturelle humaine, qui commence généralement par l'ingestion de kystes musculaires ou d'oocystes, se différenciant ensuite en tachyzoïtes pour envahir la rétine. De plus, la génération d'oocystes est complexe, nécessitant l'infection de félins et ce modèle ne permet pas d'obtenir des groupes expérimentaux homogènes. En effet, le passage du parasite dans la rétine est très variable et souvent asymptomatique, rendant difficile la distinction entre les souris présentant une infection oculaire et celles qui n'en ont pas. Par ailleurs, ce protocole rendrait impossible l'utilisation de souches toxoplasmiques virulentes, car elles entraîneraient une infection létale chez la souris.

Le second modèle (**Fig. 1, données non-publiées article 2**) inclut une étape supplémentaire : les souris sont d'abord infectées par une injection intrapéritonéale de tachyzoïtes, ce qui permet l'établissement d'une réponse immunitaire mémoire. Ce modèle recrée donc des conditions plus proches de celles observées lors d'une toxoplasmose oculaire chez l'Homme, mais il présente néanmoins des limitations similaires à celles évoquées précédemment.

1.4 Perspectives

Ces travaux ouvrent deux axes de recherche majeurs. Le premier concerne une étude plus approfondie de l'interaction entre PD-L1 et *Toxoplasma gondii*, tandis que le second se focalise sur les interférons de type III et leur rôle dans l'environnement oculaire en conditions saines et pathologiques.

Des mécanismes dépendants de protéases, permettant la régulation de PD-L1 par le parasite, ont été mis en évidence. Cependant, l'origine de ces protéases ainsi que leur nature exacte restent à déterminer. De plus, nos résultats suggèrent que la forme clivée de PD-L1 demeure fonctionnelle et possède une activité biologique.

Les interférons de type III ne sont pas capables d'induire l'expression de PD-L1. Néanmoins, nous avons montré qu'ils peuvent induire son apprêtement et sa relocalisation à la membrane des cellules de Müller. De même, « *in vivo* », dans notre modèle murin, nous avons observé un effet négatif de la neutralisation de l'IFN- λ 2/3 sur l'expression de PD-L1 dans les cellules de Müller. Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas encore connus, ce qui renforce l'idée que les IFN de type III peuvent exercer une action anti-inflammatoire. Cette action immunomodulatrice se manifeste également dans nos expériences étudiant les effets

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

synergiques et antagonistes des IFN sur le contrôle de la multiplication parasitaire. En effet, les IFN de type III réduisent l'effet antiparasitaire de l'IFN- γ , confirmant des données publiées dans des études antérieures.

Ces travaux mettent également en lumière un rôle central, jusqu'à présent insoupçonné, des cellules de Müller dans l'immunoprivilège oculaire, ouvrant ainsi une nouvelle piste de recherche pour comprendre les mécanismes sous-jacents permettant la régulation du phénotype pro- ou anti-inflammatoire des cellules de Müller.

Enfin, la dernière partie de ma thèse a été consacrée à la réalisation d'un séquençage d'ARNm de rétine murine, au cours duquel nous avons étudié l'impact de la neutralisation des interférons de type I et III lors d'une toxoplasmose oculaire. Cette expérience a permis de mettre en évidence plus de 300 gènes différenciellement exprimés, principalement dans la comparaison entre les conditions infectées et non infectées.

Parmi ces gènes, nous avons effectué une première sélection afin d'étudier leur expression en réponse à l'infection par diverses souches parasitaires dans nos modèles humains *in vitro*. L'objectif de laboratoire sera de se concentrer sur les cellules de Müller, qui semblent, d'après les résultats présentés dans ce travail, jouer un rôle particulièrement important dans la physiopathologie de la toxoplasmose oculaire.

Les résultats de ce séquençage ARN (RNAseq) constitueront donc une base solide pour l'élaboration de nouveaux travaux dans l'équipe, visant à identifier de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la toxoplasmose oculaire.

Références

1. On a Leishman body infection (or related organisms) of the gondi. *International Journal for Parasitology*. 1 juill 2009;39(8):863-4.
2. Arisue N, Hashimoto T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*. 1 juin 2015;64(3):254-9.
3. Dos Santos Pacheco N, Tosetti N, Koreny L, Waller RF, Soldati-Favre D. Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. *Trends in Parasitology*. 1 août 2020;36(8):688-704.
4. Dubremetz JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*. 2007;9(4):841-8.
5. Griffith MB, Pearce CS, Heaslip AT. Dense granule biogenesis, secretion and function in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*. nov 2022;69(6):e12904.
6. Martorelli Di Genova B, Wilson SK, Dubey JP, Knoll LJ. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. Striepen B, éditeur. *PLoS Biol*. 20 août 2019;17(8):e3000364.
7. Lüder CGK, Rahman T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. *Microb Cell*. 22 juin 2017;4(7):203-11.
8. Mayoral J, Shamamian P, Weiss LM. In Vitro Characterization of Protein Effector Export in the Bradyzoite Stage of *Toxoplasma gondii*. *mBio*. 10 mars 2020;11(2):e00046-20.
9. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. avr 2012;25(2):264-96.
10. CNR Toxoplasmose » Surveillance de la Toxoplasmose. Disponible sur: https://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=246
11. Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire. Disponible sur: http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2015/15-16/2015_15-16_5.html
12. Robinson E, de Valk H, Villena I, Le Strat Y, Tourdjman M. National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: impact for screening policy. *Euro Surveill*. févr 2021;26(5):1900710.
13. Bellali H, Pelloux H, Villena I, Fricker-Hidalgo H, Le Strat Y, Goulet V. Prevalence of toxoplasmosis in France in 1998: is there a difference between men and women? At what age do children become infected? *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2013 Aug;61(4):311-7.
14. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. oct 2009;39(12):1385-94.
15. Fortin O, Mulkey SB. Neurodevelopmental outcomes in congenital and perinatal infections. *Curr Opin Infect Dis*. 1 oct 2023;36(5):405-13.

16. CNR Toxoplasmose - Centre National de Référence sur la Toxoplasmose – CHU de Reims. Disponible sur: <https://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/>
17. Daher D, Shaghlil A, Sobh E, Hamie M, Hassan ME, Moumneh MB, et al. Comprehensive Overview of *Toxoplasma gondii*-Induced and Associated Diseases. *Pathogens*. 20 oct 2021;10(11):1351.
18. Porte R, Belloy M, Audibert A, Bassot E, Aïda A, Alis M, et al. Protective function and differentiation cues of brain-resident CD8+ T cells during surveillance of latent *Toxoplasma gondii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 juin 2024;121(24):e2403054121.
19. Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol*. déc 2008;146(6):851-5.
20. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment: . Part I: epidemiology and course of disease. *American Journal of Ophthalmology*. 1 déc 2003;136(6):973-88.
21. Goh EJH, Putera I, La Distia Nora R, Mahendradas P, Biswas J, Chee SP, et al. Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*. 9 août 2023;31(7):1342-61.
22. Kodjikian L, Wallon M, Fleury J, Denis P, Binquet C, Peyron F, et al. Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. janv 2006;244(1):14-21.
23. Song HB, Jung BK, Kim JH, Lee YH, Choi MH, Kim JH. Investigation of tissue cysts in the retina in a mouse model of ocular toxoplasmosis: distribution and interaction with glial cells. *Parasitol Res*. août 2018;117(8):2597-605.
24. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. déc 1995;172(6):1561-6.
25. Melo MB, Jensen KDC, Saeij JPJ. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol*. nov 2011;27(11):487-95.
26. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 avr 2012;109(15):5844-9.
27. Galal L, Ariey F, Gouilh MA, Dardé ML, Hamidović A, Letourneur F, et al. A unique *Toxoplasma gondii* haplotype accompanied the global expansion of cats. *Nat Commun*. 1 oct 2022;13(1):5778.
28. Hassan MA, Olijnik AA, Frickel EM, Saeij JP. Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *International Journal for Parasitology*. 1 janv 2019;49(1):63-70.
29. Fernández-Escobar M, Schares G, Maksimov P, Joeres M, Ortega-Mora LM, Calero-Bernal R. *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. *Front Cell Infect Microbiol*. 23 mars 2022;12:842595.
30. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 22 janv 2003;85(2):85-95.

31. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.
32. Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, et al. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe*. 14 févr 2008;3(2):77-87.
33. Edwards AD, Diebold SS, Slack EMC, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol*. avr 2003;33(4):827-33.
34. Wang Y, Hollingsworth LR, Sangaré LO, Paredes-Santos TC, Krishnamurthy S, Penn BH, et al. Host E3 ubiquitin ligase ITCH mediates Toxoplasma gondii effector GRA35-triggered NLRP1 inflammasome activation and cell-autonomous immunity. *mBio*. 13 mars 2024;15(3):e0330223.
35. Safronova A, Araujo A, Camanzo ET, Moon TJ, Elliott MR, Beiting DP, et al. Alarmin S100A11 initiates a chemokine response to the human pathogen Toxoplasma gondii. *Nat Immunol*. janv 2019;20(1):64-72.
36. Orchanian SB, Still K, Harris TH, Lodoen MB. Deficiency in astrocyte CCL2 production reduces neuroimmune control of Toxoplasma gondii infection. *PLoS Pathog*. janv 2024;20(1):e1011710.
37. Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. juill 1994;62(7):2818-24.
38. Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, et al. TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 juin 2013;110(26):10711-6.
39. Isaacs A, Lindenmann J, Andrewes CH. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. janv 1997;147(927):258-67.
40. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol*. 29 sept 2019;6(1):567-84.
41. Fox BA, Sheppard PO, O'Hara PJ. The Role of Genomic Data in the Discovery, Annotation and Evolutionary Interpretation of the Interferon-Lambda Family. *PLOS ONE*. 20 mars 2009;4(3):e4933.
42. Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol*. oct 2019;19(10):614-25.
43. Forero A, Ozarkar S, Li H, Lee CH, Hemann EA, Nadsombati MS, et al. Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 17 sept 2019;51(3):451-464.e6.
44. Casazza RL, Lazear HM. Why Is IFN- λ Less Inflammatory? One IRF Decides. *Immunity*. 17 sept 2019;51(3):415-7.
45. Blumer T, Coto-Llerena M, Duong FHT, Heim MH. SOCS1 is an inducible negative regulator of interferon λ (IFN- λ)-induced gene expression in vivo. *J Biol Chem*. 27 oct 2017;292(43):17928-38.

46. Wheelock EF. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*. 16 juill 1965;149(3681):310-1.
47. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1 sept 1983;158(3):670-89.
48. Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, et al. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*. 9 déc 1993;366(6455):580-3.
49. Lüder CGK. IFNs in host defence and parasite immune evasion during *Toxoplasma gondii* infections. *Front Immunol*. 7 févr 2024;15:1356216.
50. Fujiwara Y, Kato S, Nesline MK, Conroy JM, DePietro P, Pabla S, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors and cancer immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*. nov 2022;110:102461.
51. Omar M, Abdelal HO. Nitric oxide in parasitic infections: a friend or foe? *J Parasit Dis*. déc 2022;46(4):1147-63.
52. Bhushan J, Radke JB, Perng YC, McCallister M, Lenschow DJ, Virgin HW, et al. ISG15 Connects Autophagy and IFN- γ -Dependent Control of *Toxoplasma gondii* Infection in Human Cells. *mBio*. 6 oct 2020;11(5).
53. Orellana MA, Suzuki Y, Araujo F, Remington JS. Role of beta interferon in resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. sept 1991;59(9):3287-90.
54. Murray HW, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca MJ, Granger AM, Libby DM, et al. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun*. mars 1989;57(3):845-9.
55. Cf N, Tj P, Me W, Er S, E P, Hg R, et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. *The Journal of experimental medicine* [Internet]. 8 janv 1984 [cité 5 mars 2024];160(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6206183/>
56. Wilson CB, Westall J. Activation of neonatal and adult human macrophages by alpha, beta, and gamma interferons. *Infect Immun*. août 1985;49(2):351-6.
57. Schmitz JL, Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. oct 1989;57(10):3254-6.
58. Dai W, Gupta SL. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem*. 15 nov 1990;265(32):19871-7.
59. Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*. oct 1996;64(10):4188-96.
60. Lin JD, Feng N, Sen A, Balan M, Tseng HC, McElrath C, et al. Distinct Roles of Type I and Type III Interferons in Intestinal Immunity to Homologous and Heterologous Rotavirus Infections. *PLoS Pathog*. avr 2016;12(4):e1005600.

61. Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, Staeheli P, Hartmann R, Jensen UB, et al. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol.* 15 févr 2008;180(4):2474-85.
62. Lazear HM, Daniels BP, Pinto AK, Huang AC, Vick SC, Doyle SE, et al. Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Sci Transl Med.* 22 avr 2015;7(284):284ra59.
63. Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jap Med World.* 1921;14-5.
64. Medawar PB. Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br J Exp Pathol.* févr 1948;29(1):58-69.
65. Medawar PB. Immunological Tolerance. *Nature.* janv 1961;189(4758):14-7.
66. Mölzer C, Heissigerova J, Wilson HM, Kuffova L, Forrester JV. Immune Privilege: The Microbiome and Uveitis. *Front Immunol.* 2020;11:608377.
67. Teixeira L, Dubielzig RR. Chapter 53 - Eye. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, éditeurs. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition).* Boston: Academic Press; 2013. p. 2095-185.
68. Lynn KS, Peterson RJ, Koval M. Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1 sept 2020;1862(9):183339.
69. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1 mars 2016;51:1-40.
70. Thion MS, Garel S. Microglial ontogeny, diversity and neurodevelopmental functions. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1 déc 2020;65:186-94.
71. Gao W, Jin X, Zhou P, Zhu H, Xie K, Jin B, et al. Relationship between Uveitis and the Differential Reactivity of Retinal Microglia. *Ophthalmic Res.* 2023;66(1):1206-12.
72. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia Development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
73. Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, et al. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J Immunol.* 1 déc 2008;181(11):7525-36.
74. Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA. Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol.* 1 oct 1986;137(7):2232-6.
75. Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM. The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides.* 1996;17(4):675-9.
76. Lyons RE, Anthony JP, Ferguson DJ, Byrne N, Alexander J, Roberts F, et al. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and

- transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6. *Infect Immun.* avr 2001;69(4):2589-95.
77. Charles E, Joshi S, Ash JD, Fox BA, Farris AD, Bzik DJ, et al. CD4 T-cell suppression by cells from *Toxoplasma gondii*-infected retinas is mediated by surface protein PD-L1. *Infect Immun.* 2010;78(8):3484-92.
 78. Ciesielska-Figlon K, Lisowska KA. The Role of the CD28 Family Receptors in T-Cell Immunomodulation. *Int J Mol Sci.* 20 janv 2024;25(2):1274.
 79. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity.* 17 mai 2016;44(5):955-72.
 80. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887-95.
 81. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation.* avr 2002;9(2):133-45.
 82. Larsen TV, Daugaard TF, Gad HH, Hartmann R, Nielsen AL. PD-L1 and PD-L2 immune checkpoint protein induction by type III interferon in non-small cell lung cancer cells. *Immunobiology.* 1 mai 2023;228(3):152389.
 83. Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mai 2011;108(22):9196-201.
 84. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. PD-1-mediated attrition of polyfunctional memory CD8+ T cells in chronic toxoplasma infection. *J Infect Dis.* 1 juill 2012;206(1):125-34.
 85. Xiao J, Li Y, Yolken RH, Viscidi RP. PD-1 immune checkpoint blockade promotes brain leukocyte infiltration and diminishes cyst burden in a mouse model of *Toxoplasma* infection. *J Neuroimmunol.* 15 juin 2018;319:55-62.
 86. Jenkins E, Whitehead T, Fellermeier M, Davis SJ, Sharma S. The current state and future of T-cell exhaustion research. *Oxf Open Immunol.* 2023;4(1):iqad006.
 87. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* avr 1993;362(6422):758-61.
 88. McLane LM, Ngiew SF, Chen Z, Attanasio J, Manne S, Ruthel G, et al. Role of nuclear localization in the regulation and function of T-bet and Eomes in exhausted CD8 T cells. *Cell Rep.* 11 mai 2021;35(6):109120.
 89. Martinez GJ, Pereira RM, Äijö T, Kim EY, Marangoni F, Pipkin ME, et al. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8+ T cells. *Immunity.* 17 févr 2015;42(2):265-78.
 90. Joller N, Anderson AC, Kuchroo VK. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. *Immunity.* 13 févr 2024;57(2):206-22.

91. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DAA. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *European Journal of Immunology*. 2002;32(8):2255-63.
92. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*. déc 2005;6(12):1245-52.
93. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. janv 2009;10(1):48-57.
94. Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*. mars 2010;12(3):292-300.
95. Schneider CA, Figueroa Velez DX, Azevedo R, Hoover EM, Tran CJ, Lo C, et al. Imaging the dynamic recruitment of monocytes to the blood-brain barrier and specific brain regions during *Toxoplasma gondii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 déc 2019;116(49):24796-807.
96. Furtado JM, Ashander LM, Mohs K, Chipps TJ, Appukuttan B, Smith JR. *Toxoplasma gondii* migration within and infection of human retina. *PLoS One*. 2013;8(2):e54358.
97. McMenamin PG, Dutton GN, Hay J, Cameron S. The ultrastructural pathology of congenital murine toxoplasmic retinochoroiditis. Part I: The localization and morphology of *Toxoplasma* cysts in the retina. *Exp Eye Res*. oct 1986;43(4):529-43.
98. Sauer A, Pfaff AW, Villard O, Creuzot-Garcher C, Dalle F, Chiquet C, et al. Interleukin 17A as an Effective Target for Anti-inflammatory and Antiparasitic Treatment of Toxoplasmic Uveitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 15 oct 2012;206(8):1319-29.
99. De-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, et al. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. *PLoS Negl Trop Dis*. nov 2013;7(11):e2541.
100. Rochet E, Brunet J, Sabou M, Marcellin L, Bourcier T, Candolfi E, et al. Interleukin-6-driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. *Infect Immun*. mai 2015;83(5):2109-17.
101. Ke Y, Jiang G, Sun D, Kaplan HJ, Shao H. Retinal astrocytes respond to IL-17 differently than retinal pigment epithelial cells. *J Leukoc Biol*. déc 2009;86(6):1377-84.
102. Ferreira LB, Williams KA, Best G, Haydinger CD, Smith JR. Inflammatory cytokines as mediators of retinal endothelial barrier dysfunction in non-infectious uveitis. *Clin Transl Immunology*. 2023;12(12):e1479.
103. Hazim RA, Volland S, Yen A, Burgess BL, Williams DS. Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide. *Exp Eye Res*. févr 2019;179:18-24.
104. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. avr 2019;50(4):907-23.
105. Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell Mol Immunol*. mars 2023;20(3):217-51.

106. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*. 2010;40(7):1830-5.
107. Murillo-León M, Bastidas-Quintero AM, Endres NS, Schnepf D, Delgado-Betancourt E, Ohnemus A, et al. IFN- λ is protective against lethal oral *Toxoplasma gondii* infection. *bioRxiv*. 24 févr 2023;2023.02.24.529861.
108. Zanoni I, Granucci F, Broggi A. Interferon (IFN)- λ Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Front Immunol*. 2017;8:1661.
109. Ochiai E, Sa Q, Brogli M, Kudo T, Wang X, Dubey JP, et al. CXCL9 is important for recruiting immune T cells into the brain and inducing an accumulation of the T cells to the areas of tachyzoite proliferation to prevent reactivation of chronic cerebral infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Pathol*. févr 2015;185(2):314-24.
110. Bordi L, Lalle E, Caglioti C, Travaglini D, Lapa D, Marsella P, et al. Antagonistic antiviral activity between IFN-lambda and IFN-alpha against lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in vitro. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116816.
111. Peng S, Wang SB, Singh D, Zhao PYC, Davis K, Chen B, et al. Claudin-3 and claudin-19 partially restore native phenotype to ARPE-19 cells via effects on tight junctions and gene expression. *Experimental Eye Research*. oct 2016;151:179-89.
112. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology*. oct 2020;30(10):805-17.
113. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*. 25 août 2006;126(4):741-54.
114. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling. *Nat Med*. avr 1999;5(4):444-7.
115. Mazewski C, Perez RE, Fish EN, Platanius LC. Type I Interferon (IFN)-Regulated Activation of Canonical and Non-Canonical Signaling Pathways. *Front Immunol*. 2020;11:606456.
116. Ramírez-Flores CJ, Cruz-Mirón R, Lagunas-Cortés N, Mondragón-Castelán M, Mondragon-Gonzalez R, González-Pozos S, et al. *Toxoplasma gondii* excreted/secreted proteases disrupt intercellular junction proteins in epithelial cell monolayers to facilitate tachyzoites paracellular migration. *Cellular Microbiology*. 2021;23(3):e13283.
117. Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Aburatani H, Okazaki T, et al. T-Cell Suppression by Programmed Cell Death 1 Ligand 1 on Retinal Pigment Epithelium during Inflammatory Conditions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1 juin 2009;50(6):2862-70.
118. Ke Y, Sun D, Jiang G, Kaplan HJ, Shao H. PD-L1hi retinal pigment epithelium (RPE) cells elicited by inflammatory cytokines induce regulatory activity in uveitogenic T cells. *J Leukoc Biol*. déc 2010;88(6):1241-9.
119. Jimbu L, Mesaros O, Neaga A, Nanut AM, Tomuleasa C, Dima D, et al. The Potential Advantage of Targeting Both PD-L1/PD-L2/PD-1 and IL-10–IL-10R Pathways in Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceuticals (Basel)*. 29 oct 2021;14(11):1105.

120. D D, Km M, Gj F. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nature reviews Immunology*. avr 2020 ;20(4).
121. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer immunology research*. nov 2014;2(11):1023.
122. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 2 août 1990;346(6283):425-34.
123. Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, et al. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1 nov 2009;28(6):423-51.
124. Schmalen A, Lorenz L, Grosche A, Pauly D, Deeg CA, Hauck SM. Proteomic Phenotyping of Stimulated Müller Cells Uncovers Profound Pro-Inflammatory Signaling and Antigen-Presenting Capacity. *Front Pharmacol*. 2021;12:771571.

Communication scientifique réalisée au cours de la thèse :

Congrès	Lieu (Ville, Pays)	Dates	Communication orale	Conférence invitée	Poster
Congrès international de la Toxoplasmose 2022	Riverside, Californie, USA	22-26 mai	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Séminaire de microbiologie de Strasbourg SMS 2022	Strasbourg, France	23 mars 2022	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Bench and Bed Immunology BBI 2023	Strasbourg, France	1 février 2023	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Journée école doctorale ED days 2022	Strasbourg, France	21/22 avril	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Séminaire de microbiologie de Strasbourg SMS 2023	Strasbourg, France	23 mars 2023	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Journée école doctorale ED days 2023	Strasbourg, France	20/21 avril	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
SFI-DGfI joint meeting 2023	Strasbourg, France	26-29 septembre 2023	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Congrès international de la Toxoplasmose 2024	Berlin, Allemagne	26-30 mai 2024	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Séminaire de microbiologie de Strasbourg SMS 2024	Strasbourg	4 avril 2024	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>



L'immunoprivilège dans la toxoplasmose oculaire : Rôle des interférons de type I et III et de PD-L1 dans la dynamique de l'infection



Résumé en français :

La toxoplasmose oculaire (TO) est une uvéite infectieuse causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*. L'œil, et plus particulièrement la rétine, est un organe bénéficiant d'un immunoprivilège. Cette tolérance immunologique assure un contrôle étroit de la réponse immunitaire afin d'éviter une trop forte inflammation, et ainsi des dommages irréversibles. Cette tolérance est assurée par les barrières hémato-rétiniennes externes et internes, ainsi que par des facteurs cytokiniques et membranaires. Néanmoins, l'ensemble de ces dispositifs doivent être contrôlés de manière dynamique afin de pouvoir assurer la clairance d'un pathogène en cas d'infection, mais sans pour autant causer une inflammation exacerbée. « L'immunoprivilège versus le contrôle de l'infection » est donc un élément clef dans la physiopathologie de la TO. Néanmoins, les dynamiques d'expressions des marqueurs, ainsi que le rôle des différents médiateurs cytokiniques sur les barrières rétiniennes, restent encore à déterminer.

La thèse se divise en deux volets principaux : La première partie qui se focalise sur le rôle des interférons de type I et III sur la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe ainsi que sur le profil de sécrétion cytokinique de cellules rétiniennes humaines. Une seconde partie combinant une approche *in vitro* et *in vivo* dans laquelle nous avons étudié l'effet de l'infection par *T. gondii* sur l'expression de PD-L1, un ligand immunomodulateur contrôlant l'état d'activation des lymphocytes T.

Concernant la première partie : Nous avons pu observer que les souches virulentes induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires, alors qu'une souche non virulente n'induit aucune sécrétion cytokinique. Ensuite, nous avons pu montrer que les interférons (IFN- β , IFN- γ et IFN- λ 1) induisent une localisation significativement plus importante de ZO-1 au niveau des jonctions serrées, de manière STAT1 indépendant.

Dans la seconde partie : Nous avons décrit un mécanisme parasitaire protéase dépendant qui permet la déplétion de PD-L1. Nous avons également étudié le rôle central des cellules de Müller dans l'immunoprivilège rétinien à travers leurs expressions importantes de PD-L1. Finalement, nous avons mis en lumière le rôle des interférons de type I et III dans l'expression de PD-L1 dans la rétine.

Mots-clés : Toxoplasmose Oculaire ; Interférons ; Immunoprivilège ; Rétine ; PD-L1

Résumé en anglais :

Ocular toxoplasmosis (OT) is an infectious uveitis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. The eye, particularly the retina, benefits from an immune-privileged status. This immunological tolerance ensures tight control of the immune response to prevent excessive inflammation, which could lead to irreversible damage. This tolerance is maintained by the external and internal blood-retinal barriers, as well as cytokine and membrane factors. However, these mechanisms must be dynamically regulated to ensure the clearance of pathogens in case of infection, without triggering excessive inflammation. The balance between the "immune privilege versus infection control" is a key factor in the pathophysiology of OT. Nevertheless, the dynamics of marker expression and the role of various cytokine mediators on the retinal barriers are yet to be fully understood.

The thesis is divided into two main parts: The first part focuses on the role of type I and III interferons in the permeability of the external blood-retinal barrier and the cytokine secretion profile of human retinal cells. The second part combines an *in vitro* and *in vivo* approach, where we studied the effect of *T. gondii* infection on the expression of PD-L1, an immunomodulatory ligand that controls T lymphocyte activation.

In the first part: We observed that virulent strains induce the secretion of inflammatory cytokines, while a non-virulent strain does not trigger any cytokine secretion. We also demonstrated that interferons (IFN- β , IFN- γ , and IFN- λ 1) significantly increase the localization of ZO-1 at tight junctions, independent of the STAT1 pathway.

In the second part: We described a protease-dependent parasitic mechanism that leads to the depletion of PD-L1. We also studied the central role of Müller cells in retinal immune privilege through their significant expression of PD-L1. Finally, we highlighted the role of type I and III interferons in the expression of PD-L1 in the retina

Keywords: Ocular toxoplasmosis; Interferons; Immune privilege; Retina; PD-L1